

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO DO OZÔNIO, EFEITO FUNGICIDA E NA
QUALIDADE DE CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**

JULIANA MARTINS DE OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2018**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO DO OZÔNIO, EFEITO FUNGICIDA E NA
QUALIDADE DE CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**

JULIANA MARTINS DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: Dr. ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR

COORIENTADOR: Dr. LUIZ EDUARDO BASSAY BLUM

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2018**



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

**CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO DO OZÔNIO, EFEITO FUNGICIDA E NA
QUALIDADE DE CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**

JULIANA MARTINS DE OLIVEIRA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.**

APROVADO POR:

ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR, Dr. Professor Adjunto UnB – FAV (Orientador)

**LÍVIA DE LACERDA DE OLIVEIRA PINELI, Dra. Professora Associada UnB – FS
(Examinador Interno)**

**ELIANA DOS SANTOS LEANDRO, Dra. Professora Adjunta UnB – FS
(Examinador Externo)**

BRASÍLIA/DF, 28 DE FEVEREIRO DE 2018

FICHA CARTOGRÁFICA

Oliveira, Juliana Martins

Cinética de decomposição do ozônio, efeito fungicida e na qualidade de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) / Juliana Martins de Oliveira; orientação de Ernandes Rodrigues de Alencar; coorientação de Luiz Eduardo Bassay Blum. – Brasília, 2018.

75 p.:il.

Dissertação de Mestrado (M) - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2018.

1. Ozonização. 2. Castanha-do-Brasil. 3. Efeito fungicida e na qualidade.

Ernandes, R. A. Ph.D

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

OLIVEIRA, J. M. **Cinética de decomposição do ozônio, efeito fungicida e na qualidade de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018, 75p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

AUTOR: Juliana Martins de Oliveira

TÍTULO: Cinética de decomposição do ozônio, efeito fungicida e na qualidade de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)

GRAU: Mestre

ANO: 2018

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

Nome: Juliana Martins de Oliveira
E-mail: moliveira.juliana@gmail.com

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Nauza Martins, que é a pessoa mais forte, batalhadora, corajosa e inteligente que conheço, e me inspira todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Nauza, minha tia Maura, meus irmãos Carol e Vinícius e toda minha família que me apoiou em todas as etapas dessa caminhada e estiveram ao meu lado dividindo conquistas e realizações.

Ao professor Dr. Ernandes Rodrigues de Alencar, pelas oportunidades, incentivo, dedicação, paciência e conhecimento compartilhado.

Ao professor Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum, pela ajuda e apoio oferecidos.

À Emayre, por estar ao meu lado todos os dias me apoiando, incentivando e ajudando de todas as formas possíveis.

Aos companheiros de laboratório: Wallas, Márcio, Jaqueline e Éder, pela constante ajuda e ensinamentos.

Aos melhores amigos do mundo: Ana, Bárbara, Caio, Carol, Dani, Matheus e Rafael, que estiveram ao meu lado em todos os momentos, bons e ruins, sempre me apoiando e incentivando com muitas risadas e alegria.

Aos que ajudaram na realização deste trabalho, estudantes de graduação, pós-graduação, estagiários e orientandos do professor Ernandes.

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.

Muito obrigada!

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
RESUMO GERAL	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO I	18
RESUMO.....	19
ABSTRACT	20
INTRODUÇÃO	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO II	34
RESUMO.....	35
ABSTRACT	36
INTRODUÇÃO	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
RESULTADOS.....	45
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de formação do gás ozônio a partir de moléculas de oxigênio.....	8
Figura 2: Simulação computacional da degradação de membrana bacteriana.....	9
Figura 3. Limites de toxicidade do gás ozônio em diferentes concentrações e períodos de exposição.....	11

CAPÍTULO I

Figura 1. Esquema da ozonização de castanha-do-Brasil e quantificação da concentração residual do gás.....	23
Figura 2. Concentração residual do ozônio durante o processo de saturação de meio poroso contendo castanha-do-Brasil com 4,4% (b.u.) de umidade, em função do período de exposição, para diferentes concentrações iniciais do gás.....	26
Figura 3. Tempo (T_{Sat}) e concentração (C_{Sat}) de saturação do ozônio em meio poroso contendo castanha-do-Brasil com 4,4% (b.u.) de umidade em função da concentração inicial do gás.....	28
Figura 4. Curvas de regressão do modelo cinético de primeira ordem ajustado aos dados de concentração residual do ozônio em função do período de decomposição, para diferentes concentrações iniciais do gás.....	30

CAPÍTULO II

Figura 1. Contagem de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> (log UFC g ⁻¹) em castanhas-do-Brasil ozonizadas nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L ⁻¹ por até 240 min.....	45
Figura 2. Aspectos morfológicos, obtidos por microscopia óptica com objetiva de 40x, de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> coletado em castanhas-do-Brasil antes (A) e depois (B) da exposição ao gás ozônio, na concentração de 13,24 mg L ⁻¹ , por 240 min.....	46

Figura 3. Colônias de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> na superfície de castanhas-do-Brasil antes (A) e depois (B) da exposição ao gás ozônio, na concentração de 13,24 mg L ⁻¹ , por 240 min.....	47
Figura 4. Umidade (%) de castanhas-do-Brasil ozonizadas nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L ⁻¹ por até 240 min.....	47
Figura 5. Tonalidade (h), saturação (C) e diferença de cor (ΔE) em castanhas-do-Brasil ozonizadas por até 240 min.....	49
Figura 6. Diferença de cor (ΔE) de castanhas-do-Brasil ozonizadas nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L ⁻¹	50
Figura 7. Cromatogramas do perfil lipídico do óleo bruto obtido de castanhas-do-Brasil não ozonizadas (A) e ozonizadas (B) na concentração de 13,24 mg L ⁻¹ , por 240 min.....	51

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Modelos de cinética de decomposição e respectivas equações integradas e linearizadas e respectivas meias-vidas.....25

Tabela 2. Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R^2) para concentração residual do ozônio (mg L^{-1}) durante o processo de saturação de meio poroso contendo castanha-do-Brasil com 4,4% (b.u.) de umidade, em função do período de exposição, para diferentes concentrações iniciais do gás.....27

Tabela 3. Equações de regressão dos modelos cinéticos de decomposição ajustados aos dados de concentração residual do ozônio em meio de meio poroso contendo castanha-do-Brasil com 4,4% (b.u.) de umidade, em função do período de decomposição.....29

CAPÍTULO II

Tabela 1. Equações de regressão e respectivos coeficientes de determinação de contagem de *Aspergillus* seção *Flavi* ($\log \text{UFC g}^{-1}$) em castanhas-do-Brasil ozonizadas nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L^{-1} por até 240 min.....46

Tabela 2. Equações de regressão e respectivos coeficientes de determinação de umidade (%) de castanhas-do-Brasil ozonizadas nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L^{-1} por até 240 min.....48

RESUMO GERAL

A castanha-do-Brasil se destaca pela sua constituição nutricional, porém também é excelente substrato de fungos, especialmente aqueles capazes de sintetizar aflatoxinas, principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Uma técnica que vem sendo proposta no controle de fungos é a ozonização. Esse gás se destaca pelo seu elevado potencial oxidativo e por sua rápida decomposição em composto não tóxico, o oxigênio. Esse processo de decomposição é acelerado quando em contato com material orgânico. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho avaliar a cinética de decomposição do gás ozônio em meio poroso contendo castanha-do-Brasil, o efeito fungicida e possíveis alterações na qualidade do produto. Realizou-se o estudo em duas etapas. Na primeira etapa, avaliou-se a cinética de decomposição do ozônio em meio poroso contendo castanha-do-Brasil. Na segunda etapa, analisou-se o efeito fungicida do ozônio e a qualidade do produto ozonizado. Para avaliar a cinética de decomposição do ozônio, amostras de 1 kg de castanha-do-Brasil, com umidade em torno de 4,4% b.u., foram expostas as concentrações de 2,42 mg L⁻¹, 4,38 mg L⁻¹, 8,88 mg L⁻¹ e 13,24 mg L⁻¹ e vazão de 3,0 L min⁻¹, na temperatura de 25 °C. Determinaram-se o tempo e a concentração de saturação, para cada concentração inicial do gás. Os modelos cinéticos de ordem zero, primeira e segunda ordem foram ajustados aos dados de concentração de ozônio em função do tempo decomposição. Na avaliação do efeito do ozônio na inativação de fungos, as castanhas-do-Brasil foram inoculadas com *Aspergillus* Seção *Flavi* e posteriormente submetidas à ozonização nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L⁻¹, por períodos de 0, 60 120, 180 e 240 min, vazão de 3,0 L min⁻¹, na temperatura de 25 °C. Para avaliar o efeito na qualidade do produto, amostras sem inoculação foram ozonizadas, avaliaram-se a umidade, a coloração, o teor de ácidos graxos livres, o índice de peróxido e o índice de acidez do óleo bruto, além do perfil lipídico. No que se refere a cinética de decomposição, observou-se redução linear do tempo de saturação, enquanto que a concentração de saturação aumentou linearmente no meio poroso à medida que se elevou a concentração inicial do gás. Verificou-se que o modelo cinético de primeira ordem foi o que apresentou melhor ajuste aos dados de concentração residual do ozônio durante o processo de decomposição. Quanto ao efeito do ozônio sobre *Aspergillus* Seção *Flavi*, em concentração de 8,88 mg L⁻¹, por 240 min, o gás foi capaz de provocar redução

superior a 3,10 ciclos log na contagem dos microrganismos. Evidenciou-se alteração na estrutura dos microrganismos e na coloração das colônias. Houve alteração na tonalidade e na diferença de cor à medida que se elevou o período de ozonização. A ozonização não alterou a qualidade de óleo das castanhas-do-Brasil, assim como o perfil lipídico. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que: a concentração inicial do ozônio influencia linearmente o tempo e a concentração de saturação; o modelo cinético de primeira ordem é o mais adequado para o processo de decomposição do ozônio em meio poroso contendo castanha-do-Brasil, sendo meia vida equivalente a 4,20 min; o ozônio é eficiente na inativação de espécies de *Aspergillus* seção *Flavi* em castanha-do-Brasil; e nas condições adotadas no presente estudo, o ozônio não afeta a qualidade do produto, sobretudo no que se refere ao óleo bruto, inclusive o perfil lipídico.

Palavras-chave: *Ozonização; Tempo de saturação; Tempo de meia-vida; Aspergillus Seção Flavi; Alterações qualitativas; Perfil lipídico.*

ABSTRACT

Brazil nuts stand out for their nutritional constitution, but are also excellent substrates for fungi, especially those capable of synthesizing aflatoxins, mainly by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. One technique that has been proposed in the control of fungi is ozonation. This gas is notable for its high oxidative potential and for its rapid decomposition into a non-toxic compound, oxygen. This process of decomposition is accelerated when in contact with organic material. Thus, the objective of this work was to evaluate the decomposition kinetics of the ozone gas in porous medium containing Brazil nuts, fungicidal effect and possible changes in product quality. The study was carried out in two stages. In the first stage, the ozone decomposition kinetics were evaluated in porous medium containing Brazil nuts. In the second stage, the fungicidal effect of ozone and the quality of the ozonated product were analyzed. To evaluate the kinetics of ozone decomposition, samples of 1 kg of Brazil nut, with humidity around 4.4% w.b., were exposed to concentrations of 2,42 mg L⁻¹, 4,38 mg L⁻¹, 8,88 mg L⁻¹ and 13,24 mg L⁻¹ and 3.0 L min⁻¹ flow at 25 ° C. The time and saturation concentration were determined for each initial concentration of the gas. The kinetic models of order zero, first and second order were adjusted to the ozone concentration data as a function of time decomposition. In the evaluation of the effect of ozone on fungal inactivation, Brazil nuts were inoculated with *Aspergillus section Flavi* and subsequently submitted to ozonation at concentrations of 2,42, 4,38, 8,88 and 13,24 mg L⁻¹, for periods of 0, 60, 120, 180 and 240 min, flow rate of 3.0 L min⁻¹, at a temperature of 25°C. To evaluate the effect on the quality of the product, non-inoculated samples were ozonated, humidity, color, free fatty acid content, peroxide index and crude acid acidity index, as well as lipid profile, were evaluated. Regarding the decomposition kinetics, a linear reduction of the saturation time was observed, while the saturation concentration increased linearly in the porous medium as the initial concentration of the gas was increased. It was verified that the first order kinetic model presented the best fit to the residual ozone concentration data during the decomposition process. As for the effect of ozone on *Aspergillus section Flavi*, in a concentration of 8,88 mg L⁻¹, for 240 min, the gas was able to cause reduction greater than 3,10 log cycles in the count of microorganisms. Changes in the structure of the microorganisms and in the coloration of the colonies were evidenced. There was a change in tonality and color difference as the period of

ozonation increased. The ozonation did not alter the oil quality of Brazil nuts, as well as the lipid profile. From the obtained results, it was concluded that: the initial ozone concentration linearly influences the time and saturation concentration; the first-order kinetic model is the most suitable for the ozone decomposition process in porous medium containing Brazil nuts, with half-life equivalent to 4,20 min; the ozone is efficient in the inactivation of *Aspergillus* section *Flavi* species in Brazil nut; and in the conditions adopted in the present study, ozone does not affect the quality of the product, especially with regard to crude oil, including the lipid profile.

Keywords: *Ozonation; Saturation time; Half-life time; Aspergillus Section Flavi; Qualitative changes; Lipid profile.*

INTRODUÇÃO GERAL

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é nativa da região amazônica e de grande importância para o Brasil, pois apresenta potencial para emprego em programas de reflorestamento madeireiro e renda para milhares de trabalhadores rurais e urbanos (COSTA et al., 2009; TONINI; ARCOVERDE, 2005).

A castanha-do-Brasil pode ser consumida tanto *in natura* ou como ingrediente de outros alimentos. Esse produto possui grande diversidade de subprodutos, inclusive extração de óleo (FREITAS et al., 2007). O grande mercado da castanha-do-Brasil é justificado pelo seu uso na indústria alimentícia, pode ser utilizado na produção de farinha desengordurada, panificação, confeitarias, mingaus, doces, suplementos proteicos, leites, bebidas dietéticas, sorvetes, entre outros (MARTINS et al., 2008).

A produção da castanha é feita, principalmente, em sistemas extrativistas, com um número reduzido de castanhais localizados na região norte do Brasil. O sistema de produção tradicional é familiar e sem muitos investimentos tecnológicos. Por causa do baixo nível tecnológico da cadeia produtiva, além das condições climáticas no período da colheita - o clima caracterizado por umidade relativa de 97% e entre 25 a 30°C – as castanhas ficam suscetíveis à contaminação, principalmente por fungos aflatoxigênicos (SOUZA et al., 2004). Essas substâncias são de elevada toxicidade, aguda e crônica, sendo o fígado o órgão mais afetado (ABDULKADAR et al., 2000).

Diante desse cenário, é fundamental o controle adequado durante todas as etapas da produção, com o intuito de evitar a contaminação das castanhas por aflatoxinas e atender os padrões para consumo e comercialização, inclusive para exportação. O ozônio vem sendo utilizado como uma alternativa para o controle de aflatoxinas em alimentos (ZORLUGENÇ et al., 2008; ALENCAR et al., 2012; CHEN et al., 2014). Ozônio pode ser alternativa no controle de aflatoxinas em alimentos, devido sua capacidade de inativar microrganismos e de degradar esse tipo de micotoxina. A capacidade do ozônio de inativar microrganismos é justificada pelo seu elevado potencial oxidativo, podendo ocorrer a oxidação de diversos constituintes da membrana e parede celular, tais como glicolipídios, glicoproteínas e aminoácidos, o que implica em alteração da permeabilidade celular e lise (KIM et al., 1999).

