

ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR

**PROCESSO DE OZONIZAÇÃO DE AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.):
CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO, EFEITO FUNGICIDA E DETOXIFICANTE
DE AFLATOXINAS E ASPECTOS QUALITATIVOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

A368p
2009

Alencar, Ernandes Rodrigues de, 1980-
Processo de ozonização de amendoim
(*Arachis hypogaea* L.) : cinética de decomposição, efeito
fungicida e detoxificante de aflatoxinas e aspectos qualitativos
/ Ernandes Rodrigues de Alencar. – Viçosa, MG, 2009.
xiii, 92f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Lêda Rita D'Antonino Faroni.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Ozônio - Efeito nos grãos. 2. Cinética química.
3. Amendoim - Qualidade. 4. Amendoim - Controle de
qualidade. 5. Aflatoxina. 6. Óleo de amendoim - Controle de
qualidade. 7. *Aspergillus flavus*. 8. *Aspergillus parasiticus*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 631.56

ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR

**PROCESSO DE OZONIZAÇÃO DE AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.):
CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO, EFEITO FUNGICIDA E DETOXIFICANTE
DE AFLATOXINAS E ASPECTOS QUALITATIVOS**

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

Aprovada: 19 de novembro de 2009.

Dr^a Fátima Chieppe Parizzi

Dr. Washington Azevêdo da Silva

Prof^a Nilda de Fátima Ferreira Soares

Prof. Paulo Roberto Cecon
(Co-Orientador)

Prof^a Lêda Rita D'Antonino Faroni
(Orientadora)

“Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário!” (Albert Einstein).”

Aos que lutam incansavelmente por um mundo melhor, que lutam por seus sonhos e seguem seus ideais,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente A DEUS, que sempre me deu forças para não desanimar.

Aos meus pais, que mesmo muito longe, deram-me apoio na difícil caminhada.

Aos grandes amigos Ana Paula, Gustavo, Madrith, Júlio, Taís, Denilce, Soraya, Mariella, Aline's, Maurinho, Délio, Sílvia, Miriele, Leonardo, presentes nos momentos bons e transformadores dos momentos ruins.

Aos amigos André, Marta, Tales, Marcela, Meiriele, Katiane, Joseane, Juliana Paes, Adalberto, Romenique, pela amizade e ajuda.

À professora Lêda, pelo incentivo e pelos 10 anos de orientação.

À professora Nilda e aos professores Marcio Arêdes e Cecon, pelo que fizeram para que este trabalho fosse desenvolvido.

Ao Washington, por todo auxílio prestado durante a realização do experimento.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, e ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudo concedida.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao departamento de Engenharia Agrícola, pela grande oportunidade oferecida.

Aos demais colegas e amigos, pelos momentos de alegria compartilhados dentro e fora da Instituição e por, direta e indiretamente, terem contribuído para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR, filho de Antônio Pereira de Alencar e Eva Coelho Rodrigues, nasceu em Grajaú, Estado do Maranhão, no dia 25 de julho de 1980.

Ingressou no curso de Engenharia Agrícola e Ambiental em 2000 e graduou-se em julho de 2004.

Em outubro de 2000 iniciou estágio no Estágio no Setor de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola, passando a ser bolsista de iniciação científica a partir de 2001.

Em agosto de 2004, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, em nível de Mestrado, área de concentração em Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em julho de 2006.

Em outubro de 2006, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Engenharia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, área de concentração em Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas, submetendo-se à defesa de tese em novembro de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
Primeiro Capítulo	
CINÉTICA DA DECOMPOSIÇÃO DO GÁS OZÔNIO EM AMENDOIM (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	19
RESUMO	19
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. Tempo de saturação e cinética de decomposição do ozônio em grãos de amendoim	25
3. RESULTADOS	27
4. DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÕES	34
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
Segundo Capítulo	
EFICÁCIA DO OZÔNIO COMO AGENTE FUNGICIDA E DETOXIFICANTE DE AFLATOXINAS EM AMENDOIM	38
RESUMO	38
ABSTRACT	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1. Avaliação do efeito fungicida do ozônio em grãos de amendoim	45
2.2. Avaliação da capacidade detoxificante do gás ozônio sobre aflatoxinas em grãos de amendoim	45
2.3. Delineamento Experimental	46
3. RESULTADOS	46

4. DISCUSSÃO	56
5. CONCLUSÕES	59
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
Terceiro Capítulo	
EFEITO IMEDIATO DO OZÔNIO NA QUALIDADE DE AMENDOIM	65
RESUMO	65
ABSTRACT	67
1. INTRODUÇÃO	68
2. MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1. Análises qualitativas dos grãos de amendoim ozonizados	70
2.2. Análises qualitativas do óleo bruto extraído dos grãos amendoim ozonizados	72
2.3. Delineamento Experimental	74
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
3.1. Qualidade dos grãos de amendoim ozonizados	74
3.2. Qualidade do óleo bruto extraído de grãos de amendoim ozonizados	79
4. CONCLUSÕES	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS	86
APÊNDICE	89

RESUMO

ALENCAR, Ernandes Rodrigues de, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2009. **Processo de ozonização de amendoim (*Arachis hypogaea* L.): cinética de decomposição, efeito fungicida e detoxificante de aflatoxinas e aspectos qualitativos.** Orientadora: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Co-Orientadores: Paulo Roberto Cecon e Márcio Arêdes Martins.

Este trabalho teve por objetivos avaliar a cinética de decomposição do gás ozônio, o efeito do gás como agente fungicida e detoxificante sobre aflatoxinas e possíveis alterações qualitativas nos grãos de amendoim e no óleo bruto extraído desses grãos em decorrência do processo de ozonização. O trabalho, realizado no Setor de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola e no Laboratório de Embalagens, do Departamento de Tecnologia de Alimentos, ambos na Universidade Federal de Viçosa, consistiu de três etapas. Na primeira etapa, avaliou-se a cinética de decomposição do ozônio, utilizando-se amostras de 1 kg de amendoim, com teores de água de 7,1 e 10,5% (b.u.), acondicionadas em recipientes de vidro com capacidade de 3 L. Os grãos de amendoim foram ozonizados na concentração de $450 \mu\text{g L}^{-1}$, nas temperaturas de 25 e 35 °C e vazões do gás de 1,0 e 3,0 L min^{-1} . Determinou-se o tempo de saturação quantificando-se a concentração residual do ozônio, pelo método iodométrico, após a passagem do gás pela massa de grãos, até que ela se mantivesse constante. A cinética de decomposição do ozônio foi avaliada depois da saturação da massa de grãos com o gás. Obteve-se a concentração residual do ozônio, depois de períodos de repouso, durante os quais o gás reagia no meio poroso, e dessa forma, era decomposto. O modelo cinético de primeira ordem foi ajustado aos dados da concentração residual de ozônio em função do tempo, após linearização. A partir dos valores da constante da taxa de decomposição foi possível obter a meia vida do ozônio em grãos de amendoim. Na segunda etapa, grãos de amendoim com teor de água de aproximadamente 9,0% (b.u.) foram expostos ao gás ozônio para avaliação do efeito fungicida e da capacidade detoxificante desse gás sobre aflatoxinas. No processo de ozonização, utilizaram-se concentrações de 13 e 21 mg L^{-1} , temperatura de 25 °C, vazão do gás de 1,0 L min^{-1} e períodos de ozonização de 0, 24, 48, 72 e 96

h. Avaliou-se o efeito do gás ozônio na contagem de fungos totais e das espécies potencialmente aflatoxigênicas *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, pela técnica de diluição, e na infecção interna dos grãos por esses microorganismos, pela técnica de plaqueamento direto. Observaram-se, em nível microscópico, as alterações morfológicas ocorridas nos fungos devido à exposição ao gás ozônio. Para avaliar a capacidade detoxificante do gás ozônio, em cada combinação de concentração do gás e período de exposição, quantificou-se o teor de aflatoxinas totais e de aflatoxina B1 nos grãos de amendoim por cromatografia líquida de alta eficiência. Na terceira etapa, avaliou-se a qualidade dos grãos de amendoim ozonizados e do óleo bruto extraído desses grãos. Utilizaram-se grãos com teor de água em torno de 8,0% (b.u.), e no processo de ozonização concentrações do gás ozônio de 0, 13 e 21 mg L⁻¹, vazão de 1,0 L min⁻¹ e períodos de exposição de 0, 24, 48, 72 e 96 h. No tratamento controle, os grãos foram expostos ao gás oxigênio. Na avaliação da qualidade dos grãos de amendoim, foram analisados os parâmetros teor de água, condutividade elétrica da solução que continha os grãos, teor de lipídios e coloração dos grãos. Os parâmetros qualitativos do óleo bruto extraído dos grãos de amendoim analisados foram o teor de ácidos graxos livres, o índice de peróxido e o índice de iodo. Para os grãos de amendoim com teor de água de 7,1% (b.u.), nas temperaturas de 25 e 35 °C e vazões de 1,0 e 3,0 L min⁻¹, os valores obtidos de tempo de saturação do gás ozônio permaneceram na faixa entre 173 e 192 min, com concentração de saturação de aproximadamente 260 µg L⁻¹. Para os grãos com teor de água de 10,5% b.u., obteve-se maior concentração residual do gás ozônio na temperatura de 25 °C, sendo igual a 190 µg L⁻¹. O maior valor obtido para o tempo de meia vida foi igual a 7,7 min, para os grãos ozonizados na temperatura de 25 °C, enquanto para aqueles com 10,5% de teor de água, na temperatura de 35 °C, foi de 3,2 min. O ozônio foi eficiente no controle de fungos potencialmente aflatoxigênicos em grãos de amendoim, com redução superior a três ciclos log, na concentração de 21 mg L⁻¹ e período de exposição de 96 h. Com relação ao poder detoxificante do gás ozônio, ocorreu redução no teor de aflatoxinas totais e aflatoxina B1 de aproximadamente 30 e 25%, respectivamente, para os grãos expostos ao gás na concentração de 21 mg L⁻¹, depois de 96 h de exposição. Em geral, não ocorreu alteração da qualidade

dos grãos de amendoim e do óleo bruto extraído desses grãos, devido à exposição ao ozônio. Concluiu-se a partir dos resultados obtidos que no processo de decomposição do gás ozônio em grãos de amendoim, o fator determinante é a temperatura. Um aumento de 10 °C na temperatura dos grãos implica decréscimo de, pelo menos, 43% no tempo de meia vida do gás. O ozônio é uma importante alternativa para amendoim no que se refere à segurança alimentar, pois é eficiente no controle dos fungos potencialmente aflatoxigênicos e pode atuar na redução dos níveis de aflatoxinas do produto. O processo de ozonização, na concentração de até 21 mg L⁻¹, por até 96 h, não afeta a qualidade dos grãos de amendoim e do óleo bruto extraído desses grãos.

ABSTRACT

ALENCAR, Ernandes Rodrigues de, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, November, 2009. **Ozonation process of peanuts (*Arachis hypogaea* L.): decomposition kinetics, fungicidal and aflatoxin detoxification effects and qualitative aspects.** Adviser: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Co-Advisers: Paulo Roberto Cecon and Márcio Arêdes Martins.

The objective of this study was to evaluate decomposition kinetics of ozone gas, the effect of this gas as a fungicide agent and detoxificant against aflatoxins and possible quantitative alterations on peanuts and crude oil extracted from these nuts after undergoing the ozonation process. This study, performed in the Sector of Pre-processing and Storage of Agricultural Products pertaining to the Department of Agricultural Engineering and the Laboratory of Packaging of the Department of Food Technology, both of the Universidade Federal de Vicosa, was composed of three stages. In the first stage, decomposition kinetics of ozone was evaluated using 1 kg peanut samples with moisture contents of 7.1 and 10.5% (w.b.), stored in 3 L glass recipients. The peanuts were ozonized at the concentration of $450 \mu\text{g L}^{-1}$, at temperatures of 25 and 35°C and gas flows of 1.0 and 3.0 L min⁻¹. Saturation time was determined and residual concentration of ozone was quantified by the iodometric method after passing the gas through the peanut mass until becoming constant. Decomposition kinetics of ozone was evaluated after saturation of the peanut mass with the gas. A residual concentration of ozone was obtained, followed by repose periods in which the gas reacted with the porous medium and was therefore decomposed. The first order kinetic model was adjusted to the data for residual ozone concentration in function of time, after linearization. From the values of the decomposition rate it was possible to obtain a half-life for ozone in peanuts. In the second stage, peanuts with moisture contents of approximately 9.0% (w.b.) were exposed to ozone gas for evaluation of its effect as a fungicide and detoxifying ability on aflatoxins. In the ozonation process, concentrations of 13 and 21 mg L⁻¹, temperature of 25 °C, gas flow rate of 1.0 L min⁻¹ and ozonation periods of 0, 24, 48, 72 and 96 h were used. The effect of ozone gas on the count of total fungi and the potentially aflatoxigenic species *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* was evaluated by the dilution technique, and in internal

infection of peanuts by these microorganisms, by the direct plating technique. It was observed on the microscopic level that morphological alterations occurred in the fungi due to exposure to ozone gas. To evaluate detoxification effectiveness of ozone gas, in each combination of gas concentration and exposure period, the concentrations of total aflatoxins and aflatoxin B1 in the peanuts were quantified by high performance liquid chromatography. In the third stage, quality of the ozonized peanuts and crude extracted oil was evaluated. Peanuts with moisture contents of 8.0% (w.b.) were used, and the ozonation process utilized ozone gas concentrations of 0, 13 and 21 mg L⁻¹, flow rate of 1.0 L min⁻¹ and exposure periods of 0, 24, 48, 72 and 96 h. For treatment of the control, peanuts were exposed to oxygen gas. Evaluation of peanut quality consisted of analysis for moisture content, electrical conductivity of the solution containing the peanuts, lipid concentration and peanut color. The qualitative parameters of the crude oil extracted from the peanuts analyzed were the concentration of free fatty acids, peroxide index and iodine index. For the peanuts with moisture contents of 7.1% (w.b.), at the temperatures of 25 and 35°C and flow rates of 1.0 and 3.0 L min⁻¹, the values obtained for ozone gas saturation time remained between 173 and 192 min, with a saturation concentration of approximately 260 µg L⁻¹. For the peanuts with moisture contents of 10.5% (w.b.), a greater concentration of residual ozone gas was obtained at the temperature of 25°C, equal to 190 µg L⁻¹. The greatest value obtained of half-life was equal to 7.7 min, for the peanuts ozonized at 25°C, while for those with moisture content of 10.5%, at the temperature of 35°C, half-life was 3.2 min. Ozone was efficient for the control of potentially aflatoxigenic fungi in peanuts, with reduction greater than three log cycles at the concentration of 21 mg L⁻¹ and exposure period of 96 h. In general, there was no alteration in quality of the peanuts or crude oil extracted due to exposure to ozone. It was concluded that from the obtained results that the decomposition process of ozone gas in peanuts, the determining factor is temperature. A 10°C temperature increase of the peanuts implicated a decrease of at least 43% on the half-life of the gas. Ozone is an important alternative for peanuts when referring to food safety since it is efficient in the control of potentially aflatoxigenic fungi and can actuate in the reduction of aflatoxin levels of the

product. The ozonation process, at a concentration of up to 21 mg L⁻¹ and for up to 96 h does not affect quality of peanuts and crude oil extracted from peanuts.

INTRODUÇÃO GERAL

A produção mundial 2008/09 de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) foi estimada em aproximadamente 33 milhões de toneladas (USDA, 2009). Nessa safra, os principais produtores de amendoim foram China e Índia, com 42,0 e 18% da produção mundial, respectivamente. O Brasil ainda ocupa uma modesta posição entre os países produtores de grãos de amendoim, com estimativa de produção para a safra 2009/10 de cerca de 290 mil toneladas (BRASIL, 2009).

Em escala global, cerca de 8 milhões de toneladas anuais dos grãos de amendoim são destinados ao consumo como alimento “*in natura*” ou industrializado, e 15 a 18 milhões são esmagados para fabricação de óleo comestível. O Japão, a Indonésia e os países europeus importam anualmente cerca de 1 milhão de toneladas de grãos para confeitaria. Estados Unidos e China, além de produtores, são grandes consumidores de amendoim como alimento, consumindo juntos cerca de 3 milhões de toneladas. Nos Estados Unidos, além de outras utilizações em confeitaria, cerca de 500 mil toneladas são destinadas especificamente à fabricação da pasta ou manteiga de amendoim (“*peanut butter*”), consumida diariamente em sanduíches, em substituição a manteigas ou margarinas convencionais (BRASIL, 2007). No Brasil, o consumo de amendoim é da ordem de 100 mil toneladas de grãos/ano.

