

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**Ozônio na inativação de fungos micotoxigênicos em amêndoas de cacau e seu  
efeito na qualidade**

Elia Wedja Renata Corrêa Nascimento  
*Magister Scientiae*

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2025**

**ELIA WEDJA RENATA CORRÊA NASCIMENTO**

**Ozônio na inativação de fungos micotoxigênicos em amêndoas de cacau e seu efeito na qualidade**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Ernandes R. de Alencar

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

N244o  
2025  
Nascimento, Elia Wedja Renata Corrêa, 2000-  
Ozônio na inativação de fungos micotoxigênicos em  
amêndoas de cacau e seu efeito na qualidade / Elia Wedja Renata  
Corrêa Nascimento. – Viçosa, MG, 2025.  
1 dissertação eletrônica (44 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Ernandes Rodrigues de Alencar.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Engenharia Agrícola, 2025.

Referências bibliográficas: f. 38-44.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.694>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cacau - Doenças e pragas - Controle. 2. Fungos  
fitopatogênicos - Controle - Efeito do ozônio. 3. *Aspergillus* -  
Controle - Efeito do ozônio. 4. Cacau - Qualidade - Efeito do  
ozônio. I. Alencar, Ernandes Rodrigues de, 1980-  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia  
Agrícola. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola.  
III. Título.

CDD 22. ed. 633.7494657

**ELIA WEDJA RENATA CORRÊA NASCIMENTO**

**Ozônio na inativação de fungos micotoxigênicos em amêndoas de cacau e seu efeito na qualidade**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2025.

Assentimento:

---

Elia Wedja Renata Corrêa Nascimento  
Autora

---

Ernandes Rodrigues de Alencar  
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 24/10/2025 às 06:45:04 e pelo orientador em 24/10/2025 às 07:09:42. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **IIEV.9L58.RES8** e clique no botão 'Validar documento'.

*Aos meus pais e avós, meus maiores alicerces.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ser meu ouvinte e por me ter proporcionado tantas conquistas.

À minha mãe, por ter sido o alicerce do que construí ao longo desses anos de formação.

Aos meus avós, por todo o conhecimento e valores repassados durante toda a minha vida.

À minha irmã, um raio de luz em nossas vidas, por quem tenho imensa admiração, mesmo sendo tão nova.

À minha família, meu pai, tios e tias, primos e primas, por todo o carinho e a sensação de pertencimento.

A Pedro Severnini, por ser um verdadeiro amigo e estar ao meu lado nos momentos de tristeza e alegria ao longo deste ciclo.

Aos colegas de laboratório que se tornaram verdadeiros amigos e que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho, em especial: Vivian Gabriela, Wellerson Oliveira, Ebinezer Monteiro, Diana Magalhães, Samara Braga, Carollayne Magalhães, Camila Lessa, Emanuel Henrique, Francisco Siteo e Gleison Silva.

À Jéssica Silva e Letícia Rossi, profissionais excepcionais que contribuíram com todo o conhecimento e competência, e por serem parceiras e amigas.

Ao meu orientador, Ernandes Rodrigues de Alencar, pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## RESUMO

NASCIMENTO, Elia Wedja Renata Corrêa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025. **Ozônio na inativação de fungos micotoxigênicos em amêndoas de cacau e seu efeito na qualidade.** Orientador: Ernandes Rodrigues de Alencar.

Durante seu processamento, amêndoas de cacau são expostas a condições que propiciam o crescimento de fungos filamentosos responsáveis pela síntese de micotoxinas, gerando perda de qualidade e riscos ao consumo. Desse modo, faz-se necessário adotar medidas para evitar a proliferação desses fungos, sem que a qualidade seja comprometida. O presente estudo teve como objetivos: caracterizar o processo de saturação do ozônio em amêndoas de cacau; determinar o efeito do ozônio no percentual de infecção por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* em amêndoas de cacau em diferentes concentrações do gás e períodos de exposição; e analisar possíveis efeitos da ozonização na qualidade das amêndoas de cacau. No processo de ozonização foi adotada a vazão específica de ar de  $1 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1} \text{ t}^{-1}$ , a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , três diferentes concentrações de entrada ( $1,60$ ,  $3,10$  e  $7,00 \text{ mg L}^{-1}$ ) e quatro tempos de exposição (3, 6, 9 e 12 h). O tempo saturação e a concentração da saturação referente à concentração de entrada de  $1,6 \text{ mg L}^{-1}$  foram de 0,51 h e  $0,94 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. Com a concentração de entrada de  $3,10 \text{ mg L}^{-1}$ , o tempo de saturação foi de 0,35 h, e a concentração de saturação foi de  $2,02 \text{ mg L}^{-1}$ . Para a concentração de entrada de  $7,00 \text{ mg L}^{-1}$ , o tempo saturação foi de 0,33 h e a concentração de saturação foi de  $3,78 \text{ mg L}^{-1}$ . O ozônio mostrou-se eficaz na inativação fúngica, reduzindo a infecção inicial em 44,50% para *Aspergillus flavus* e 61,60% para *A. niger* após 3 horas de exposição, independentemente da concentração aplicada. A ozonização não promoveu alterações significativas nos parâmetros de teor de água, acidez titulável, capacidade antioxidante e tonalidade de cor das amêndoas. Observou-se, entretanto, redução no pH após 12 horas de tratamento com  $7,00 \text{ mg L}^{-1}$  de ozônio. O teor de compostos fenólicos totais aumentou em relação ao controle em todas as concentrações testadas, atingindo o máximo de  $854,23 \pm 4,82 \text{ mg equivalentes de ácido gálico por } 100 \text{ g}^{-1}$  após 3 h de exposição na concentração de  $7,00 \text{ mg L}^{-1}$ . Embora não tenham ocorrido diferenças significativas no teor de antocianinas ao longo do tempo dentro de cada concentração, após 12 h de ozonização, as amêndoas tratadas com  $3,10 \text{ mg L}^{-1}$  apresentaram maior valor ( $26,51 \pm 7,40 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) em comparação às concentrações de  $1,60 \text{ mg L}^{-1}$  ( $13,97 \pm 2,54$ ) e  $7,00 \text{ mg L}^{-1}$  ( $17,57 \pm 3,68$ ). O tratamento com  $7,00 \text{ mg L}^{-1}$  também resultou em valor de cor ligeiramente

superior ( $7,45 \pm 0,74$ ) em relação às concentrações de 1,60 e 3,10 mg L<sup>-1</sup> ( $6,45 \pm 0,62$  e  $6,77 \pm 0,65$ ), respectivamente. Conclui-se que: (i) o processo de saturação do ozônio nas amêndoas apresentou comportamento crescente até a estabilização, com tempo e concentração de saturação proporcionais à concentração de entrada; (ii) a infecção por *A. flavus* e *A. niger* pode ser significativamente reduzida com 1,60–7,00 mg L<sup>-1</sup> de ozônio por 3 h de exposição; (iii) o tratamento, especialmente nas concentrações de 3,10 e 7,00 mg L<sup>-1</sup>, pode elevar os teores de compostos fenólicos totais e antocianinas nas amêndoas de cacau.

Palavras-chave: ozonização; *Theobroma cacao* L; compostos fenólicos; controle de fungos

## ABSTRACT

NASCIMENTO, Elia Wedja Renata Corrêa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2025. **Ozone in the inactivation of mycotoxigenic fungi in cocoa beans and its effect on quality.** Adviser: Ernandes Rodrigues de Alencar.

During processing, cocoa beans are exposed to conditions that favor the growth of filamentous fungi responsible for mycotoxin synthesis, leading to quality loss and potential health risks. Therefore, it is essential to adopt control measures to prevent fungal proliferation without compromising product quality. The present study aimed to characterize the ozone saturation process in cocoa beans; determine the effect of ozone on the infection rate by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* under different gas concentrations and exposure times; and evaluate possible effects of ozonation on the quality attributes of cocoa beans. Ozonation was performed using a specific air flow rate of  $1.00 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1} \text{ t}^{-1}$  at  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , with three inlet ozone concentrations ( $1.60$ ,  $3.10$ , and  $7.00 \text{ mg L}^{-1}$ ) and four exposure periods (3, 6, 9, and 12 h). For the inlet concentration of  $1.60 \text{ mg L}^{-1}$ , the saturation time and corresponding saturation concentration were  $0.51 \text{ h}$  and  $0.94 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively. At  $3.10 \text{ mg L}^{-1}$ , the saturation time was  $0.35 \text{ h}$  and the saturation concentration  $2.02 \text{ mg L}^{-1}$ ; while at  $7.00 \text{ mg L}^{-1}$ , the saturation time and concentration were  $0.33 \text{ h}$  and  $3.78 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively. Ozone proved effective in fungal inactivation, reducing initial infection by  $44.50\%$  for *A. flavus* and  $61.60\%$  for *A. niger* after 3 hours of exposure, regardless of the concentration used. Ozonation did not cause significant changes in moisture content, titratable acidity, antioxidant capacity, or color tone of the beans. However, a pH reduction was observed after 12 hours of treatment with  $7.00 \text{ mg L}^{-1}$  ozone. The total phenolic content increased in all concentrations compared to the control, reaching a maximum of  $854.23 \pm 4.82 \text{ mg gallic acid equivalents per } 100 \text{ g}^{-1}$  after 3 h of exposure at  $7.00 \text{ mg L}^{-1}$ . Although no significant differences in anthocyanin content were observed within each concentration over time, after 12 h of ozonation, beans treated with  $3.10 \text{ mg L}^{-1}$  showed the highest value ( $26.51 \pm 7.40 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) compared to  $1.60 \text{ mg L}^{-1}$  ( $13.97 \pm 2.54$ ) and  $7.00 \text{ mg L}^{-1}$  ( $17.57 \pm 3.68$ ). The treatment with  $7.00 \text{ mg L}^{-1}$  also resulted in a slightly higher chroma ( $C^*$ ) value ( $7.45 \pm 0.74$ ) than those obtained with  $1.60 \text{ mg L}^{-1}$  ( $6.45 \pm 0.62$ ) and  $3.10 \text{ mg L}^{-1}$  ( $6.77 \pm 0.65$ ). It can be concluded that: (i) the ozone saturation process in cocoa beans showed a progressive increase until stabilization, with saturation time and concentration proportional to the inlet concentration; (ii) fungal infection by *A. flavus* and *A. niger* can be significantly reduced using  $1.60\text{-}7.00 \text{ mg}$

L<sup>-1</sup> ozone for 3 h of exposure; (iii) treatment, particularly at 3.10 and 7.00 mg L<sup>-1</sup>, can enhance total phenolic and anthocyanin contents in cocoa beans.