O gás poder ser gerado no local de aplicação, além de apresentar alta reatividade e não apresentar especificidade a um grupo de microrganismos e ter o oxigênio como produto final de sua decomposição, são algumas das vantagens do uso do ozônio no controle de micotoxinas (NOVAK e YUAN, 2007). Considerando-se que o ozônio é altamente reativo quando em contato com material orgânico, é necessário que seja feita a avaliação cinética de decomposição do gás em meio contendo produtos distintos de origem vegetal, determinando assim parâmetros como concentração e tempo de saturação, tempo de meia vida e possíveis alterações físicas e qualitativas do produto. Diante do exposto, objetivou-se avaliar a cinética de decomposição do gás ozônio, o efeito fungicida desse gás e possíveis alterações qualitativas na castanha-do-Brasil em decorrência do processo de ozonização.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Castanha-do-Brasil

Características gerais

A Castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), conhecida popularmente por “castanha-do-pará” ou “castanha-da-amazônia” é uma árvore que pertence à família Lecythidaceae e é presente em regiões de solos arenosos ou argilo-arenosos de todas as terras não inundáveis da floresta amazônica, incluindo estados como Acre, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Roraima, Rondônia e Tocantins, fora do Brasil também é presente em países como Bolívia, Colômbia, Peru e Venezuela (SALOMÃO, 2009). Essa espécie apresenta bom desenvolvimento em regiões de clima quente e úmido, as maiores densidades ocorrem em regiões com tipos climáticos tropicais chuvosos predominantes e com períodos de estiagem definidos (MULLER et al., 1995).

A castanheira-do-Brasil pode atingir uma altura que varia entre 45 e 50 m, diâmetro à altura do peito (DAP) entre 1 e 3 m, copa com diâmetro entre 20 e 35 cm, podendo atingir idade que varia entre 361 e 401 anos. Quando se encontram em condições naturais, a produção de fruto das árvores se inicia entre 73 e 93 anos e a produção máxima é de 240 anos de idade (SCHÖNGART et al., 2015).

A castanheira-do-Brasil apresenta copa cilíndrica e bom corte natural de galhos, essas características silviculturais geram a formação de fustes retilíneos, o que a torna desejável em plantios (SCOLES et al., 2011). A espécie, por ser rústica, apresenta elevada sobrevivência e crescimento rápido em plantios heterogêneos em áreas degradadas pela mineração (SALOMÃO et al., 2006).

Produção

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de castanha-do-Brasil, sendo o primeiro a Bolívia. A região norte é responsável por 98% da produção nacional (IBGE, 2016). De toda essa produção, apenas 1% é destinada ao mercado interno, os principais consumidores são Alemanha, Inglaterra e Estados Unidos (VIEIRA; REGITANO-D'ARCE, 1999).

No Brasil, o extrativismo da castanha-do-Brasil é caracterizado pela alta concentração em poucos estados. Segundo o IBGE (2016), a produção brasileira de castanha-do-Brasil no ano de 2012 foi de 38.805 toneladas, o Acre foi o estado com a maior participação com 36,3% da produção, seguido por Amazonas com 27%, Pará com 26,9%, Rondônia com 4,4%, Mato Grosso com 4%, Amapá com 1,1% e Roraima com 0,3%.

Valor Nutricional

O produto mais importante da *Bertholletia excelsa* é sua castanha que pode ser consumida tanto “in natura” ou misturada com outros alimentos. Essa matéria-prima possui grande diversidade de produtos e subprodutos, inclusive extração de óleo (FREITAS et al., 2007). O grande mercado desse produto é dado devido ao seu amplo uso na indústria alimentícia, pode ser usado na produção de farinha desengordurada, panificação, confeitarias, mingaus, bolos, biscoitos, doces, suplementos proteicos, leites, bebidas dietéticas, sorvetes, entre outros (MARTINS et al., 2008)

Considerada um alimento nutricionalmente rico, a castanha-do-Brasil é constituída principalmente por ácidos graxos insaturados e proteínas que apresentam alto valor biológico. A proteína da castanha é rica em todos os aminoácidos essenciais, principalmente cisteína e metionina (SOUZA; MENEZES, 2004). A composição química das castanhas apresenta abundância em lipídeos, proteínas, carboidratos e fibras. Além disso, apresenta altos valores de selênio (Se), ferro (Fe), magnésio (Mg) e manganês (Mn) que são interessantes no ponto de vista nutricional (CHUNHIEG et al., 2008).

Um dos destaques nutricionais da castanha é seu elevado percentual de selênio, que é um importante antioxidante e vem sendo vinculado a redução de alguns tipos de câncer e outras doenças (CHUNHIEG et al., 2008).

Micotoxinas

De acordo com Baker et al., (2007), micotoxina é um termo utilizado para designar as toxinas produzidas por fungos filamentosos, e são caracterizadas pelo seu baixo peso molecular e toxicidade em baixas concentrações. A invasão e infestação fúngica e produção de micotoxinas dependem de diversos fatores pré e pós-colheita (BILGRAMI; CHOUDHARY, 1998). Ciegler (1978) destacaram como fatores que afetam a síntese de micotoxinas, variação entre linhagens dos fungos, suscetibilidade genética do substrato, temperatura do ambiente, umidade da matéria prima, composição química da matéria prima, aeração e fatores de estresse. Dentre as diferentes toxinas produzidas por fungos, tem-se aflatoxinas fumonisinas, tricotecenos, zearalenona, ocratoxina A e patulina. As aflatoxinas, produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, são consideradas as mais tóxicas dentre as micotoxinas, destacando-se por serem hepatotóxicas, teratogênicas e mutagênicas (PINHEIRO, 2004).

Aflatoxinas e importância para Castanha-do-Brasil

As aflatoxinas são produzidas por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, sendo as principais Aflatoxina B (AFB1), Aflatoxina B2 (AFB2), Aflatoxina G1 (AFG1) e Aflatoxina G2 (AFG2) (FREIRE et al., 2007). As aflatoxinas são metabólitos secundários carcinogênicos, tóxicos e apresentam efeito deletério aos animais e ao ser humano, podendo causar distúrbios neurológicos, imunológicos e o desenvolvimento de câncer hepático (WANG, 2010). De acordo com Coulombe (1991), a AFB1 é um dos mais potentes hepatocarcinógenos naturais.

Apesar de se destacar por sua constituição nutricional, a castanha-do-Brasil, por ser um excelente substrato para fungos, está sujeita à contaminação por micotoxinas, principalmente aflatoxinas, que são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* seção *Flavi*, *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (PAYNE, 1998). Esta contaminação pode ocorrer nas diversas etapas do desenvolvimento da planta, colheita ou armazenamento (FREIRE et al., 2007).

De acordo com Payne (1998), *A. flavus* produz predominantemente AFB1 e AFB2, enquanto que *A. parasiticus* também sintetiza AFG1 e AFG2. Ainda de acordo

com esse autor, apesar de esses microrganismos serem capazes de sintetizar aflatoxinas em diferentes matérias-primas, a ocorrência dessas substâncias é mais comum em milho, amendoim, algodão e nozes. Essas espécies de fungos são frequentes durante o armazenamento, apesar de também serem capazes de colonizar grãos e sementes ainda no campo.

A castanha-do-Brasil é produzida, principalmente, em sistemas de base extrativista, com apenas um número reduzido de castanhais localizados nos estados da região norte do Brasil. O sistema de produção tradicional é basicamente focado em unidades familiares e não possui muitos investimentos tecnológicos. Por causa desse baixo nível tecnológico da cadeia produtiva, além das condições climáticas no período da colheita - o clima caracterizado por umidade relativa de 97% e temperaturas entre 25 a 30°C - a castanha fica suscetível à contaminação, principalmente por fungos produtores de aflatoxinas (SOUZA et al, 2004).

No período de 1998 a 2003, o Laboratório de Controle e Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA) do Laboratório Vegetal (LV) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA realizou análise para detectar aflatoxinas em 491 amostras de castanha-do-brasil, de acordo com os resultados, 236 (48,10%) estavam contaminadas (PINHEIRO, 2004). Estes problemas resultam em um forte entrave na comercialização do produto, principalmente no mercado externo, devido ao rigoroso controle de qualidade imposto pelos países europeus e Estados Unidos (ARRUS et al., 2005).

Diante do risco de saúde para o 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, 2001), enquanto que no Brasil, foi estabelecido limite de 10 ppb para quando o produto é direcionado para consumo direto (BRASIL, 2011).

Diante desse cenário, é fundamental a melhoria do manejo, coleta, beneficiamento, empacotamento e armazenamento das castanhas, tendo em vista que a manutenção do baixo nível de teor de umidade em todas as fases é fundamental para se obter um produto de boa qualidade, principalmente por se tratar de um produto de exportação. É de extrema importância estudos de tecnologias que possam contribuir para a prevenção e controle de aflatoxinas em alimentos, em especial na castanha-do-Brasil (PINHEIRO, 2004).

Embora os fungos possam infectar as culturas ainda no campo, na castanha-do-Brasil, as contaminações geralmente ocorrem primariamente em função de triagens e secagens inadequadas e/ou armazenamento impróprio, pois normalmente técnicas culturais adequadas são a solução para evitar a ocorrência de fungos antes da colheita (PINHEIRO, 2004). Para que sejam oferecidas aos consumidores com segurança, são necessárias intervenções na gestão de toda cadeia produtiva de castanha-do-brasil. O processamento e boas práticas nesta etapa constituem a melhor medida para evitar a contaminação e garantir a qualidade (FREITAS-SILVA; VENÂNCIO, 2011).

Como estratégia, também pode ser feita a remoção de castanhas visivelmente danificadas por insetos, ação essa que pode reduzir significativamente o nível de contaminação por aflatoxinas, apesar de que os fungos também podem estar presentes em castanhas sem danos (BAYMAN et al., 2002). Nas etapas do processamento, a seleção visual das castanhas assim como a classificação e demais procedimentos adotados no beneficiamento podem diminuir a contaminação (MARKLINDER et al., 2005).

Ozônio

Desde a descoberta das aflatoxinas em 1960, em decorrência do episódio denominado à época como Turkey X Disease, vários procedimentos têm sido propostos com intuito de minimizar a ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas (OGUZ et al., 2002). Uma das possibilidades é a inativação dos microrganismos, evitando, dessa forma, a síntese das aflatoxinas nos alimentos. Uma alternativa que vem sendo apresentada como efetiva na inativação dos microrganismos em alimentos é o gás ozônio. O gás ozônio tem eficácia

comprovada na inibição ou retardamento do desenvolvimento de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium* e *Mucor*, dentre outros, em produtos agrícolas (WU et al., 2006; ALENCAR et al., 2012), além de outros microrganismos como vírus e bactérias (ÖZTEKIN et al., 2006).

O gás ozônio (O_3), ou oxigênio triatômico, é uma forma alotrópica do oxigênio, que pode ser produzida naturalmente como resultado de relâmpagos ou radiação ultravioleta ou de forma sintética pelo método de descarga por efeito corona (KIM et al., 1999). Na geração do ozônio, segundo Novak e Yuan (2007), moléculas de oxigênio (O_2) quando expostas a descarga elétrica são dissociadas, produzindo radicais livres altamente reativos. Esses radicais livres reagem com outras moléculas de oxigênio, formando o O_3 , conforme mostrado na Figura 1.

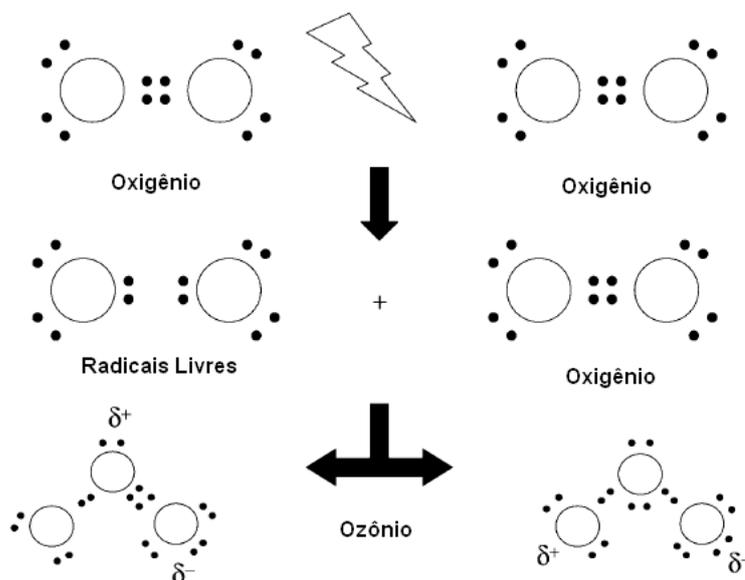


Figura 1 - Mecanismo de formação do gás ozônio a partir de moléculas de oxigênio. Fonte: NOVAK; YUAN (2007).

De acordo com Novak e Yuan (2007), o ozônio foi descoberto por Schonbein em 1840. Em 1988, foi emitida patente por Fewson nos Estados Unidos, para utilização do ozônio na remoção de odores provenientes de esgotos. Desde então, o ozônio tem sido utilizado no tratamento de água, na sanitização de equipamento da indústria de alimentos, degradação de pesticida, como método de conservação de alimento e no controle de insetos-praga de grãos armazenados (HSIEH et al., 1998; MENDEZ et al., 2003; PEREIRA et al., 2008; SOUSA et al., 2008). Dentre as características desse gás, podem ser destacadas o fato que esse gás é altamente

reativo; é necessário que seja gerado no próprio local de aplicação; tem como produto final de sua decomposição o oxigênio; é agente oxidante eficaz contra uma variedade de microrganismos.

A diferença do ozônio em relação a outros sanificantes é o seu mecanismo de destruição dos microrganismos. O cloro, por exemplo, possui um mecanismo de ação onde ele atravessa a membrana celular, agindo sobre os elementos vitais (enzimas, proteínas, DNA e RNA) no interior da célula. Já o ozônio degrada primariamente a estrutura da membrana (Figura 2), inativando os microrganismos em menor tempo de contato e inviabilizando sua recuperação, o mecanismo de destruição é o mesmo para bactérias, fungos e outros microrganismos (KIM et al., 1999). Ainda de acordo com esses autores, o ozônio interage com constituinte da membrana e paredes celulares, oxidando glicolipídios, glicoproteínas e aminoácidos, alterando, dessa forma, a permeabilidade celular e causando sua rápida lise.

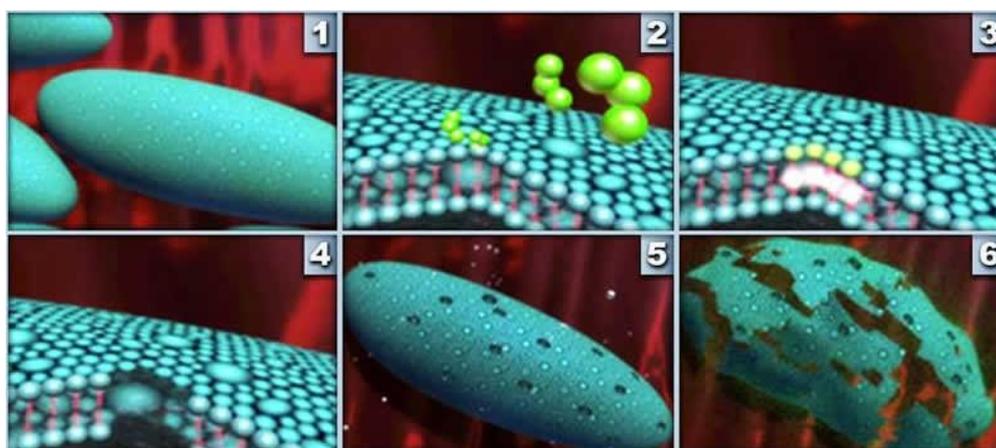


Figura 2: Simulação computacional da degradação de membrana bacteriana.

1. Bactéria em condição original;
2. Membrana da bactéria sendo atacada pelo ozônio;
3. Oxidação da membrana da bactéria;
- 4 a 6. Ruptura e destruição da bactéria

Fonte: SNATURAL (2016).

Outro aspecto que deve ser mencionado é que o ozônio possui largo espectro antimicrobiano, possuindo capacidade de inativar bactérias gram-negativas e gram-positivas, células vegetativas e esporos, vírus em concentrações relativamente baixas e em reduzido tempo de contato (KIM et al, 1999). Estudos comprovam que o

caráter fortemente oxidante e não seletivo do ozônio lhe confere expressiva eficácia contra diferentes grupos de microrganismos.