Uma das principais características do amendoim é seu alto valor nutricional, e é uma importante fonte de óleo e proteína vegetal, com destaque para os elementos folato, niacina, vitamina e ácidos graxos essenciais (YEH et al., 2002). Deve-se destacar, entretanto, que os grãos de amendoim são substratos ideais para o desenvolvimento de fungos, que, além de causar degradação dos nutrientes, podem produzir as aflatoxinas, metabólitos secundários tóxicos aos homens e animais (SABINO et al., 1989). A síntese das aflatoxinas ocorre naturalmente e é atribuída aos fungos das espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e também por *Aspergillus nomius* em outras matérias-primas, como milho e algodão (PITT, 2000; BLESA et al., 2003; EHRLICH et al., 2007). Dentre os fatores que afetam a contaminação de amendoim e derivados por aflatoxinas destacam-se as práticas agrícolas

durante as etapas de plantio, colheita, secagem, transporte e armazenamento (OLIVEIRA et al., 2009).

Os fungos das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, segundo Payne (1998), são os dois produtores de aflatoxinas em grãos e subprodutos agrícolas e podem ser encontradas tanto no solo como no ar. Ainda de acordo com esse autor, essas espécies potencialmente aflatoxigênicas são frequentemente considerados fungos de armazenamento, todavia, em certas regiões, principalmente nas de clima tropical, podem colonizar os grãos ainda no campo. No campo, os dois principais parâmetros que afetam a produção de aflatoxinas em amendoim são temperatura e estresse hídrico. Temperaturas na faixa de 28 e 34 °C associadas a estresse hídrico durante a formação das vagens do amendoim são favoráveis à infecção pelos fungos e à produção de aflatoxinas (CRAUFURD et al., 2006; BATTILANI et al., 2008). Durante o armazenamento, a produção de aflatoxinas é afetada por diversos parâmetros, dentre os quais atividade de água, temperatura, presença de danos mecânicos e ocasionados por insetos, composição nutricional, composição do gás intergranular, competição entre espécies, dentre outros (SHAPIRA e PASTER, 2004). A síntese de aflatoxinas por *A. flavus* ocorre em temperaturas entre 15 e 37 °C, sendo mais acentuada na faixa entre 20 e 30 °C (FAO, 2001). De acordo com GQALENI et al. (1997), a temperatura e a atividade de água ótimas para a síntese de aflatoxinas por *A. flavus* são 30 °C e 0,996, respectivamente. Vale ressaltar que as condições climáticas verificadas no território brasileiro são ideais para o desenvolvimento desses fungos, particularmente em amendoim e derivados (RODRÍGUEZ-AMAYA e SABINO, 2002; OLIVEIRA et al., 2009).

A presença de aflatoxinas em alimentos é um sério problema mundial no que se refere à saúde pública, à agricultura e à economia (AMARAL et al., 2006; OZDEMIR e OZILGEN, 2007). Por muitos anos, os fungos foram conhecidos pela sua capacidade de produzir metabólitos tóxicos, porém, seus efeitos foram ignorados, tornando as micotoxicoses negligenciadas. Entretanto, tal situação foi alterada drasticamente em 1960, devido a um surto, conhecido como “*turkey-X disease*”, que provocou alta mortalidade em perus na Inglaterra. Durante a epidemia, cerca de 100.000 perus morreram após o consumo de torta de amendoim acrescentada à ração, proveniente do Brasil. Após análises químicas e microbiológicas, foram detectados quatro metabólitos

secundários do fungo *Aspergillus flavus*, denominados Aflatoxina B1 (AFB1), Aflatoxina B2 (AFB2), Aflatoxina G1 (AFG1) e Aflatoxina G2 (AFG2) (JEWERS, 1990).

As aflatoxinas se destacam por apresentar alta toxidez, aguda e crônica, em animais, incluindo o homem, podendo ocasionar danos no fígado, como cirroses e indução de tumores, além de efeitos mutagênicos e teratogênicos (ABDULKADAR et al., 2000). De acordo com Deshpande (2002), as aflatoxinas correspondem a um grupo de aproximadamente 20 metabólitos de fungos, incluindo AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 (Figura 1). AFB1 e AFG1 apresentam maior atividade carcinogênica que AFB2 e AFG2, sendo a AFB1 a de maior toxicidade e um dos mais potentes hepatocarcinógenos naturais (COULOMBE, 1991; OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

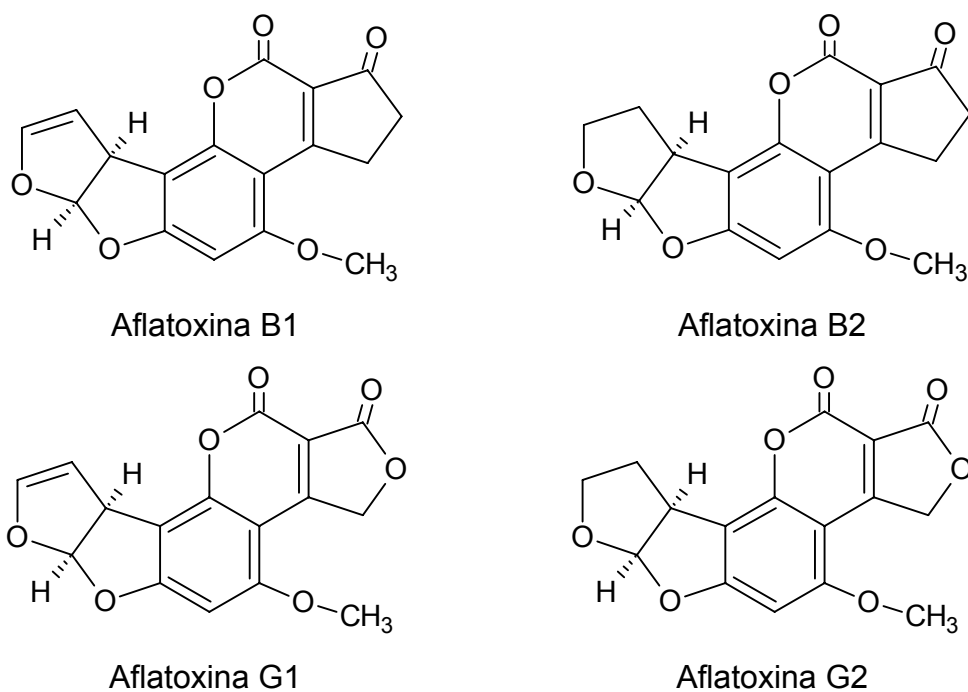


Figura 1 – Estruturas químicas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

A sensibilidade aos efeitos tóxicos das aflatoxinas, segundo Oliveira et al. (2004), varia consideravelmente entre as diferentes espécies. Com relação às espécies exploradas na avicultura comercial, a susceptibilidade é maior em patos, seguida pelos perus, gansos, faisões e frangos (MULLER et al., 1970). Para aves, a dose efetiva das aflatoxinas para a indução de hepatocarcinomas situa-se entre 10 e 30 ppb de AFB1 na dieta (WOGAN et al., 1992). Numa mesma espécie, a relação dose-resposta, de acordo com Coulombe (1991),

pode variar em função da raça, sexo, idade, dentre outros fatores. Em frangos, MARIANI (1998) relata que o efeito das aflatoxinas é maior na fase inicial de crescimento, ou seja, quando as aves ingerem aflatoxinas nos primeiros 21 dias de idade.

As aflatoxinas são extremamente tóxicas a aves, devido à rápida absorção desse composto pelo trato gastrointestinal, sendo um problema frequente na produção avícola (SANTURIO, 2000; STRINGHINI et al. 2000). Uma vez absorvidas, as aflatoxinas são imediatamente ligadas, de forma reversível, à albumina e, em menor escala, a outras proteínas. Formas de aflatoxinas ligadas e não ligadas a proteínas séricas espalham-se pelos tecidos, especialmente o fígado. Após serem depositadas no fígado, as aflatoxinas são biotransformadas pelo sistema microsomal hepático em metabólitos muito tóxicos, como 2,3-epóxido de aflatoxinas.

A toxicidade das aflatoxinas em frangos é caracterizada pela diminuição das concentrações de proteína total, albumina, colesterol, glicose, ácido úrico, fósforo inorgânico e cálcio, pelo aumento da atividade enzimática da alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST), indicativos de lesões hepáticas (BALACHANDRAN e RAMARKRISHNAN, 1987; AMER, 1998; SANTURIO, 1999; FERREIRA et al., 2006) e pela redução dos glóbulos brancos (MARIN et al., 2003). Podem ser citados, também, outros efeitos da ação tóxica como o decréscimo no ganho de peso, além de anorexia, depressão, desuniformidade da estatura, anemia, esteatorréia, aumento da incidência de problemas de penas, lesões no nervo ciático, redução do peso das penas, dentre outros (SANTURIO, 2000; GIACOMINI et al., 2006).

O quadro clínico da aflatoxicose, de acordo com Ferreira et al. (2006), está diretamente relacionado ao grau de contaminação do produto, tempo de exposição e quantidade de ração contaminada por aflatoxinas ingerida pelos animais e seu estado nutricional. Suínos e caninos são as espécies mais sensíveis, sendo, normalmente, os animais jovens, os mais afetados pelas aflatoxicoses (MALLMANN et al., 1994; ZLOTOWSKI et al., 2004; YU et al., 2005; AKANDE et al., 2006), e a redução da taxa de desenvolvimento dos animais, a maior consequência de aflatoxicose crônica (PIER, 1992).

No que se refere à capacidade das aflatoxinas de ocasionar câncer em humanos, vários estudos foram realizadas entre a década de 60 e a década de

80, com o intuito de estabelecer correlações entre dieta contendo aflatoxinas e risco de adquirir câncer de fígado primário. Deve-se destacar que a maioria dos estudos foi realizada em países em desenvolvimento da África Subsaariana ou da Ásia, onde é comum a incidência de câncer de fígado. Apesar das limitações referentes à metodologia adotada nesses estudos, os resultados obtidos indicaram maior incidência de câncer de fígado primário nas regiões onde havia maior ingestão de aflatoxinas. Em 1992, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (AIPC), diante de todos os estudos relevantes, concluiu que havia evidências suficientes da carcinogenicidade em humanos da aflatoxina B1 e das aflatoxinas totais (IARC, 1993; IARC, 2002). Vale ressaltar que há muitos relatos na literatura que indicam altos níveis de contaminação por aflatoxinas em grãos muito utilizados na dieta da população de países africanos e asiáticos, como amendoim, milho e arroz (POLYCHRONAKI, 2007).

Ressalta-se que cada vez mais as diversas nações estabelecem regulamentações rigorosas referentes à presença de micotoxinas tanto para alimentação humana quanto para animal. De acordo com Egmond e Jonker (2006), o número de países que possuem tais regulamentações cresce continuamente e em 2004 cerca de 100 países apresentavam limites específicos para várias combinações de micotoxinas e commodities. Gradualmente algumas comunidades econômicas, como a União Europeia e o Mercosul, estabeleceram legislações comuns dentro de cada bloco. Especialmente no caso da União Europeia, num curto período, entraram em vigor regulamentos severos para muitas combinações de toxina/*commodity*. Este tipo de procedimento adotado em um bloco econômico não acarreta impacto somente entre seus associados, mas, também, em seus parceiros comerciais e ainda nas nações que pretendem aderir ao grupo. Em se tratando de aflatoxinas, o FDA (US Food and Drug Administration) estabelece limite de 20 ppb para produtos destinados à alimentação humana, exceto para o leite, cujo limite é de 0,5 ppb (FDA, 2007). No caso do leite, os limites são altamente variáveis, dependendo, inclusive, do grau de desenvolvimento econômico dos países, como afirmam Kaniou-Grigoriadou *et al.* (2005). De acordo com esses autores, enquanto a União Europeia estabeleceu limite de 0,05 ppb para leite cru, outras nações permitem maior concentração da toxina no produto, como no caso da Nigéria, com limite de 1,0 ppb. No Brasil, as aflatoxinas são as

únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na Legislação (CALDAS et al., 2002). O Ministério da Saúde, por meio da Resolução - RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002, estabeleceu como limite máximo 20 ppb de aflatoxinas totais (AFB1 + AFB2 + AFG1 + AFG2) em amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho, destinados ao consumo (BRASIL, 2002).

O processo de prevenção e controle dos diversos tipos de micotoxinas, após mais de 40 anos da sua descoberta, ainda não apresentou um modelo seguro, eficaz e de solução definitiva (PRADO et al., 2006). Muitas micotoxinas se destacam por apresentar significativa estabilidade química, acarretando sua persistência no produto, mesmo após a remoção dos fungos durante as etapas do processamento (BITTENCOURT, 2005).

Existem dois processos básicos no controle de micotoxinas em alimentos: descontaminação e detoxificação (OZDEMIR e OZILGEN, 2007). O processo de descontaminação é definido como a remoção física das unidades contaminadas. Por outro lado, a detoxificação é a remoção ou destruição da toxina nas unidades contaminadas. Para as aflatoxinas, em decorrência da impossibilidade de evitar algum grau de contaminação, uma variedade de estratégias tem sido proposta com o intuito de detoxificação de alimentos (RITCHIE, 2002). De acordo com Shapira e Paster (2004), um processo de detoxificação ideal deve inativar, destruir ou remover a toxina completamente ou reduzir sua concentração em níveis aceitáveis; não produzir resíduos tóxicos na matéria-prima ou subproduto; preservar o valor nutricional do alimento; destruir micélios e esporos de fungos de modo a evitar a produção da toxina; ser eficiente economicamente; ser de fácil uso e aprovado por agências reguladoras.

As estratégias de detoxificação incluem métodos de inativação térmica, irradiação, extração com solvente, inativação microbiológica, métodos químicos de inativação e fermentação. Os métodos químicos de inativação têm sido amplamente testados devido à grande capacidade de degradação e inativação das aflatoxinas (RITCHEI, 2002). Entretanto, apesar da significativa capacidade das substâncias químicas de eliminar as aflatoxinas, na maioria das vezes tais métodos são inviáveis tecnicamente e economicamente, ou ainda

proporcionam formação de resíduos tóxicos, ou alteram a composição nutritiva dos alimentos. Dentre os métodos químicos apresentados, destacam-se a detoxificação com amônia e a reação com bissulfito de sódio, que apresentam efetiva capacidade detoxificante (KOLTUN, 1986; BOZOGLU, 2006; OZDEMIR e ZILGEN, 2007). Particularmente, a detoxificação de aflatoxinas com amônia em alimentos é um procedimento aprovado em países como Estados Unidos, França, Senegal e Inglaterra, custando tal processo entre 5 e 10% do valor da *commodity* (COKER, 1998; HUWIG et al., 2001). Uma alternativa que vem sendo apresentada para prevenção e controle de micotoxinas e em especial as aflatoxinas é o gás ozônio.

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 (KIM et al., 1999a). Sinteticamente, o gás ozônio pode ser gerado pelo método de descarga por efeito corona. Durante a geração do ozônio, moléculas de oxigênio (O_2) são dissociadas, produzindo radicais livres altamente reativos, que reagem com outras moléculas de oxigênio, formando o O_3 , conforme mostrado na Figura 2 (NOVAK e YUAN, 2007).

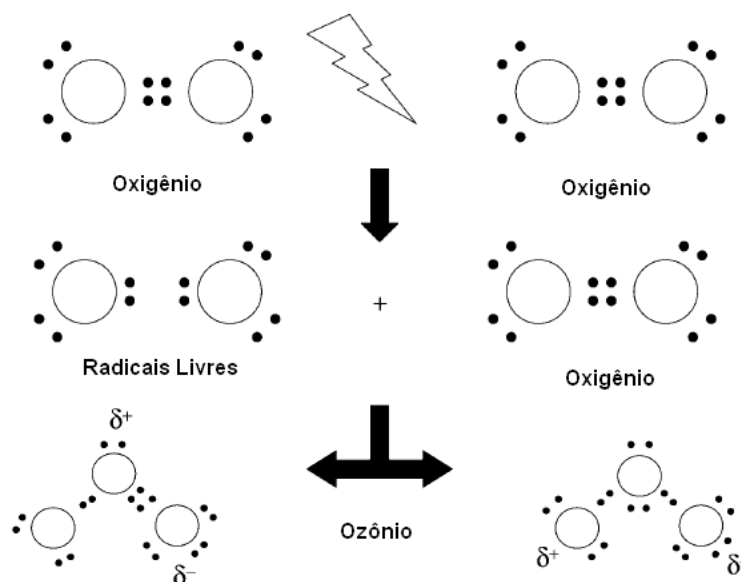


Figura 2 - Mecanismo de formação do gás ozônio a partir de moléculas de oxigênio (NOVAK e YUAN, 2007).