Keywords: ozonation; *Theobroma cacao* L; phenolic compounds; fungal control

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Esquema experimental adotado com a disposição dos equipamentos e protótipo para realização da aplicação de ozônio em amêndoas de cacau..... 19
- Figura 2.** Curvas de regressão de concentração residual do ozônio em função do período de exposição em amêndoas de cacau, para concentrações de entrada de 1,60, 3,10 e 7,00 mg L<sup>-1</sup> (C<sub>0</sub>) e vazão específica de 1 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> t.....25
- Figura 3.** Curvas de regressão referentes ao percentual de infecção por *A. flavus* e por *A. niger* em amêndoas de cacau, em função do período de ozonização, independentemente da concentração do ozônio, na vazão específica de 1,0 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> t<sup>1</sup>.....26
- Figura 4.** Valores médios de croma (C\*) em amêndoas de cacau, em diferentes concentrações de entrada do ozônio, independentemente do período de ozonização, na vazão específica de 1 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> t<sup>1</sup>.....31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Equações de regressão e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) de concentração residual do ozônio em função do período de exposição em amêndoas de cacau, para concentrações de entrada de 1,60, 3,10 e 7,00 mg L <sup>-1</sup> ( $C_0$ ) e vazão específica de 1 m <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> t <sup>-1</sup> .....	25
<b>Tabela 2.</b> Equações de regressão referentes ao percentual de infecção por <i>A. flavus</i> e por <i>A. niger</i> em função do período de ozonização (x), independentemente da concentração do ozônio, na vazão específica de 1,00 m <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> t <sup>-1</sup> .....	27
<b>Tabela 3.</b> Valores médio de pH e teores de fenólicos totais e de antocianinas totais em amêndoas de cacau ozonizadas, nas concentrações de 1,30; 3,10 e 7,00 mg L <sup>-1</sup> , por até 12 h, na vazão específica de 1 m <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> t <sup>-1</sup> .....	29
<b>Tabela 4.</b> Valores médios de luminosidade ( $L^*$ ) e diferença de cor ( $\Delta E^*$ ) em amêndoas de cacau, em função do período de ozonização, independentemente da concentração do ozônio, na vazão específica de 1 m <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> t <sup>-1</sup> . .....	30
<b>Tabela 5.</b> Valores médios de teor de água, acidez titulável, tonalidade de cor ( $h^*$ ) e capacidade antioxidante para os métodos ABTS e DPPH em amêndoas de cacau ozonizadas nas concentrações de 1,30; 3,10 e 7,00 mg L <sup>-1</sup> , por até 12 h, na vazão específica de 1 m <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> t <sup>-1</sup> .....	32

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
O <sub>3</sub>	Ozônio
UFV	Universidade Federal de Viçosa
nm	nanômetro
mg EAG g <sup>-1</sup>	miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
mM	milimolar
b.u.	Base úmida
μM TE g <sup>-1</sup>	micromol de equivalentes de Trolox por grama
ppm	partes por milhão

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Matéria Prima</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2. Obtenção do ozônio e método de quantificação</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3 Determinação do processo de saturação</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4 Efeito do ozônio no controle de <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus niger</i></b> .....	<b>18</b>
2.4.1 Inoculação das amêndoas de cacau com <i>A. flavus</i> e <i>A. niger</i> .....	18
2.4.2 Ozonização das amêndoas de cacau .....	18
2.4.3 Determinação do percentual de infecção por <i>A. flavus</i> e <i>A. niger</i> .....	20
<b>2.5 Qualidade das amêndoas de cacau expostas ou não ao ozônio</b> .....	<b>20</b>
2.5.1. Composição físico-química das amêndoas .....	20
2.5.2 Cor .....	21
2.5.3. Antocianinas, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante .....	21
2.5.3.1 Preparo dos extratos.....	21
2.5.3.2 Antocianinas .....	21
2.5.3.3 Compostos fenólicos totais .....	22
2.5.3.4 Capacidade antioxidante .....	22
2.5.3.4.1 Capacidade antioxidante por método DPPH .....	22
2.5.3.4.2 Capacidade antioxidante por método ABTS .....	23
<b>2.6 Delineamento Experimental</b> .....	<b>23</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 Processo de saturação do ozônio</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2 Infecção por <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus niger</i></b> .....	<b>26</b>
<b>3.3 Qualidade das amêndoas de cacau expostas ou não ao ozônio</b> .....	<b>27</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>37</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Theobroma cacao* L., originária da bacia Amazônica, é conhecida pela produção de amêndoas amplamente utilizadas na indústria de alimentos, especialmente na fabricação de chocolate e seus derivados (COPETTI et al., 2014; SCHWAN e WHEALS, 2004). Atualmente, a produção de cacau está concentrada na África Ocidental, sendo a Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria, Camarões e Brasil os principais países produtores (FAO, 2023). Em 2022, o mercado de amêndoas de cacau movimentou US\$ 8,29 bilhões, sendo o quarto lugar em valor comercializado dentre as culturas tropicais (OEC, 2022; BRENES et al., 2023).

As amêndoas de cacau apresentam elevada concentração de compostos fenólicos, especialmente flavonoides, reconhecidos por uma ampla gama de efeitos benéficos à saúde. Entre eles destaca-se a atividade antioxidante (responsável por neutralizar radicais livres), antimicrobiana, anti-inflamatória, antitrombótica, anti-hipertensiva, anticarcinogênica, antialérgica, imunomoduladora e cardioprotetora. Em razão desse conjunto de propriedades, o cacau é considerado um alimento com elevado potencial funcional (ŻYŻELEWICZ et al., 2020).

Devido à exigência da planta por climas tropicais, países com altas temperaturas e umidade relativa altas concentram a maior parte da produção. Há uma crescente preocupação global com a contaminação destes alimentos por fungos e seus metabólitos, cujo crescimento é influenciado pelas condições climáticas. Dados da Agência Internacional de pesquisa sobre câncer (IARC), apontam que aproximadamente 500 milhões de pessoas em regiões tropicais da África Subsaariana, América Latina e Ásia estão expostas a altos níveis de micotoxinas. (NEME e MOHAMMED, 2017; WILD et al., 2015).

Conforme destacado por Delgado-Ospina et al. (2021), as amêndoas de cacau são expostas a agentes microbianos ao longo de todo seu processamento. Durante a colheita, os frutos, cuja parte interna é considerada estéril, são quebrados, e as sementes, ainda envoltas pela polpa mucilaginosa, são transportadas para estruturas específicas onde ocorre a fermentação. Segundo Copetti et al. (2014) as primeiras contaminações por agentes microbianos, como fungos filamentosos, têm início a partir do contato com os trabalhadores e as ferramentas utilizadas durante a colheita.

Uma etapa essencial no processamento do cacau é a fermentação. Na fase inicial, a fermentação do cacau é responsável pela acidificação do meio e aumento da

temperatura (COPETTI et al., 2014). Contudo, a partir do quinto dia de fermentação, observa-se a formação de esporos de fungos filamentosos, que podem estabelecer-se durante a secagem e armazenamento e comprometer a qualidade das amêndoas (SCHWAN e WHEALS, 2004; ROMANENS et al., 2019; MARWATI et al., 2024).

A secagem das amêndoas de cacau é frequentemente feita sob exposição ao sol (TARDZENYUY et al., 2020). Essa prática é popular entre pequenos agricultores devido aos elevados custos da secagem mecânica, que muitas vezes é considerada inviável neste setor (DZELAGHA et al., 2020). No entanto, a secagem ao sol pode favorecer a contaminação fúngica, uma vez que expõe as amêndoas a condições de elevada temperatura e umidade relativa, criando um ambiente propício ao desenvolvimento de fungos indesejáveis (COPETTI et al., 2014). Em estudo com amêndoas de cacau provenientes da África, Akinfala et al. (2020) constataram a ocorrência de espécies como *Aspergillus niger* e *Penicillium citrinum* logo após a fermentação, e durante a secagem e armazenamento.

As espécies de fungos ocratoxigênicas *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus ochraceus*, assim como ocratoxina A, foram detectadas nas etapas do processamento do cacau em estudo realizado por Copetti et al. (2010), com maior incidência durante a secagem e armazenamento. Níveis de ocratoxina A também foram detectados em produtos derivados do cacau e chocolate originados de amêndoas de vários países, em concentrações baixas (BONVEHÍ, 2004; COPETTI et al., 2013). A ocratoxina A é classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), como um agente do grupo 2B, ou seja, possivelmente carcinogênico para humanos (IARC, 1993).

Pires et al. (2019) constataram que 16% das amostras de cacau brasileiras analisadas em seu estudo continham níveis detectáveis de aflatoxinas, metabólitos produzidos por cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. As aflatoxinas são classificadas como carcinógenos de classe 1A pela IARC (IARC, 2012), e a sua exposição, tanto aguda quanto crônica, pode ter impactos significativos em grupos vulneráveis, especialmente crianças (MEDINA et al., 2014).

Devido aos graves riscos à saúde associados à exposição a micotoxinas, estabeleceram-se limites máximos dessas substâncias em alimentos importados em diversos países. Conforme estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o nível máximo tolerado para ocratoxina A e aflatoxinas totais em amêndoas de cacau no Brasil é de 10  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  para ambas as micotoxinas (BRASIL,

2021). A União Europeia estabelece um limite máximo de  $3,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para ocorrência de ocratoxina A em cacau em pó (EU, 2023).

Conforme demonstrado por Janik et al. (2020) e Agriopoulou et al. (2020), as micotoxinas podem ser resistentes à altas temperaturas, pressão, radiação e solventes químicos. Fleurat-Lessard (2017) sugere que o controle da atividade fúngica durante o armazenamento é uma estratégia viável para prevenir a síntese de micotoxinas prejudiciais à saúde humana e animal. Nesse contexto, tratamentos biológicos, físicos e químicos estão sendo estudados para eliminação de fungos toxigênicos (FLEURAT-LESSARD, 2017; MOHAPATRA et al., 2017).

O ozônio ( $\text{O}_3$ ) tem demonstrado eficácia na redução da contagem de fungos e diminuição da contaminação por micotoxinas em alimentos (ALENCAR et al., 2012; CONTE et al., 2020; DEMIRCI et al., 2023). O principal alvo desse tratamento é a parede celular dos microrganismos, em que a reação de oxidação provocada pelo ozônio causa o extravasamento do conteúdo intracelular. Além disso, o ozônio promove a oxidação de glicoproteínas e glicolipídios da membrana celular (XUE et al., 2023).

Devido à sua alta instabilidade, o ozônio gasoso se decompõe rapidamente em oxigênio, sem deixar resíduos na massa de grãos. Assim, o ozônio emerge como uma alternativa interessante para a descontaminação de amêndoas de cacau, as quais são altamente sensíveis a aromas e resíduos que comprometem sua qualidade (FREITAS-SILVA et al., 2013; COPETTI et al., 2014; DZELAGHA et al., 2020).

Embora o ozônio em sua forma gasosa e dissolvido em água tenham demonstrado eficácia no controle de fungos e micotoxinas em diversos produtos agrícolas (SAVI et al., 2014; ISIKBER e ATHANASSIOU, 2015; AFSAH-HEJRI et al., 2020; GOMES et al., 2023; BHAVITHA et al., 2024), a pesquisa sobre o uso desse gás em amêndoas de cacau ainda é limitada. Portanto, é necessário avaliar os efeitos desse tratamento na descontaminação de amêndoas de cacau e se o ozônio pode afetar suas características físicas e químicas, de tal forma a influenciar a sua comercialização.

Desse modo, o presente estudo teve como objetivos: (i) caracterizar o processo de saturação do ozônio em meio poroso com amêndoas de cacau; (ii) determinar o efeito do ozônio no percentual de infecção por *A. flavus* e *A. niger* em amêndoas de cacau em diferentes concentrações do gás e períodos de exposição; (iii) analisar possíveis efeitos da ozonização na qualidade das amêndoas de cacau submetidas

aos tratamentos. Os resultados obtidos no trabalho podem contribuir para o desenvolvimento e a consolidação de um novo método de desinfecção de amêndoas de cacau, visando à segurança alimentar frente ao risco de contaminação por micotoxinas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Matéria Prima

Foram utilizadas amêndoas de cacau fermentadas e secas, com teor de água de aproximadamente 8,0% base úmida (b.u.). As amêndoas foram adquiridas na Cooperativa dos cacauicultores do Sul da Bahia (COOPERCABRUCA), Itabuna – BA.