Diante do exposto, tem-se que o ozônio pode ser utilizado na inativação espécies aflatoxigênicas, evitando a contaminação dos alimentos por aflatoxinas. Destaca-se que esse gás ainda é capaz de degradar micotoxinas. Encontram-se na literatura relatos que o gás ozônio é indicado como agente capaz de degradar as aflatoxinas, fumonisina, ochratoxina, patulina, deoxinivalenol e zearalenona (MCKENZIE et al., 1997; YOUNG et al., 2006; ALENCAR et al., 2012). Ressalta-se ainda que o ozônio não altera a composição nutricional dos cereais e que não são formados metabólitos prejudiciais à saúde humana e animal (KIM et al., 2003; MENDEZ et al., 2003; YOUNG et al., 2006).

Segurança ocupacional durante a ozonização

O uso de um sistema seguro é de importância primária para aplicação do ozônio na indústria de alimentos. Para que a aplicação da ozonização seja segura para os trabalhadores, faz-se necessária a utilização de sistemas de detecção e destruição do gás ozônio residual. O detector do ozônio no ambiente de trabalho deve ser capaz de medir a concentração do gás na faixa entre 0,01 a 100 ppm, enquanto que o destruidor, que pode ser térmico ou catalítico, deve acelerar o processo de degradação do gás (DAMEZ et al., 1991; KHADRE et al., 2001).

De acordo com Stockinger citado por Kim et al. (2003), pequenas concentrações do ozônio no ar (0,3 ppm) podem causar desconforto em pessoas suscetíveis. O trato respiratório é o principal local de ação do gás, no que se refere à toxicidade, podendo causar congestão pulmonar, além de sintomas como irritação e secura no nariz, na garganta e nos olhos, além de dor de cabeça. Entretanto, segundo WHO (2000), a toxicidade elevada ocorre quando se tem exposição contínua, elevada concentração do gás e maior período de exposição. Os limites de toxicidade do ozônio em diferentes concentrações e períodos de exposição são apresentados na Figura 3.

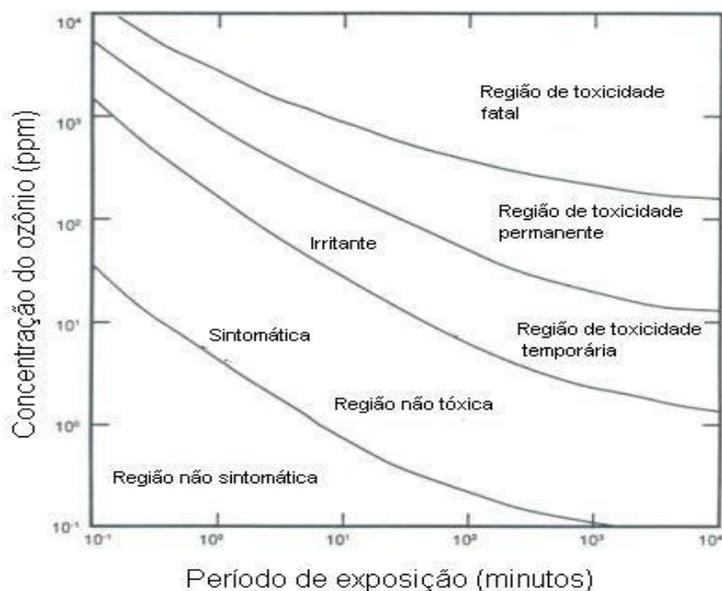


Figura 3. Limites de toxicidade do gás ozônio em diferentes concentrações e períodos de exposição.

Fonte: O3 Company (2016).

Existem em diversos países regulamentações que tratam dos níveis aceitáveis de concentração do gás e período de exposição, tendo em vista a segurança e saúde ocupacional dos trabalhadores. Nos Estados Unidos o limite de concentração do gás é de 0,1 ppm por até 8 h por dia (CFR, 2011). Na Europa, o limite estabelecido para exposição de indivíduos ao gás ozônio é de 120 $\mu\text{g m}^{-3}$, por até 8 h (WHO, 2000). No Brasil, por meio da Norma Regulamentadora Nº 15, Portaria Nº 3.214/78, foi estabelecido limite de exposição de trabalhadores ao ozônio de 0,08 ppm ou 0,16 mg m^{-3} , para jornada semanal de trabalho de até 48 h, sendo máximo o grau de insalubridade a ser considerado (BRASIL, 1978).

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a cinética de decomposição do gás ozônio em meio poroso contendo castanha-do-Brasil, o efeito fungicida e possíveis alterações na qualidade do produto. As informações obtidas foram sistematizadas em dois capítulos. O Capítulo 1 refere-se à cinética de decomposição do gás ozônio em meio poroso contendo castanha-do-Brasil, observando-se o efeito de diferentes concentrações do gás. No Capítulo 2, estudou-se o efeito do gás ozônio como agente fungicida e o efeito da aplicação do gás ozônio na qualidade da castanha-do-Brasil e do óleo bruto extraído do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULKADAR, A.H.W.; AL-ALI, A., AL-JEDAH, J. Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. **Food Control**, v.11, n.2, p.157-160, 2000.

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, p.899-905, 2012.

ARRUS, K.; BLANK, G.; ABRANSON, D.; CLEAR, R.; HOLLEY, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v.41, n.5, p.513-527, 2005.

BAKER, S.E.; BENNETT, J.W. An overview of the genus *Aspergillus*. **The Aspergilli: Genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods**, p.3-13, 2007.

BAYMAN, P.; BAKER, J.L.; MAHONEY, N.E. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. **Mycopathologia**, Den Haag, v.155, n.3, p.161–169, 2002.

BILGRAMI, K.S.; CHOUDHARY, A.K. Mycotoxins in preharvest contamination of agricultural crops. In: SINHA, K.L.; Bhatnagar, D. (Ed.) **Mycotoxins in agriculture and food safety**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998, p.1-43.

BRASIL. Ministério do Trabalho e do Emprego. **NR 15 - Atividades e Operações Insalubres, Portaria GM n.º 3.214, de 08 de junho de 1978**, Diário Oficial da União. 06.07.1978, Brasília, DF.

BRASIL. **Resolução De Diretoria Colegiada – RDC Nº 07**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966. Acesso em: 15.02.18.

CHEN, R.; MA, F.; LI, P.W.; ZHANG, W.; DING, X.X.; ZHANG, Q.; LI, M.; WANG, Y.R.; XU, B.C. Effect of ozone on aflatoxins detoxification and nutritional quality of peanuts. **Food chemistry**, v.146, p.284-288, 2014.

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.

CIEGLER, A. Fungi that produce mycotoxins: conditions and occurrence. **Mycopathology**, v.65, n.1-3, p.5-11, 1978.

COSLOVSKY, S.V. Economic development without pre-requisites: How Bolivian producers met strict food safety standards and dominated the global Brazil-nut market. **World Development**, v.54, p.32-45, 2014.

COSTA, J.R.; CASTRO, A.B.C.; WANDELLI, E.V.; CORAL, S.C.T.; SOUZA, S.A.G. Aspectos silviculturais da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) em sistemas agroflorestais na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 9, n.4, p.843-850, 2009.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. (Eds.). **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.103-144.

CFR Code of Federal Regulations. **Air contaminants**. Title 29, part 1910. Washington, D.C.: Office of Federal Register, 2011.

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**. Chelsea, Mich., U.S.A.: Lewis Publishers, p.469-490, 1991.

EUROPEAN UNION. Commission Regulation (EC) n° 165/10 of 26, February 2010. Amending Regulation (EC) no 1881/06 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. **Official Journal of the European Communities**, United Kingdom, L. 50, p. 8-12, 2010.

FDA. **FDA Mycotoxin Regulatory Guidance: A Guide for Grain Elevators, Feed Manufacturers, Grain Processors and Exporters**. Aug. 2011. Available at: <https://www.ngfa.org/wp-content/uploads/NGFAComplianceGuide-FDARegulatoryGuidanceforMycotoxins8-2011.pdf>. Accessed: 15.02.18.

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**, p. 49, 2007.

FREITAS, S.P.; FREITAS-SILVA, O.; 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.

FREITAS-SILVA, O.; VENÂNCIO, A. Brazil nuts: benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. **Food Research International**, v.44, n.5, p.1434-1440, 2011.

HSIEH, S.P.Y.; NINQ, S.S.; TZENG, D.D.S. Control of turf grass seedborne pathogenic fungi by ozone. **Plant Pathology Bulletin**, v.7, p.105-112, 1998.

IBGE. Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. **Produção extrativa vegetal (anos 1990 a 2006) - Quantidade produzida na extração vegetal por tipo de produto extrativo**. Disponível em: <[http:// www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br) >. Acesso em: 31 out. 2016.

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., 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, 1999.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; KHADRE, M.A. Ozone and its current and future application in the food industry. In: TAYLOR, S.L. (Ed.) **Advances in Food and Nutrition Research**. New York: Academic Press, v.45, p.167-218, 2003.

MARKLINDER, I.; LINDBLAD, M.; GIDLUND, A.; OLSEN, M. Consumers' ability to discriminate aflatoxin contaminated Brazil nuts. **Food Additives & Contaminants**, v.22, n.1, p.56-64, 2005.

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., 2008, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco: UFAC, p.14, 2008.

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, p.807–820, 1997.

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.

MULLER, C.H.; FIQUEIREDO, F.J.C.; KATO, A.K.; CARVALHO, J.E.U.; STEIN, R.L.B.; SILVA, A.B. Castanha-do-Brasil. Brasília: Embrapa-SPI (Coleção plantar), p.65, 1995.

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.

O3 COMPANY. The power of ozone. Toxicity of ozone to humans. Disponível em: <http://www.o3co.com/aboutozone_safety.php>. Acesso em: 31 out. 2016.

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.

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.

PAYNE, G.A. Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. In: SINHA, K.L.; Bhatnagar, D. (Ed.) **Mycotoxins in agriculture and food safety**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998, p. 279-306.

PEREIRA, A.M.; FARONI, L.R.D.; SOUSA, A.H.; URRUCHI, W.I.; PAES, J.L. Influência da temperatura da massa de grãos sobre a toxicidade do ozônio a *Tribolium castaneum*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, p.493-497, 2008.

PINHEIRO, M. Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* como base para o desenvolvimento de PCR multiplex para a detecção de fungos produtores de aflotoxinas em castanha-do-brasil e castanha-de-caju. **Brasília, Brasil: Universidade Católica de Brasília**, 2004.

SALOMÃO, R.P. Densidade, estrutura e distribuição espacial da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. & B.) em dois platôs de floresta ombrófila densa na Amazônia setentrional. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v.4, n.1, p.11-25, 2009.

SALOMÃO, R. P.; ROSA, N. A.; CASTILHO, A.; MORAIS, K. A. C. Castanheira-do-brasil recuperando áreas degradadas e provendo alimento e renda para comunidades da Amazônia Setentrional. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v.1, n.2, p.65-78, 2006.

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.

SCOLES, R.; GRIBEL, R.; KLEIN, G.N. Crescimento e sobrevivência de castanheira (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) em diferentes condições ambientais na região do rio Trombetas, Oriximiná, Pará. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v.6, n.3, p.273-293, 2011.

SNATURAL LTDA. Simulação computacional da degradação de membrana bacteriana. Disponível em: <<http://www.snatural.com.br/Tratamento-Agua-Ozonio.html>>. Acesso em: 31 out. 2016.

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.; CARTAXO, C.B.C.; LEITE, F.M.N. Manual de segurança e qualidade para a cultura da castanha-do-brasil. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 61, 2004.

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**, Campinas, v.24, n.1, p.120-128, 2004.

TONINI, H.; ARCO-VERDE, M.F.; SÁ, S.P.P. Dendrometria de espécies nativas em plantios homogêneos no estado de Roraima - andiroba (*Carapa guianensis* Aubl), castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), ipê-roxo (*Tabebuia avellaneda* Lorentz ex Griseb) e jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). **Acta Amazonica**, v.35, n.3, p.353-362, 2005.

VIEIRA, T.M.F.S.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Antioxidant concentration effect on stability of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) crude oil. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. v.49, n.3, p.271-274, 1999.

WANG, S.; LIU, H.; LIN, J.; CAO, Y. Can ozone fumigation effectively reduce aflatoxin B 1 and other mycotoxins contamination on stored grain?. **Julius-Kühn-Archiv**, n.425, p.582, 2010.

WHO World Health Organization. **Air Quality Guidelines for Europe**. WHO Regional Publications, European Series, Nº 91, Second Edition, 2000. 273p.

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.

YOUNG, J.C.; ZHU, H.; ZHOU, T. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.417-424, 2006.

ZORLUGENÇ, B.; ZORLUGENÇ, F.K.; ÖZTEKIN, S.; EVLIYA, I.B. The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B1 in dried figs. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.12, p.3593-3597, 2008.

CAPÍTULO I

CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO DO OZÔNIO EM MEIO POROSO CONTENDO CASTANHA-DO-BRASIL

CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO DO OZÔNIO EM MEIO POROSO CONTENDO CASTANHA-DO-BRASIL

RESUMO

A castanha-do-Brasil é extremamente suscetível a contaminação por aflatoxinas, sintetizadas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Uma alternativa que vem sendo estudada no controle desses microrganismos é o ozônio, que é um composto altamente reativo, sobretudo em contato com material orgânico. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho avaliar a cinética de decomposição do gás ozônio em meio poroso contendo castanha-do-Brasil. Foram utilizadas amostras de castanha-do-Brasil com umidade em torno de 4,4% b.u. Para avaliar a cinética de decomposição do ozônio, amostras de 1 kg de castanhas-do-Brasil foram expostas as concentrações de 2,42 mg L⁻¹, 4,38 mg L⁻¹, 8,88 mg L⁻¹ e 13,24 mg L⁻¹ e vazão de 3,0 L min⁻¹, na temperatura de 25 °C. Determinaram-se o tempo e a concentração de saturação, para cada concentração inicial do gás. Os modelos cinéticos de ordem zero, primeira e segunda ordem foram ajustados aos dados de concentração de ozônio em função do tempo decomposição. Observou-se redução linear do tempo de saturação, enquanto que a concentração de saturação aumentou linearmente no meio poroso à medida que se elevou a concentração inicial do gás. Verificou-se que o modelo cinético de primeira ordem foi o que apresentou melhor ajuste aos dados de concentração residual do ozônio durante o processo de decomposição. Concluiu-se que a concentração inicial do ozônio influencia linearmente o tempo e a concentração de saturação. O modelo cinético de primeira ordem é o mais adequado para o processo de decomposição do ozônio em meio poroso contendo castanha-do-Brasil, sendo meia vida equivalente a 4,20 min.

Palavras-chave: *Ozonização; Cinética de decomposição; Tempo de saturação; Tempo de meia-vida.*

KINETICS OF DECOMPOSITION OF OZONE IN POROUS MEDIUM CONTAINING BRAZIL NUTS

ABSTRACT

The Brazil nuts are extremely susceptible to aflatoxin contamination, synthesized mainly by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. An alternative that has been studied in the control of these microorganisms in foods is ozone, which is a highly reactive compound mainly in contact with organic material. The objective of this work was to evaluate the decomposition kinetics of the ozone gas in a porous medium containing Brazil nuts. Samples of Brazil nuts with water content of 4.4% w.b. were used. In order to evaluate the kinetics of ozone decomposition, samples of 1 kg of Brazilian nuts were exposed to concentrations of 2.42 mg L⁻¹, 4.38 mg L⁻¹, 8.88 mg L⁻¹ and 13.24 mg L⁻¹ and a 3.0 L min⁻¹ flow at 25 ° C. The time and saturation concentration were determined for each initial concentration of the gas. The kinetic models of order zero, first and second order were adjusted to the ozone concentration data in function of time of decomposition. A linear reduction of the saturation time was observed, while the saturation concentration increased linearly in the porous medium as the initial gas concentration was increased. It was verified that the first order kinetic model presented the best fit to the residual ozone concentration data during the decomposition process. It was concluded that the initial ozone concentration linearly influences the time and saturation concentration. The first-order kinetic model is the most suitable for the decomposition process of ozone in porous medium containing Brazil nuts, with half-life equivalent to 4.20 min.