Historicamente, o ozônio foi descoberto por Schonbein em 1840, seguido por uma patente nos Estados Unidos emitida por Fewson em 1888,

que tratava da remoção de odores provenientes de esgotos. A primeira desinfecção de água com ozônio data de 1906, na França, e o primeiro sistema de tratamento de água com uso do ozônio, em escala comercial, foi instalado em 1940, nos Estados Unidos. Dentre as características do ozônio, pode ser destacado que esse gás é altamente reativo; é necessário que seja gerado no próprio local de aplicação; apresenta alta a solubilidade em água em baixa temperatura e pH; tem como produto final de sua decomposição o oxigênio; é um efetivo agente oxidante contra uma variedade de microorganismos (GRAHAM, 1997; NOVAK e YUAN, 2007).

A ozonização tem sido utilizada na Europa para sanitizar água destinada ao consumo humano. Atualmente, utiliza-se essa tecnologia para outros fins, como para o tratamento de água de piscinas; para a sanitização de galões de água, de superfícies de alimentos, de plantas e de equipamentos de processamento de alimentos; para a desinfecção de carcaças; na conservação de frutas e de verduras; 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).

No que tange ao uso do gás ozônio na prevenção da produção das aflatoxinas em alimentos, o gás ozônio, que é um forte agente antimicrobiano, pode atuar na inativação ou inibição do desenvolvimento de espécies de fungos potencialmente aflatoxigênicas nas diversas *commodities*. Sabe-se que em produtos agrícolas o gás ozônio inibe ou retarda o desenvolvimento de fungos dos gêneros *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium* e *Mucor*, dentre outros (RAILA et al., 2006; WU et al., 2006), além de outros microorganismos, como vírus e bactérias (KIM et al., 1999b; KHADRE et al., 2001; AGUAYO et al., 2006; ÖZTEKIN et al., 2006; WHANGCHAI et al., 2006).

Além de apresentar grande capacidade de inativar microorganismos e dessa forma ser capaz de prevenir a formação das aflatoxinas, o gás ozônio tem sido proposto como agente na degradação de micotoxinas. Na literatura encontram-se relatos que mencionam o gás ozônio como agente capaz de degradar as aflatoxinas, fumonisina, ochratoxina, patulina, deoxinivalenol e zearalenona (MCKENZIE et al., 1997; YOUNG et al., 2006). A capacidade de o gás ozônio, produzido eletroquimicamente, eliminar aflatoxinas em grãos de milho foi verificada por McKenzie et al. (1998), que confirmaram a detoxificação

alimentando perus com dieta à base de produtos ozonizados ou não. Observou-se alta capacidade detoxificante do gás ozônio e dieta contendo grãos de milho inicialmente contaminados com aflatoxinas e posteriormente ozonizados não afetou o desenvolvimento dos perus. A eficácia do processo de ozonização na degradação de aflatoxina em grãos de milho com teor de água entre 10 e 12% b.u. foi verificada por Prudente e King (2002). O gás ozônio foi aplicado na massa de grãos com vazão de 2 L min^{-1} , sendo observada uma redução de 92% na concentração de aflatoxinas no produto. Inan et al. (2007) estudaram o poder detoxificante do gás ozônio sobre aflatoxinas em pimentão. Foram utilizadas três concentrações do gás ozônio (16; 33 e 66 mg L^{-1}) e quatro períodos de exposição (7,5; 15; 30 e 60 min). Os autores observaram uma redução de 80 e 90% de Aflatoxina B1, após 60 min, para as concentrações do gás ozônio de 33 e 66 mg L^{-1} , respectivamente. 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).

Em vista da extensa aplicabilidade da ozonização na indústria de alimentos, vale destacar os cuidados necessários no que tange à segurança do trabalho durante as atividades ou operações em que os indivíduos ficam ou podem ficar expostos ao gás ozônio. Na Figura 3 são apresentados os limites referentes aos graus de toxicidade do gás ozônio. Verifica-se que a exposição a concentrações acima de 10.000 ppm, normalmente adotadas nas indústrias, podem levar a morte.

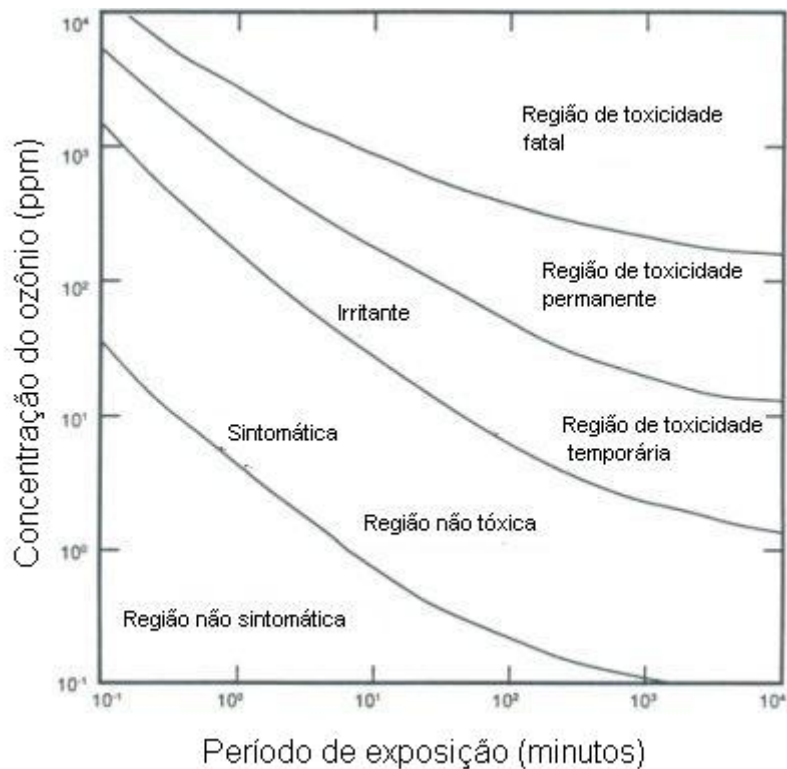


Figura 3 – Limites de toxicidade do gás ozônio em diferentes concentrações e períodos de exposição.

Fonte: <<http://www.lenntech.com/ozone-and-humans.htm>> Acesso: dez. 2009.

De acordo com Khadre et al. (2001), o uso de um sistema seguro é de importância primária para aplicação do ozônio na indústria de alimentos. Sistemas de detecção e destruição do gás ozônio residual são essenciais para a segurança dos trabalhadores. Esses autores afirmaram que se faz necessária a instalação no local de ozonização de um detector com célula ajustada para medição da concentração do gás na faixa entre 0,01 a 100 ppm. Outro dispositivo que é de suma importância é o destruidor térmico ou catalítico de ozônio que deve ser instalado com a finalidade de acelerar a decomposição do gás residual na saída do sistema (DAMEZ et al., 1991).

No que se refere às regulamentações governamentais que tratam dos níveis aceitáveis de concentração e período de exposição ao ozônio, tem-se que nos Estados Unidos um indivíduo pode ficar exposto a concentração do gás de 0,1 ppm por até 8 h por dia (CRF, 1997). Na Europa, o limite estabelecido para exposição de indivíduos ao gás ozônio é de 0,06 ppm por até 8 horas (WHO, 2000). A legislação brasileira, por meio da Norma Regulamentadora N° 15, Portaria N° 3.214/78, estabelece limite de exposição

de trabalhadores ao gás ozônio, que é 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 no caso de sua caracterização (BRASIL, 1978).

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a cinética de decomposição do gás ozônio, o efeito desse gás como agente fungicida e detoxificante de aflatoxinas e possíveis alterações qualitativas nos grãos de amendoim e no óleo bruto extraído desses grãos em decorrência do processo de ozonização.

As informações obtidas foram sistematizadas em três capítulos. O Capítulo 1 refere-se à cinética de decomposição do gás ozônio em grãos de amendoim, observando-se o efeito de diferentes teores de água, temperatura e vazão de entrada do gás. No Capítulo 2, estudou-se o efeito do gás ozônio como agente fungicida e detoxificante sobre aflatoxinas nos grãos de amendoim. No Capítulo 3, avaliou-se o efeito da aplicação do gás ozônio na qualidade de grãos de amendoim e do óleo bruto extraído desses grãos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULKADAR, A.H.W.; AL-ALI, A., AL-JEDAH, J. Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. **Food Control**, v.11, p.157-160, 2000)
- AGUAYO, E.; ESCALONA, V.H.; ARTES, F. Effect of cyclic exposure to ozone gas on physicochemical, sensorial and microbial quality of whole and sliced tomatoes. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, p.169-177, 2006.
- AKANDE, K.E.; ABUBAKAR, M.M.; ADEGBOLA, T.A.; BOGORO, S.E. Nutritional and Health Implications of Mycotoxins in Animal Feeds: A Review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.5, n.5, p.398-403, 2006.
- AMARAL, K.A.S., NASCIMENTO, G.B., SEKIYAMA, B.L., JANEIRO, V., MACHINSKI JR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.336-342, 2006.

AMER, A.M.M.; FAHIM, E.M.M.; IBRAHIM, R.K. Effect of aflatoxicosis on the kinetic behaviour of ceftiofur in chickens. **Research in Veterinary Science**, v.65, p.115-118, 1998.

BALACHANDRAN, C.; RAMARKRISHNAN, R. Influence of dietary aflatoxin on certain serum enzyme levels in broiler chickens. **Mycopathologia**, v.101, p.65-67, 1987.

BATTILANI, P.; BARBANO, C.; LOGRIECO, A. Risk assessment and safety evaluation of mycotoxins in fruits. In: BARKAI-GOLAN, R.; PASTER, N. **Mycotoxins in Fruits and Vegetables**. London: Academic Press, 2008, p.1-26.

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

BLESA, J.; SORIANO, J.M.; MOLTO, J.C.; MARIN, R.; MANES, J. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase q dispersion and liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.1011, p.49-54, 2003.

BOZOGLU, F. Different mycotoxin inactivation applications and their inactivation mechanisms. **The Bulletin of the Istanbul Technical University**. V.54, n.4, p.59-63, 2006.

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. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. **Resolução - RDC nº 274 de 15 de outubro de 2002**, Diário Oficial da União. 16.10.2002, Brasília, DF.

BRASIL. **Conjunturas Agropecuárias - Especiais 2005. Amendoim análise perspectiva do mercado 2004**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/cas/especiais/amendoim_perspectiva_do_mercado_safra_2004_2005.pdf> Acesso em: 09 novembro 2007.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. Estimativa de produção de grãos da safra 2009/2010. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1graos_09.10.pdf> Acesso em: 30 outubro 2009.

CALDAS, E.D., SILVA, S.C., OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.3, p.319-323, 2002.

COKER, R.D. The chemical detoxification of aflatoxin contaminated animal feed. In: Watson, D.H. (Ed.). **Natural Toxicants in Food**. Boca Raton: CRC Press, p.284–298, 1998.

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

CRAUFURD, P.Q.; PRASAD, P.V.V.; WALIYAR, F.; TAHERI, A. Drought, pod yield, pre-harvest *Aspergillus* infection and aflatoxin contamination on peanut in Niger. **Field Crops Research**, v.98, p.20–29, 2006.

CFR Code of Federal Regulations. **Air contaminants**. Title 13, part 1910. Washington, D.C.: Office of Federal Register, 1997.

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.

DESHPANDE, S.S. **Handbook of Food Toxicology**. New York: Marcel Dekker, 2002. 920p.

EGMOND, H.P.V.; JONKER, M.A. Regulations for Mycotoxins in Food: Focus on the European Union and Turkey. **The Bulletin of the Istanbul Technical University**. V.54, n.4, p.1-17, 2006.

EHRlich, K.C.; KOBEMAN, K.; MONTALBANO, B.G.; COTTY, P.J. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v.114, n. 2, p.153-159, 2007.

FAO. **Food and Agriculture Organization**. Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. Roma. Editora das Nações Unidas, 2001. 124p.

FDA. Food and Drug Administration. **Compliance Policy Guide Manual**. Disponível em: <http://www.fda.gov/ora/compliance_ref/cpg/default.htm> Acesso em: 10 agosto 2007.

FERREIRA, H.; PITTNER, E.; SANCHES, H.F.; MONTEIRO, M.C. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. **Ambiência**, v.2 n.1 p.113-127, 2006.

GIACOMINI, L.; FICK, F.A.; DILKIN, P.; MALLMANN, C.A.; RAUBER, R.H.; ALMEIDA, C. Desempenho de frangos de corte intoxicados por aflatoxinas. **Ciência Rural**, v.36, n.01, p.234-239, 2006.

GQALENI, N. SMITH, J.E.; LACEY, J.; GETTINBY, G. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate *Aspergillus flavus* in surface agar culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.3, p.1048-1053, 1997.

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.

HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v.122, p.179-188, 2001.

IARC International Agency for Research on Câncer. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: IARC Press, v. 56, pp. 245–395, 1993.

IARC International Agency for Research on Câncer. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene**. Lyon: IARC Press, v.82, pp.171–300, 2002.

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

JEWERS, K. Mycotoxins and their effect on poultry production. **Options Méditerranéennes**, Sér. A., n.7, p.196-202, 1990.

KANIOU-GRIGORIADOU, I.; ELEFThERIADOU, A.; MOURATIDOU, T.; KATIKOU, P. Determination of aflatoxin M1 in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. **Food Control**, v.16, p.257-261, 2005.

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, 1999a.

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

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; KHADRE, MA. 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, pp.167-218, 2003.

KOLTUN, S.P. Aflatoxin inactivation of undelinted cottonseed by ammoniation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.63, n.4, p.533-534, 1986.

MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; WENTZ, I. Aflatoxinas - Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, n.24, n.3, p.635-643, 1994.

MARIANI, G.V.C. **Efeito de aflatoxinas sobre o desempenho produtivo de frangos de corte em diferentes períodos de desenvolvimento corporal**. 78p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, RS, 1998.

MARÍN, F.R.; RIVERA, S.; FINOL, G.; MAVÁREZ, Y. Aflatoxina B1, selenio y saccharomyces cerevisiae en la respuesta inmune de pollos de engorde en el estado Zulia, Venezuela. **Revista Científica**, v.13, n.5, p.360-370, 2003.

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.

MCKENZIE, K.S.; KUBENA, L.F.; DENVIR, A.J.; ROGERS, T.D.; HITCHENS, G.D.; BAILEY, R.H.; HARVEY, R.B.; BUCKLEY, S.A.; PHILLIPS, T.D. Aflatoxicosis in Turkey Poults is Prevented by Treatment of Naturally Contaminated Corn with Ozone Generated by Electrolysis. **Poultry Science**, v.77, p.1094–1102, 1998.

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, R.D.; CARLSON, C.W.; SEMENIUK, G.; HARSHFIELD, G.S. The response of chicks, ducklings, goslings, pheasants and poults to graded levels of aflatoxin. **Poultry Science**, v.49, p.1346-1350, 1970.

OLIVEIRA, C.A.F.; GERMANO, P.M.L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, v.31, n.4, p.417-424, 1997.

OLIVEIRA, C.A.F.; BUTKERAITIS, P.; ROSMANINHO, J.F.; GUERRA, J.L.; CORREA, B.; REIS, T.A. Alterações hepáticas em codornas japonesas submetidas à intoxicação prolongada por aflatoxina B1. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.213-217, 2004.

OLIVEIRA, C.A.F.; GONÇALVES, N.B.; ROSIM, R.E.; FERNANDES, A.M. Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p.174-183, 2009.

OZDEMIR, M.; OZILGEN, M. **Mycotoxins in grains and nuts: II) Decontamination and detoxification.** Disponível em: <<http://www.okyanusbilgiambari.com/Bilim/Mycotoxin-Detoxification.pdf>>.

Acesso em: 10 agosto 2007.

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.K.; BHATNAGAR, D. **Mycotoxins in Agriculture And Food Safety.** New York: Macel Dekker, 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.

PIER, C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3964-3967, 1992.

PITT, J.I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, v.38, Supplement 1, p.17–22, 2000.

POLYCHRONAKI, N. **Biomarkers of aflatoxin exposure and a dietary intervention: studies in infants and children from Egypt and Guinea and young adults from China.** 114p. Thesis (Doctor of Medicine) - University of Kuopio - Kuopio. 2007.