### 2.2. Obtenção do ozônio e método de quantificação

A ozonização foi realizada no Laboratório de Pós-colheita da Universidade Federal de Viçosa - UFV, em Viçosa-MG. Foi utilizado gerador de ozônio da marca *Ozone & Life*, modelo O&L3 ORM, utilizando-se como insumo ar oxigênio (O<sub>2</sub>), obtido de concentrador de oxigênio medicinal. A quantificação do O<sub>3</sub> foi feita por meio do método iodométrico com titulação indireta, conforme descrito por Eaton et al. (2000).

### 2.3 Determinação do processo de saturação

Inicialmente, amostras de 2,00 kg de amêndoas de cacau foram dispostas em protótipo cilíndrico de PVC, de 0,17 m de altura e 0,30 m de diâmetro, dotado de tela metálica perfurada, posicionada a 0,05 m do fundo, permitindo a passagem de ar através das amêndoas. Foram determinados o tempo de saturação e a concentração de saturação. Para isso, o gás foi injetado a partir da base do protótipo, adotando-se vazão de entrada de 1,00 m<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup>·t<sup>-1</sup>, mantendo-se a temperatura de 20 °C e concentrações de entrada de 1,60, 3,10 e 7,00 mg L<sup>-1</sup>. Tais concentrações foram obtidas a partir das posições 0, 1 e 2 do dosador acoplado ao gerador de ozônio, respectivamente. A concentração de saída do gás foi medida após sua passagem pelo produto, em intervalos de tempo regulares até a estabilização, conforme o método proposto por Santos et al. (2007). Para relacionar a concentração de saída do gás ozônio com o tempo, os dados obtidos foram ajustados à equação sigmoidal (Equação 1).

$$C = \left[ \frac{a}{1 + e^{-\frac{t-b}{c}}} \right]$$

Equação 1

Em que:

C = concentração do gás ozônio ( $\text{mg L}^{-1}$ ); t = tempo (min); a, b e c = parâmetros da equação.

Após a determinação dos parâmetros a, b e c, o tempo de saturação para amêndoas de cacau foi obtido através da equação 2.

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

Em que:

$t_{sat}$  = tempo de saturação (min)

## 2.4 Efeito do ozônio no controle de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*

### 2.4.1 Inoculação das amêndoas de cacau com *A. flavus* e *A. niger*

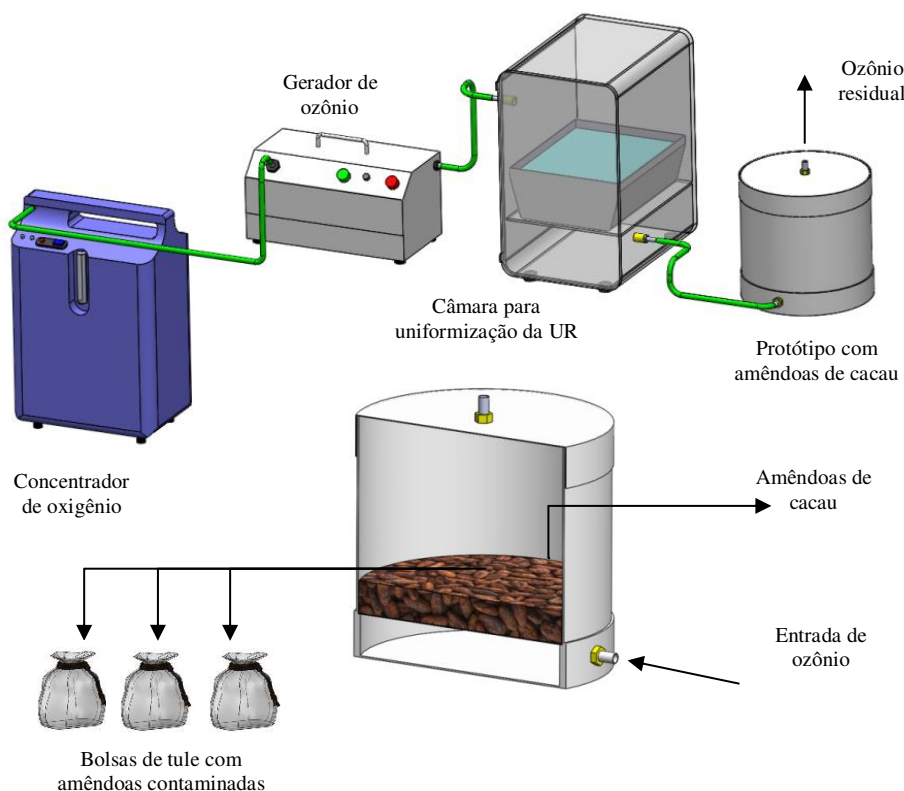
Para a inoculação foram utilizados isolados das espécies *A. flavus* e *A. niger*. O *A. flavus* foi cultivado em meio de cultura extrato de malte ágar (MEA) por trinta dias, e o *A. niger* foi cultivado por sete dias, em arroz cozido. Em seguida, adicionou-se água destilada estéril com tween ao material, que foi filtrado para obtenção de uma suspensão concentrada de esporos. A suspensão foi homogeneizada e retirada uma alíquota para contagem dos esporos, sob microscópio, em câmara de Neubauer. Por meio de diluições, a suspensão foi ajustada em  $10^6$  esporos. $\text{mL}^{-1}$ . Foram utilizadas amostras de 2,00 kg de amêndoas de cacau para inoculação dos fungos *A. flavus* e *A. niger*. Cada amostra foi inicialmente imersa em solução de hipoclorito de sódio a 1% por um minuto, com o objetivo de eliminar a microbiota natural. Em seguida, as amêndoas foram mergulhadas nas suspensões de esporos por 10 minutos e, depois, secas em exaustor sob fluxo de ar constante. Foram separadas as amostras controle (inoculadas e sem ozonização) e amostras tratadas com ozônio em diferentes concentrações e tempos de exposição. Todas as amostras foram mantidas em câmara fria, em  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  até a realização dos tratamentos.

### 2.4.2 Ozonização das amêndoas de cacau

Nessa etapa, foi adotado procedimento descrito no item 2.3. Em um protótipo de PVC cilíndrico (Figura 1), foram adicionados de 2,00 kg de amêndoas de cacau, em 3 repetições. Para ajuste da umidade relativa do ar de ozonização, utilizou-se uma

câmara hermética com bandejas contendo solução salina de cloreto de sódio e água na proporção de 5:10 v/v. Em cada ozonização, foram utilizadas amostras de 30 g, divididas em duas subamostras de 15 g, previamente inoculadas com *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. As subamostras foram acondicionadas em duas bolsas de tecido tule (15 g por bolsa) e distribuídas aleatoriamente dentro da massa de grãos no protótipo. As amostras foram expostas ao gás em 3 concentrações de entrada (1,60; 3,10 e 7,00 mg. L<sup>-1</sup>) e 5 diferentes tempos de exposição: 0 (não tratadas), 3, 6, 9 e 12 h. Após os tratamentos, as amostras foram mantidas em câmara fria, em 5 ± 3°C até a realização das demais análises.

**Figura 1** - Esquema experimental adotado com a disposição dos equipamentos e protótipo para realização da aplicação de ozônio em amêndoas de cacau.



### 2.4.3 Determinação do percentual de infecção por *A. flavus* e *A. niger*

Após a ozonização, as amêndoas contidas nas bolsas de tecido tule foram acondicionadas em sacos plásticos *zip lock* 0,60x8,50 cm e quebradas com auxílio de um alicate, separando as cascas dos nibs. Com auxílio de uma pinça estéril foram retirados fragmentos de nibs dos sacos plásticos, de diâmetros semelhantes, para verificar a porcentagem de infecção das amêndoas.

O percentual de amêndoas infectadas foi determinado pelo método de plaqueamento direto em meios de cultura seletivos. Para amostras inoculadas com *A. niger*, utilizou-se o meio Batata Dextrose Ágar (BDA) acidificado com ácido tartárico a 10% (PITT e HOCKING, 2009), enquanto para *A. flavus* empregou-se o meio *Aspergillus flavus and parasiticus* Ágar (AFPA). Em cada placa de Petri foram dispostos 10 fragmentos de amêndoas. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas em BOD a 25 °C por 5 dias para amostras em meio BDA, e 30 °C por 48 h para as amostras em meio AFPA.

A determinação da porcentagem de fragmentos infectados nas placas contendo meio BDA baseou-se na observação de colônias com características morfológicas típicas de *A. niger*. Já nas placas com meio AFPA, consideraram-se infectados os fragmentos que apresentaram colônias com coloração amarelada no verso da placa, que caracterizam colônias de *A. flavus* nesse meio de cultura (PITT e HOCKING, 2009). Os resultados foram expressos como a porcentagem de fragmentos infectados.

## 2.5 Qualidade das amêndoas de cacau expostas ou não ao ozônio

### 2.5.1. Composição físico-química das amêndoas

O teor de água para amêndoas de cacau foi determinado utilizando-se estufa com circulação de ar, à temperatura de 105±2 °C até o peso constante, de acordo com a metodologia descrita por Brasil (2009). O pH das amostras foi determinado de acordo com o método 31.1.07 da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1985). Foram pesadas 5,00 g de amêndoas de cacau trituradas em liquidificador PH900 (Philco, Curitiba, Brasil) e adicionadas em béquer com 50 mL de água destilada. A mistura foi agitada em agitador magnético por 2 min e a leitura do pH foi feita a em pHmetro de bancada modelo K39-1410A (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil). A acidez total titulável foi determinada segundo método 312/IV do Instituto

Adolfo Lutz (IAL, 2008), utilizando-se solução de hidróxido de sódio a 0,10 N padronizada.

### 2.5.2 Cor

A análise da cor das amêndoas de cacau submetidas ou não a ozonização foi feita em colorímetro modelo CR410 (Konica Minolta, Osaka, Japão), obtendo-se as coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  do sistema Hunter. Os valores das coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  foram utilizados para calcular a tonalidade de cor ( $h^*$ ) (Equação 3), a saturação de cor ou croma ( $C^*$ ) (Equação 4), e a diferença de cor ( $\Delta E^*$ ) (Equação 5).

$$h^* = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad \text{Equação 3}$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Equação 4}$$

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^* - L^{*0})^2 + (a^* - a^{*0})^2 + (b^* - b^{*0})^2} \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

$L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ : Coordenadas das amostras expostas ao ozônio;  $L^{*0}$ ,  $a^{*0}$  e  $b^{*0}$ : Coordenadas das amostras que não foram expostas ao ozônio.

### 2.5.3. Antocianinas, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

#### 2.5.3.1 Preparo dos extratos

Utilizaram-se amostras de 1,00 g de amêndoas trituradas e adicionadas em 10 mL de solvente composto por etanol e água na proporção de 80:20 (v/v). A mistura foi agitada em agitador rotativo por 1 h a 80 rpm e, em seguida, centrifugada a 5000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado para as demais análises.

#### 2.5.3.2 Antocianinas

A quantificação de antocianinas foi feita de acordo com a metodologia de Fuleki e Francis (1968). Alíquotas do extrato foram diluídas em solução etanol-HCl 1,5 N (85:15, v/v), e transferidas para microplaca. A quantificação das antocianinas foi realizada por espectrofotometria, utilizando-se leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific, Multiskan Skyhigh), medindo-se a absorbância a 535 nm. Os valores de absorbância foram corrigidos pela subtração da leitura do branco (etanol-HCl 1,5 N).

A concentração de antocianinas foi expressa em mg de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo por 100 g de amostra, utilizando-se a Equação 6.

$$C' = (A \cdot FD \cdot 449,2) / (26900 \cdot b) \cdot 10$$

Equação 6

Em que:

C': Teor de antocianinas totais (mg eq.de cianidina-3-glicosídeo/100g);

A: Absorbância em 535 nm;

FD: Fator de diluição do extrato;

b: Espessura do poço de microplaca (0,7 cm).