Keywords: *Ozonation; Decomposition kinetics; Saturation time; Half-life time.*

INTRODUÇÃO

A castanha-do-Brasil é produzida, principalmente, em sistema extrativista, com número reduzido de castanhais localizados nos estados da região norte do Brasil. O sistema de produção tradicional é familiar e sem muitos investimentos tecnológicos. Por causa do baixo nível tecnológico da cadeia produtiva e condições climáticas no período da colheita, com clima no local de produção com umidade relativa de 90% e entre 25 a 30°C, as castanhas se caracterizam por serem suscetíveis à contaminação, principalmente por fungos produtores de aflatoxinas (SOUZA et al, 2004).

Uma alternativa que vem sendo apresentada para controle de microrganismos em alimentos, inclusive daqueles que são capazes de produzir as aflatoxinas, é o gás ozônio. O gás ozônio tem capacidade comprovada de inibir ou retardar o desenvolvimento de fungos (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium* e *Mucor*), em produtos agrícolas (WU et al., 2006; ALENCAR et al., 2012), além de outros microrganismos como vírus e bactérias (ÖZTEKIN et al., 2006).

O gás ozônio (O₃), ou oxigênio triatômico, é uma forma alotrópica do oxigênio, que pode ser gerado de forma sintética pelo método de descarga por efeito corona (KIM et al., 1999). Durante a geração do O₃, moléculas de oxigênio (O₂) são dissociadas, produzindo radicais livres altamente reativos, que reagem com outras moléculas de O₂, formando o O₃ (NOVAK; YUAN, 2007). Conforme esses autores, o O₃ se destaca por ser altamente reativo e na forma gasosa (20°C), pode apresentar meia vida inferior a 20 min, sendo o O₂ o produto de sua decomposição. O processo de decomposição pode ser acelerado quando a ozonização ocorre em meio contendo materiais orgânicos, tais como produtos vegetais, e depende de fatores tais como o tipo de material orgânico presente no meio, teor de umidade e temperatura (KIM et al., 1999; ALENCAR et al., 2011; PAES et al., 2017).

A diferença entre o O₃ e outros sanificantes é o mecanismo de destruição dos microrganismos. O cloro possui um mecanismo de ação em que ele atravessa a membrana celular, agindo sobre os elementos vitais, tais como enzimas, proteínas, DNA e RNA. Por outro lado, o O₃ e os produtos de sua decomposição degradam primeiramente constituintes da membrana e da parede celular, inativando os microrganismos com menor tempo de contato e inviabilizando sua recuperação (KIM et al., 1999). A ação antimicrobiana do O₃ é decorrente da oxidação de constituintes,

tais como glicolipídios, glicoproteínas e aminoácidos, alterando a permeabilidade celular e causando sua rápida lise, além de material nucléico, como timina e citosina (ISHIZAKI et al., 1981; KIM et al, 1999). Outra vantagem do O₃ é que este pode ser gerado no local de aplicação, não necessitando de recipientes para armazenamento como para outros produtos químicos, além de apresentar alta reatividade e não apresentar especificidade a um grupo de microrganismos e o produto final de sua decomposição é O₂ (NOVAK e YUAN, 2007).

Considerando-se que o O₃ é altamente reativo quando em contato com material orgânico, é necessário que seja feita a avaliação cinética de decomposição do gás em meio contendo os diferentes produtos de origem vegetal, determinando assim parâmetros como concentração, tempo de saturação e tempo de meia vida. Tais parâmetros são fundamentais para a implementação da ozonização pela indústria, tendo em vista a avaliação da viabilidade técnica e o dimensionamento do sistema (ALENCAR et al., 2011). Diante do exposto, objetivou-se avaliar a cinética de decomposição do gás ozônio em meio poroso contendo castanha-do-Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado lote de castanha-do-Brasil com teor de umidade de 4,4% (Safrá 2016/17), obtidas da Cooperativa dos Produtores Agropecuários da região Norte do Estado do Mato Grosso (Coopervia). Utilizaram-se amostras (1 kg) de castanha, acondicionadas em recipiente de vidro (3,0 L) de tampa rosqueável, dotadas de conexões para entrada e saída de gás. Depois que o O_3 passava pelo meio poroso contendo o produto, o gás era direcionado para o destruidor térmico (Figura 1). O gás O_3 foi obtido de um gerador de O_3 (Modelo 0&L 5.0 RM – Ozone & Life, São José dos Campos, SP) baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica. No processo de geração do O_3 , foi utilizado como insumo oxigênio (O_2) com grau de pureza de aproximadamente 90%, isento de umidade, obtido de concentrador de O_2 acoplado ao gerador de O_3 .

A concentração de O_3 foi determinada pelo método iodométrico, descrito por Clescerl et al. (2000), borbulhando-se o gás contendo ozônio em 50 mL de solução de iodeto de potássio (KI) 1 N, com produção de Iodo (I_2). Para garantir o deslocamento da reação para a produção de I_2 , a solução foi acidificada com 2,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 N, depois foi feita a titulação com tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) 0,01 N. Como indicador foi utilizada solução de amido à 1%.



Figura 1. Esquema da ozonização de castanha-do-Brasil e quantificação da concentração residual do gás.

Foram adotadas as concentrações do gás ozônio de $2,42 mg L^{-1}$, $4,38 mg L^{-1}$, $8,88 mg L^{-1}$ e $13,24 mg L^{-1}$ adotando-se vazão de $3,0 L min^{-1}$, na temperatura de $25 ^\circ C$. Inicialmente foi avaliado o processo de saturação do ozônio em meio poroso

contendo castanha-do-Brasil, quantificando-se a concentração residual, pelo método iodométrico, até que a mesma permanecesse constante.

Para relacionar concentração residual do gás ozônio com o tempo, foi ajustada equação sigmoidal aos dados obtidos (Equação 1):

$$C = \left[\frac{a}{1 + e^{-(t-b)/c}} \right] \quad \text{Equação 1}$$

em que

C = concentração do gás ozônio (mg L^{-1});

t = tempo (min);

a, b e c = são as constantes da equação.

A partir das constantes b e c, foi possível a obtenção do tempo de saturação para cada concentração do gás e, posteriormente, a concentração de saturação, conforme Venegas et al. (1998) (Equação 2):

$$t_{\text{Sat}} = b + 2c \quad \text{Equação 2}$$

em que, t_{Sat} = tempo de saturação (min).

A avaliação da cinética de decomposição do ozônio foi realizada depois da saturação do meio com o gás, conforme Santos et al., (2007). A concentração residual do gás foi quantificada, depois de intervalos de tempo sem injeção do gás durante os quais acontecia a decomposição do ozônio. Durante o período em que não eram realizadas quantificações do gás, o ozônio residual era direcionado para destruidor térmico a fim de garantir a segurança dos manipuladores.

Foram ajustados os modelos cinéticos de ordem zero, de primeira e de segunda ordens aos dados da concentração de ozônio em função do tempo (WRIGHT, 2004). Os modelos de cinética de decomposição e respectivas equações integradas e linearizadas e meias-vidas são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Modelos de cinética de decomposição e respectivas equações integradas e linearizadas e respectivas meias-vidas

Ordem	Equação Diferencial	Equação Integrada e Linearizada	Meia-vida
0	$\frac{dC}{dt} = -k$	$C = C_0 - kt$	$t_{1/2} = \frac{C_0}{2k}$
1	$\frac{dC}{dt} = -kC$	$\ln C = \ln C_0 - kt$	$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$
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).

O experimento foi realizado no Delineamento Inteiramente Casualizado, sendo quatro concentrações iniciais do gás (2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L⁻¹), com três repetições. Para a obtenção das equações de regressão e plotagem dos gráficos, foi utilizado o software SigmaPlot 10.0 (Systat, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apresentam-se na Figura 2 e Tabela 2 as curvas de regressão referentes ao processo de saturação de meio poroso contendo castanha-do-Brasil pelo ozônio nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L⁻¹, na vazão de 3,0 Lmin⁻¹ e temperatura de 25 °C, por 60 min. Verificou-se aumento da concentração do ozônio à medida que se elevou o período de ozonização para todas as concentrações iniciais do gás. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de que, inicialmente, o ozônio reage com sítios ativos na superfície do produto, ocorrendo rápida degradação do gás e eliminação dos sítios ativos (STRAIT, 1998; KELLS et al., 2001). Ainda de acordo com esses autores, depois da eliminação dos sítios ativos, a taxa de degradação do gás no meio poroso diminui, e, conseqüentemente a concentração no meio poroso tende a aumentar. A tendência observada em meio poroso contendo castanha-do-Brasil foi semelhante ao observado para outros produtos, tais como amendoim, arroz e farinha de trigo (ALENCAR et al., 2011; RAVI et al., 2015; PAES et a., 2017).

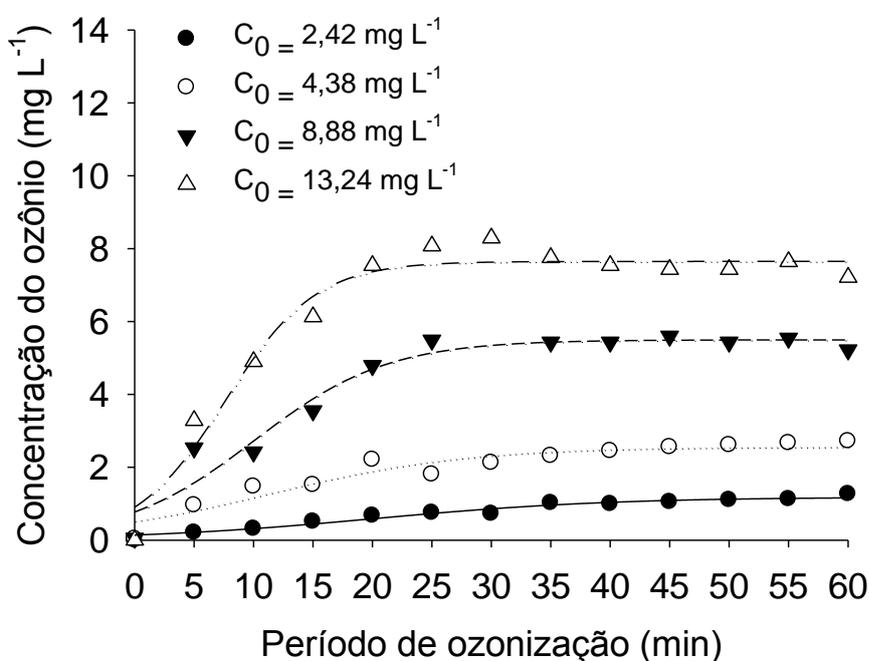


Figura 2. Concentração residual do ozônio durante o processo de saturação de meio poroso contendo castanha-do-Brasil com 4,4% (b.u.) de umidade, em função do período de exposição, para diferentes concentrações iniciais do gás.

Tabela 2. Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R^2) para concentração residual do ozônio (mg L^{-1}) durante o processo de saturação de meio poroso contendo castanha-do-Brasil com 4,4% (b.u.) de umidade, em função do período de exposição, para diferentes concentrações iniciais do gás

Concentração Inicial (mg L^{-1})	Equações ajustadas	R^2	EPE
2,42	$\hat{y} = \frac{1,183}{1+e^{-\left(\frac{x-20,127}{10,074}\right)}}$	0,96	0,0828
4,38	$\hat{y} = \frac{2,569}{1+e^{-\left(\frac{x-11,313}{8,284}\right)}}$	0,91	0,2560
8,88	$\hat{y} = \frac{5,497}{1+e^{-\left(\frac{x-10,120}{5,596}\right)}}$	0,95	0,4542
13,24	$\hat{y} = \frac{7,650}{1+e^{-\left(\frac{x-7,629}{3,801}\right)}}$	0,96	0,5201

EPE – Erro padrão da estimativa.

No que se refere aos valores de tempo de saturação, obtidos a partir das equações contidas na Tabela 2, observou-se redução linear à medida que se elevou a concentração inicial do gás (Figura 3). Para concentração inicial do ozônio de $2,42 \text{ mg L}^{-1}$, o tempo de saturação foi de 40,3 min, enquanto que para $13,24 \text{ mg L}^{-1}$, foi equivalente a 15,2 min. Quanto a concentração de saturação, houve aumento linear com a elevação da concentração inicial do gás. Aumento de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ implica no incremento da concentração de saturação no meio poroso contendo castanha-do-Brasil de aproximadamente $0,53 \text{ mg L}^{-1}$.

Salienta-se a importância de se conhecer a concentração do ozônio no meio poroso contendo castanha-do-Brasil, pois tal variável é fundamental para o estabelecimento de condições para o controle de microrganismos e degradação de aflatoxinas. As concentrações de saturação obtidas no presente trabalho, na faixa entre $0,87$ e $6,74 \text{ mg L}^{-1}$ são superiores a concentração do ozônio utilizada por Kells et al. (2001) em grãos de milho, que foi equivalente a $0,11 \text{ mg L}^{-1}$, suficiente para

provocar redução de 63% na infecção superficial pela espécie potencialmente aflatoxigênica *Aspergillus parasiticus*, depois de três dias de ozonização.

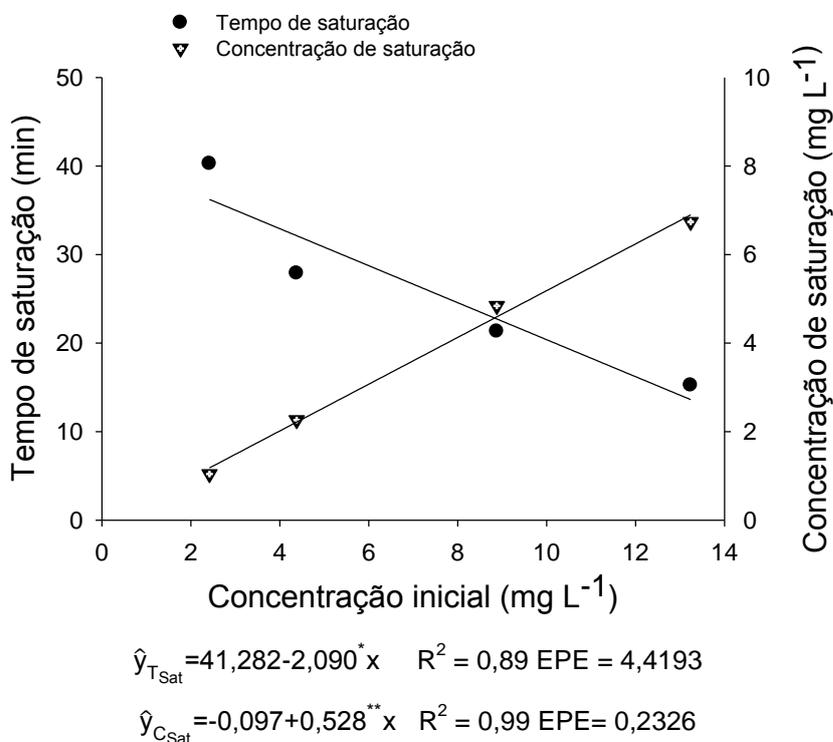


Figura 3. Tempo (T_{Sat}) e concentração (C_{Sat}) de saturação do ozônio em meio poroso contendo castanha-do-Brasil com 4,4% (b.u.) de umidade em função da concentração inicial do gás.

* Significativo a 5% de probabilidade. ** Significativo a 1% de probabilidade. EPE – Erro padrão da estimativa.

As equações de regressão dos diferentes modelos cinéticos ajustados aos dados de concentração residual do ozônio em meio de meio poroso contendo castanha-do-Brasil em função do período de decomposição, nas diferentes concentrações do gás, encontram-se na Tabela 3. Verificou-se que o modelo cinético de primeira ordem foi o que apresentou melhor ajuste aos dados de concentração residual do ozônio durante o processo de decomposição, para todas as concentrações iniciais, de acordo com o coeficiente de determinação (R^2). Outros autores também observaram resultado semelhante em meio poroso contendo arroz, milho e farinha de trigo (SANTOS et al., 2007; RAVI et al., 2015; PAES et al., 2017). Na Figura 4, são apresentadas as curvas referentes à concentração residual do ozônio para o modelo cinético de primeira ordem.