PRADO, G.; CARVALHO, E. P. ; MADEIRA, J. E. C. G. ; MORAIS, V. A. D. ; OLIVEIRA, M. S. ; CORREA, R. F. ; CARDOSO, V. N. Efeito da irradiação gama (⁶⁰Co) na freqüência fúngica de amendoim in natura em função do tempo de prateleira. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.5, p. 930-936, 2006.

PRUDENTE, A.D.; KING, J.M. Efficacy and Safety Evaluation of Ozonation to Degrade Aflatoxin in Corn. **Journal of Food Science**, v.67, n.8, 2002.

RAILA, A.; LUGAUSKAS, A.; STEPONAVIČIUS, D.; RAILIENĖ, M.; STEPONAVIČIENĖ, A.; ZVICEVIČIUS, E. Application of ozone for reduction of mycological infection in wheat grain. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.13, n.2, p.287-294, 2006.

RITCHIE, J.C. Aflatoxin. In: Waring, R.H.; Steventon, G.B.; Mitchell, S.C. **Molecules of Death**. London: Imperial College Press, p. 1-18, 2002.

SABINO, M.; ZORBETT, M.A. P.; PEDROSO, M.O.; MILANEZ, T.V. Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de São Paulo, no período de 1980 a 1987. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.49, n.1, p.41-44, 1989.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.1-11, 2002.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.2, n.1, p.1-12, 2000.

SANTURIO, J.M.; MALLMANN, C.A.; ROSA, A.P.; APPEL, G.; HEER, A.; DAGFÖRDE, S.; BÖTTCHER, M. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. **British Poultry Science**, v.40, n.1, p.115-119, 1999.

SHAPIRA, R.; PASTER, N. Control of mycotoxins in storage and techniques for their decontamination. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. (Eds.) **Mycotoxins in food**. New York: CRC Press, pp.190-223, 2004.

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.

STRINGHINI, J.H.; MOGYCA, N.S.; ANDRADE, M.A.; ORSINE, G.F.; CAFÉ, M.B.; BORGES, S.A. Efeito da qualidade do milho no desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.1, p.191-198, 2000.

USDA. **Production, Supply and Distribution**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: 31 out 2009.

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, p.821–825, 2006.

WHO World Health Organization. **Air Quality Guidelines for Europe**. WHO Regional Publications, European Series, N° 91, Second Edition, 2000. 273p.

WOGAN, G.N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. **Progress in Clinical and Biological Research**, v.374, p.123-37, 1992.

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.

YEH, J.; PHILLIPS, R.D.; RESURRECCION, A.V.A; HUNG, Y. Physicochemical and sensory characteristic changes in fortified peanut spreads after 3 months of storage at different temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2377-2384, 2002.

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

YU, J.; CLEVELAND, T.E.; NIERMAN, W.C.; BENNETT, J.W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micología**. v.22, p.194-202, 2005.

ZLOTOWSKI, P., CORRÊA, A.M.R., ROZZA, D.B., DRIEMEIER, D., MALLMANN, C.A., MIGLIAVACCA, F.A. Surto de aflatoxicose em suínos no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.24, n.4, p.207-210, 2004.

Primeiro Capítulo

CINÉTICA DA DECOMPOSIÇÃO DO GÁS OZÔNIO EM AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.)

ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR¹

¹ Departamento de Engenharia Agrícola

Universidade Federal de Viçosa, CEP 36.570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

e-mail: ernandes.alencar@ufv.br

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a cinética de decomposição do gás ozônio em grãos de amendoim. Para avaliar a cinética de decomposição do ozônio utilizaram-se amostras de 1 kg de amendoim, com teores de água de 7,1 e 10,5% base úmida (b.u.), acondicionadas em recipientes de vidro com capacidade de 3 L. Os grãos de amendoim foram ozonizados na concentração de $450 \mu\text{g L}^{-1}$, nas temperaturas de 25 e 35 °C e vazões do gás de 1,0 e 3,0 L min^{-1} . Determinou-se o tempo de saturação, quantificando-se a concentração residual do ozônio após a passagem do gás pela massa de grãos, até que a mesma se mantivesse constante. A cinética de decomposição do ozônio foi avaliada depois da saturação da massa de grãos com o gás. Nessa etapa, obteve-se a concentração residual do ozônio, depois de períodos de repouso, durante os quais o gás reagia no meio poroso, e dessa forma, era decomposto. Um modelo cinético de primeira ordem foi ajustado aos dados da concentração residual de ozônio em função do tempo, após linearização. A partir dos valores da constante da taxa de decomposição, definida como a inclinação da reta referente ao modelo cinético de primeira ordem linearizado, foi possível obter a meia vida do ozônio em grãos de amendoim. Para os grãos de amendoim com teor de água de 7,1% (b.u.), nas temperaturas de 25 e 35 °C e vazões de 1,0 e 3,0 L min^{-1} , os valores obtidos de tempo de saturação do gás ozônio permaneceram na faixa entre 173 e 192 min, com concentração de saturação de aproximadamente $260 \mu\text{g L}^{-1}$. Para os grãos com teor de água de 10,5% b.u., obteve-se maior concentração

residual do gás ozônio na temperatura de 25 °C, sendo igual a 190 $\mu\text{g L}^{-1}$. No que se refere ao tempo de meia vida do gás ozônio, o maior valor obtido foi equivalente a 7,7 min para os grãos ozonizados na temperatura de 25 °C, enquanto para aqueles com 10,5% de teor de água, na temperatura de 35 °C, foi de 3,2 min. Concluiu-se que, no processo de decomposição do ozônio em grãos de amendoim, o fator determinante é a temperatura. Um aumento de 10 °C na temperatura dos grãos implica decréscimo de, pelo menos, 43% no tempo de meia vida do gás.

Palavras-chave: Concentração de saturação, tempo de saturação, tempo de meia vida.

DECOMPOSITION KINETICS OF OZONE GAS IN PEANUTS (*Arachis hypogaea* L.)

ABSTRACT

This study was developed with the objective of analyzing decomposition kinetics of ozone gas in peanuts. To evaluate decomposition kinetics of ozone, 1 kg of peanuts was used with moisture contents between 7.1 and 10.5% (w.b.), stored in a glass recipient with volume of 3 L. The peanuts were ozonized at a concentration of $450 \mu\text{g L}^{-1}$, at temperatures of 25 and 35 °C and gas flow rates of 1.0 and 3.0 L min^{-1} . Saturation time was determined and residual concentration of ozone was quantified after passing the gas through the peanut mass until becoming constant. Decomposition kinetics of the ozone was evaluated after saturation of the peanut mass with gas. In this stage, residual ozone concentration was obtained after repose periods, during which the gas reacted in the porous medium and therefore, was decomposed. A first order kinetic model was adjusted to the residual ozone concentration data in function of time, after linearization. From the values of the decomposition rate, defined as the slope of the line referring to the linearized first order kinetic model, it was possible to obtain a half-life for ozone in peanuts. For the peanuts with moisture contents of 7.1% (w.b.), at the temperatures of 25 and 35°C and flow rates of 1.0 and 3.0 L min^{-1} , the values obtained for ozone gas saturation time remained between 173 and 192 min, with a saturation concentration of approximately $260 \mu\text{g L}^{-1}$. For the peanuts with moisture contents of 10.5% (w.b.), a greater concentration of residual ozone gas was obtained at the temperature of 25°C, equal to $190 \mu\text{g L}^{-1}$. When referring to half-life, the greatest value obtained was equal to 7.7 min, for the peanuts ozonized at 25°C, while for those with moisture content of 10.5%, at the temperature of 35°C, half-life was 3.2 min. It was concluded that in the decomposition process of ozone gas in peanuts, the determining factor is temperature. A 10°C temperature increase of the peanuts implicated a decrease of at least 43% on the half-live of the gas.

Keywords: Saturation concentration, saturation time, half-life.

1. INTRODUÇÃO

O amendoim possui alto valor nutricional e seus grãos são largamente utilizados, e é uma importante fonte de óleo e proteína vegetal, com destaque para os elementos folato, niacina, vitamina e ácidos graxos essenciais (YEH et al., 2002). Em virtude disso, a obtenção de um produto dentro dos padrões de qualidade é de fundamental importância, pois o amendoim é um substrato ideal para o desenvolvimento de fungos toxigênicos, que, além de causar degradação dos nutrientes, produzem metabólitos secundários tóxicos aos homens e animais (SABINO et al., 1989). A contaminação do amendoim por fungos, para Chiou (1997), é uma preocupação para processadores e consumidores devido à sua associação com a deterioração da qualidade e com a produção de aflatoxinas. As aflatoxinas afetam diretamente a qualidade do amendoim e seus derivados, tanto para consumo humano como para consumo animal (PRADO et al., 1999). Nesse sentido, tem-se proposto o ozônio tanto como fungicida, atuando como agente preventivo no processo de produção dessa toxina, ou como agente curativo, atuando na detoxificação do produto (MCKENZIE et al., 1997; MCKENZIE et al., 1998; HSIEH et al., 1998; PRUDENTE e KING, 2002; GÜZEL-SEYDIM et al., 2004; WU et al., 2006; YOUNG et al., 2006).

O ozônio é uma molécula instável formada pela adição de um átomo de oxigênio à molécula diatômica de oxigênio. Esse gás, dentre os compostos geralmente utilizados, destaca-se por apresentar o segundo maior potencial de oxidação (2,07 mV), sendo superado somente pelo flúor (MUSTAFA, 1990; GUZEL-SEYDIM et al., 2004). Essa característica torna o ozônio um forte agente antimicrobiano com grande aplicabilidade na indústria de alimentos e um dos mais potentes sanitizantes. Normalmente, são necessárias baixas concentrações de ozônio e curto tempo de contato para inativar bactérias, fungos, leveduras, parasitas e vírus, porém a suscetibilidade dos microrganismos a esse gás varia com o estado fisiológico da cultura, pH do meio, temperatura, teor de água, carga orgânica, presença de aditivos, entre outros fatores (KHADRE et al., 2001; PUIA e FLORIAN, 2004; SUSLOW, 2004; STUCKI et al., 2005; PASCUAL et al., 2007; YUK et al., 2007; AKBAS e OZDEMIR, 2008; Selma et al., 2008). Outro importante aspecto a ser

mencionado é que o ozônio foi classificado como GRAS (Generally Recognized as Safe) nos Estados Unidos e liberado pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso direto em alimentos, tanto na forma gasosa quanto dissolvido em água, como agente antimicrobiano (FDA, 2001).

Dentre as vantagens da aplicação do ozônio, tem-se o fato de que o gás 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 oxigênio (NOVAK e YUAN, 2007).

A alta reatividade do ozônio é atribuída à configuração eletrônica da molécula (BELTRÁN, 2005). O ozônio pode se caracterizar tanto como agente eletrofílico como nucleofílico. Como agente eletrofílico, o ozônio apresenta ausência de elétrons em um dos orbitais dos átomos de sua molécula. Quando há excesso de elétrons em um dos orbitais dos átomos da molécula do ozônio, o gás é um agente nucleofílico.

Em alimentos, o ozônio reage rapidamente e, conseqüentemente, decompõe-se com a produção de oxigênio, sem a presença de resíduo tóxico (KHADRE et al., 2001; CULLEN et al., 2009). Em água, dentre os fatores que afetam a decomposição do ozônio, destacam-se o pH e a temperatura. Em temperaturas ou pH elevados, acelera-se o processo de decomposição do ozônio em uma variedade de radicais livres (CSÉFALVAY et al., 2007; NOVAK e YUAN, 2007; ERSHOV e MOROZOV, 2009).

Apesar de serem encontrados na literatura muitos relatos referente à degradação do ozônio em água e também ao efeito da aplicação dessa tecnologia na preservação de alimentos, há carência de estudos que tratem, por exemplo, do tempo de saturação, ou seja, o tempo necessário para que a concentração do gás ozônio aplicada permaneça constante, e de parâmetros da cinética de decomposição do ozônio em meios porosos, como o tempo de meia vida, que é o tempo necessário para que a concentração desse gás se reduza à metade. Esses parâmetros são importantes na predição da distribuição do ozônio em um determinado meio poroso, na avaliação da viabilidade técnica do processo de ozonização e para dimensionar sistemas industriais com a utilização do gás ozônio.

Diante do contexto apresentado, objetivou-se com este trabalho determinar a concentração e o tempo de saturação do ozônio e avaliar a cinética de decomposição desse gás em grãos de amendoim.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Setor de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola – DEA, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG.

Para determinar a concentração e o tempo de saturação e avaliar a cinética de decomposição do gás ozônio, foram utilizados grãos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), com teores de água de 7,1 e 10,5% base úmida (b.u.), nas temperaturas de 25 e 35 °C.

O teor de água dos grãos de amendoim foi determinado pelo método gravimétrico em estufa com circulação forçada de ar e temperatura de 130 ± 1 °C por 6 h (ASAE, 2002).

O gás ozônio foi obtido por meio de um gerador de ozônio baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica (DBD) desenvolvido pelo Departamento de Física do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA), São José dos Campos, SP (Figura 1). No processo de geração do ozônio, foi utilizado como insumo o oxigênio com grau de pureza de $90\pm 3\%$, isento de umidade, obtido do concentrador Mark 5 Plus Oxygen Concentrator.



Figura 1 - Gerador de ozônio.

A concentração de ozônio foi determinada pelo método iodométrico, descrito por Clescerl et al. (2000), que consiste no borbulhamento do 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 , foi necessário acidificar o meio com 2,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 N. A solução foi então titulada com tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) 0,005 N, com uso de solução de amido 1% como indicador.

2.1. Tempo de saturação e cinética de decomposição do ozônio em grãos de amendoim

Para determinar o tempo de saturação do gás ozônio em grãos de amendoim, fez-se a injeção do gás, na concentração de $450 \mu g L^{-1}$, em recipientes de vidro, com capacidade de 3,25 L, contendo 1 kg de grãos. Nessa etapa, as vazões de entrada do gás foram de 1,0 e $3,0 L min^{-1}$. Determinou-se a concentração residual do gás após a passagem pelo produto, em intervalos de tempos regulares, até que ela se mantivesse constante, para as diferentes combinações de teor de água, temperatura e vazão do gás, seguindo método proposto por Santos et al. (2007). Para relacionar concentração residual do gás ozônio com o tempo, realizou-se ajuste da 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 ($\mu g L^{-1}$);

t = tempo (s);

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

A partir dos valores das constantes b e c, de acordo com Venegas et al. (1998), foi possível obter o tempo de saturação para cada combinação de teor de água, temperatura e vazão do gás (Equação 2):

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

em que

t_{Sat} = tempo de saturação (s).

A cinética de decomposição foi avaliada depois da saturação do meio poroso com o ozônio, quantificando-se a concentração residual do gás, após intervalos de tempo durante os quais acontecia a decomposição do ozônio. Após cada intervalo, estabelecia-se novamente a concentração de saturação. Esse procedimento foi repetido até que o ozônio residual não pudesse ser quantificado pelo método iodométrico. Na avaliação da cinética de decomposição, utilizou-se apenas a vazão de entrada do gás de 1 L min⁻¹

O modelo cinético de primeira ordem, Equação 3, foi ajustado aos dados da concentração de ozônio em função do tempo (WRIGHT, 2004). O ajuste do modelo de cinética de decomposição, após linearização, Equação 4, foi realizado por meio de análise de regressão. A constante da taxa de decomposição (k) é dada pela inclinação da reta depois do ajuste dos modelos integrados e linearizados.

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad \text{Equação 3}$$

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad \text{Equação 4}$$

em que

C = concentração do gás ozônio ($\mu\text{g L}^{-1}$);

t = tempo (s);

k = constante de reação de decomposição (s^{-1}).

C₀ = ozônio injetado na massa de produto no tempo inicial ($\mu\text{g L}^{-1}$).

A partir dos valores da constante da taxa de decomposição, foi possível obter o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) do ozônio em grãos de amendoim, que, para o modelo cinético de primeira ordem, é definido pela Equação 5 (WRIGHT, 2004):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Equação 5}$$

O experimento foi realizado em esquema fatorial 2 x 2 x 2, sendo dois teores de água (7,1 e 10,5%), duas temperaturas (25 e 35 °C) e duas vazões do gás (1,0 e 3,0 L min⁻¹), no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições.

Para a obtenção das equações de regressão e plotagem dos gráficos, referentes ao tempo de saturação e taxa de decomposição, utilizou-se o software SigmaPlot 2001.