### 2.5.3.3 Compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais dos extratos foi realizada segundo a metodologia de Singleton e Rossi (1965), adaptada por Cândido et al. (2015). Alíquotas de 500  $\mu$ L de uma solução de carbonato de sódio a 7,50% foram adicionadas a 100  $\mu$ L do extrato etanólico diluído em proporção de 1:10. A mistura foi agitada por 3 min e, em seguida, adicionou-se 400  $\mu$ L da solução do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:10). A reação foi mantida protegida da luz durante 1 h. Após esse período, as leituras de absorbância foram realizadas a 760 nm, utilizando leitor de microplacas (Thermo Fisher Scientific, Multiskan Skyhigh). Para essa análise, utilizou-se uma curva padrão de ácido gálico, e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de amostra (mg EAG  $g^{-1}$  de amostra).

### 2.5.3.4 Capacidade antioxidante

#### 2.5.3.4.1 Capacidade antioxidante por método DPPH

A análise da capacidade antioxidante pelo método de eliminação do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi realizada utilizando a metodologia de Brand-Williams et al. (1995) com modificações, mais recentemente adaptada por Cândido et al. (2015). Primeiramente, foi preparada a curva padrão do radical DPPH, usando etanol 80% (v/v) como branco. Foram preparadas quatro diluições diferentes em triplicata utilizando os extratos obtidos de cada amostra. Em seguida, 100  $\mu$ L de cada diluição preparada da amostra foram transferidos para poços de 2 mL em uma microplaca, e

adicionou-se 700  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH (0,1  $\mu\text{mol/L}$ ). As absorvâncias das misturas foram determinadas a 517 nm após 1 h de reação. A atividade antioxidante foi calculada utilizando curvas padrão de Trolox, e os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de Trolox por g de amostra ( $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

#### 2.5.3.4.2 Capacidade antioxidante por método ABTS

A capacidade antioxidante pelo método de captura do radical Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS) foi realizada utilizando a metodologia de Re et al. (1999), com modificações de Cândido et al. (2015). O radical ABTS foi obtido pela reação de soluções na mesma proporção de 7 mM de ABTS e 2,45 mM de persulfato de potássio. A solução foi colocada em banho-maria a 50 °C por 15 minutos. Após esse período, a solução foi diluída com etanol a 80% até atingir absorvância de  $0,700 \pm 0,005$  a 734 nm. Para a análise, 100  $\mu\text{L}$  da diluição do extrato da amostra foram misturados com 700  $\mu\text{L}$  da solução do radical ABTS, permanecendo em reação por 6 min. As leituras de absorvância foram realizadas a 734 nm em leitor de microplacas. Foram utilizadas quatro diluições diferentes do extrato em etanol 80% para a construção da curva da amostra. A curva padrão de Trolox também foi construída para elaboração dos cálculos. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de Trolox por g de amostra ( $\mu\text{M TE}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

## 2.6 Delineamento Experimental

Foi adotado Delineamento Inteiramente Casualizado com três repetições. Para o processo de saturação, foram adotadas três concentrações do ozônio, sendo 1,60; 3,10 e 7,00  $\text{mg L}^{-1}$ . Quanto ao efeito do ozônio na inativação de *A. flavus* e *A. niger* e na qualidade de amêndoas de cacau, foi adotado esquema fatorial 3x5, sendo três concentrações do ozônio (1,60 3,10 e 7,00  $\text{mg L}^{-1}$ ) e cinco tempo de exposição (0, 3, 6, 9 e 12 h). Inicialmente foi realizada Análise de Variância, e posteriormente teste de Tukey a 5% de probabilidade ou análise de regressão. Foram utilizados o software StatPlus 5.0 (AnalystSoft Inc), para a análise de variância e teste Tukey, e o software SigmaPlot versão 10.0 (Systat Software Inc), para a obtenção das equações de regressão e plotagem dos gráficos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Processo de saturação do ozônio

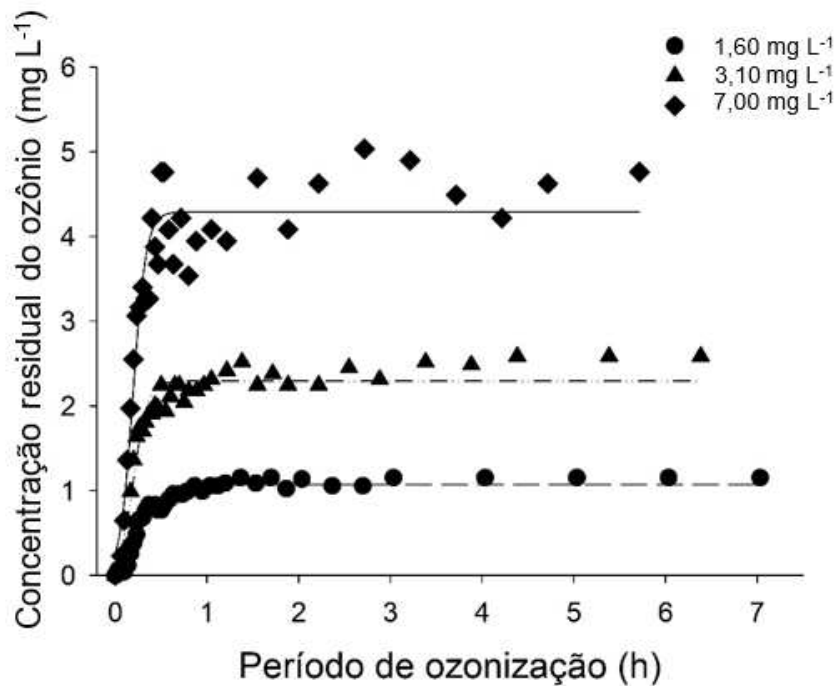
A quantificação da concentração residual de ozônio em função do tempo de exposição foi realizada para amêndoas de cacau submetidas a três diferentes concentrações de entrada do gás ( $C_0$ ), a saber: 1,60 mg L<sup>-1</sup>, 3,10 mg L<sup>-1</sup> e 7,00 mg L<sup>-1</sup>, sob uma vazão específica de 1 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> t<sup>-1</sup> (Figura 2 e Tabela 1). Ajustou-se equações de regressão aos dados, as quais permitiram estimar parâmetros relevantes ao processo, como o tempo de saturação ( $t_{sat}$ ), a concentração de saturação ( $C_{sat}$ ), bem como a razão entre a  $C_{sat}$  e a concentração de entrada ( $C_0$ ).

As curvas de regressão ajustadas apresentaram elevados coeficientes de determinação ( $R^2$ ), demonstrando a adequação dos modelos propostos à descrição do comportamento da concentração residual em função do tempo de ozonização. Especificamente, os valores de  $R^2$  foram de 0,95 para a concentração de entrada de 1,60 mg L<sup>-1</sup>, 0,94 para 3,10 mg L<sup>-1</sup> e 0,92 para 7,00 mg L<sup>-1</sup>.

No que se refere ao tempo de saturação ( $t_{sat}$ ), identificou-se uma redução expressiva desse parâmetro com o aumento da concentração de entrada. Para  $C_0$  de 1,60 mg L<sup>-1</sup>, o tempo de saturação foi estimado em 0,51 h; para  $C_0$  de 3,10 mg L<sup>-1</sup>, em 0,35 h; e para  $C_0$  de 7,00 mg L<sup>-1</sup>, 0,33 h. Essa tendência evidencia que concentrações mais elevadas de ozônio promovem uma saturação mais rápida no sistema.

A concentração de saturação ( $C_{sat}$ ) apresentou aumento gradual conforme o acréscimo da concentração de entrada, atingindo os valores de 0,94 mg L<sup>-1</sup>, 2,02 mg L<sup>-1</sup> e 3,78 mg L<sup>-1</sup> para  $C_0$  de 1,60 mg L<sup>-1</sup>, 3,10 mg L<sup>-1</sup> e 7,00 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Tal comportamento era esperado, uma vez que maiores concentrações de entrada implicam em maiores concentrações residuais ao final do processo de saturação. No entanto, é importante observar a relação entre a concentração de saturação e a concentração de entrada, expressa pela razão  $C_{sat} / C_0$ , que fornece uma estimativa da fração de ozônio que efetivamente permanece no sistema após o período de exposição. Essa razão variou de forma não linear entre os tratamentos, sendo de 0,59 para  $C_0$  de 1,60 mg L<sup>-1</sup>, 0,65 para  $C_0$  de 3,10 mg L<sup>-1</sup> e 0,54 para  $C_0$  de 7,00 mg L<sup>-1</sup>.

**Figura 2.** Curvas de regressão de concentração residual do ozônio em função do período de exposição em amêndoas de cacau, para concentrações de entrada de 1,60, 3,10 e 7,00 mg L<sup>-1</sup> (C<sub>0</sub>) e vazão específica de 1 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> t<sup>-1</sup>.



**Tabela 1.** Equações de regressão e coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) de concentração residual do ozônio em função do período de exposição em amêndoas de cacau, para concentrações de entrada de 1,60, 3,10 e 7,00 mg L<sup>-1</sup> (C<sub>0</sub>) e vazão específica de 1 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> t<sup>-1</sup>.

Concentração de entrada (mg L <sup>-1</sup> )	Equações ajustadas	R <sup>2</sup>	EPE	t <sub>Sat</sub> (h)	C <sub>Sat</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	C <sub>Sat</sub> /C <sub>0</sub>
1,60	$\hat{y} = \frac{1,0678}{1 + e^{-\left(\frac{x-0,2784}{0,1151}\right)}}$	0,95	0,0862	0,51	0,94	0,59
3,10	$\hat{y} = \frac{2,2906}{1 + e^{-\left(\frac{x-0,2023}{0,0745}\right)}}$	0,94	0,1857	0,35	2,02	0,65
7,00	$\hat{y} = \frac{4,2889}{1 + e^{-\left(\frac{x-0,1952}{0,0711}\right)}}$	0,92	0,4159	0,33	3,78	0,54

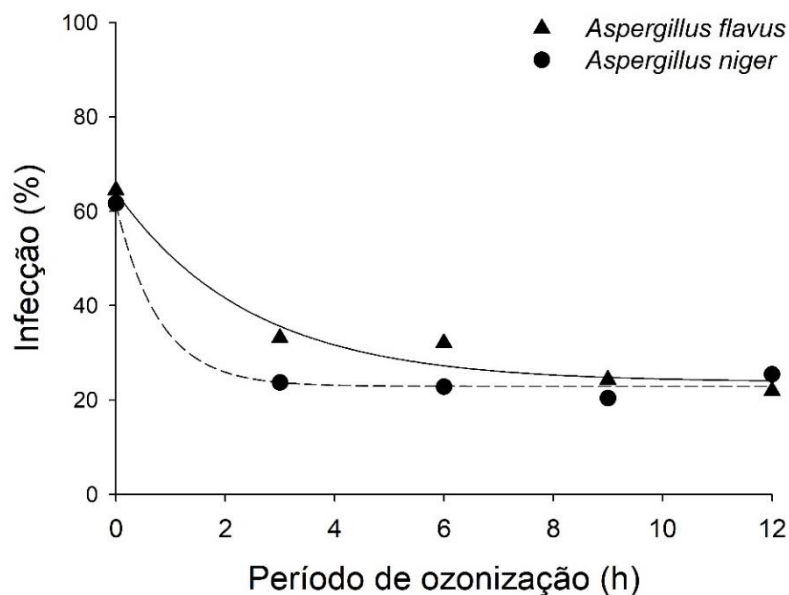
EPE – Erro padrão da estimativa; t<sub>Sat</sub> – tempo de saturação (h); C<sub>Sat</sub> – concentração de saturação (mg L<sup>-1</sup>); C<sub>Sat</sub>/C<sub>0</sub> – relação entre C<sub>Sat</sub> e C<sub>0</sub>.