Tabela 3. Equações de regressão dos modelos cinéticos de decomposição ajustados aos dados de concentração residual do ozônio em meio de meio poroso contendo castanha-do-Brasil com 4,4% (b.u.) de umidade, em função do período de decomposição

Concentração					
Inicial (mg L ⁻¹)	Ordem	Equações ajustadas	R ²	EPE	Meia vida (min)
2,42	0	$\hat{y} = 0,360 - 0,028^{\text{ns}} x$	0,58	0,1505	-
	1	$\hat{y} = -0,298 - 0,175^{**} x$	0,92	0,2777	3,96
	2	$\hat{y} = -19,786 + 10,333^* x$	0,82	27,5098	-
4,38	0	$\hat{y} = 1,683 - 0,136^{\text{ns}} x$	0,50	0,8481	-
	1	$\hat{y} = 0,333 - 0,171^* x$	0,89	0,3223	4,05
	2	$\hat{y} = -5,376 + 2,609^* x$	0,78	7,9065	-
8,88	0	$\hat{y} = 3,455 - 0,262^{\text{ns}} x$	0,56	1,4699	-
	1	$\hat{y} = 0,906 - 0,165^{**} x$	0,86	0,4328	4,20
	2	$\hat{y} = -0,986 + 0,500^* x$	0,79	1,6715	-
13,24	0	$\hat{y} = 6,688 - 0,477^{**} x$	0,81	1,4565	-
	1	$\hat{y} = 1,340 - 0,151^* x$	0,89	0,3321	4,59
	2	$\hat{y} = -0,722 + 0,248^* x$	0,71	1,0227	-

* Significativo a 5% de probabilidade. ** Significativo a 1% de probabilidade. ^{ns} Não significativo a 5% de probabilidade. EPE – Erro padrão da estimativa.

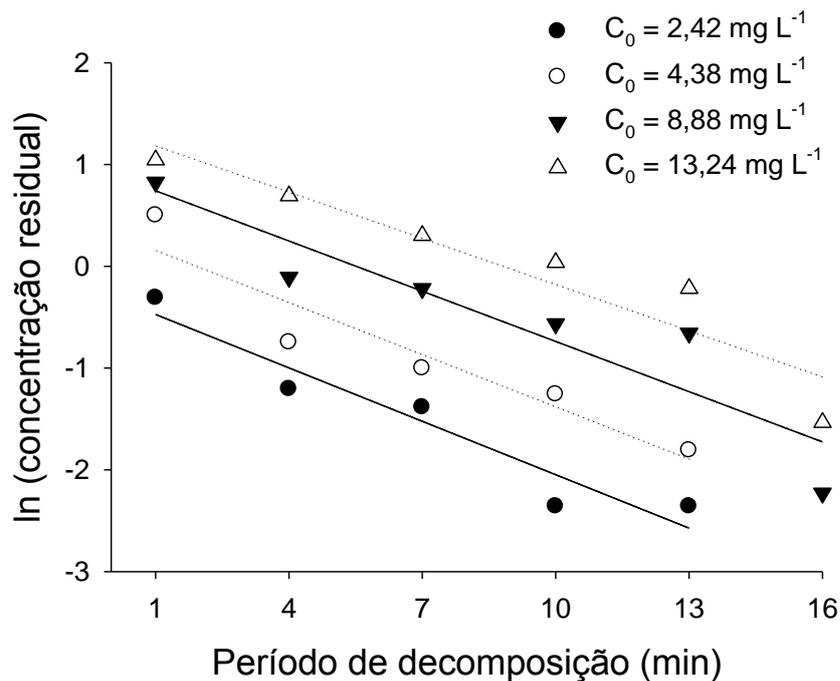


Figura 4. Curvas de regressão do modelo cinético de primeira ordem ajustado aos dados de concentração residual do ozônio em função do período de decomposição, para diferentes concentrações iniciais do gás.

A partir dos resultados relacionados aos modelos cinéticos, em que foi possível verificar que o modelo cinético de primeira ordem é o que apresenta melhor ajuste aos dados de concentração residual do ozônio, foi possível obter a meia vida em meio poroso contendo castanha-do-Brasil, conforme apresentado na Tabela 2. A constante da taxa de decomposição permaneceu na faixa entre $-0,151$ e $-0,175 \text{ min}^{-1}$. Ressalta-se que para modelo cinético de primeira ordem, o tempo de meia vida é independente da concentração inicial do composto avaliado (WRIGHT, 2004). Dessa forma, a meia vida do ozônio em meio poroso contendo castanha-do-Brasil com 4,4% de umidade, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, calculado a partir dos valores obtidos para as diferentes concentrações do gás, é equivalente a $4,20 \pm 0,28 \text{ min}$.

A meia vida do ozônio em meio poroso contendo castanha-do-Brasil é inferior aos valores obtidos para amendoim, equivalente a 7,1 min (teor de umidade de 7,1%/25 °C), milho igual a 5,57 min (teor de umidade de 12,8%/25 °C) e arroz equivalente a 13,8 min (teor de umidade de 11,4%/31 °C) (SANTOS et al., 2007; ALENCAR et al., 2011; RAVI et al., 2015). Um dos fatores que provavelmente favorece a rápida decomposição do ozônio quando em contato com castanha-do-

Brasil é a composição, podendo apresentar 15,0-17,0% de proteínas e 63-70% de lipídeos (CHUNHIENG et al., 2008).

CONCLUSÕES

A concentração inicial do ozônio influencia o tempo de saturação e a concentração de saturação em meio poroso contendo castanha-do-Brasil. À medida que se eleva a concentração inicial do gás, ocorre decréscimo linear do tempo de saturação e aumento linear da concentração de saturação. Tem-se ainda que o modelo cinético de primeira ordem é o mais adequado para o processo de decomposição, com meia vida equivalente a 4,20 min.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, E.R.; FARONI, L.R.A.; MARTINS, M.A.; COSTA, A.R.; CECON, P.R. Decomposition kinetics of gaseous ozone in peanuts. **Engenharia Agrícola**, v.31, n.5, p.930-939, 2011.

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.4, p.899-905, 2012.

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.

CLESCERL, L.S.; GREENBERG, A.E.; EATON, A.D. Standard methods for the ex-729 amination of water and wastewater. Denver: **Water Work Association**, p.1220, 2000.

ISHIZAKI, K.; SHINRIKI, N.; IKEHATA, A.; UEDA, T. Degradation of Nucleic Acids with Ozone. I. Degradation of Nucleobases, Ribonucleosides, and Ribonucleoside-5'-Monophosphates. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.3, p.868-872, 1981.

KELLS, S.A.; MASON, L.J.; MAIER, D.E.; WOLOSOSHUK, C.P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v.37, n.4, p.371-383, 2001.

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, 1999.

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.

ÖZTEKIN, S.; ZORLUGENC, B.; ZORLUGENC, F.K. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. **Journal of Food Engineering**, v.75, n.3, p.396–399, 2006.

PAES, J.L; FARONI, L.R.A; MARTINS, M.A; CECON, P.R; HELENO, F.F. Reaction kinetics of ozone gas in wheat flour. **Engenharia Agrícola**, v.37, n.3, p. 520-528, 2017.

RAVI, P.; VENKATACHALAM, T.; RAJAMANI, M. Decay rate kinetics of ozone gas in rice grains. **Ozone: Science & Engineering**, v.37, n.5, p.450-455, 2015.

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

SOUZA, J.M.L.; CARTAXO, C.B.C.; LEITE, F.M.N. Manual de segurança e qualidade para a cultura da castanha-do-brasil. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 61, 2004.

STRAIT, C. A. Efficacy of ozone to control insects and fungi in stored grain. **Purdue University**, West Lafayette, IN, 1998.

SYSTAT. **SigmaPlot for Windows Version 10.0**. San Jose: Systat Software Inc., 2006.

VENEGAS, J.G.; HARRIS, R.S; SIMON, B.A. A comprehensive equation for the pulmonary pressure-volume curve. **Journal of Applied Physiology**, v.84, n.1, p.389-395, 1998.

WRIGHT, M.R. An introduction to quematical kinects. 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.

CAPÍTULO II

EFICÁCIA DO OZÔNIO NA INATIVAÇÃO DE FUNGOS EM CASTANHA-DO-BRASIL E EFEITO NA QUALIDADE

EFICÁCIA DO OZÔNIO NA INATIVAÇÃO DE FUNGOS EM CASTANHA-DO-BRASIL E EFEITO NA QUALIDADE

RESUMO

A castanha-do-Brasil se destaca pela sua constituição nutricional, porém também é excelente substrato de fungos, especialmente aqueles capazes de sintetizar aflatoxinas. Uma técnica que vem sendo proposta no controle de fungos é a ozonização, em função do elevado potencial oxidativo do gás. Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a eficácia do ozônio no controle de fungos em castanha-do-Brasil e avaliar possíveis efeitos na qualidade do produto. Para avaliar o efeito do ozônio na inativação de fungos, as castanhas-do-Brasil foram inoculadas com *Aspergillus* Seção *Flavi* e posteriormente submetidas à ozonização nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L⁻¹, por 0, 60 120, 180 e 240 min, vazão de 3,0 L min⁻¹, a 25°C. Para avaliar o efeito na qualidade do produto, amostras sem inoculação foram ozonizadas, foram avaliados a umidade, a coloração, o teor de ácidos graxos livres, o índice de peróxido e o índice de acidez do óleo bruto, além do perfil lipídico. O ozônio, em concentração de 8,88 mg L⁻¹, por 240 min, foi capaz de provocar redução superior a 3,10 ciclos log na contagem de *Aspergillus*. Evidenciou-se alteração na estrutura dos microrganismos e na coloração das colônias. Houve alteração na tonalidade e na diferença de cor à medida que se elevou o período de ozonização. A ozonização não alterou a qualidade de óleo das castanhas-do-Brasil, assim como o perfil lipídico. Conclui-se, a partir dos resultados obtidos que o ozônio é eficiente na inativação de *Aspergillus* seção *Flavi* em castanha-do-Brasil, nas condições adotadas no presente estudo, não afeta a qualidade do produto, sobretudo no que se refere ao óleo bruto.

Palavras-chave: Ozonização; *Aspergillus* Seção *Flavi*; *Bertholletia excelsa*; Alterações qualitativas; Perfil lipídico.

EFFECTIVENESS OF OZONE IN THE INACTIVATION OF FUNGI IN BRAZIL NUTS AND EFFECT ON QUALITY

ABSTRACT

Brazil nuts stand out for their nutritional constitution, but are also excellent substrates for fungi, especially those capable of synthesizing aflatoxins. One technique that has been proposed in the control of fungi is ozonation, due to the high oxidative potential of the gas. The objective of this work was to evaluate the effectiveness of ozone in the control of fungi in Brazil nuts and to evaluate possible effects on the quality of the product. To evaluate the effect of ozone on fungal inactivation, Brazil nuts were inoculated with *Aspergillus* section *Flavi* and subsequently submitted to ozonation at concentrations of 2,42, 4,38, 8,88 and 13,24 mg L⁻¹, for periods of 0, 60, 120, 180 and 240 min, flow rate of 3,0 L/min, at a temperature of 25 °C. In order to evaluate the effect on the quality of the product, samples without inoculation were ozonated, being evaluated the humidity, color, free fatty acid content, peroxide index and crude acid acidity index, besides the lipid profile. The ozone, at a concentration of 8.88 mg L⁻¹, for 240 min, was able to cause reduction greater than 3,10 log cycles in the *Aspergillus* count. Changes in the structure of the microorganisms and in the coloration of the colonies were evidenced. There was a change in tonality and color difference as the period of ozonation increased. The ozonation did not alter the oil quality of Brazil nuts, as well as the lipid profile. It is concluded from the results obtained that ozone is efficient in the inactivation of *Aspergillus* section *Flavi* in Brazil nuts, under the conditions adopted in the present study, and does not affect the quality of the product, especially with regard to crude oil.

Keywords: *Ozonation; Aspergillus section Flavi; Bertholletia excelsa; Qualitative changes; Lipid profile.*

INTRODUÇÃO

O produto mais importante da *Bertholletia excelsa* H.B.K. é sua amêndoa, conhecida como castanha-do-Brasil, que pode ser consumida tanto “in natura” ou como ingrediente de outros alimentos. Essa matéria-prima possui grande diversidade de produtos e subprodutos, inclusive óleo (FREITAS et al., 2007). O grande mercado desse produto é justificado pelo seu amplo uso na indústria alimentícia, podendo ser usado na produção de farinha, pão, confeito, mingau, bolo, biscoito, doce, suplemento proteico, leite, bebida dietética, sorvete, entre outros (MARTINS et al., 2008).

A composição nutricional das castanhas-do-Brasil apresenta abundância em lipídeos, além de proteínas, carboidratos e fibras, tornando seu valor energético muito elevado. Além disso, apresenta altos valores de Se, Fe, Mg e Mn, além de compostos fenólicos, que são interessantes no ponto de vista nutricional (CHUNHIEG et al., 2008; JOHN; SHAHIDI, 2010).

Mesmo se destacando por sua constituição nutricional, as castanhas-do-Brasil, por ser substrato para fungos, estão sujeitas à contaminação por micotoxinas, principalmente aflatoxinas, que são extremamente tóxicas e carcinogênicas, sendo produzidas por fungos (*Aspergillus* seção *Flavi*) (MASSI et al., 2014). As aflatoxinas são produzidas principalmente por *A. flavus* e *A. parasiticus* (PAYNE, 1998). *A. flavus* é capaz de produzir Aflatoxina B1 e Aflatoxina B2, enquanto que *A. parasiticus* sintetiza adicionalmente Aflatoxina G1 e Aflatoxina G2. Em produtos de origem vegetal, essa contaminação pode ocorrer nas diversas etapas do desenvolvimento da planta, colheita ou armazenamento (FREIRE et al., 2007).

Diante do risco 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 o 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, 2001), enquanto que no Brasil, foi estabelecido

limite de 10 ppb para quando o produto é direcionado para consumo direto (BRASIL, 2011). 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.

Uma alternativa que vem sendo apresentada como método para o controle de aflatoxinas em alimentos é o ozônio (ZORLUGENÇ et al., 2008; ALENCAR et al., 2012; CHEN et al., 2014). O ozônio pode atuar na prevenção da síntese de aflatoxinas, em decorrência de sua comprovada ação antimicrobiana. A ação antimicrobiana do ozônio é decorrente de seu elevado potencial oxidativo, o que o torna capaz de oxidar glicolipídios, glicoproteínas e aminoácidos da parede e membrana celulares, além de outros constituintes do conteúdo celular (KIM et al., 1999). Em produtos de origem vegetal, o ozônio tem comprovada eficácia na inibição de fungos (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium* e *Mucor*) (RAILA et al., 2006; WU et al., 2006, ALENCAR et al. 2012; SANCHEZ et al., 2016), além de como vírus e bactérias (KIM et al., 1999; KHADRE et al., 2001; ÖZTEKIN et al., 2006; WHANGCHAI et al., 2006).

Apesar de serem encontrados na literatura diversos trabalhos nos quais se avalia o efeito do ozônio sobre diferentes grupos de microrganismos, há poucos relatos que abordam a ozonização de castanha-do-Brasil, sobretudo objetivando o controle de fungos, inclusive daqueles potencialmente aflatoxigênicos. Freitas-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. Outro aspecto fundamental é o efeito na qualidade do produto, sobretudo em função do elevado potencial oxidativo do ozônio e da composição das castanhas-do-Brasil, com aproximadamente 65,0% de lipídeos, predominantemente ácidos graxos insaturados (FREITAS; NAVES, 2010).

Considerando-se que a ozonização representa uma alternativa no controle de fungos e conseqüentemente na prevenção de síntese de aflatoxinas, e que a presença dessa substância na castanha-do-Brasil é considerada importante do ponto de vista de saúde pública e comercial, objetivou-se nesse trabalho avaliar a capacidade do ozônio de inativar de fungos em castanha-do-Brasil e possíveis efeitos na qualidade do produto.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas, de Leites e derivados e de Análise de Alimentos, localizados na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, FAV, e no Laboratório de Micologia, do Departamento de Fitopatologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas, IB, na Universidade de Brasília, UnB.