3. RESULTADOS

Na Figura 2, são apresentadas as curvas referentes à concentração de ozônio em função do tempo de exposição, durante o processo de saturação dos grãos de amendoim, nas diferentes combinações de teor de água, temperatura e vazões do gás. Apresentam-se, na Tabela 1, as equações de regressão ajustadas e os seus respectivos coeficientes de determinação, que relacionam o ozônio residual e o tempo de exposição ao gás.

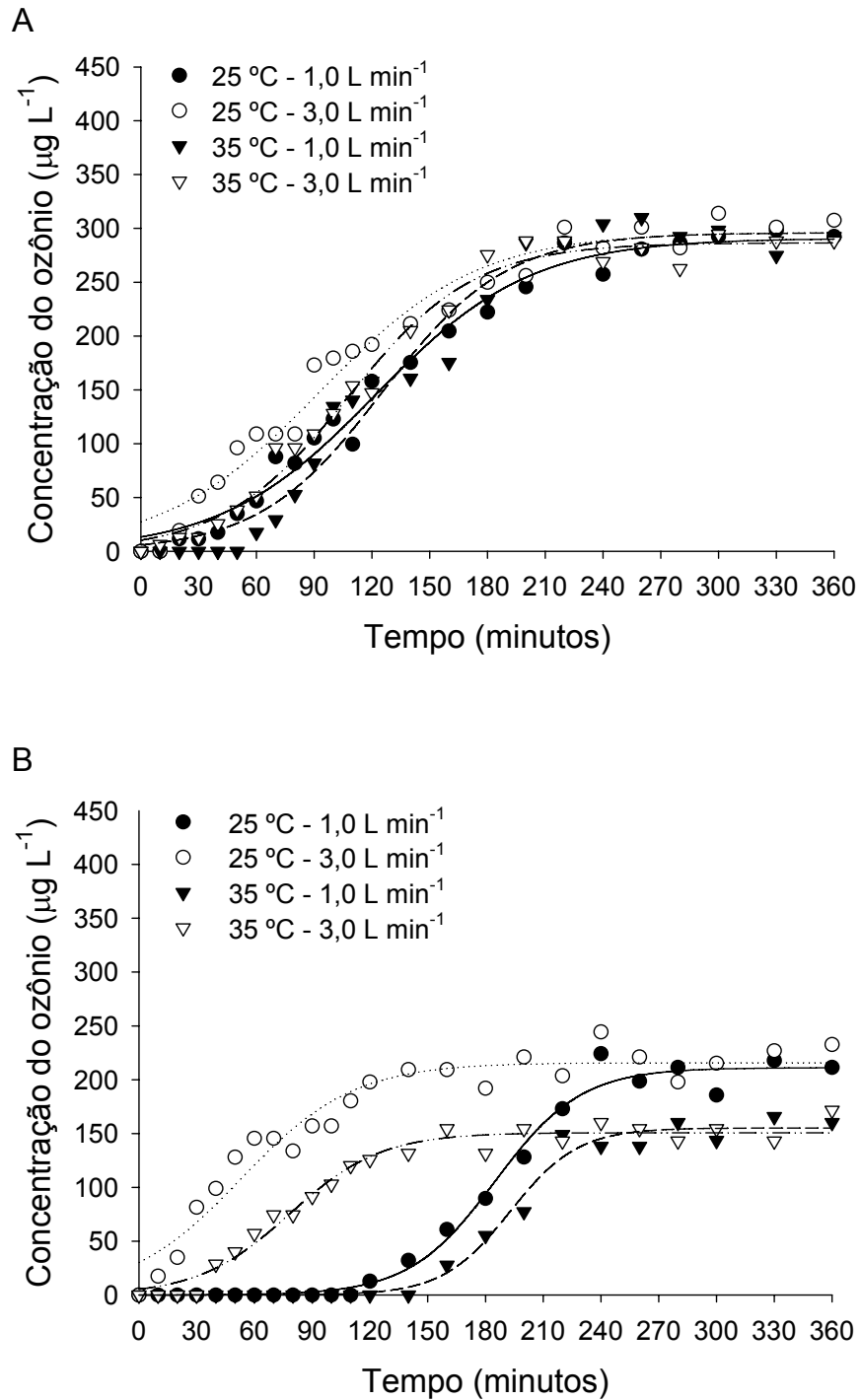


Figura 2 - Concentração residual do ozônio ($\mu\text{g L}^{-1}$) em função do tempo durante o processo de saturação dos grãos de amendoim com 7,1 (A) e 10,5 (B) % (b.u.) de teor de água, nas temperaturas de 25 e 35 °C e vazões de 1,0 e 3,0 L min⁻¹.

Tabela 1 - Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R^2) para concentração residual do ozônio ($\mu\text{g L}^{-1}$) durante o processo de saturação dos grãos de amendoim com 7,1 e 10,5% (b.u.) de teor de água nas temperaturas de 25 e 35 °C e vazões de 1,0 e 3,0 L min^{-1}

Teor de água (%)	Temp. (°C)	Vazão (L min^{-1})	Equações ajustadas	R^2	t_{Sat} (min)	C_{Sat} ($\mu\text{g L}^{-1}$)
7,1	25	1	$\hat{y} = \frac{290,83}{1 + e^{-\left(\frac{x - 121,92}{35,08}\right)}}$	0,98	192	256
		3	$\hat{y} = \frac{296,53}{1 + e^{-\left(\frac{x - 92,92}{40,82}\right)}}$	0,96	175	261
	35	1	$\hat{y} = \frac{295,89}{1 + e^{-\left(\frac{x - 125,39}{32,23}\right)}}$	0,97	190	260
		3	$\hat{y} = \frac{286,59}{1 + e^{-\left(\frac{x - 107,58}{32,74}\right)}}$	0,98	173	253
10,5	25	1	$\hat{y} = \frac{211,10}{1 + e^{-\left(\frac{x - 184,92}{22,58}\right)}}$	0,98	230	186
		3	$\hat{y} = \frac{215,82}{1 + e^{-\left(\frac{x - 52,58}{29,22}\right)}}$	0,93	111	190
	35	1	$\hat{y} = \frac{155,18}{1 + e^{-\left(\frac{x - 192,82}{17,57}\right)}}$	0,98	228	137
		3	$\hat{y} = \frac{150,80}{1 + e^{-\left(\frac{x - 78,32}{23,76}\right)}}$	0,97	126	133

t_{Sat} = Tempo de saturação

C_{Sat} = Concentração de saturação

Para os grãos de amendoim com teor de água de 7,1% (b.u.), nas temperaturas de 25 e 35 °C e vazões de 1,0 e 3,0 L min⁻¹ (Tabela 1), verifica-se os valores obtidos de tempo de saturação do gás ozônio permaneceram na faixa entre 173 e 192 min. A concentração de saturação do gás ozônio foi de aproximadamente 260 µg L⁻¹, para todas as combinações de teor de água, temperatura e vazão do gás. Destaca-se que esse valor de concentração residual do ozônio obtido corresponde a 58% do inicial, que foi de 450 µg L⁻¹.

Com relação aos grãos com teor de água de 10,5% b.u., na temperatura de 25 °C, Tabela 1, obteve-se tempo de saturação de 230 e 111 min, para vazão de 1,0 e 3,0 L min⁻¹, respectivamente, com concentração residual do gás de aproximadamente 190 µg L⁻¹. Esse valor obtido equivale a 42% da concentração inicial do gás ozônio. Para os grãos ozonizados na temperatura de 35 °C, a concentração residual do ozônio obtida na saturação foi de aproximadamente 135 µg L⁻¹, o que representa 28% da concentração inicial, com tempos de saturação de 228 e 126 min e vazões do gás de 1,0 e 3,0 mg L⁻¹, respectivamente.

No que tange ao modelo cinético, verifica-se que o de primeira ordem, na forma linearizada, Figura 3, representou adequadamente a decomposição do ozônio em grãos de amendoim em função do tempo. Na Tabela 2, apresentam-se as constantes da taxa de decomposição (*k*), definidas como as inclinações das retas, nas diferentes combinações de temperatura e teor de água.

O processo de decomposição do ozônio (Tabela 2) foi mais acelerado com a elevação da temperatura. Para os grãos de amendoim ozonizados na temperatura de 35 °C, os valores de *k* foram de 0,156 e 0,215 min⁻¹ para os teores de água de 7,1 e 10,2%, respectivamente.

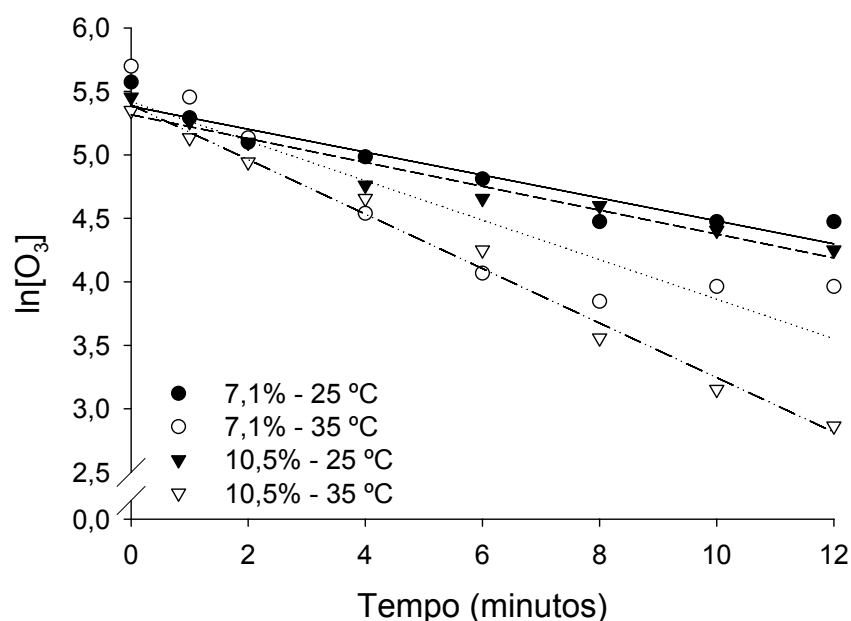


Figura 3 - Modelo cinético de primeira ordem ajustado aos dados observados de concentração residual de ozônio, após saturação, em amendoim com 7,1 e 10,5% (b.u.) de teor de água nas temperaturas de 25 e 35 °C.

Tabela 2 - Equações de regressão ajustadas em função do tempo para a concentração residual do gás ozônio em grãos de amendoim em diferentes combinações de teor de água e temperatura e seus respectivos coeficientes de determinação (r^2)

Teor de água (%)	Temperatura (°C)	Equações ajustadas	r^2
7,1	25	$\hat{y} = 5,383 - 0,090^* x$	0,91
	35	$\hat{y} = 5,420 - 0,156^* x$	0,83
10,5	25	$\hat{y} = 5,316 - 0,094^* x$	0,94
	35	$\hat{y} = 5,393 - 0,215^* x$	0,98

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

No que se refere ao tempo de meia vida do ozônio em grãos de amendoim (Tabela 3), os maiores valores obtidos ocorreram na temperatura de 25 °C, sendo equivalentes a 7,7 e 7,4 min para os teores de água de 7,1 e

10,5%, respectivamente. Os menores valores de tempo de meia vida foram obtidos para os grãos ozonizados na temperatura de 35 °C.

Tabela 3 - Tempo de meia vida do ozônio após a saturação dos grãos de amendoim ozonizados nas diferentes combinações de teores de água e temperatura

Teor de água (%)	Temperatura (°C)	Tempo de meia vida (min)
7,1	25	7,7
	35	4,4
10,5	25	7,4
	35	3,2

4. DISCUSSÃO

Na forma gasosa, o ozônio apresenta reatividade 100 vezes maior que o cloro, e um dos fatores que afetam a cinética de decomposição desse gás é a temperatura. De acordo com Novak e Yuan (2007), a 20 °C, o ozônio na forma gasosa apresenta tempo de meia vida menor que 20 min. Em água destilada a 20 °C, o tempo de meia vida do ozônio dissolvido é geralmente considerado entre 20 e 30 min, e com a elevação da temperatura há decréscimo desse valor, de tal forma que a 35 °C se situa entre 8 e 10 min (CULLEN et al., 2009).

Nesse estudo, no que se refere à concentração e ao tempo de saturação do ozônio em grãos de amendoim, à medida que se eleva o teor de água dos grãos, maior é a influência dos parâmetros temperatura e vazão do gás, como apresentado na Figura 2. Nos grãos com teor de água de 7,1% obteve-se praticamente o mesmo comportamento no que se refere à concentração e ao tempo de saturação. Por outro lado, para os grãos de amendoim com 10,5% de teor de água, à medida que se elevou a temperatura e se reduziu a vazão de entrada do gás, observou-se maior tempo de saturação e menor concentração residual do ozônio. Essa tendência pode ser explicada pelo fato de que o teor de água é um fator determinante no processo de adsorção do gás ozônio em

superfícies (KERSTIENS e LENDZIAN, 1989; GRONTOFT et al., 2004). Dessa forma, a elevação do teor de água favoreceu a adsorção do ozônio pela superfície dos grãos de amendoim e conseqüentemente aumentou a reatividade do gás. Vale destacar que a variável teor de água deve ser considerada no processo de ozonização, quando se utiliza o gás, por exemplo, como agente fungicida. De acordo com Raila et al. (2006) maior eficiência do ozônio no controle de fungos é obtida em produtos com maior teor de água. Destaca-se ainda que os valores de tempo de saturação para grãos de amendoim, em todas as combinações de teor de água, temperatura e vazão do gás, são superiores ao observado por Santos et al. (2007) para grãos de milho. Esses autores obtiveram tempo de saturação de 70 min para os grãos com 12,8% de teor de água, na temperatura de 25 °C e vazão de 4,6 L min⁻¹.

O comportamento observado da concentração residual do ozônio nos grãos de amendoim durante o processo de saturação, nas diferentes combinações de teor de água, temperatura e vazão do gás, está de acordo com Strait (1998), Kells et al (2001) e Mendez et al. (2003). Segundo esses autores, o movimento do ozônio na massa de grãos apresenta duas fases. Na fase 1, o ozônio reage com sítios ativos na superfície do produto no início da ozonização, ocorrendo degradação do ozônio e, conseqüentemente, eliminação desses sítios ativos. Uma vez que esses elementos são eliminados, o gás se move através do meio poroso, com taxa de degradação reduzida. E quando é atingido esse estado, ocorre a fase 2 do processo.

No que se refere à cinética de decomposição (Tabela 3), o fator temperatura foi determinante. Para os grãos com teor de água de 7,1 e 10,5%, inicialmente saturados, um acréscimo de 10 °C na temperatura resultou num aumento do valor da constante da taxa de decomposição equivalente a 73,3 e 128,7%, respectivamente. Conseqüentemente, o menor tempo de meia vida foi obtido para os grãos com teor de água de 10,5%, na temperatura de 35 °C. Esses resultados estão de acordo com Wright (2004), que afirma que em muitas reações químicas há acréscimo da constante da taxa de decomposição à medida que se eleva a temperatura. Comportamento semelhante foi evidenciado em água por Cséfalvay et al. (2007), que observaram que um acréscimo de 10 °C na temperatura da água acarreta em duplicação do valor da taxa de reação do ozônio. Santos et al. (2007) obtiveram tempo de meia

vida igual a 5,57 min para milho com teor de água de 12,8% na temperatura de 25 °C. Comparativamente, esse valor de tempo de meia vida para milho é inferior aos obtidos nos grãos de amendoim com 7,1 e 10,5% de teor de água, na temperatura de 25 °C.

5. CONCLUSÕES

A análise dos dados e a interpretação dos resultados obtidos permitiram concluir que o comportamento do ozônio, durante o processo de saturação em grãos de amendoim, depende dos parâmetros teor de água, temperatura e vazão do gás. À medida que se eleva o teor de água dos grãos e a temperatura obtêm-se menores valores de concentração de saturação do ozônio.

No processo de decomposição do ozônio em grãos de amendoim, o fator determinante é a temperatura. Um aumento de 10 °C na temperatura dos grãos implica decréscimo de pelo menos 43% no tempo de meia vida do gás.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBAS, M.Y.; OZDEMIR, M. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. **Food Microbiology**, v.25, p.386–391, 2008.

ASAE. Moisture measurement - Peanuts. p. 600-601. In: **Standards**, 2002. St. Joseph: American Society of Agricultural Engineers.

BELTRÁN, F.J. **Ozone reaction kinetics for water and wastewater systems**. Boca Raton: CRC Press, 358p, 2005.