### 3.2 Infecção por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*

De acordo com a análise de variância, não houve variação significativa do percentual de infecção por *A. flavus* e por *A. niger* ( $p > 0,05$ ) nas amêndoas de cacau, em decorrência da interação entre concentração de entrada e período de ozonização. Verificou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente em decorrência do período de ozonização, independentemente da concentração de entrada do gás.

Na Figura 3 e na Tabela 2, é possível observar as curvas de regressão e as equações de regressão, respectivamente, para ambos as espécies de fungos nas amêndoas de cacau, ao longo do período de ozonização de 12 h. As equações de regressão apresentaram bom ajuste aos dados experimentais, com  $R^2$  de 0,97 para *A. flavus* e 0,99 para *A. niger*, e erros padrão da estimativa (EPE) de 4,14 e 2,53, respectivamente.

**Figura 3.** Curvas de regressão referentes ao percentual de infecção por *A. flavus* e por *A. niger* em amêndoas de cacau, em função do período de ozonização, independentemente da concentração do ozônio, na vazão específica de  $1 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1} \text{ t}^{-1}$



**Tabela 2.** Equações de regressão referentes ao percentual de infecção por *A. flavus* e por *A. niger* em função do período de ozonização (x), independentemente da concentração do ozônio, na vazão específica de 1 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> t<sup>-1</sup>

Espécie	Equações ajustadas	R <sup>2</sup>	EPE
<i>A. flavus</i>	$\hat{y}=23,75+40,36e^{-0,41x}$	0,97	4,14
<i>A. niger</i>	$\hat{y}=22,85+38,82e^{-1,28x}$	0,99	2,53

EPE – Erro padrão da estimativa

Para *A. flavus*, o percentual de infecção inicial (tempo zero) foi estimado em 64,10%, com redução progressiva para 35,50% após 3 h de exposição ao ozônio, independentemente da concentração do gás. Esse resultado indica redução estimada de 44,50%, em relação ao percentual de infecção inicial. Para *A. niger*, estimou-se o percentual de infecção inicial em 61,70%, com redução para 23,70% ao final do mesmo período, o que equivale a uma redução de aproximadamente 61,60%, em percentual de infecção inicial. Esses resultados indicam que o tratamento com ozônio, independentemente das concentrações de entrada, foi eficiente na diminuição da atividade fúngica das duas espécies avaliadas, com desempenho superior para *A. niger*. É importante mencionar que depois de 3 h de ozonização, o percentual de infecção por *A. flavus* e por *A. niger* nas amêndoas de cacau permaneceram praticamente constantes.

### 3.3 Qualidade das amêndoas de cacau expostas ou não ao ozônio

No que se refere a qualidade das amêndoas de cacau expostas ao ozônio, obteve-se variação significativa ( $p<0,05$ ), em decorrência da interação entre concentração de entrada e período de ozonização, quando se consideram as variáveis pH, teor de fenólicos totais e teor de antocianinas totais. Por outro lado, o croma ou saturação de cor ( $C^*$ ) variou significativamente ( $p<0,05$ ) em decorrência da concentração do ozônio isoladamente. A luminosidade ( $L^*$ ) e a diferença de cor também variaram significativamente em decorrência do período de ozonização, independentemente da concentração de entrada do gás. Ademais, as variáveis teor de água, acidez titulável, tonalidade de cor ( $h^*$ ) e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS não variaram significativamente devido à interação entre

concentração de entrada e período de ozonização, assim como os fatores isoladamente.

Na Tabela 3, são apresentados os valores obtidos para as variáveis pH, fenólicos totais (mg EAG 100 g<sup>-1</sup>) e antocianinas totais (mg eq. cianidina-3-glicosídeo 100 g<sup>-1</sup>), nas amêndoas de cacau, nas diferentes combinações de concentração de entrada do gás e período de ozonização, na vazão específica de 1 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> t<sup>-1</sup>.

Os valores de pH das amêndoas de cacau tratadas com ozônio não apresentaram alterações significativas nas concentrações de entrada de 1,60 mg L<sup>-1</sup> e 3,10 mg L<sup>-1</sup>, mantendo-se próximos ao valor inicial de 5,68, ao longo das 12 h. No entanto, na maior concentração de entrada (7,0 mg L<sup>-1</sup>), observou-se redução significativa do pH após 3 e 9 h (5,61 e 5,62, respectivamente), com valor mínimo de 5,46, depois de 12 h, o que pode indicar ligeira acidificação pelo tratamento.

O teor de fenólicos totais aumentou em todos os tratamentos ao longo do tempo, sendo mais expressivo nas concentrações de entrada do ozônio de 3,10 e 7,00 mg L<sup>-1</sup>. Na concentração de entrada de 7,00 mg L<sup>-1</sup>, o teor de fenólicos totais atingiu 854,23 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>, depois de 6 h de tratamento. Nessa concentração de entrada, o teor de fenólicos totais se manteve elevado até 9 h (831,73 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>), com ligeira redução depois de 12 h. Para a concentração de entrada de 3,10 mg L<sup>-1</sup>, foi observado pico de 801,68 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>, depois de 9 h. Em contrapartida, na concentração de entrada de 1,60 mg L<sup>-1</sup>, verificou-se pico de 633,96±14,83 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> nas primeiras 3 h, e redução significativa depois de 9 h (569,08±12,6 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>). No que se refere às antocianinas totais, quando se adotou a concentração de entrada de 3,10 mg L<sup>-1</sup>, os valores médios foram superiores em relação as demais concentrações depois de 9 e 12 h, atingindo 26,51 mg eq. cianidina-3-glicosídeo 100 g<sup>-1</sup>. Nas concentrações de entrada de 7,00 mg L<sup>-1</sup> e 1,60 mg L<sup>-1</sup>, observou-se que os valores médios mantiveram-se constantes ao longo da ozonização

**Tabela 3.** Valores médio de pH e teores de fenólicos totais e de antocianinas totais em amêndoas de cacau ozonizadas, nas concentrações de 1,30; 3,10 e 7,00 mg L<sup>-1</sup>, por até 12 h, na vazão específica de 1 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> t<sup>-1</sup>

Concentração de entrada (mg L <sup>-1</sup> )	Período de ozonização (horas)				
	0	3	6	9	12
pH					
1,60	5,68±0,02 <sup>Aa</sup>	5,72±0,03 <sup>Aa</sup>	5,67±0,03 <sup>Aa</sup>	5,65±0,05 <sup>ABa</sup>	5,70±0,06 <sup>Aa</sup>
3,10	5,68±0,02 <sup>Aa</sup>	5,74±0,05 <sup>Aa</sup>	5,68±0,04 <sup>Aa</sup>	5,74±0,11 <sup>Aa</sup>	5,75±0,10 <sup>Aa</sup>
7,00	5,68±0,02 <sup>Aa</sup>	5,61±0,05 <sup>Ba</sup>	5,67±0,08 <sup>Aa</sup>	5,62±0,02 <sup>Ba</sup>	5,46±0,02 <sup>Bb</sup>
Teor de fenólicos totais (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> )					
1,60	576,14±42,76 <sup>Ab</sup>	633,96±14,83 <sup>Aa</sup>	622,71±15,40 <sup>Aa</sup>	569,08±12,61 <sup>Ab</sup>	534,48±4,31 <sup>Ab</sup>
3,10	576,14±42,76 <sup>Ab</sup>	614,81±10,01 <sup>Ab</sup>	585,36±11,01 <sup>Ab</sup>	801,68±3,01 <sup>Ba</sup>	755,59±6,26 <sup>Ba</sup>
7,00	576,14±42,76 <sup>Ac</sup>	722,55±6,88 <sup>Bb</sup>	854,23±4,82 <sup>Ba</sup>	831,73±10,60 <sup>Ba</sup>	741,22±26,64 <sup>Bb</sup>
Teor de antocianinas totais (mg eq. cianidina-3-glicosídeo 100g <sup>-1</sup> )					
1,60	17,55±3,11 <sup>Aa</sup>	19,14±2,42 <sup>Aa</sup>	17,92±2,09 <sup>Aa</sup>	16,47±3,06 <sup>Aa</sup>	13,97±2,54 <sup>Aa</sup>
3,10	17,55±3,11 <sup>Aa</sup>	17,04±3,80 <sup>Aa</sup>	17,24±3,54 <sup>Aa</sup>	26,11±3,65 <sup>Ba</sup>	26,51±7,40 <sup>Ba</sup>
7,00	17,55±3,11 <sup>Aa</sup>	20,74±1,51 <sup>Aa</sup>	24,60±5,20 <sup>Aa</sup>	21,68±7,37 <sup>ABa</sup>	17,57±3,68 <sup>Aa</sup>

Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem estatisticamente ( $0 > 0,05$ ), pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os valores médios referentes as variáveis  $L^*$  (luminosidade) e  $\Delta E^*$  (diferença de cor) nas amêndoas de cacau, nos diferentes períodos de ozonização, independentemente da concentração de entrada do ozônio, são apresentados na Tabela 4. A variável  $L^*$  aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) depois 3 h de exposição ao ozônio, em comparação com as amostras não ozonizadas (0 h), passando de 53,34 para 55,14. Os valores de  $L^*$  das amêndoas, referentes aos demais períodos de ozonização, não diferiram estatisticamente daquele obtido nas amostras não ozonizadas. A variável  $\Delta E^*$ , que representa a diferença total de cor, apresentou variações entre 1,97 e 2,78, sem diferenças estatísticas significativas ao longo do tempo.

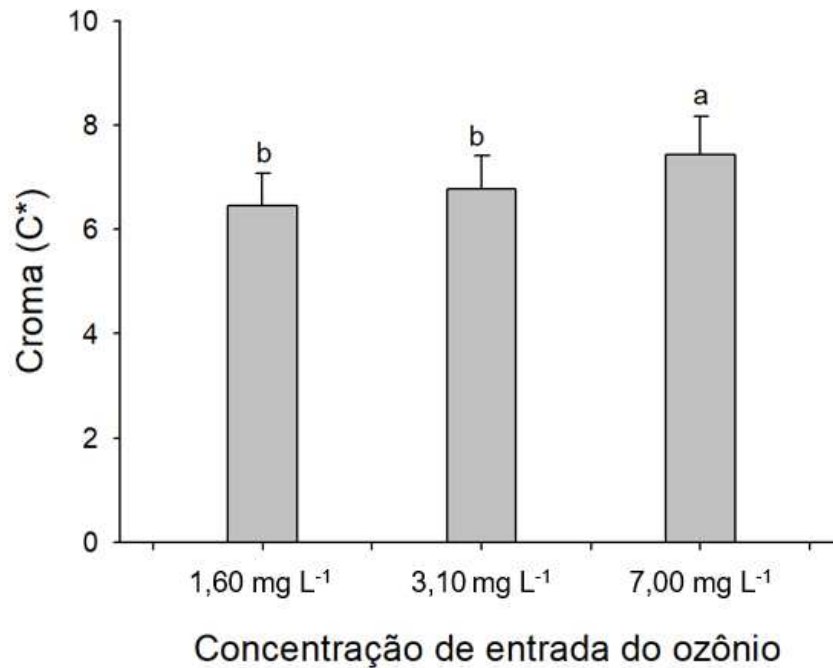
**Tabela 4.** Valores médios de luminosidade ( $L^*$ ) e diferença de cor ( $\Delta E^*$ ) em amêndoas de cacau, em função do período de ozonização, independentemente da concentração do ozônio, na vazão específica de  $1 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1} \text{ t}^{-1}$ .