Geração do 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, SP, Brasil) baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica. No processo de geração do ozônio, foi utilizado como insumo oxigênio (O₂) com grau de pureza de aproximadamente 90%, isento de umidade, obtido de concentrador de oxigênio acoplado ao gerador de ozônio. A concentração de ozônio foi determinada pelo método iodométrico, descrito por Clescerl et al. (2000).

Avaliação da capacidade do ozônio de inativar espécies de *Aspergillus* Seção *Flavi* em castanha-do-Brasil e efeito na qualidade

Para avaliar a capacidade do ozônio de inativar espécies de *Aspergillus* Seção *Flavi*, inicialmente efetuou-se isolamento e posterior inoculação em castanhas-do-Brasil. Efetuou-se isolamento de *Aspergillus* Seção *Flavi* de grãos de amendoim adquiridos no mercado local. Os grãos foram inoculados adotando-se a técnica de plaqueamento direto, utilizando-se o meio de cultura *Aspergillus flavus* e *parasiticus* Agar (AFPA), com incubação na temperatura de 30 °C, por 42 h, de acordo com Pitt e Hocking (2009). Utilizaram-se no isolamento, somente colônias com coloração alaranjada no verso, característica das espécies potencialmente aflatoxigênicas *A. flavus* e *A. parasiticus*. Na multiplicação do inóculo, também foi utilizado o meio de cultura AFPA.

Para inoculação dos fungos nas castanhas-do-Brasil foi adicionado 10 mL de água destilada estéril a cada placa, obtendo-se suspensão de conídios do isolado, posteriormente ajustada para a concentração de 10³ conídios mL⁻¹. As castanhas-do-Brasil foram imersas por 10 min na suspensão de conídios (MICHEL;

RADCLIFFE, 1995). Depois da inoculação, as amostras permaneceram em temperatura ambiente por sete dias, de tal forma que ocorresse a proliferação dos microrganismos.

Na ozonização, utilizaram amostras de 100 g de castanhas inoculadas, individualizadas em sacolas de tules de armação. Adotaram-se concentrações do ozônio equivalentes a 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L⁻¹, por períodos de 0, 60 120, 180 e 240 min, vazão de 3,0 L min⁻¹, na temperatura de 25 °C. Depois que o ozônio passava pelo meio poroso contendo o produto, o gás era direcionado para o destruidor térmico.

Na avaliação da contagem de *Aspergillus* Seção *Flavi* nas castanhas-do-Brasil foi utilizado o método de quantificação de fungos por diluição em placas (PITT; HOCKING, 2009). No método de diluição em placas, 25 g de castanha-do-Brasil foram previamente diluídos em 225 mL de água peptonada a 0,1%. As diluições utilizadas foram 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴. O meio de cultura e as condições de incubação foram os mesmos adotados no isolamento de *Aspergillus* Seção *Flavi*. Os resultados referentes ao método de diluição foram obtidos em termos de unidades formadoras de colônias por grama (UFC g⁻¹).

O efeito do ozônio na estrutura dos fungos foi analisado em microscópio ótico Leica DM2500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), com câmara clara e sistema de captura de imagem acoplado, utilizando-se objetiva de 40x. Para avaliar o efeito do ozônio na coloração das colônias dos fungos foi utilizado estereomicroscópio Leica MDG33 com iluminação incidente (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Análises qualitativas das castanhas-do-Brasil ozonizadas

Na avaliação de possíveis alterações na qualidade de castanhas-do-Brasil ozonizadas foram avaliados a umidade, coloração e variáveis qualitativas do óleo bruto. Para avaliação da qualidade do óleo bruto extraído de castanhas ozonizadas analisaram-se o teor de ácidos graxos livres, o índice de peróxido, o índice de iodo e o perfil lipídico.

Nessa etapa foram ozonizadas amostras de 100 g de castanhas, provenientes do lote sem inoculação de *Aspergillus* Seção *Flavi*, adotando-se

procedimento semelhante ao utilizado na etapa de avaliação do efeito fungicida do ozônio.

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).

Coloração

A avaliação da coloração das castanhas-do-Brasil foi realizada no espectrofotômetro Colorquest XE (HunterLab, Reston, United States), obtendo-se os valores das coordenadas L (mensurável em termos de intensidade de branco a preto), a (mensurável em termos de intensidade de branco a preto) e b (mensurável em termos de intensidade de amarelo e azul) do sistema Hunter. A partir das coordenadas L, a e b foi possível obter tonalidade de cor 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).

$$h = \arctang(b/a) \quad (1)$$

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

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

em que:

h = tonalidade da cor; C = saturação da cor ou croma; ΔE = diferença de cor; L_0 , a_0 e b_0 são as coordenadas obtidas antes da ozonização das castanhas.

Extração do óleo bruto

A extração de lipídios totais foi realizada pelo método Bligh e Dyer (1959). Foram pesados 5,0 g de amostra triturada, posteriormente transferidas para o tubo de 80 mL. Foram adicionados exatamente 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada. Agitou-se a mistura no agitador rotativo por 30 min. Adicionaram-se mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio a 1,5%. Agitou-se vigorosamente por 2 min e centrifugou-se a 1.000 rpm por dois min. Em seguida, a camada metanólica superior foi pipetada e descartada. Coletou-se a

camada inferior, acondicionada, em seguida, em tubo de 30 mL. Filtrou-se a amostra coletada na camada inferior em funil com papel de filtro qualitativo. O filtrado foi coletado em um béquer de 50 mL, que foi levado posteriormente à estufa a 40 °C para a evaporação do clorofórmio residual. Esse procedimento foi repetido quatro vezes para cada amostra, de tal forma que fosse possível a obtenção de massa de óleo suficiente para as análises qualitativas.

Ácidos graxos livres do óleo bruto

A determinação de ácidos graxos livres (AGL) foi realizada de acordo com as normas AOCS (1993), Método Ca 5a-40. O percentual de ácidos graxos livres (AGL), expresso em mg KOH g⁻¹, foi calculado por meio da Equação 4,

$$\text{AGL (mg KOH g}^{-1}\text{)} = \frac{V_a \cdot f \cdot N \cdot 56,1}{m} \quad (4)$$

em que,

V_a = volume de KOH 0,01 N gasto para a amostra, mL;

N = normalidade da solução de KOH;

f = fator de correção da solução de KOH; e

m = massa da amostra, g.

Índice de peróxido do óleo bruto

O índice de peróxido (IP) 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,

$$\text{IP (mEq kg}^{-1}\text{)} = \frac{(V_a - V_s) \cdot N \cdot f \cdot 1000}{m} \quad (5)$$

em que,

IP = Índice de peróxido, mEq kg⁻¹;

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

V_s = volume de Na₂S₂O₃ 0,1N padronizada 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.

Índice de iodo

A determinação do índice de iodo (II) foi realizada segundo as normas AOCS (1993), Método Cd 1b-87. O índice de iodo foi obtido pela Equação 6,

$$II \text{ (gI}_2 \text{ 100g}^{-1}\text{)} = \frac{(V_s - V_a) 1,27 f}{m} \quad (7)$$

em que,

V_s = volume da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N padronizada gasto para a titulação sem amostra, mL;

V_a = volume da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N padronizada gasto para a titulação da amostra, mL;

f = fator de correção da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; e

m = massa da amostra, g.

Determinação do perfil lipídico

Na determinação do perfil lipídico foi analisado o óleo bruto extraído das castanhas não ozonizadas e daquelas ozonizadas nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L⁻¹ por 240 min. Inicialmente foi feita esterificação dos ácidos graxos, a partir do óleo extraído pelo método Bligh e Dyer (1959), de acordo com Mendonça et al. (2015). Alíquotas de 20 mg de óleo bruto foram transferidas para tubo de ensaio com tampa rosqueável. Em seguida, adicionava-se 1,5 mL de uma solução de KOH 0,5 N em metanol para a saponificação dos ácidos graxos. As amostras foram então agitadas em agitador vortex por 1 min. Posteriormente, as misturas resultantes foram colocadas em banho-maria a 70 °C por 5 min e resfriada imediatamente em água corrente. Após o resfriamento, adicionava-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. Depois dessa etapa, adicionava-se as amostras 2,5 mL de solução de NaCl saturado e 1 mL de hexano, seguido de centrifugação por 10 min a 1.200rpm. Para cada amostra, o sobrenadante foi recolhido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferido para outro tubo de vidro com capacidade de 2 mL, com tampa rosqueável, septo de silicone e atmosfera saturada de nitrogênio. As amostras foram armazenadas sob

congelamento a 18 °C negativos até o momento das análises por cromatografia gasosa.

Na análise cromatográfica, utilizou-se Cromatógrafo gasoso GC-2014ATF/SPL (Shimadzu Corp., Japan) com autoinjeter AOC 20i, com detector de ionização de chamas (FID-2014), coluna cromatográfica Rt-2560 (Restek, Bellefonte, PA, USA), com 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0.20 µm de espessura do filme. As condições cromatográficas estabelecidas foram: modo de injeção do tipo Split, com temperatura do injeto igual a 200 °C; a rampa de aquecimento da coluna foi programada para iniciar com 140 °C, permanecendo a essa temperatura por 5 min, estabelecendo-se aumento de 5 °C a cada minuto até atingir 200 °C. A temperatura do detector era de 220 °C, utilizando-se hélio como gás de arraste, com fluxo na coluna de 1,2 mL min⁻¹. A corrida cromatográfica foi equivalente a 45 min. 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). Os resultados foram expressos em g de cada ácido graxo, em relação à 100 g dos ácidos graxos totais.

Delineamento Experimental

O experimento foi realizado no Esquema Fatorial 4 x 5, sendo quatro concentrações do gás (2,42 mg L⁻¹, 4,38 mg L⁻¹, 8,88 mg L⁻¹ e 13,24 mg L⁻¹) e cinco períodos de ozonização (0, 1, 2, 3 e 4 h), com três repetições. Foi realizada análise de variância a 5% de probabilidade e, posteriormente, análise de regressão. Na análise de variância, foi utilizado o Software StatPlus v.5 (AnalystSoft Inc, Canada). Para a obtenção das equações de regressão e plotagem dos gráficos, foi utilizado o software SigmaPlot v.10 (Systat Software Inc, Germany).

RESULTADOS

Apresentam-se na Figura 1 e na Tabela 1 a contagem de *Aspergillus* seção *Flavi* ($\log \text{UFC g}^{-1}$) em castanhas-do-Brasil ozonizadas nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L^{-1} por até 240 min. Verificou-se redução significativa ($p < 0,05$) na contagem dos microrganismos sendo a redução mais acentuada nas concentrações de 8,88 e 13,24 mg L^{-1} . Quando foram utilizadas as concentrações de 2,42 e 4,38 mg L^{-1} , as reduções estimadas na contagem dos microrganismos foram de 1,38 e de 1,89 ciclos log, respectivamente, depois de 240 min de ozonização. Entretanto, quando se utilizaram as concentrações de 8,88 e 13,24 mg L^{-1} , obtiveram-se reduções estimadas superiores a 2,80 ciclos log depois de 60 min. Para tempo de 240 min redução na contagem do microrganismos foi superior a 3,10 ciclos log.

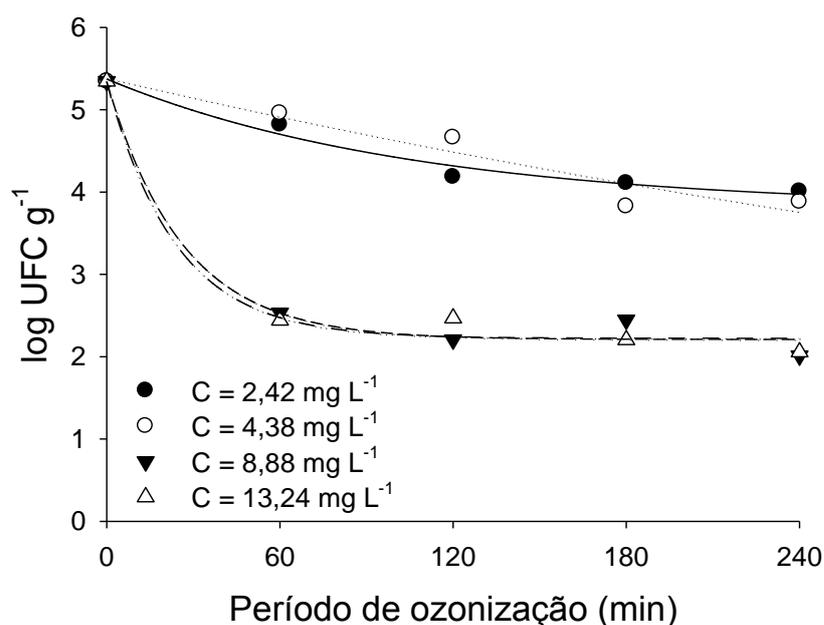


Figura 1. Contagem de *Aspergillus* seção *Flavi* ($\log \text{UFC g}^{-1}$) em castanhas-do-Brasil ozonizadas nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L^{-1} por até 240 min.

Tabela 1. Equações de regressão e respectivos coeficientes de determinação de contagem de *Aspergillus* seção *Flavi* (log UFC g⁻¹) em castanhas-do-Brasil ozonizadas nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L⁻¹ por até 240 min.

Concentração Inicial (mg L ⁻¹)	Equações ajustadas	R ²	EPE
2,42	$\hat{y}=3,805+1,567e^{(-0,009x)}$	0,97	0,1304
4,38	$\hat{y}=0,431+4,956e^{(-0,002x)}$	0,93	0,2512
8,88	$\hat{y}=2,209+3,135e^{(-0,038x)}$	0,99	0,2183
13,24	$\hat{y}=2,223+3,1193e^{(-0,042x)}$	0,98	0,1998

EPE – Erro padrão da estimativa.

Na Figura 2 são encontrados os aspectos morfológicos, obtidos por microscopia óptica, de *Aspergillus* seção *Flavi* coletado em castanhas-do-Brasil expostas ou não ao gás ozônio na 13,24 mg L⁻¹, por 240 min. Verificou-se alterações na coloração dos microrganismos, certamente associada a oxidação estruturas celulares vitais. A alteração na coloração é confirmada na Figura 3, na qual é possível observar alteração na coloração das colônias dos fungos depois da ozonização. Nas castanhas não ozonizadas verificou-se coloração esverdeada característica de colônias de *Aspergillus* seção *Flavi*. Entretanto, naquelas castanhas que foram ozonizadas a coloração das colônias dos fungos sofreu despigmentação, com expressivo branqueamento.

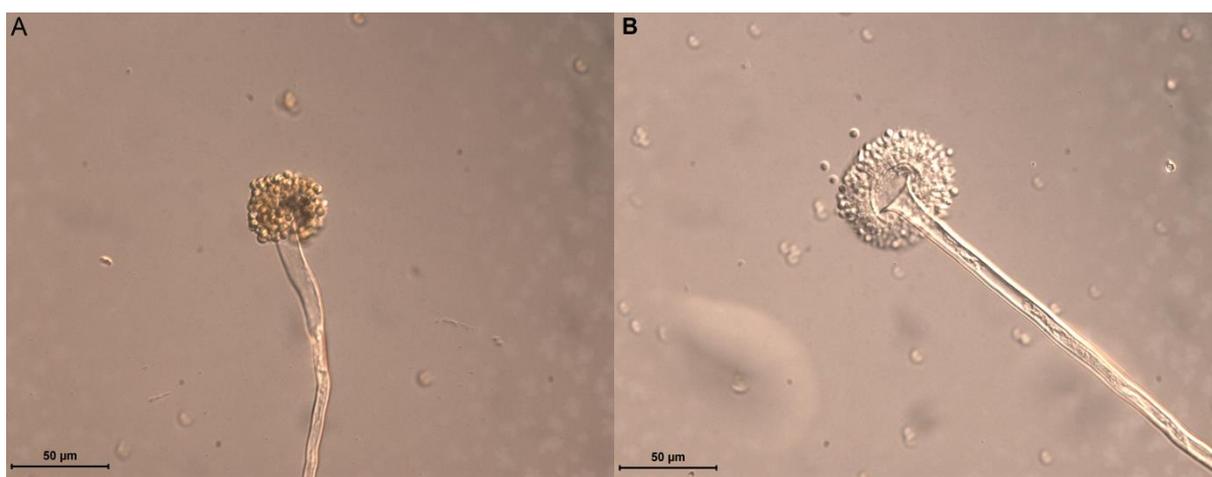


Figura 2. Aspectos morfológicos, obtidos por microscopia óptica com objetiva de 40x, de *Aspergillus* seção *Flavi* coletado em castanhas-do-Brasil antes (A) e depois (B) da exposição ao gás ozônio, na concentração de 13,24 mg L⁻¹, por 240 min.