CHIOU, R.Y. Estimation of fungal infection of peanut kernels by determination of free glutamic acid content. **Applied and Environmental Microbiology**, p. v.63, n.3, p. 1083–1087, 1997.

CLESCERL, L.S.; GREENBERG, A.E. EATON, A.D. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Denver: American Water Works Association, 1220p, 2000.

CSÉFALVAY, E.; NÖTHE, T.; MIZSEY, P. Modelling of wastewater ozonation – determination of reaction kinetic constants and effect of temperature. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, v.51, n.2, p.13–17, 2007.

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

ERSHOV, B.G.; MOROZOV, P.A. The Kinetics of Ozone Decomposition in Water, the Influence of pH and Temperature. **Russian Journal of Physical Chemistry**, v.83, n.8, p.1295–1299, 2009.

FDA. Food and Drug Administration. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. **Federal Register**, v.66, n.123, p.33829-33830, 2001.

GRONTOFT, T.; HENRIKSEN, J.F.; SEIP, H.M. The humidity dependence of ozone deposition onto a variety of building surfaces. **Atmospheric Environment**, v.38, p.59-68, 2004.

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

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.

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.

KERSTIENS, G.; LENDZIAN, K.J. Interactions between ozone and plant cuticles. **New Phytologist**, v. 112, n.1,p.13-19, 1989.

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.

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.

MCKENZIE, K.S.; KUBENA, L.F.; DENVIR, A.J.; ROGERS, T.D.; HITCHENS,G.D.; BAILEY, R.H.; HARVEY, R.B.; BUCKLEY, S.A.; PHILLIPS, T.D. Aflatoxicosis in turkey poult is prevented by treatment of naturally

contaminated corn with ozone generated by electrolysis. **Poultry Science**, v.77, p.1094–1102, 1998.

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.

MUSTAFA, M.G. Biochemical basis of ozone toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v.9, p.245–265, 1990.

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, 2007, p.185-193.

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.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; GASSINELLI MADEIRA, J. E. C.; GODOY, I. J.; CORRÊA, B.; JUNGUEIRA, R. G.; FERREIRA, S. O. Resistência de quatro genótipos de amendoim à produção de aflatoxina B1 após inoculação com *Aspergillus flavus* Link. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.1, p. 84-87, 1999.

PRUDENTE, A.D.; KING, J.M. Efficacy and safety evaluation of ozonation to degrade aflatoxin in corn. **Journal of Food Science**, v.67, n.8, p. 2866-2872, 2002.

PUIA, C.; OROIAN, I.; FLORIAN, V. Effect of ozone exposure on phytopathogenic microorganisms on stored apples. **Journal of Agricultural Sciences**, v.15, p.9-13, 2004.

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.

SABINO, M.; ZORBETT, M.A. P.; PEDROSO, M.O.; MILANEZ, T.V. Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de São Paulo, no período de 1980 a 1987. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.49, n.1, p.41-44, 1989.

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.

SELMA, M.V.; IBÁÑEZ, A.M.; ALLENDE, A.; CANTWELL, M.; SUSLOW, T. Effect of gaseous ozone and hot water on microbial and sensory quality of cantaloupe and potential transference of *Escherichia coli* O157:H7 during cutting. **Food Microbiology**, v.25, p.162–168, 2008.

STRAIT, C.A. **Efficacy of ozone to control insects and fungi in stored grain**. Purdue University, West Lafayette, IN, 1998, 59 p. (M.S. thesis).

STUCKI, S.; SCHULZE, D.; SCHUSTER, D.; STARK, C. Ozonization of purified water systems. **Pharmaceutical Engineering**, v. 25, n.1, p.1-7, 2005.

SUSLOW, T.V. **Ozone applications for postharvest disinfection of edible horticultural crops**. Oakland: University of California - Division of Agriculture and Natural Resources, 2004. Publication 8133, 8p.

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

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

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.

YEH, J.; PHILLIPS, R.D.; RESURRECCION, A.V.A; HUNG, Y. Physicochemical and sensory characteristic changes in fortified peanut spreads after 3 months of storage at different temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2377-2384, 2002.

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

YUK, H.G.; YOO, M.Y.; YOON, J.W.; MARSHALL, D.L.; OH, D.H. Effect of combined ozone and organic acid treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on enoki mushroom. **Food Control**, v.18, p.548–553, 2007

Segundo Capítulo

EFICÁCIA DO OZÔNIO COMO AGENTE FUNGICIDA E DETOXIFICANTE DE AFLATOXINAS EM AMENDOIM

ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR¹

¹ Departamento de Engenharia Agrícola

Universidade Federal de Viçosa, CEP 36.570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

e-mail: ernandes.alencar@ufv.br

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito fungicida e detoxificante do gás ozônio sobre aflatoxinas em grãos de amendoim. No processo de ozonização, 1 kg de grãos de amendoim, acondicionados em frascos de vidro com capacidade de 3 L, à temperatura de 25 °C, foram ozonizados nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹, vazão do gás de 1,0 L min⁻¹, por períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 h. Avaliou-se o efeito do gás ozônio na contagem de fungos totais e das espécies potencialmente aflatoxigênicas *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, pela técnica de diluição, e na infecção interna dos grãos por esses microorganismos, pela técnica de plaqueamento direto. Para avaliar a capacidade detoxificante do gás ozônio, em cada combinação de concentração do gás e período de exposição, quantificou-se, por cromatografia líquida de alta eficiência, o teor de aflatoxinas totais e de aflatoxina B1 nos grãos de amendoim. O gás ozônio foi eficiente no controle de fungos totais e das espécies potencialmente aflatoxigênicas em grãos de amendoim, com redução superior a três ciclos log na contagem dos microorganismos, na concentração de 21 mg L⁻¹ e 96 h de exposição. Verificou-se ainda redução no percentual de grãos infectados internamente pelos fungos, com tendência mais acentuada nos grãos expostos ao gás ozônio na concentração de 21 mg L⁻¹. Com relação ao poder detoxificante do gás ozônio, ocorreu redução no teor de aflatoxinas totais e aflatoxina B1 de aproximadamente 30 e 25%, respectivamente, para os grãos expostos ao gás na concentração de 21 mg L⁻¹, por 96 h. Concluiu-se que o ozônio é uma importante alternativa para detoxificação de amendoim, no

que se refere a segurança alimentar, pois é eficiente no controle dos fungos potencialmente aflatoxigênicos e atua na redução dos níveis de aflatoxinas nos grãos.

Palavras-chave: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, ozonização, segurança alimentar.

EFFECTIVENESS OF OZONE AS A FUNGICIDAL AGENT AND AFLATOXIN DETOXICANT IN PEANUTS

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the fungicidal and detoxificant effect of ozone gas on aflatoxins in peanuts. In the ozonation process, 1 kg of peanuts, stored in 3 L glass flasks, at 25°C, were ozonized at concentrations of 13 and 21 mg L⁻¹, gas flow rate of 1.0 L min⁻¹, for periods of 0, 24, 48, 72 and 96 h. The effect of ozone gas on the total fungal count and potentially aflatoxigenic species *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* was evaluated by the dilution technique, and in internal infection of peanuts by these microorganisms, by the direct plating technique. To evaluate detoxification effectiveness of ozone gas, in each combination of gas concentration and exposure period, the concentrations of total aflatoxins and aflatoxin B1 in the peanuts were quantified by high performance liquid chromatography. Ozone was efficient for the control of potentially aflatoxigenic fungi in peanuts, with reduction greater than three log cycles at the concentration of 21 mg L⁻¹ and exposure period of 96 h. Reduction in the percentage of peanuts infected internally by the fungi was also verified, with more accentuated tendency in peanuts exposed to ozone gas as the concentration of 21 mg L⁻¹. In relation to the detoxificant force of ozone gas, there was a reduction in the concentration of total aflatoxins and aflatoxin B1 by approximately 30 and 25%, respectively, for peanuts exposed to gas at the concentration of 21 mg L⁻¹, for 96 h. It was concluded that ozone is an important alternative for detoxification of peanuts when referring to food safety since it is efficient in the control of potentially aflatoxigenic fungi and can actuate in the reduction of aflatoxin levels of the product.

Keywords: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, ozonation, food safety.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação do amendoim por fungos, para Chiou (1997), é uma preocupação para processadores e consumidores, devido à associação desses microrganismos com a deterioração da qualidade e com a produção de micotoxinas. Dentre os diversos tipos de micotoxinas, as aflatoxinas se destacam por apresentar alta toxidez aguda e crônica em animais, incluindo o homem, podendo ocasionar danos ao fígado, como cirroses e carcinoma hepatocelular, além de efeitos teratogênicos (ABDULKADAR et al., 2000). Estes compostos são produzidos principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e também por *Aspergillus nomius* (PITT, 2000; BLESA et al., 2003; EHRLICH et al., 2007). Enquanto *A. flavus* produz predominantemente aflatoxinas B1 e B2, *A. parasiticus* é capaz de sintetizar adicionalmente as aflatoxinas G1 e G2 (PAYNE, 1998). As principais culturas susceptíveis a contaminação por aflatoxinas são a do milho, a do algodão e a do amendoim (BAGLEY, 1979).

As espécies potencialmente aflatoxigênicas, *A. flavus* e *A. parasiticus*, podem ser encontradas tanto no solo como no ar, e são classificadas como fungos de campo e de armazenamento, ou seja, esses microorganismos são capazes de infectar os grãos na pré e na pós-colheita. No campo, temperaturas na faixa de 28 e 34 °C associadas a estresse hídrico durante a formação das vagens do amendoim são favoráveis à infecção pelos fungos e à produção de aflatoxinas (CRAUFURD et al., 2006; BATTILANI et al., 2008). Durante o armazenamento, a produção de aflatoxinas é afetada por diversos fatores, dentre os quais se destacam temperatura e atividade de água. A síntese de aflatoxinas por *A. flavus* ocorre em temperaturas entre 15 e 37 °C, sendo mais acentuada na faixa entre 20 e 30 °C (FAO, 2001). De acordo com GQALENI et al. (1997), a temperatura e a atividade de água ótimas para a síntese de aflatoxinas por *A. flavus* são 30 °C e 0,996, respectivamente.

O processo de prevenção e controle dos diversos tipos de micotoxinas desde a década de 60, e em especial das aflatoxinas, ainda não apresentou um modelo seguro, eficaz e de solução definitiva (PRADO et al., 2006). Nesse contexto, existem dois processos básicos para a redução dos níveis de micotoxinas em alimentos: descontaminação e detoxificação (OZDEMIR e

OZILGEN, 2007). O processo de descontaminação é definido como a remoção física das unidades contaminadas e a detoxificação é a remoção ou destruição da toxina das unidades contaminadas. Os métodos químicos de remoção têm sido amplamente testados devido à grande capacidade de degradação e inativação das aflatoxinas (RITCHIE, 2002). Entretanto, apesar da significativa capacidade das substâncias químicas de eliminar as aflatoxinas, na maioria das vezes tais métodos são inviáveis tecnicamente e economicamente, proporcionam formação de resíduos tóxicos, ou ainda alteram a composição nutritiva dos alimentos. Uma alternativa que vem sendo apresentada na prevenção e controle de contaminação de alimentos por aflatoxinas é o gás ozônio, que pode ser utilizado como agente fungicida e como detoxificante (MCKENZIE et al., 1997; PRUDENTE e KING, 2002; ZOITI et al., 2009).

O gás ozônio pode atuar na inativação ou inibição do desenvolvimento de microorganismos. Na literatura há diversos relatos que descrevem o efeito do ozônio sobre microorganismos, dentre os quais, os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Alternaria* e *Mucor* (RAILA et al., 2006; WU et al., 2006; ZOTTI et al., 2009), além vírus, protozoários e bactérias (KIM et al., 1999; KHADRE et al., 2001; AGUAYO et al., 2006; ÖZTEKIN et al., 2006; WHANGCHAI et al., 2006). A inativação de microorganismos pelo ozônio, segundo Cullen et al. (2009), é atribuída, principalmente, à ruptura do envoltório celular e posterior dispersão dos constituintes citoplasmáticos, uma vez que esse gás apresenta alto poder oxidante. Essa capacidade do ozônio de inativar ou inibir o desenvolvimento dos microorganismos é fundamental sob ponto de vista de segurança alimentar, pois pode representar uma forma de controle de fungos potencialmente aflatoxigênicos e, conseqüentemente, de prevenção da síntese de aflatoxinas.

A ozonização também é proposta como tecnologia capaz de degradar micotoxinas, dentre as quais as aflatoxinas, fumonisinas, ochratoxina, patulina, deoxinivalenol e zearalenona (MCKENZIE et al., 1997; YOUNG et al., 2006). McKenzie et al. (1998) apresentaram o mecanismo de degradação da aflatoxina B1 pelo ozônio e os produtos finais da reação são aldeídos, cetonas, ácidos e dióxido de carbono (Figura 1). De acordo com esses autores, o ozônio reage com a ligação dupla C8-C9 do terminal furano da aflatoxina B1. Vale ressaltar que a capacidade toxigênica, carcinogênica e teratogênica da aflatoxina B1 é

associado à presença do terminal furano (WOGAN et al., 1971; DESHPANDE, 2002).

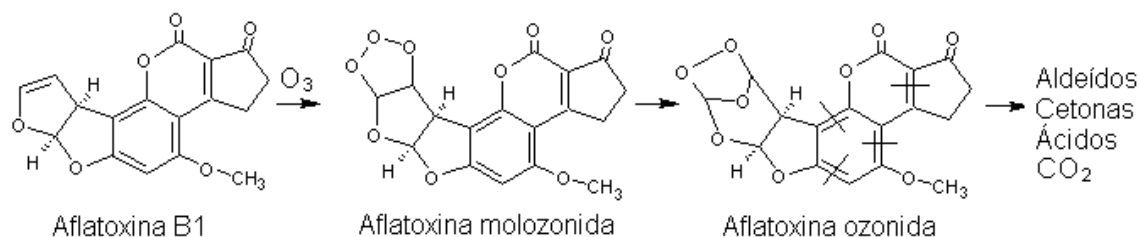


Figura 1 – Mecanismo de degradação da Aflatoxina B1 pelo gás ozônio (MCKENZIE et al. (1998).

A capacidade de o gás ozônio eliminar aflatoxinas em grãos de milho foi confirmada por McKenzie et al. (1998), que alimentaram perus com dieta contendo milho contaminado com a micotoxina, tratado ou não com o gás ozônio. Os autores observaram alta capacidade detoxificante do ozônio, e a dieta com o milho detoxificado com o gás não afetou o desenvolvimento das aves. A eficácia do gás ozônio (148-179 mg L⁻¹) na degradação de aflatoxinas também foi avaliada por Prudente e King (2002), que obtiveram redução de 92% no teor de aflatoxinas em grãos de milho.

Tendo em vista que a ozonização representa uma alternativa no controle de aflatoxinas em alimentos, uma vez que pode atuar como agente fungicida e na redução dos níveis de aflatoxinas, e que a presença dessa micotoxina no amendoim é considerada importante do ponto de vista de saúde pública, objetivou-se nesse trabalho avaliar o efeito fungicida e detoxificante do gás ozônio sobre aflatoxinas em grãos de amendoim.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Setor de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola – DEA e no Laboratório de Embalagens, do Departamento de Tecnologia de Alimentos – DTA, ambos na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

Para a avaliação do efeito fungicida e detoxificante do gás ozônio utilizaram-se grãos de amendoim com teor de água de 8,0% base úmida (b.u.),

que continham fungos potencialmente aflatoxigênicos e que apresentavam nível de aflatoxinas inferior a 20 ppb, que é o limite máximo estabelecido pela legislação brasileira para amendoim (BRASIL, 2002). Para a obtenção de grãos contaminados com aflatoxinas acima de 20 ppb, adotou-se metodologia proposta por Prudente (2008) modificada. Grãos de amendoim foram acondicionados por um período de 10 dias em câmara climática a temperatura de 28 ± 3 °C e umidade relativa de $95 \pm 2\%$, condições consideradas ótimas para o crescimento dos fungos aflatoxigênicos e produção de aflatoxinas (DIENER e DAVIS, 1967; SCHROEDER e HEIN JR., 1967). Ao final desse processo, além da quantificação das aflatoxinas, 200 ppb, ajustou-se o teor de água dos grãos para 9,0% b.u. por meio de secagem, em secador de camada fixa, utilizando-se apenas ar ambiente.

A determinação do teor de água dos grãos de amendoim foi realizada em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 130 ± 1 °C por 6 h (ASAE, 2002). Depois da determinação do teor de água, foi realizada a desinfecção da estufa com hipoclorito de sódio 3,0%.