Variável	Período de ozonização				
	0	3	6	9	12
$L^*$	53,34±1,41 <sup>b</sup>	55,14±1,02 <sup>a</sup>	54,68±0,53 <sup>ab</sup>	54,44±1,35 <sup>ab</sup>	55,09±0,60 <sup>a</sup>
$\Delta E^*$	-	2,78±0,80 <sup>a</sup>	2,20±1,07 <sup>a</sup>	1,97±1,19 <sup>a</sup>	2,56±0,70 <sup>a</sup>

Médias seguidas por mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ), pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No que se refere ao croma ( $C^*$ ), o tempo de exposição não resultou em diferenças estatísticas, portanto foi realizada comparação de médias obtidas nas diferentes concentrações de entrada de ozônio, independentemente do tempo de exposição (Figura 4). As concentrações de 1,60 e 3,10  $\text{mg L}^{-1}$  apresentaram valores de croma ( $C^*$ ) estatisticamente iguais, sendo equivalentes a  $6,45 \pm 0,62$  e  $6,77 \pm 0,65$  respectivamente. Em contrapartida, a concentração de 7,00  $\text{mg L}^{-1}$  resultou valor médio de croma ligeiramente maior, de  $7,45 \pm 0,74$ .

**Figura 4.** Valores médios de croma ( $C^*$ ) em amêndoas de cacau, em diferentes concentrações de entrada do ozônio, independentemente do período de ozonização, na vazão específica de  $1 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1} \text{ t}^{-1}$



Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ), pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 5, apresentam-se os valores médios de teor de água, acidez titulável, tonalidade de cor ( $h^*$ ) e capacidade antioxidante para os métodos ABTS e DPPH em amêndoas de cacau ozonizadas nas concentrações de 1,30; 3,10 e  $7,00 \text{ mg L}^{-1}$ , por até 12 h, na vazão específica de  $1 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1} \text{ t}^{-1}$ .

Os valores médios de teor de água nas amêndoas variaram entre  $7,29 \pm 0,09\%$  e  $7,68 \pm 0,19\%$  (Tabela 5), sem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), nas diferentes concentrações de ozônio e período de exposição. De forma semelhante, os valores médios de acidez titulável oscilaram entre  $0,33 \pm 0,01$  e  $0,42 \pm 0,07$  g de ácido acético por 100 g de amostra, sem diferenças significativas. Os valores de tonalidade de cor variaram de  $37,69 \pm 0,88$  a  $43,54 \pm 1,14$ .

Não foi possível observar diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as médias da capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS em amêndoas de cacau ozonizadas. Os valores não apresentaram alterações em nenhuma das condições

avaliadas, independentemente da concentração inicial de ozônio ou do tempo de exposição.

**Tabela 5.** Valores médios de teor de água, acidez titulável, tonalidade de cor ( $h^*$ ) e capacidade antioxidante para os métodos ABTS e DPPH em amêndoas de cacau ozonizadas nas concentrações de 1,30; 3,10 e 7,00  $\text{mg L}^{-1}$ , por até 12 h, na vazão específica de  $1 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1} \text{ t}^{-1}$

Concentração de entrada ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Período de ozonização (horas)				
	0	3	6	9	12
Teor de água (% b.u.)					
1,60	7,56±0,12 <sup>Aa</sup>	7,59±0,17 <sup>Aa</sup>	7,48±0,41 <sup>Aa</sup>	7,34±0,05 <sup>Aa</sup>	7,39±0,47 <sup>Aa</sup>
3,10	7,56±0,12 <sup>Aa</sup>	7,49±0,15 <sup>Aa</sup>	7,68±0,19 <sup>Aa</sup>	7,50±0,28 <sup>Aa</sup>	7,50±0,18 <sup>Aa</sup>
7,00	7,56±0,12 <sup>Aa</sup>	7,39±0,08 <sup>Aa</sup>	7,37±0,16 <sup>Aa</sup>	7,29±0,09 <sup>Aa</sup>	7,33±0,14 <sup>Aa</sup>
Acidez titulável ( $\text{g ácido acético } 100 \text{ g}^{-1}$ )					
1,60	0,36±0,09 <sup>Aa</sup>	0,33±0,01 <sup>Aa</sup>	0,39±0,11 <sup>Aa</sup>	0,38±0,08 <sup>Aa</sup>	0,42±0,05 <sup>Aa</sup>
3,10	0,36±0,09 <sup>Aa</sup>	0,41±0,04 <sup>Aa</sup>	0,38±0,01 <sup>Aa</sup>	0,42±0,07 <sup>Aa</sup>	0,37±0,02 <sup>Aa</sup>
7,00	0,36±0,09 <sup>Aa</sup>	0,35±0,06 <sup>Aa</sup>	0,34±0,05 <sup>Aa</sup>	0,40±0,11 <sup>Aa</sup>	0,41±0,08 <sup>Aa</sup>
$h^*$					
1,60	42,82±3,96 <sup>Aa</sup>	41,46±2,64 <sup>Aa</sup>	43,54±1,14 <sup>Aa</sup>	43,19±2,47 <sup>Aa</sup>	41,91±2,40 <sup>Aa</sup>
3,10	42,82±3,96 <sup>Aa</sup>	41,91±2,47 <sup>Aa</sup>	37,69±0,88 <sup>Ba</sup>	41,66±1,21 <sup>Aa</sup>	40,67±0,22 <sup>Aa</sup>
7,00	42,82±3,96 <sup>Aa</sup>	40,77±2,88 <sup>Aa</sup>	41,98±3,16 <sup>ABa</sup>	42,35±2,07 <sup>Aa</sup>	42,14±2,00 <sup>Aa</sup>
Capacidade Antioxidante ( $\mu\text{M TE g}^{-1}$ )					
ABTS					
1,60	9,97±0,93 <sup>Aa</sup>	9,41±0,81 <sup>Aa</sup>	8,82±1,31 <sup>Aa</sup>	11,41±4,91 <sup>Aa</sup>	9,63±3,75 <sup>Aa</sup>
3,10	9,97±0,93 <sup>Aa</sup>	11,84±5,47 <sup>Aa</sup>	8,91±1,30 <sup>Aa</sup>	10,55±0,89 <sup>Aa</sup>	10,69±1,63 <sup>Aa</sup>
7,00	9,97±0,93 <sup>Aa</sup>	9,25±3,47 <sup>Aa</sup>	10,67±0,82 <sup>Aa</sup>	11,33±4,42 <sup>Aa</sup>	9,11±1,31 <sup>Aa</sup>
DPPH					
1,60	9,50±0,75 <sup>Aa</sup>	9,58±0,82 <sup>Aa</sup>	9,89±0,27 <sup>Aa</sup>	9,98±1,94 <sup>Aa</sup>	9,62±1,46 <sup>Aa</sup>
3,10	9,50±0,75 <sup>Aa</sup>	9,65±0,78 <sup>Aa</sup>	9,08±0,38 <sup>Aa</sup>	10,19±1,05 <sup>Aa</sup>	8,88±0,89 <sup>Aa</sup>
7,00	9,50±0,75 <sup>Aa</sup>	10,19±0,71 <sup>Aa</sup>	9,76±1,50 <sup>Aa</sup>	9,47±1,97 <sup>Aa</sup>	10,22±0,63 <sup>Aa</sup>

Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna ou minúscula na linha não diferem estatisticamente ( $0 > 0,05$ ), pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo, caracterizou-se o processo de saturação do gás ozônio em um meio poroso composto por amêndoas de cacau, utilizando concentrações de entrada de 1,60; 3,10 e 7,00 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 1 e Figura 1). Observou-se que concentrações mais elevadas do gás aceleraram o processo de saturação nas amêndoas de cacau e resultaram em maiores valores de concentração de saturação (CSat). O comportamento observado, com uma fase inicial de acúmulo rápido de ozônio seguido por estabilização da concentração residual (Figura 1), está de acordo com o relatado por Kells et al. (2001) e Mendez et al. (2003). Segundo esses autores, nas fases iniciais da ozonização, o gás reage preferencialmente com compostos da superfície dos grãos, promovendo sua rápida degradação e resultando em menor concentração residual. À medida que o ozônio penetra no espaço intergranular, sua taxa de reação com o substrato diminui, promovendo maior estabilidade na concentração acumulada. Tal padrão de comportamento tem sido amplamente descrito na literatura para produtos agrícolas com estrutura porosa, como amendoim, milho-pipoca e feijão-caupi (ALENCAR et al., 2011; SILVA et al., 2019; ABREU et al., 2022).

A porcentagem de infecção por *A. flavus* e *A. niger* foi avaliada ao longo do tempo de exposição ao ozônio. Observou-se uma redução acentuada na infecção por ambas as espécies de fungos nas primeiras três horas de tratamento, sendo de aproximadamente 44,50% para *A. flavus* e 61,60% para *A. niger*, em relação aos percentuais de infecção inicial. Os percentuais de infecção mantiveram-se estabilizados ao longo da ozonização. Esse comportamento reforça a eficácia da ozonização como estratégia para redução de microrganismos em produtos armazenados.

Resultados semelhantes foram relatados por Kreibich et al. (2016), que observaram uma redução de 86,80% nas unidades formadoras de colônia (UFC) de *A. flavus* em amêndoas de cacau submetidas ao ozônio na concentração de 60 µmol mol<sup>-1</sup>. De forma análoga, Gomes et al. (2023) registraram inibição de 87% no crescimento de *Aspergillus* spp. em grãos de amendoim após 240 min de exposição contínua a ozônio (0,21 mol m<sup>-3</sup>), com fluxo de 15 L min<sup>-1</sup>. Ainda, Siteo et al. (2023), utilizando injeções de ozônio a baixa pressão (1,0 L min<sup>-1</sup>) em grãos de feijão, reportaram redução da infecção por *A. flavus* de 100% para 30%, conforme análise

por plaqueamento direto. Tais resultados corroboram o potencial da tecnologia de ozonização para o controle de fungos micotoxigênicos em produtos agrícolas.

Com base nos dados do presente estudo e em evidências da literatura, observa-se que mesmo concentrações moderadas de ozônio possuem potencial fungicida relevante. No entanto, parâmetros como vazão e tempo de exposição devem ser otimizados em estudos futuros para ampliar a eficiência do tratamento.

A análise do teor de água nas amêndoas indicou que a ozonização não promoveu variações significativas. É possível inferir, a partir desse resultado, que a umidificação do ar foi eficiente para obter umidade relativa estável, o que favoreceu a preservação do teor de água durante a ozonização. Da mesma forma, não foram observadas alterações relevantes no pH e na acidez titulável das amostras, o que demonstra que as condições de ozonização não comprometeram a estabilidade ácido-base do produto. (ABREU et. al., 2022; LI et al., 2022).

Em relação ao teor de compostos fenólicos totais, observou-se um aumento significativo associado à interação entre o tempo de exposição e a concentração de ozônio. Em produtos vegetais frescos, essa tendência tem sido relacionada a reações enzimáticas desencadeadas pelo estresse oxidativo gerado pela ozonização. Li et al. (2022), ao estudarem pitayas tratadas com ozônio, identificaram a indução da expressão de enzimas-chave na via dos fenólicos, como a antocianina sintase, a chalcona sintase (relacionada à biossíntese de flavonoides e isoflavonoides) e a 4-cumaroil-CoA ligase, envolvida na formação de ligninas e outros compostos fenólicos.

Río Segade et al. (2020) também demonstraram que o ozônio pode ativar enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase, ao passo que inibe a atividade da polifenoloxidase, enzima associada à degradação de fenólicos. Zardzewiały et al. (2025) observaram aumento de aproximadamente 10% no teor de compostos fenólicos em tomates após exposição a ozônio gasoso a 2 ppm por 1,5-3 minutos, efeito atribuído à ativação de rotas biossintéticas desencadeadas pelo estresse oxidativo.