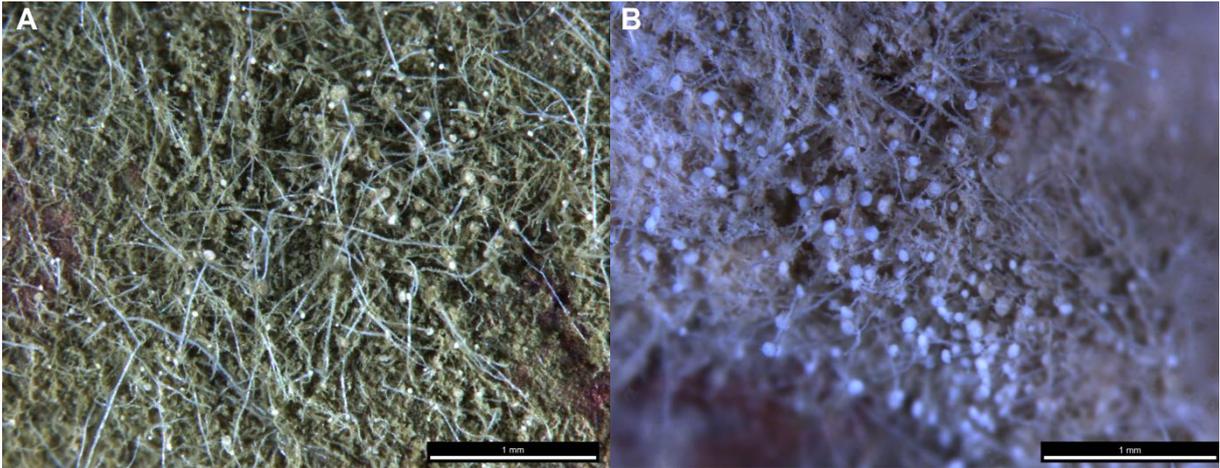


Figura 3. Colônias de *Aspergillus* seção *Flavi* na superfície de castanhas-do-Brasil antes (A) e depois (B) da exposição ao gás ozônio, na concentração de $13,24 \text{ mg L}^{-1}$, por 240 min.

No que se refere à umidade das castanhas, verificou-se redução significativa ($p < 0,05$) durante o processo de ozonização. Antes do processo de ozonização, a umidade média das castanhas era de 4,40% e depois de 240 min permaneceu inferior a 4,00% (Figura 4 e Tabela 2).

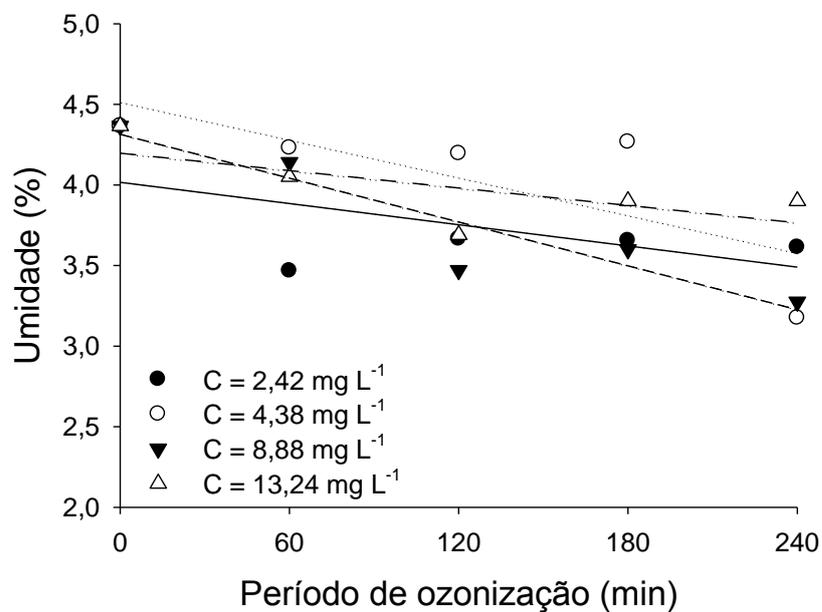


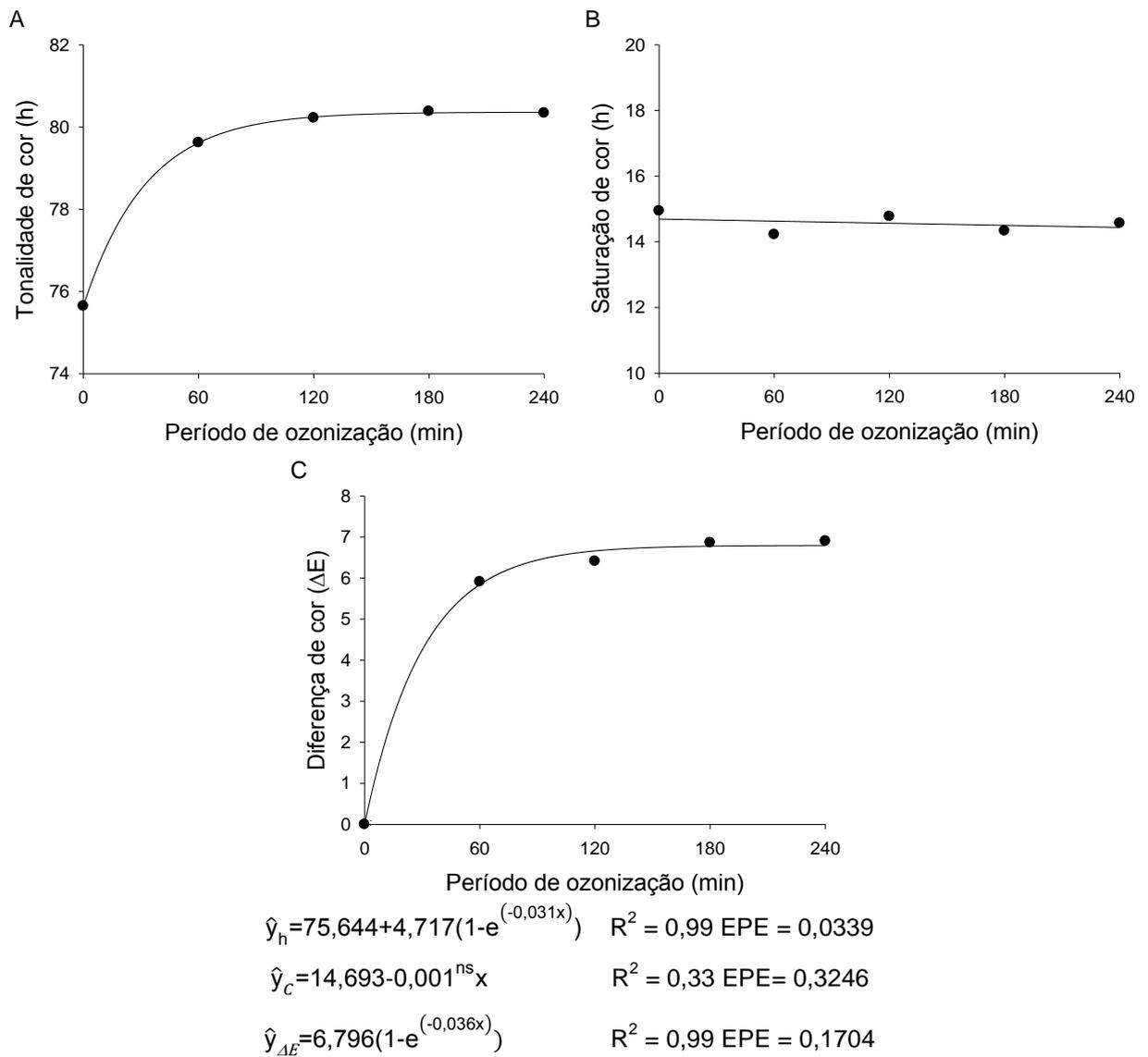
Figura 4. Umidade (%) de castanhas-do-Brasil ozonizadas nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e $13,24 \text{ mg L}^{-1}$ por até 240 min.

Tabela 2. Equações de regressão e respectivos coeficientes de determinação de umidade (%) de castanhas-do-Brasil ozonizadas nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L⁻¹ por até 240 min.

Concentração Inicial (mg L ⁻¹)	Equações ajustadas	R ²	EPE
2,42	$\hat{y}=4,016-0,002^{ns}x$	0,36	0,3267
4,38	$\hat{y}=4,515-0,004^{ns}x$	0,57	0,3724
8,88	$\hat{y}=4,314-0,005^*x$	0,82	0,1958
13,24	$\hat{y}=4,197-0,002^{ns}x$	0,47	0,2109

* Significativo a 5% de probabilidade. ^{ns} Não significativo a 5% de probabilidade.

Com relação ao efeito do processo na coloração do produto, as variáveis tonalidade (h), saturação (C) e diferença de cor (ΔE) variaram significativamente ($p < 0,05$) em decorrência do período de ozonização independentemente da concentração do gás (Figura 5). A tonalidade (Figura 5A) e a diferença de cor (Figura 5C) apresentaram tendência de aumento à medida que se elevou o período de ozonização. Entretanto, a saturação de cor (Figura 5B) não apresentou variação expressiva durante 240 min de ozonização, permanecendo em todo de 14,70. Verificou-se ainda variação significativa ($p < 0,05$) da diferença de cor quando se analisou o efeito da concentração inicial do gás isoladamente (Figura 6). O valor médio de diferença de cor das castanhas expostas à concentração de 8,88 mg L⁻¹ diferiu daqueles obtidos quando se adotaram as concentrações de 2,42 e 4,38 mg L⁻¹.



^{ns} Significativo a 1% de probabilidade. EPE – Erro padrão da estimativa.

Figura 5. Tonalidade (h), saturação (C) e diferença de cor (ΔE) em castanhas-do-Brasil ozonizadas por até 240 min.

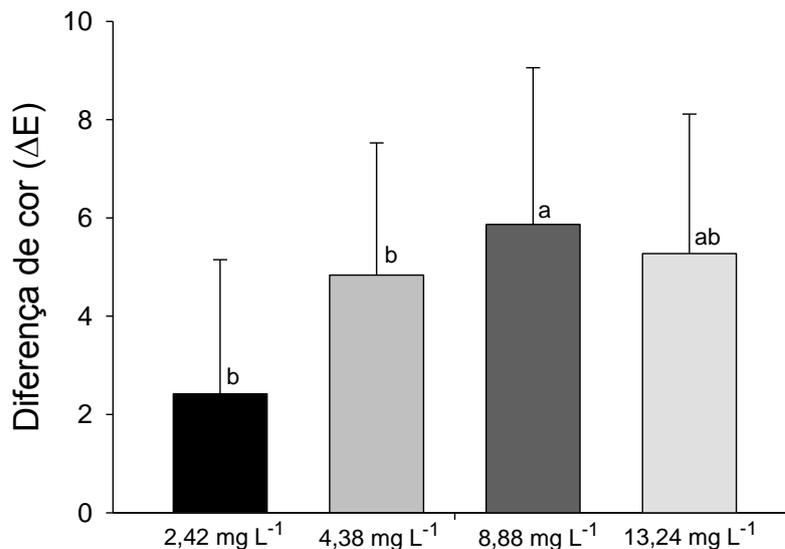


Figura 6. Diferença de cor (ΔE) de castanhas-do-Brasil ozonizadas nas concentrações de 2,42, 4,38, 8,88 e 13,24 mg L⁻¹.

Valores médios seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação às variáveis qualitativas do óleo bruto extraído das castanhas-do-Brasil; teor de ácidos graxos livres, índice de peróxido e índice de iodo, não houve variação significativa ($p > 0,05$) em decorrência da interação entre concentração do ozônio e período de exposição ao gás, assim como esses fatores isoladamente. O teor de ácidos graxos livres permaneceu na faixa entre 0,66 e 0,84 mg KOH g⁻¹, enquanto que o índice de peróxido variaram entre 12,4 e 21,4 mEq kg⁻¹. No que se refere ao índice de iodo, obtiveram-se valores entre 96,7 e 105,8 g I₂ 100g⁻¹. No tange ao perfil lipídico do óleo bruto, não houve variação significativa ($p > 0,05$) quando se analisaram o efeito das diferentes concentrações do ozônio por período de 240 min. Foi possível quantificar, independentemente da ozonização os ácidos graxos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2). Para os ácidos graxos C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2, independentemente da exposição ao ozônio, obtiveram-se valores médios equivalentes a 14,37, 11,25, 23,94 e 50,35 g 100g⁻¹, respectivamente. Na figura 7, encontram-se os cromatogramas referentes ao perfil lipídico do óleo bruto obtido de castanhas-do-Brasil não ozonizadas (A) e ozonizadas (B) na concentração de 13,24 mg L⁻¹, por 240 min.

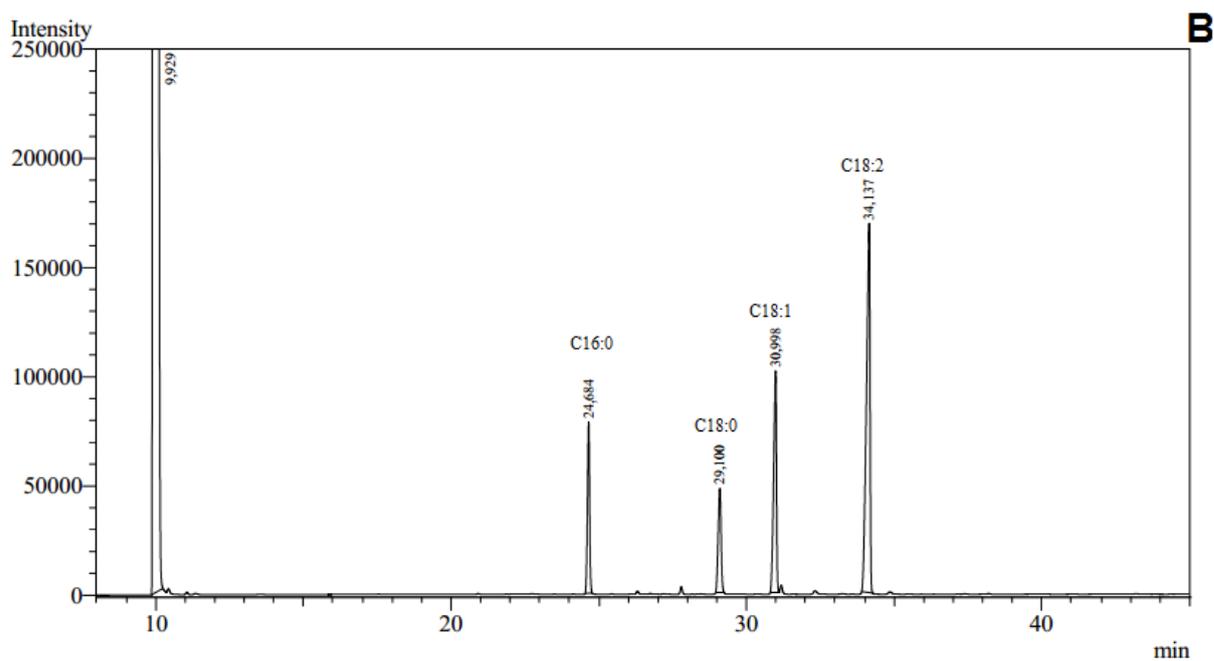
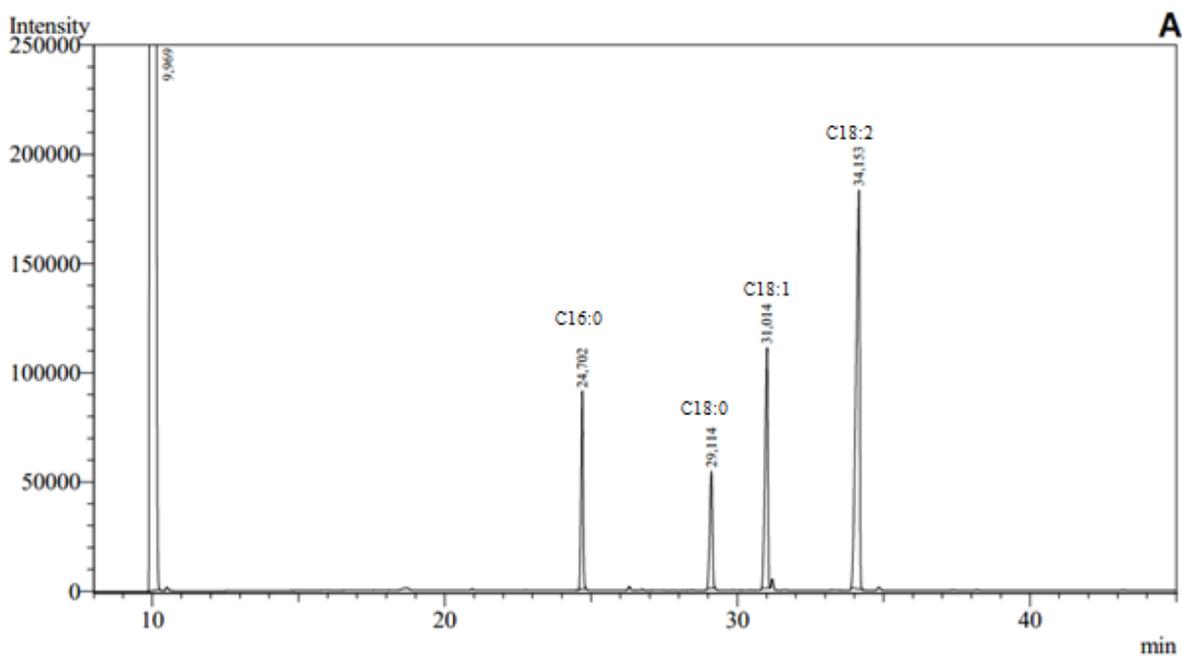