O gás ozônio foi obtido por meio de um gerador de ozônio baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica (DBD) desenvolvido pelo Departamento de Física do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA), São José dos Campos, SP. No processo de geração do ozônio, foi utilizado como insumo o oxigênio com grau de pureza de $90 \pm 3\%$, isento de umidade, obtido do concentrador Mark 5 Plus Oxygen Concentrator.

A concentração de ozônio foi determinada pelo método iodométrico, descrito por Clescerl et al. (2000), que consiste no borbulhamento do 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 , foi necessário acidificar o meio com 2,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 N. A solução foi então titulada com tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) 0,005 N, com uso de solução de amido 1% como indicador.

No processo de ozonização, amostras de 1 kg de grãos de amendoim, previamente contaminadas, foram acondicionadas em frascos de vidro com capacidade de 3 L, à temperatura de 25 °C, e ozonizadas nas concentrações de 13 e 21 $mg L^{-1}$, vazão do gás de 1,0 $L min^{-1}$, por períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 h.

2.1. Avaliação do efeito fungicida do gás ozônio em grãos de amendoim

Para avaliação do efeito fungicida do gás ozônio nos grãos de amendoim utilizaram-se dois métodos de quantificação de fungos: o de diluição em placas e o de plaqueamento direto (PITT e HOCKING, 2009).

No método de diluição em placas, 25 g de grãos foram previamente diluídos em 225 mL de água peptonada a 0,1%. No plaqueamento, foram utilizadas as diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . No método de plaqueamento direto foram utilizados 10 grãos de amendoim, previamente desinfectados com hipoclorito de sódio 0,4%. Para a quantificação de fungos totais nos grãos de amendoim, tanto no método de diluição em placas quanto no de plaqueamento direto, utilizou-se o meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) acidificado com ácido tartárico a 10%, tendo sido as placas incubadas por 5 dias em câmaras climáticas a 25 °C (DOWNES e ITO, 2001). Para a quantificação das espécies potencialmente aflatoxigênicas, *A. flavus* e *A. parasiticus*, foi utilizado o meio de cultura *Aspergillus flavus* e *parasiticus* Agar (AFPA), e as placas foram incubadas por 42 h a 30 °C (PITT et al., 1983). Os resultados referentes ao método de diluição foram obtidos em termos de unidades formadoras de colônias por grama (UFC g⁻¹), enquanto os referentes ao método de plaqueamento direto foram expressos em porcentagem de grãos infectados pelos fungos.

O efeito do ozônio nos fungos foi analisado em microscópio óptico OLYMPUS BX 50 com câmara clara e sistema de captura de imagem acoplado, utilizando-se objetiva de 40x.

2.2. Avaliação da capacidade detoxificante do gás ozônio sobre aflatoxinas em grãos de amendoim

Para avaliar a capacidade detoxificante do gás ozônio, quantificou-se o teor de aflatoxinas totais e de aflatoxina B1, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), nos grãos de amendoim ozonizados em duas concentrações, 13 e 21 mg L⁻¹, e em períodos de exposição ao gás de 0, 24, 48, 72 e 96 h.

Amostras de 50 g de grãos triturados de amendoim, obtidas de cada combinação, concentração do gás *versus* período de exposição, foram distribuídas em Erlenmeyer de 250 mL. Após a adição de 100 mL de solução

metanol:água (80:20 v:v), os frascos foram agitados em mesa agitadora TECNAL TE – 141, por 30 min. Posteriormente, procedeu-se a filtração da amostra em papel Whatman nº 4. Transferiu-se 2 mL do filtrado para béquer de 50 mL e adicionou-se 14 mL de tampão fosfato (pH = 7,2). A mistura (amostra + tampão) foi passada pela coluna de imunoafinidade AflaStar (3 mL) - Romer Labs. Em seguida, a coluna foi lavada com 20 mL de tampão fosfato. Finalmente, efetuou-se a eluição das aflatoxinas, com 1,5 mL de metanol e 1,5 mL de água milique. O eluato foi coletado em frasco âmbar.

A análise cromatográfica foi realizada segundo a metodologia descrita por Blesa *et al.*, (2003). Utilizou-se equipamento LC-10AT VP com detector de fluorescência (excitação: 362 nm e emissão: 465 nm) e com coluna C-18 (5 µm, 150 mm × 4.6 mm). A fase móvel utilizada foi água:metanol:acetonitrila (60:20:20 v:v:v) com fluxo de 1 mL min⁻¹, sendo injetados 100 µL de amostra. A derivatização pós-coluna foi realizada com célula eletroquímica Kobra Cell®. A quantificação das aflatoxinas foi realizada pelo cálculo da área dos picos de cada tipo da micotoxina utilizando-se o software CLASS-VP, versão 6.12.

Delineamento Experimental

O experimento foi realizado em esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas as concentrações (13 e 21 mg L⁻¹) e nas subparcelas os períodos de exposição ao gás (0, 24, 48, 72 e 96 h), no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Inicialmente realizou-se análise de variância a 5% de probabilidade e, posteriormente, análise de regressão. Na análise de variância, utilizou o Software SAEG 9.0 (SAEG, 2007). Para a obtenção das equações de regressão e plotagem dos gráficos, utilizou-se o software SigmaPlot 2001.

3. RESULTADOS

Apresentam-se, na Tabela 1, os valores médios do teor de água dos grãos de amendoim ozonizados nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e períodos de exposição do gás de 0, 24, 48, 72 e 96 h. Verifica-se redução do teor de água dos grãos à medida que se elevou o período de exposição ao gás, para ambas as concentrações utilizadas.

Tabela 1 - Valores médios de teor de água dos grãos de amendoim expostos ao gás ozônio nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição

Concentração de ozônio (mg L ⁻¹)	Período de exposição (h)				
	0	24	48	72	96
13	9,2	6,1	5,5	5,2	5,1
21	9,2	6,8	6,0	5,6	5,3

O efeito do gás ozônio, nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição, na contagem de fungos totais e de *A. flavus* e *A. parasiticus* em grãos de amendoim, é apresentado nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Ocorreu decréscimo significativo ($p < 0,05$) na contagem de fungos totais (Figura 2) à medida que se elevou o período de exposição dos grãos ao gás ozônio. Obteve-se redução na contagem de fungos totais superior a 2 e 3 ciclos log quando os grãos de amendoim foram ozonizados nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹, respectivamente, pelo período de exposição de 96 h.

Comportamento semelhante foi observado na contagem das espécies potencialmente aflatoxigênicas em grãos de amendoim ozonizados. Obteve-se redução significativa ($p < 0,05$) na contagem de *A. flavus* e *A. parasiticus* (Figura 3) com o aumento da concentração e do período de exposição ao gás ozônio. O decréscimo na contagem de *A. flavus* e *A. parasiticus* foi de aproximadamente 3 ciclos log quando os grãos de amendoim foram ozonizados na concentração de 21 mg L⁻¹ e período de exposição de 96 h.

Encontram-se, na Tabela 2, as equações de regressões ajustadas e seus respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de fungos totais e de *A. flavus* e *A. parasiticus* em grãos de amendoim expostos ao gás ozônio nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹, em diferentes períodos de exposição.

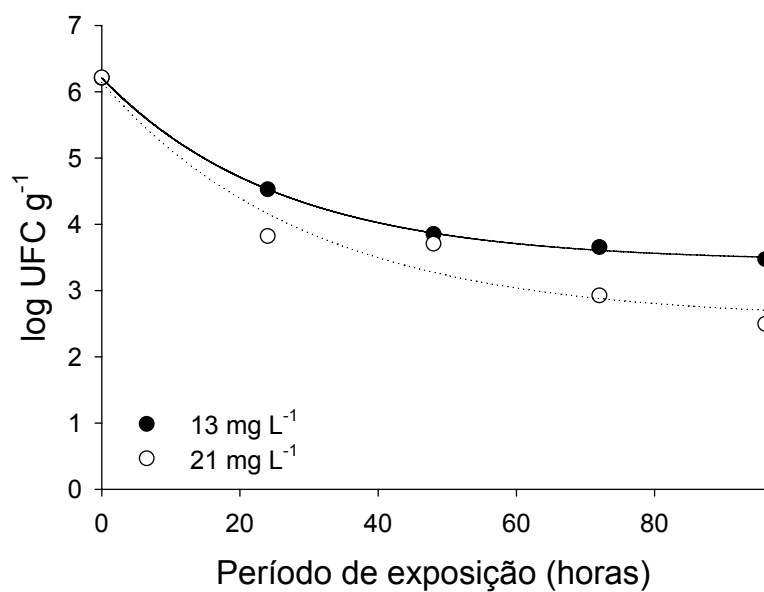


Figura 2 - Contagem de fungos totais em grãos de amendoim expostos ao gás ozônio, nas concentrações 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição.

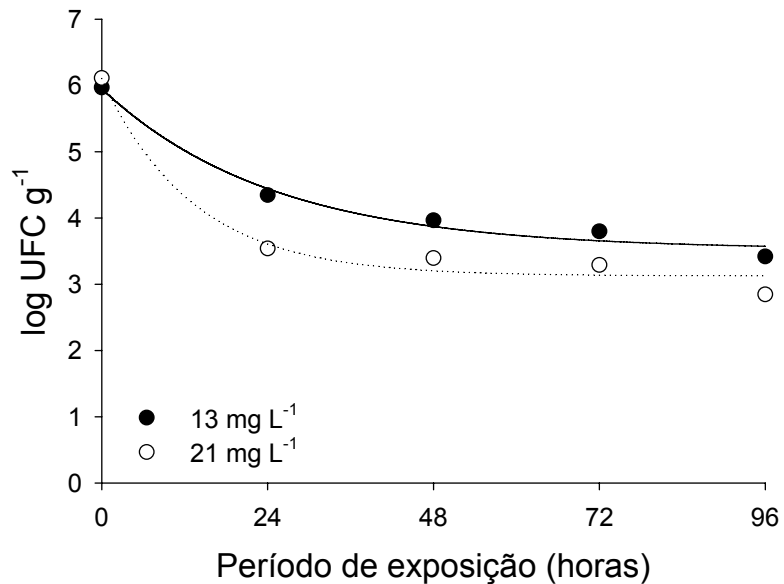


Figura 3 - Contagem de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em grãos de amendoim expostos ao gás ozônio, nas concentrações 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição.

Tabela 2 - Equações de regressão ajustadas e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) referentes à contagem de fungos totais e de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em grãos de amendoim expostos ao gás ozônio, nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição

	Concentração de ozônio (mg L ⁻¹)	Equações ajustadas	R ²
Fungos totais	13	$\hat{y} = 3,438 + 2,769e^{(-0,039x)}$	0,99
	21	$\hat{y} = 2,560 + 3,584e^{(-0,033x)}$	0,96
<i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>	13	$\hat{y} = 3,524 + 2,427e^{(-0,041x)}$	0,98
	21	$\hat{y} = 3,125 + 2,980e^{(-0,075x)}$	0,98

Apresenta-se, nas Figuras 4 e 5, o percentual de grãos de amendoim infectados por fungos e pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* em diferentes períodos de exposição ao gás ozônio, nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹.

O percentual de grãos de amendoim infectados por fungos e pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* reduziu significativamente ($p < 0,05$) quando os grãos foram ozonizados nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ à medida que se elevou o período de exposição. A redução no percentual de grãos infectados foi mais acentuada nos grãos ozonizados na concentração de 21 mg L⁻¹, com 40 e 20% de grãos infectados por fungos (Figura 4) e por *A. flavus* e *A. parasiticus* (Figura 5), respectivamente, quando o período de exposição foi de 96 h.

As equações de regressões ajustadas e seus respectivos coeficientes de determinação referentes ao percentual de grãos de amendoim infectados por fungos totais e por *A. flavus* e *A. parasiticus*, em diferentes períodos de exposição de exposição ao gás ozônio, nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹, encontram-se na Tabela 3.

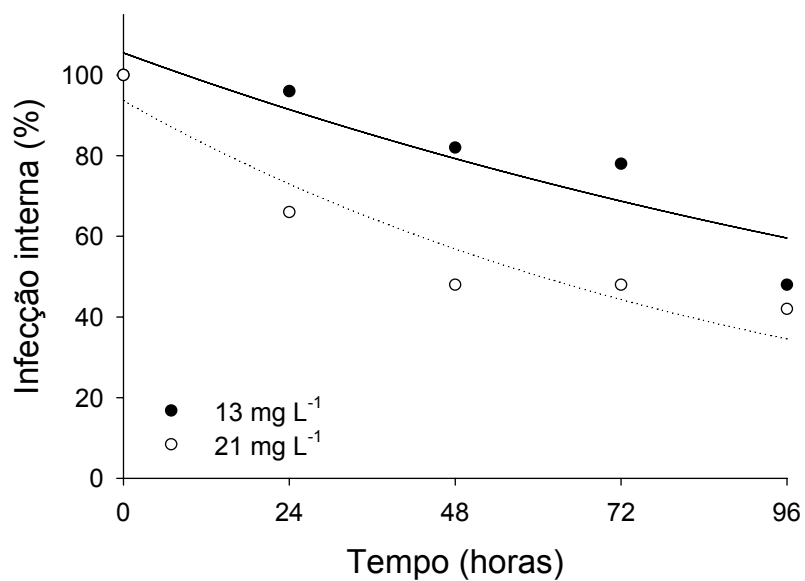


Figura 4 - Porcentagem de infecção interna por fungos em grãos de amendoim expostos ao gás ozônio nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição de exposição.

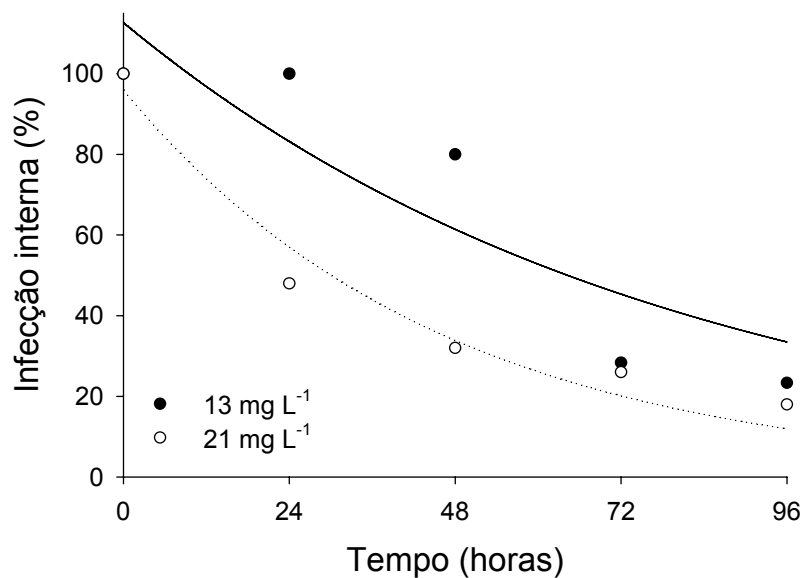


Figura 5 - Porcentagem de infecção interna por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em grãos de amendoim expostos ao gás ozônio nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição de exposição.

Tabela 3 - Equações de regressão ajustadas e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) referentes ao percentual de grãos infectados por fungos e por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em decorrência da aplicação do gás ozônio nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição

	Concentração de ozônio (mg L ⁻¹)	Equações ajustadas	R ²
Fungos	13	$\hat{y} = 105,489e^{(-0,006x)}$	0,84
	21	$\hat{y} = 93,646e^{(-0,010x)}$	0,90
<i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>	13	$\hat{y} = 112,668e^{(-0,013x)}$	0,79
	21	$\hat{y} = 95,957e^{(-0,028x)}$	0,96

Apresentam-se, na Figura 6, aspectos morfológicos, obtidos por microscopia óptica, do fungo do gênero *Aspergillus* coletado em grãos de amendoim expostos ou não ao gás ozônio na concentração de 21 mg L⁻¹, por 96 h. Nota-se que ocorreu despigmentação do fungo, associada a desorganização na estrutura do microorganismo. A despigmentação é confirmada nas Figuras 7, 8 e 9, nas quais se verifica alteração na coloração das colônias dos fungos nos grãos, independentemente da concentração e do período de exposição ao gás. Nos grãos não tratados, permaneceu a coloração esverdeada, enquanto que naqueles expostos ao gás ozônio, nas diferentes concentrações e períodos de exposição, observou-se branqueamento das colônias fúngicas.