No presente estudo, amêndoas tratadas com  $3,10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ozônio por 9 a 12h apresentaram teores de antocianinas totais superiores em comparação com aquelas tratadas com  $1,60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Resultados semelhantes foram reportados por Piechowiak et al. (2020a) em framboesas armazenadas sob atmosfera com ozônio, nas quais se observou aumento nas antocianinas após sete dias de armazenamento, em contraste com a estabilidade ou redução no grupo controle. Em estudo com mirtilos, Piechowiak

et al. (2020b) identificaram aumento da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), responsável pela conversão de fenilalanina em ácido trans-cinâmico, precursor de compostos fenólicos, incluindo antocianinas.

Outro mecanismo que pode explicar o aumento no teor de compostos fenólicos após o tratamento é a ozonólise. O ozônio ( $O_3$ ) é uma molécula altamente reativa que se liga às ligações duplas presentes nos anéis aromáticos dos polifenóis, quebrando essas estruturas. Essa reação provoca a formação de compostos menores e mais reativos, como ácidos carboxílicos, aldeídos e quinonas (KAUR et al., 2022).

No estudo de Kalyanaraman et al. (2015), a ozonização foi aplicada em um extrato de acácia-negra, rico em taninos condensados, que simulava efluente da indústria de curtume vegetal. Os autores observaram que o ozônio atacou os anéis aromáticos dos taninos, fragmentando as moléculas e gerando compostos menores e mais solúveis. Esses produtos aumentaram a biodegradabilidade do efluente, mostrando que o ozônio pode quebrar estruturas polifenólicas complexas em subprodutos menos tóxicos.

Os taninos condensados (ou proantocianidinas) são encontrados em células taníferas das sementes, tanto nos cotilédones quanto na casca. No cacau, por exemplo, eles são formados por flavanóis como catequina e epicatequina, que se unem formando polímeros. (BRILLOUET e HUE, 2017).

Durante a exposição ao ozônio, as proantocianidinas podem sofrer quebra das cadeias, reduzindo o tamanho das moléculas e liberando flavanóis monoméricos, como a epicatequina. Río Segade et al. (2020) observaram esse efeito em uvas submetidas à oxidação, onde a quebra dos taninos condensados resultou em maior liberação de monômeros fenólicos. Dessa forma, quando o ozônio quebra os taninos em unidades menores, há maior exposição de grupos de hidroxila fenólicos, o que aumenta a biodisponibilidade e a reatividade dos compostos. Esse efeito pode explicar o aumento no teor de compostos fenólicos totais observados no presente estudo.

Jackowska et al. (2019) observaram aumento do teor de compostos fenólicos no óleo de colza após o tratamento das sementes com ozônio, passando de 14,3 mg para 16,9 mg de ácido sinápico por grama, além de uma leve redução no teor de vitamina E. Segundo os autores, o ozônio provocou a liberação de fenóis antes ligados a outros componentes, aumentando sua concentração total.

Embora tenha ocorrido um aumento no teor de compostos fenólicos totais no presente estudo, os valores de capacidade antioxidante permaneceram relativamente

estáveis nos ensaios ABTS e DPPH. Essa estabilidade sugere que os compostos antioxidantes originais não foram completamente degradados, mas sim convertidos em moléculas menores, preservando, em grande parte, sua atividade redutora de radicais. Assim, ocorreu uma modificação estrutural, e não uma perda do potencial antioxidante (SACHADYN-KRÓL e AGRIOPOULOU, 2020; LI et al., 2022).

No presente estudo, o teor de antocianinas observado na maior concentração ( $7,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) após 12 h foi inferior aos registrados com  $3,10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , indicando que exposições prolongadas a concentrações elevadas podem promover degradação oxidativa desses pigmentos. Segundo Sachadyn-Król e Agriopoulou (2020), exposições curtas e controladas ao ozônio tendem a preservar ou estimular a síntese de antioxidantes; por outro lado, a ozonização prolongada pode induzir reações deletérias e perdas significativas desses compostos.

Quanto aos atributos de cor, observou-se um leve aumento na luminosidade ( $L^*$ ) após 3 h (55,14) e 12 horas (55,09) de ozonização, em relação ao controle (53,34). Amostras tratadas com  $7,00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  também apresentaram valores mais elevados de croma ( $C^*$ ), sugerindo intensificação da saturação da cor. Esse efeito já foi descrito em amendoim (ALENCAR et al., 2011) e castanha-do-Brasil (OLIVEIRA et al., 2020). Esses autores indicaram que essas alterações podem estar associadas a degradação de pigmentos presentes nas películas que envolvem os produtos.

Os valores de  $\Delta E^*$  variaram entre 1,97 e 2,78, indicando que as alterações de cor foram discretas. Segundo Altmann et al. (2022), valores de  $\Delta E^*$  inferiores a 3 são, em geral, imperceptíveis ao olho humano. Assim, os dados indicam que o ozônio, quando aplicado de forma controlada, não compromete a coloração das amêndoas.

Neste estudo, diferentes concentrações e tempos de exposição ao ozônio foram avaliados quanto à infecção fúngica, e alterações na qualidade das amêndoas de cacau. Para estudos futuros, recomenda-se investigar a viabilidade econômica e ambiental da utilização do ozônio na cadeia produtiva do cacau, bem como seus efeitos em produtos derivados, como chocolate, pó de cacau e manteiga. Além disso, análises mais detalhadas, incluindo a atividade de enzimas associadas à síntese de compostos fenólicos, a quantificação de taninos totais e compostos aromáticos, são necessárias para elucidar de forma mais precisa o impacto da ozonização sobre os componentes químicos de interesse funcional e comercial das amêndoas.

## 5. CONCLUSÕES

No presente estudo, o ozônio gasoso ( $O_3$ ) foi testado como mecanismo de descontaminação em amêndoas de cacau. Assim, para as condições em que este trabalho foi conduzido, conclui-se que:

- i. O processo de saturação do ozônio nas amêndoas de cacau seguiu uma dinâmica crescente até atingir estabilização, com tempo e concentração de saturação proporcionais à concentração de entrada. Concentrações mais elevadas exigiram maior tempo para saturação.
- ii. A infecção pelos fungos *A. flavus* e *A. niger* pode ter redução expressiva, adotando-se concentrações de entrada entre  $1,60 \text{ mg L}^{-1}$  e  $7,00 \text{ mg L}^{-1}$ , associadas a 3 h de exposição ao gás.
- iii. O teor de água, a acidez titulável e a capacidade antioxidante das amêndoas não foram alterados pelo tratamento com ozônio.
- iv. Observou-se redução do pH nas amêndoas tratadas com  $7,00 \text{ mg L}^{-1}$  de ozônio durante 12 horas de exposição.
- v. A saturação de cor ( $C^*$ ) variou significativamente em função da concentração de ozônio, enquanto a luminosidade ( $L^*$ ) e a diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) apresentaram variações sutis ao longo do tempo de exposição, sem impacto visual perceptível.
- vi. O tratamento de amêndoas de cacau com ozônio na concentração de  $1,60 \text{ mg L}^{-1}$  e 3 h de exposição não resultam em alterações na qualidade.
- vii. O tratamento de amêndoas de cacau com ozônio, especialmente nas concentrações de  $3,10$  e  $7,00 \text{ mg L}^{-1}$ , pode ocasionar aumento dos teores de compostos fenólicos totais e antocianinas, sem, no entanto, implicar em aumento da capacidade antioxidante.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABREU, A. O.; FARONI, L. R. D. A.; SILVA, M. V. A.; SOUSA, A. H.; ALENCAR, E. R.; SILVA, G. N. Ozone as an alternative fumigant for controlling *Callosobruchus maculatus* (F.)(*Coleoptera: Chrysomelidae*) in cowpea beans. **Journal of Stored Products Research** v. 97, p. 101969, 2022.
- AFSAH-HEJRI, L., HAJEB, P., EHSANI, R. J. Application of ozone for degradation of mycotoxins in food: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.19, n. 4, p. 1777–1808. 2020. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12594>
- AGRIOPOULOU, S.; STAMATELOPOULOU, E.; VARZAKAS, T. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: prevention and detoxification in foods. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 137, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9020137>.
- AKINFALA, T. O., HOUBRAKEN, J., SULYOK, M., ADEDEJI, A. R., ODEBODE, A. C., KRSKA, R., EZEKIEL, C. N. Moulds and their secondary metabolites associated with the fermentation and storage of two cocoa bean hybrids in Nigeria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 316. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108490>.
- ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. D.; MARTINS, M. A.; COSTA, A. R.; CECON, P. R. Decomposition kinetics of gaseous ozone in peanuts. **Engenharia Agrícola**, v. 31, 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**, London, v. 92, n.4, p. 899-905, 2012. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.4668>. PMID:22095762.
- ALTMANN, B. A.; GERTHEISS, J.; TOMASEVIC, I.; ENGELKES, C.; GLAESENER, T.; MEYER, J.; SCHÄFER, A; WIESEN, R.; MÖRLEIN, D. Human perception of color differences using computer vision system measurements of raw pork loin. **Meat Science**, v. 188, 108766, 2022.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. *Official methods of analysis*. 14th ed. Washington, DC: AOAC, 1985.
- BHAVITHA K.C.; MADHUBALAJI, C.; BHATT, P.; PRASANNA, V.; SANDEEP N. Potential of gaseous ozone to inhibit *Aspergillus flavus* and detoxify aflatoxin B1 in agar and broth media (solid and liquid food states) at different growth phases. **Food and Humanity**, v.2. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2024.100275>.
- BONVEHÍ, J. Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.52, n.20, p. 6347–6352. 2004. <https://doi.org/10.1021/jf040153w>
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVÉLIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25- 30, 1995.

BRASIL. Instrução Normativa nº 88, de 26 de março de 2021 estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. **Diário Oficial da União**. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395 p. Disponível em: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946\\_regras\\_analise\\_\\_sementes.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf). Acesso em: 11 mai. 2024.

BRENES, E. R., MARTINEZ, O. LOPEZ, M., CIRAVEGNA, L., PICHARDO, C. Cacao Oro. **International Food and Agribusiness Management Review** v. 26, n.5, p.783-799, 2023. doi: <https://doi.org/10.22434/ifamr-2022-0136r1>

BRILLOUET, J. M.; HUE, C. Fate of proanthocyanidins and anthocyanins along fermentation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.). **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 90, p. 141–146, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2017.090.017>.

CÂNDIDO, T.L.N.; SILVA, M.R.; AGOSTINI-COSTA, T.S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food Chemistry**, v. 177, p. 313–319, 2015.

CONTE, G.; FONTANELLI, M.; GALLI, F.; COTROZZI, L.; PAGNI, L.; PELLEGRINI, E. Mycotoxins in Feed and Food and the Role of Ozone in Their Detoxification and Degradation: An Update. **Toxins**, v.12, n. 8, p. 486, 2020. <https://doi.org/10.3390/toxins12080486>.

COPETTI, M. V., IAMANAKA, B. T., NESTER, M. A., EFRAIM, P., TANIWAKI, M. H. Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture. **Food Chemistry**, v.136, n.1, p.100–104. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.093>.

COPETTI, M. V., IAMANAKA, B. T., PITT, J. I., & TANIWAKI, M. H. Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. **International Journal of Food Microbiology**, v.178, p.13–20. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.023>.

COPETTI, M. V., PEREIRA, J. L., IAMANAKA, B. T., PITT, J. I., & TANIWAKI, M. H. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p. 67–70. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.031>.