Figura 7. Cromatogramas do perfil lipídico do óleo bruto obtido de castanhas-do-Brasil não ozonizadas (A) e ozonizadas (B) na concentração de $13,24 \text{ mg L}^{-1}$, por 240 min.

DISCUSSÃO

O gás ozônio se destaca por apresentar o segundo maior potencial oxidativo (2,07 mV), dentre as substâncias geralmente utilizadas e que apresentam expressiva capacidade de oxidação, sendo inferior somente ao flúor (GUZEL-SEYDIM et al., 2004). Essa característica torna a ozonização uma importante alternativa para o controle de microrganismos, incluindo fungos, bactérias e vírus (KIM et al., 1999). Nesse sentido, no presente estudo foi possível obter expressiva redução na contagem de *Aspergillus* seção *Flavi* (Figura 1) em castanhas-do-Brasil, ozonizadas nas concentrações de 8,88 e 13,24 mg L⁻¹, para período de exposição de 240 min. A redução na contagem dos microrganismos nessas condições foi superior a 3,1 ciclos log. Salienta-se que dentre as espécies que fazem parte do grupo *Aspergillus* seção *Flavi*, estão *A. flavus* e *A. parasiticus*, que são as capazes de sintetizar aflatoxinas, substâncias que se destacam pela elevada carcinogenicidade (NESCI; ETCHEVERRY, 2002; ASTORECA et al., 2011).

Ressalta-se que na contagem dos fungos presentes nas castanhas submetidas ou não ao processo de ozonização, somente foram consideradas as colônias que apresentavam coloração alaranjada no verso da placa de Petri, característico das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* (PITT; HOCKING, 2009). Dessa forma, o ozônio demonstrou eficácia na inativação de microrganismos potencialmente aflatoxigênicos em castanha-do-Brasil. Alencar et al. (2012) também observaram expressivo efeito do ozônio na inativação de *Aspergillus* spp., com redução de aproximadamente 3,0 ciclos em grãos de amendoim ozonizado, na concentração de 21 mg L⁻¹, por 96 h.

A inativação dos microrganismos durante a ozonização ocorre a partir da oxidação de constituintes da parede e membrana celular e elementos do conteúdo celular, podendo ocorrer lise celular durante a exposição ao ozônio. Dentre os compostos que podem ser oxidados pelo ozônio têm-se ácidos graxos polisaturados, polissacarídeos, enzimas e materiais nucleicos, como timina e citosina (ISHIZAKI et al., 1981; KHADRE et al., 2001). É importante destacar que o ozônio molecular e/ou radicais gerados durante sua decomposição podem atuar no processo de oxidação desses constituintes celulares (PASCUAL et al., 2007).

Nas Figuras 2 e 3 é possível verificar o efeito do ozônio sobre a coloração dos microrganismos. Houve alteração na coloração característica dos microrganismos

certamente em decorrência da oxidação de constituintes celulares. Outros autores também observaram alteração na coloração de colônias de espécies de fungos durante a ozonização. Zotti et al. (2008) atribuíram a alteração na coloração de colônias de *A. niger* à oxidação do pigmento melanina e de *A. flavus* a oxidação de antraquinona, que de acordo com Shier et al. (2005), é um pigmento intermediário na síntese de aflatoxinas. Alencar et al. (2012) também observaram alteração na coloração de colônias de *Aspergillus* spp. quando ozonizaram amendoim na concentração de 21 mg L⁻¹, por 96 h.

Com relação a possíveis alterações na qualidade das castanhas-do-Brasil, observou-se redução significativa ($p < 0,05$) da umidade durante a ozonização (Figura 4). Tal fato pode ser atribuído à umidade relativa da mistura gasosa contendo ozônio que passou pelo produto, reduzida durante o processo de concentração do oxigênio antes da geração do gás. Dessa forma, tem-se que a redução da umidade das castanhas não é decorrente simplesmente da ação do gás, mas do efeito predominante da baixa umidade relativa durante a ozonização. Ressalta-se que a composição das castanhas-do-Brasil, com teor de lipídeos em torno de 65,0% (FREITAS; NAVES, 2009), favorece a perda de água durante a ozonização. Resultado semelhante foi obtido por Alencar et al. (2011) em grãos de amendoim ozonizados nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹, por até 96 h.

No que se refere à coloração das castanhas-do-Brasil, houve variação significativa ($p < 0,05$) quando se analisou o efeito do período de ozonização independentemente da concentração do gás para a tonalidade, saturação e diferença de cor (Figura 5). Todavia, somente houve variação expressiva para as variáveis tonalidade e diferença de cor. Essas alterações ao longo do período de ozonização podem ser atribuídas a oxidação de compostos da película que envolve as castanhas, de maneira semelhante à observada em grãos de amendoim por Alencar et al. (2011) e por Sanchez et al. (2016).

A ozonização em concentração de até 13,24 mg L⁻¹ por até 240 min também não afetou a qualidade do óleo bruto quando consideradas as variáveis teor de ácidos graxos livres, índice de peróxido e índice de iodo. O teor de ácidos graxos livres, que variou entre 0,66 a 0,84 mg KOH g⁻¹, que é inferior ao limite estabelecido pelo *Codex Alimentarius* para óleo bruto, que é de 4,00 mg KOH g⁻¹ (FAO, 1999). Quanto ao índice de peróxido do óleo bruto, cujo limite estabelecido pelo *Codex*

Alimentarius é de 15 mEq kg⁻¹, obtiveram-se valores entre 12,4 e 21,4 mEq kg⁻¹. Essa faixa de variação pode ser atribuída à qualidade inicial da matéria-prima, não devendo, portanto, ser atribuídos ao processo de ozonização, nas condições adotadas no presente trabalho. O índice de iodo, que mede o grau de instauração do óleo, variou entre 96,7 e 105,8 g I₂100 g⁻¹, não sendo afetado significativamente pela ozonização. Esses valores estão próximos ao obtido por Muniz et al. (2015) para óleo de castanha-do-Brasil, que foi a 95,0 g I₂100 g⁻¹. Os resultados relacionados à qualidade do óleo bruto estão de acordo com os observados por outros autores em milho e amendoim ozonizados (FARONI et al., 2007; ALENCAR et al., 2011; CHEN et al., 2014). Por outro lado, Sanchez et al. (2016) observaram aumento do índice de peróxido do óleo bruto extraído de grãos de amendoim ozonizados na concentração de 6,41 mg L⁻¹, por 12 h. Porém esses autores obtiveram valores inferiores a 10 mEq kg⁻¹.

A determinação do perfil lipídico confirmou que, nas condições adotadas no presente estudo, não há alteração significativa ($p > 0,05$) na qualidade do óleo bruto extraído de castanhas-do-Brasil ozonizadas. No óleo bruto, independentemente da ozonização, foram detectados e quantificados os ácidos graxos C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2. Dessa forma, mesmo o ozônio apresentando elevado potencial oxidativo, a ozonização não foi capaz de provocar oxidação de tal forma a alterar o perfil lipídico do óleo. Esse resultado é extremamente importante tendo em vista a manutenção da qualidade das castanhas-do-Brasil e o fato de que o óleo de castanha-do-Brasil é composto predominantemente por ácidos graxos insaturados (FREITAS; NAVES, 2009). Destaca-se que os ácidos graxos insaturados são suscetíveis a oxidação, e ocorrendo tal processo há alteração no odor e flavor (MATZ, 1992). MENDEZ et al. (2003) também não observaram alteração significativa no perfil lipídico de óleo bruto extraído de grãos de milho, de soja e de trigo ozonizados na concentração de 50 ppm por 30 dias.

CONCLUSÕES

O ozônio mostrou-se eficiente na inativação de *Aspergillus* seção *Flavi* em castanhas-do-Brasil, sendo capaz de provocar redução superior a 3,1 ciclos log quando se adota concentração de 8,88 mg L⁻¹ e período de exposição de 240 min. Dessa forma, a ozonização é uma técnica alternativa na inativação de fungos potencialmente aflatoxigênicos, podendo atuar, portanto, na prevenção da síntese das aflatoxinas. Em geral, nas condições adotadas no presente estudo, o ozônio não afeta a qualidade do produto, sobretudo no que se refere ao óleo bruto, inclusive o perfil lipídico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, E.R.; FARONI, L.R.; SOARES, N.F.; CARVALHO, M.C.; PEREIRA, K.F. Effect of the ozonization process on the quality of peanuts and crude oil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.2, p.154-160, 2011.

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.4, p.899-905, 2012.

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

ASTORECA, A.L.; DALCERO, A.M.; PINTO, V.F.; VAAMONDE, G. A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in poultry feeds. **International Journal of Food Microbiology**, v.146, n.1, p.38-43, 2011.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BRASIL. **Resolução De Diretoria Colegiada – RDC Nº 07**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966. Acesso em: 15.02.18.

CHEN, R.; MA, F.; LI, P.W.; ZHANG, W.; DING, X.X.; ZHANG, Q.; LI, M.; WANG, Y.R.; XU, B.C. Effect of ozone on aflatoxins detoxification and nutritional quality of peanuts. **Food chemistry**, v.146, p.284-288, 2014.

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.

CLESCERL, L.S.; GREENBERG, A.E.; EATON, A.D. Standard methods for the ex-729 amination of water and wastewater. Denver: **Water Work Association**, p.1220, 2000.

COSLOVSKY, S.V. Economic development without pre-requisites: How Bolivian producers met strict food safety standards and dominated the global Brazil-nut market. **World Development**, v.54, p.32-45, 2014.

EUROPEAN UNION. Commission Regulation (EC) n° 165/10 of 26, February 2010. Amending Regulation (EC) no 1881/06 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. **Official Journal of the European Communities**, United Kingdom, L. 50, p 8-12, 2010.

FAO. (1999). Codex standard for edible fats and oils not covered by individual standards. Available at: <http://www.fao.org/docrep/004/y2774e/y2774e03.htm>. Accessed 13.02.18.

FDA. FDA Mycotoxin Regulatory Guidance: A Guide for Grain Elevators, Feed Manufacturers, Grain Processors and Exporters. Aug. 2011. Available at: <https://www.ngfa.org/wp-content/uploads/NGFAComplianceGuide-FDARegulatoryGuidanceforMycotoxins8-2011.pdf>. Accessed: 15.02.18.

FARONI, L.R.D.; PEREIRA, A.M.; SOUSA, A.H.; SILVA, M.T.C.; URRICHI, W.I. Influence of corn grain mass temperature on ozone toxicity to *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and quality of oil extracted from ozonized grains. In: **IOA Conference and Exhibition**. Valência: IOA, 2007.

FRANCIS, F.J. The origin of $\tan^{-1} a/b$. **Journal of Food Science**, v.40, p.412, 1975.

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**, p.49, 2007.

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.P.; FREITAS-SILVA, O.; 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.

FREITAS-SILVA, O.; MORALES-VALLE, H.; VENÂNCIO, A. Potential of aqueous ozone to control aflatoxigenic fungi in Brazil nuts. **ISRN biotechnology**, v.2013, 2013.

GUZEL-SEYDIM, Z.; GREENE, A.K.; SEYDIM, A.C. Use of ozone in the food industry. **LWT-Food Science and Technology**, v.37, n.4, p.453-460, 2004.

ISHIZAKI, K.; SHINRIKI, N.; IKEHATA, A.; UEDA, T. Degradation of nucleic acids with ozone. i. degradation of nucleobases, ribonucleosides, and ribonucleoside- 5'-monophosphates. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.3, p.868–872, 1981.

JOHN, J.A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, v.2, n.3, p.196-209, 2010.

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., 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, 1999.

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

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., 2008, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco: UFAC, 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.

MASSI, F.P.; VIEIRA, M.L.C.; SARTORI, D.; PENHA, R.E.S., FREITAS MUNHOZ, C.; FERREIRA, J.M.; FUNGARO, M.H. P. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. **International journal of food microbiology**, v.186, p.14-21, 2014.

MATZ, S.A. **Bakery Technology and Engineering**. Van Nostrand Reinhold, New York, 1992, 864p.

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.

MICHEL, B.E.; RADCLIFFE, D.A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, v.87, n.1, p.126-130, 1995.

MUNIZ, M.A.P.; SANTOS, M.N.F.; COSTA, C.E.F.; MORAIS, L.; LAMARÃO, M.L.N.; RIBEIRO-COSTA, R M.; SILVA-JÚNIOR, J.O.C. Physicochemical characterization, fatty acid composition, and thermal analysis of *Bertholletia excelsa* HBK oil. **Pharmacognosy Magazine**, v.11, n.41, p.147, 2015.

NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. *Aspergillus* section Flavi populations from field maize in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, n.5, p.343-348, 2002.

ÖZTEKIN, S.; ZORLUGENC, B.; ZORLUGENC, F.K. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. **Journal of Food Engineering**, v.75, n.3, p.396–399, 2006.

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, p.S29-S35, 2007.

PAYNE, G.A. Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. In: SINHA, K.L.; Bhatnagar, D. (Ed.) **Mycotoxins in agriculture and food safety**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998, p.279-306.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. Fungi and food spoilage. New York: **Springer**, p. 519, 2009.

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.2, p.287-294, 2006.

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.64, n.1, p.668-675, 2016.

SHEIR, W.T.; LAO, Y.; STEELE, T.W.J.; ABBAS, H.K. Yellow pigments used in rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains are anthraquinones associated with the aflatoxin biosynthetic pathway. **Bioorganic Chemistry**, v.33, n.6, p.426–438, 2005.

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

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.

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.

ZORLUGENÇ, B.; ZORLUGENÇ, F.K.; ÖZTEKİN, S.; EVLIYA, I.B. The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B1 in dried figs. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.12, p.3593-3597, 2008.

ZOTTI, M.; PORRO, R.; VIZZINI, A.; MARIOTTI, M.G. Inactivation of *Aspergillus* spp. by ozone treatment. **Ozone-Science & Engineering**, v.30, n.6; p.423-430, 2008.