DELGADO-OSPINA, J., MOLINA-HERNÁNDEZ, J. B., CHAVES-LÓPEZ, C., ROMANAZZI, G., PAPARELLA, A. The Role of Fungi in the Cocoa Production Chain and the Challenge of Climate Change. **Journal of Fungi**, v.7, n.3, p. 202. 2021. <https://doi.org/10.3390/jof7030202>.

DEMIRCI, A.S., TIRPANCI SIVRI, G., TUNC, M. Detoxification of unshelled hazelnut artificially contaminated with aflatoxins by gaseous ozone. **Food Measure**. v.17, p.3515–3522, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-01886-9>.

DZELAGHA, B. F., NGWA, N. M., NDE BUP, D. A Review of Cocoa Drying Technologies and the Effect on Bean Quality Parameters. **International Journal of Food Science**, v. 2020, p.1–11, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8830127>.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. **Standard methods for the examination of water and wastewater** 20.ed, APHA/AWWA/WEF2, Washington. 2000.

EUROPEAN COMMISSION. Regulation no. 2023/915 of 25 April 2023 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs and repealing Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006. **Off. J. Eur. Union**, v.119, p.103–157. 2023.

FAO. 2023. **Crops and livestock products**. *FAO-STAT*. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>. Acesso em: 11 mai. 2024.

FLEURAT-LESSARD, F. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins: An update. **Journal of Stored Products Research**, v.71, p. 22–40, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2016.10.002>.

FREITAS-SILVA, O., MORALES-VALLE, H., VENÂNCIO, A. Potential of Aqueous Ozone to Control Aflatoxigenic Fungi in Brazil Nuts. **International Scholarly Research Notices**. v. 2013, p. 6, 2013. <https://doi.org/10.5402/2013/859830>

FULEKI, T.; FRANCIS, F. Quantitative Methods for Anthocyanins. I. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, v.33, p. 72-77.

GOMES, T.; SOUZA, H. M.; BORTOLOTTI, G. D. S.; ESCOBAR, B. A.; FURTADO, B. G.; ANGIOLETTI, E. Application of ozone in peanut kernels: a multiscale model approach and effects on filamentous fungi decontamination. **Journal of Food Engineering**, v. 357, p. 111649, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2023.111649>

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: IAL, 2008. 1020 p. Disponível em: [https://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016\\_3\\_19/analisedealimentosia\\_l\\_2008.pdf](https://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosia_l_2008.pdf). Acesso em: 3 jul. 2024.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**, v. 56, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 1993.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. p. 224–248. 2012.

ISIKBER, A. A., ATHANASSIOU, C. G. The use of ozone gas for the control of insects and micro-organisms in stored products. **Journal of Stored Products Research**, v. 64, p.139–145, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2014.06.006>.

JACKOWSKA, I.; BOJANOWSKA, M.; STASZOWSKA-KARKUT, M.; SACHADYN-KROL, M. Low concentration short time ozonation of rapeseed seeds reduces the stability of the oil and content of some antioxidant components. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 12, p. 3674–3683, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14251>

JANIK, E.; NIEMCEWICZ, M.; CEREMUGA, M. STELA, M. SALUK-BIJAK, J. SIADKOWSKI, A. BIJAK, M. Molecular Aspects of Mycotoxins - A Serious Problem for Human Health. **International journal of molecular sciences**. v.21, n. 21, p. 8187, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21218187>.

KABAK, B. The fate of mycotoxins during thermal food processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, n.4, p.549–554, 2009. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3491>

KALYANARAMAN, C.; SRI BALA KAMESWARI, K.; RAGHAVA RAO, J. Studies on enhancing the biodegradation of tannins by ozonation and Fenton's oxidation process. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 25, p. 329–337, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.11.012>

KAUR, K.; PANDISELVAM, R.; KOTHAKOTA, A.; ISHWARYA, S. P.; ZALPOURI, R.; MAHANTI, N. K. Impact of ozone treatment on food polyphenols – a comprehensive review. **Food Control**, v. 142, p. 109207, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109207>.

KELLS, S. A.; MASON, L. J.; MAIER, D. E.; WOLESKOK, C. P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 37, p. 371-382, 2001.

KONAR, N.; PALABIYIK, İ.; KARIMIDASTJERD, A.; TOKER, Ö. S.; GÖRGÜLÜ, A. Recent advances in cocoa chemistry and roasting. **Trends in Food Science & Technology**, v. 162, p. 105036, 2025.

KREIBICH, H. H.; CHRIST, D.; MARIA, G. S.; SILVA, J.; SAVI, G. D.; SCUSSEL, V. M. Decontamination of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) inoculated with *Aspergillus flavus* by ozone gas. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 6, n. 3, p. 560–570, 2016.

LI, C.; WANG, S.; WANG, J.; WU, Z.; XU, Y.; WU, Z. Ozone treatment promotes physicochemical properties and antioxidant capacity of fresh-cut red pitaya based on phenolic metabolism. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 1016607, 2022. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1016607>.

MARWATI, T., KURNIAWAN, F. I., KARISMA, V. L. K., HATMI, R. U., FAJARIYAH, A., FITROTIN, U., DJAAFAR, T. F., WIKANDARI, R., RAHAYU, E. S. Indigenous lactic acid bacteria as a biological control agent to prevent fungi contamination in the fermentation of cocoa beans. **Food Science and Technology**, v.44, 2024. <https://doi.org/10.5327/fst.17923>.

MEDINA, A., RODRIGUEZ, A., MAGAN, N. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00348>.

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 processing performance. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, p. 33-44, 2003.

MOHAPATRA, D., KUMAR, S., KOTWALIWALE, N., SINGH, K. K. Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-chemical approaches for their control. **Industrial Crops and Products**, v.108, p.162–182. 2017.

NEME, K., MOHAMMED, A. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. **Food Control**. v. 78, p. 412–425, 2017. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.03.012

OBSERVATORY OF ECONOMIC COMPLEXITY (OEC). **Cocoa Beans** (HS: Cocoa) Trade, exporters and importers of products. Disponível em: <https://oec.world/en/profile/hs/cocoa-beans>. Acesso em: 1 maio 2024.

OLIVEIRA, J. M.; DE ALENCAR, E. R.; BLUM, L. E. B.; DE SOUZA FERREIRA, W. F.; BOTELHO, S. D. C. C.; RACANICCI, A. M. C.; LEANDRO, E. D. S.; MENDONÇA, M. A.; MOSCON, E.S.; BIZERRA, L. V. A. D. S.; DA SILVA, C. R. Ozonation of Brazil nuts: Decomposition kinetics, control of *Aspergillus flavus* and the effect on color and on raw oil quality. **LWT- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY**, v. 123, 109106, 2020.

PIECHOWIAK, T.; GRZESZCZUK, M.; SOSNOWSKA, D.; SZCZERBA, J.; BALAWEJDER, M. Impact of Ozone Treatment on the Content of Bioactive Compounds and the Activity of Antioxidant Enzymes in Blueberries. **Food and Bioprocess Technology**, v. 13, p. 2029–2040, 2020b. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02450-9>

PIECHOWIAK, T.; MIKOŁAJCZAK, N.; SKROBACZ, K.; NAJDA, A.; BALAWEJDER, M. Changes in phenolic compounds profile and glutathione status in raspberry fruit during storage in ozone-enriched atmosphere. **Postharvest Biology and Technology**, v. 169, p. 111277, 2020a. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111277>

PIRES, P. N., VARGAS, E. A., GOMES, M. B., VIEIRA, C. B. M., SANTOS, E. A. DOS, BICALHO, A. A. C. Aflatoxins and ochratoxin A: occurrence and contamination levels in cocoa beans from Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part A**. v.36, n.5, p.815–824. 2019. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1600749>.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**, 3 ed. New York: Springer, 2009.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, Min; RICE-EVANS, Catherine. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9 –10, p. 1231–1237, 1999.

RÍO SEGADE, S.; BAUTISTA-ORTÍN, A. B.; PAISSONI, M. A.; GIACOSA, S.; GERBI, V.; ROLLE, L.; GÓMEZ-PLAZA, E. S. Changes in skin flavanol composition as a response to ozone-induced stress during postharvest dehydration of red wine grapes with different phenolic profiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,

Washington, DC, v. 68, n. 47, p. 13439-13449, 2020.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04081>

ROMANENS E., LEISCHTFELD S.F., VOLLAND A., STEVENS M.J., KRÄHENMANN U., ISELE D., FISCHER B., MEILE L., SCHWENNINGER S.M. Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted anti-fungal co-cultures for cocoa bean fermentation. **Int. J. Food Microbiol.** v. 290, p. 262-272, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.001>.

SACHADYN-KRÓL, M.; AGRIOPOULOU, S. Ozonation as a method of abiotic elicitation improving the health-promoting properties of plant products – a review. **Molecules**, v. 25, n. 10, p. 2416, 2020. DOI:  
<https://doi.org/10.3390/molecules25102416>

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

SAVI, G. D., PIACENTINI, K. C., SCUSSEL, V. M. Ozone Treatment Efficiency in *Aspergillus* and *Penicillium* Growth Inhibition and Mycotoxin Degradation of Stored Wheat Grains (*Triticum aestivum L.*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v.39, n.6, p.940–948, 2014. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12307>.

SCHWAN, R. F., WHEALS A. The Microbiology of Cocoa Fermentation and Its Role in Chocolate Quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.44, n.4 p. 205, 2004. doi:10.1080/10408690490464104.

SILVA, M. V. A.; FARONI, L. R. A.; SOUSA, A. H.; PRATES, L. H. F.; ABREU, A. O. Kinetics of the ozone gas reaction in popcorn kernels. **Journal of Stored Products Research**, v. 83, p. 168–175, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2019.06.014>.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SITOE, E. D. P. E.; DE ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. D. A.; FONTES, E. A. F.; DE ASSIS SILVA, M. V.; MACHADO, F. J.; PANDISELVAM, R.; MAGALHÃES, C. G. Application of ozone at low-pressure: control of egg and larval phases of *Zabrotes subfasciatus*, inactivation of *Aspergillus flavus* and qualitative changes in bean grains. **Food Control**, v. 158, p. 110238, 2024.

TARDZENYUY, M., JIANGUO, Z., TETTEH, A., MBUWEL, M. Improving cocoa beans value chain using local convection dryer: A case study of Fako Division Cameroon. **Scientific African**, v.8, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00343>.

WILD, C.P., MILLER J.D., GROOPMAN J.D. **Mycotoxin control in low and middle-income countries**. 9. ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK350556/>. Acesso em: 1 maio 2024.

XUE, W.; MACLEOD, J.; BLAXLAND, J. The Use of Ozone Technology to Control Microorganism Growth, Enhance Food Safety and Extend Shelf Life: A Promising Food Decontamination Technology. **Foods**, v.12, n.4, p.814, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12040814>.

ZARDZEWIAŁY, M.; MATŁOK, N.; KAPUSTA, I.; PIECHOWIAK, T.; GORZELANY, J.; BALAWEJDER, M. Effect of Gaseous Ozone and Hydrogen Peroxide Treatment on the Polyphenolic Profile of Tomato Fruits Grown Under Cover. **Applied Sciences**, v. 15, n. 1, p. 224, 2025. <https://doi.org/10.3390/app15010>.

ŻYŻELEWICZ, D.; ORACZ, J.; BOJCZUK, M.; BUDRYN, G.; JURGOŃSKI, A.; JUŚKIEWICZ, J.; ZDUŃCZYK, Z. Effects of raw and roasted cocoa bean extracts supplementation on intestinal enzyme activity, biochemical parameters, and antioxidant status in rats fed a high-fat diet. **Nutrients**, Basel, v. 12, n. 4, p. 889, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12040889>