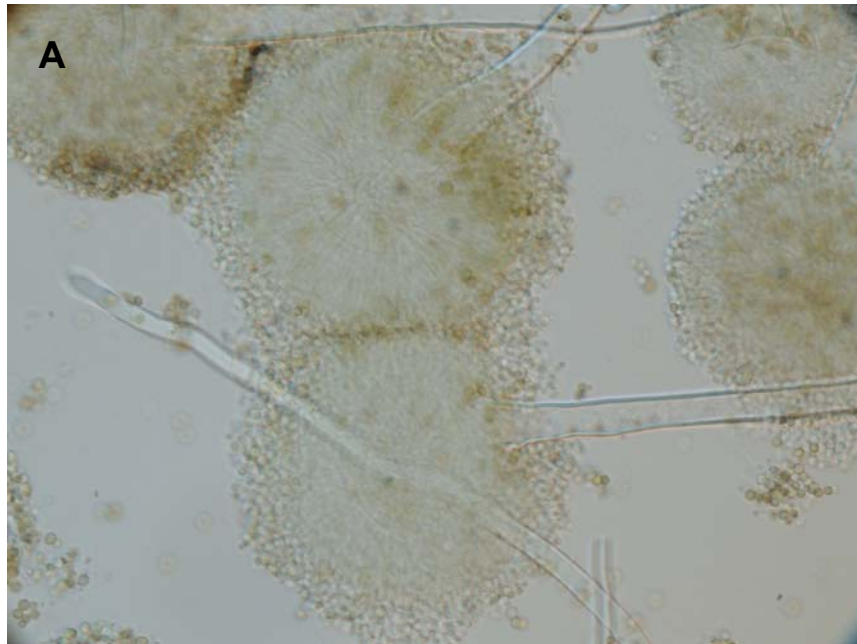


Figura 6 – Aspectos morfológicos, obtidos por microscopia óptica com objetiva de 40x, de *Aspergillus* spp. antes (A) e após (B) a exposição ao gás ozônio, na concentração de 21 mg L⁻¹, por 96 h.



Figura 7 - Grão de amendoim antes do processo de ozonização.

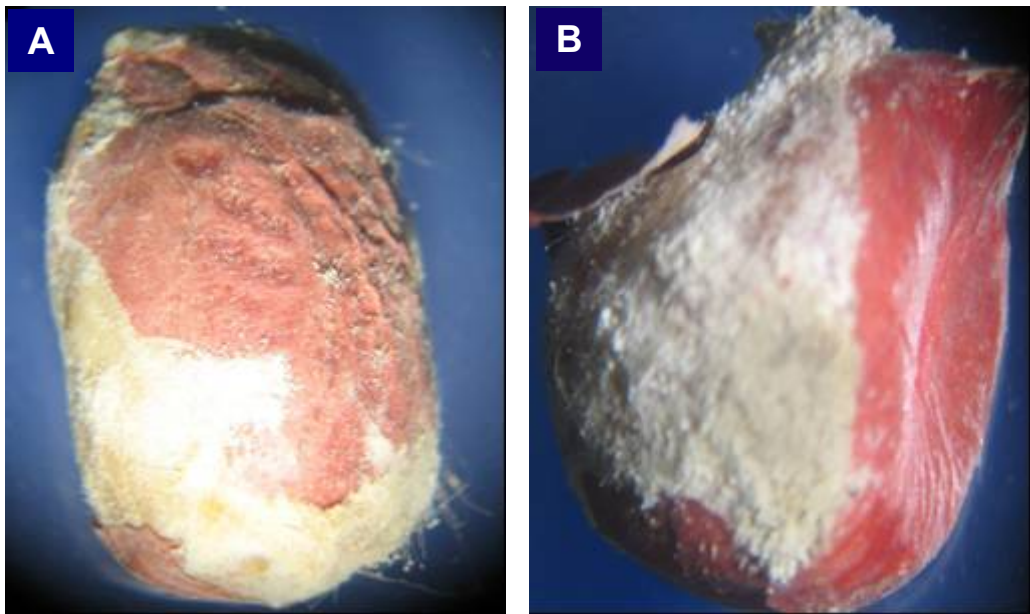


Figura 8 - Grãos de amendoim após o processo de ozonização nas concentrações de 13 (A) e 21 (B) mg L^{-1} , por 24 h.

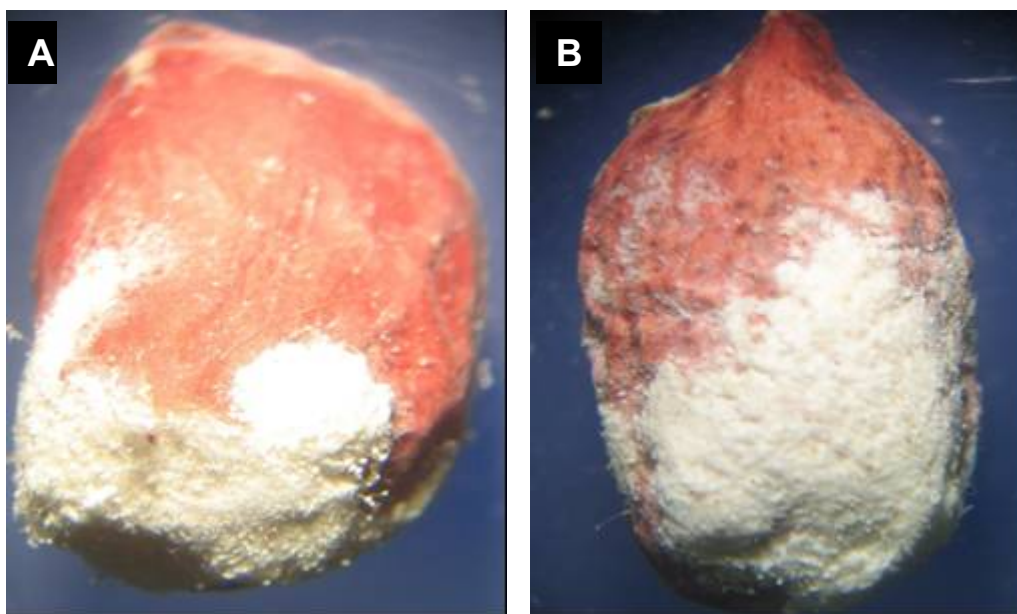


Figura 9 - Grãos de amendoim após o processo de ozonização nas concentrações de 13 (A) e 21 (B) mg L^{-1} , por 96 h.

Os teores de aflatoxinas totais e de aflatoxinas B1 nos grãos de amendoim ozonizados nas concentrações de 21 e 13 mg L^{-1} , em diferentes períodos de exposição, são apresentados nas Figuras 10 e 11, respectivamente. Observa-se redução significativa ($p < 0,05$) no teor de aflatoxinas totais e aflatoxinas B1 com aumento do período de exposição, com decréscimo mais acentuado nos grãos ozonizados na concentração de 21 mg L^{-1} . Vale ressaltar que nos grãos expostos ao gás ozônio na concentração de 21 mg L^{-1} , por 96 h, ocorreu redução nos teores de aflatoxinas totais e aflatoxina B1 equivalente a 30 e 25%, respectivamente.

Encontram-se na Tabela 4, as equações de regressões ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes ao teor de aflatoxinas totais e de aflatoxina B1 em grãos de amendoim ozonizados nas concentrações de 13 e 21 mg L^{-1} , em diferentes períodos de exposição.

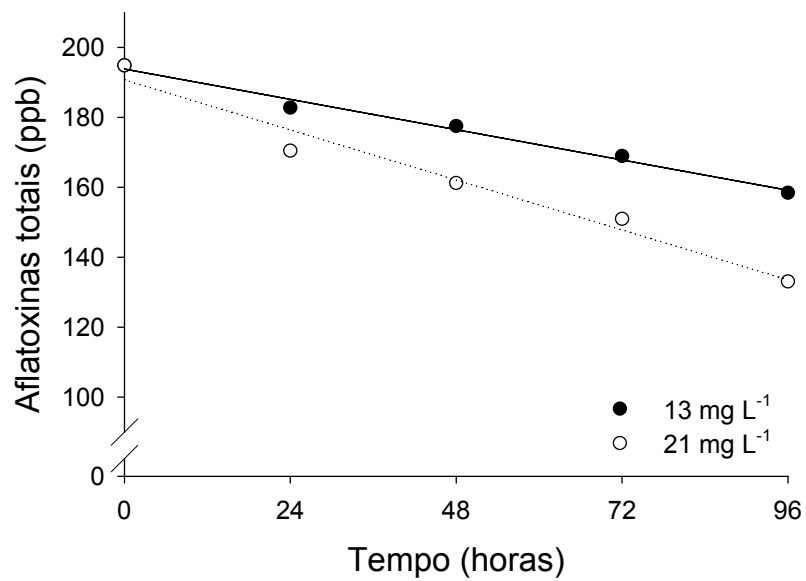


Figura 10 - Teor de aflatoxinas totais (ppb) em grãos de amendoim expostos ao gás ozônio, nas concentrações 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição.

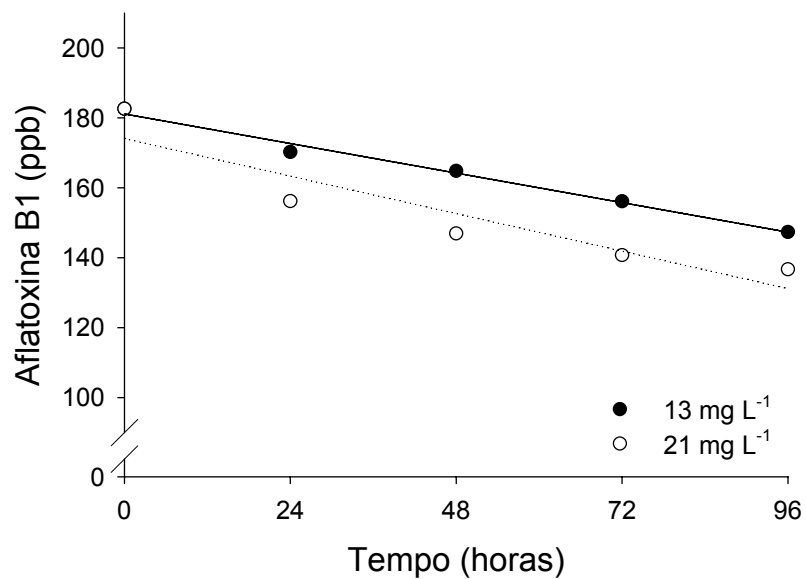


Figura 11 - Teor de aflatoxina B1 (ppb) em grãos de amendoim expostos ao gás ozônio, nas concentrações 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição.

Tabela 4 - Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (r^2) referentes ao teor de aflatoxinas totais e de aflatoxina B1 em grãos de amendoim expostos ao gás ozônio, nas concentrações 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição

	Concentração (mg L ⁻¹)	Equações ajustadas	r^2
Aflatoxinas totais	13	$\hat{y} = 193,836 - 0,361^{**}x$	0,98
	21	$\hat{y} = 190,734 - 0,596^{**}x$	0,96
Aflatoxina B1	13	$\hat{y} = 181,123 - 0,352^{**}x$	0,98
	21	$\hat{y} = 174,083 - 0,447^{*}x$	0,86

**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

4. DISCUSSÃO

A eficácia do ozônio como agente antimicrobiano tem sido estudada por diversos autores, e esse gás é considerado um dos mais potentes sanitizantes conhecidos, por apresentar largo espectro antimicrobiano e ser eficiente no controle de fungos, bactérias, vírus e protozoários, além de esporos de fungos e de bactérias (KHADRE et al., 2001; AKBAS e OZDEMIR, 2006; WU et al., 2006). Dentre as espécies já estudadas e que apresentaram sensibilidade ao ozônio, destacam-se as bactérias *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*; os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus fumigatus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*; e o protozoário *Cyptosporidium parvum*, dentre outros (RESTANO et al., 1995; QUINN et al., 1996; BEUCHAT et al., 1999; KIM e YOUSEF, 2000; KELLS et al., 2001; IGURA et al., 2004; RAILA et al., 2006; HUDSON e SHARMA, 2009). Diante disso, é importante destacar que cada microorganismo apresenta sensibilidade inerente ao ozônio, de tal forma que as bactérias são mais sensíveis que fungos e leveduras; bactérias gram-positivas são mais sensíveis que as gram-negativas; e os esporos são mais resistentes que as células vegetativas (PASCUAL et al., 2007).

Os resultados obtidos referentes à redução na contagem de fungos totais e de *A. flavus* e *A. parasiticus* nos grãos de amendoim ozonizados, assim como o decréscimo de grãos infectados (Figuras 1, 2, 3 e 4), podem ser atribuídos ao alto poder oxidativo do gás. Ciccarese et al. (2007) também observaram redução significativa da infecção fúngica em grãos de trigo, aveia e ervilha devido à exposição ao gás ozônio. Dentre os fungos avaliados por esses autores, destacam-se os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Fusarium*.

A inativação ou inibição do desenvolvimento de microrganismos pelo ozônio, a partir da oxidação de componentes celulares vitais, é um processo complexo, em que o gás atua sobre constituintes da membrana e da parede celular, como os ácidos graxos insaturados, assim como elementos do conteúdo celular, como enzimas e ácidos nucleicos. Os microrganismos são inativados pelo rompimento da célula, em decorrência da ação do ozônio molecular ou dos radicais livres gerados durante a decomposição do gás (GUZEL-SEYDIM et al., 2004; PASCUAL et al., 2007; CULLEN et al., 2009). Victorin (1992) afirmou que existem dois mecanismos do ozônio na destruição de biomoléculas. No primeiro mecanismo o ozônio oxida grupos sulfidril e aminoácidos de enzimas, proteínas e peptídeos. No segundo mecanismo ocorre a ação do gás como agente oxidante de ácidos graxos poli-insaturados a peroxiácidos.

A descoloração dos fungos no amendoim ozonizado, conforme evidenciado nas Figuras 5, 6, 7 e 8, pode ser atribuída à oxidação dos pigmentos dos microrganismos. Zooti et al. (2009) também observaram descoloração de colônias de *A. niger* e *A. flavus*, em decorrência da exposição ao ozônio. Esses autores atribuíram a descoloração da espécie *A. niger* à destruição da melanina, um pigmento de alto peso molecular formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos. Quanto ao *A. flavus*, a descoloração foi atribuída à destruição de pigmentos do grupo antraquinona, responsável pela coloração amarelada da espécie e que, segundo Shier et al. (2005), são intermediários necessários para a síntese de aflatoxinas.

O gás ozônio, além de alternativa para controle de microrganismos, tem sido proposto como agente na degradação de micotoxinas, dentre essas as aflatoxinas (MCKENZIE et al., 1997; MCKENZIE et al. 1998; PRUDENTE e

KING, 2002; YOUNG et al., 2006; INAN et al., 2007; ZORLUGENÇ et al., 2008).

Ressalta-se que apesar de ter ocorrido decréscimo significativo no teor de aflatoxinas totais e aflatoxina B1, em decorrência do tratamento com ozônio, nas duas concentrações utilizadas do gás, conforme apresentado nas Figuras 9 e 10, os grãos de amendoim ainda apresentaram nível da micotoxina acima do permitido na legislação brasileira, cujo limite de aflatoxinas totais (B1 + B2 + G1 + G2) é de 20 ppb (BRASIL, 2002).

A redução depois de 96 h de exposição do produto ao ozônio na concentração de 21 mg L⁻¹ foi de aproximadamente 30 e 25% para aflatoxinas totais e aflatoxina B1, respectivamente. Comparativamente Proctor et al. (2004), obtiveram redução de aflatoxina B1 equivalente a aproximadamente 70% em grãos de amendoim, depois de aplicação de 4,2% (≈ 60 mg L⁻¹) de ozônio a 25 °C, por 15 min. Vale destacar que o amendoim utilizado pelos autores foi contaminado artificialmente, e dessa forma, a micotoxina encontrava-se somente na superfície dos grãos. A distribuição de aflatoxinas em grãos não é uniforme e, de acordo com Cucullu et al. (1966) a micotoxina pode estar presente em todo cotilédone. Segundo Lee et al. (1967), há duas hipóteses para explicar a distribuição dessa micotoxina nos grãos. A primeira hipótese indica que ha difusão das aflatoxinas da parte superficial para o interior dos grãos; a segunda, que ocorre síntese da micotoxina no interior do cotilédone. De acordo com a segunda hipótese, os fungos aflatoxigênicos penetram nos grãos, com posterior síntese das aflatoxinas.

Outro fator que pode ter influenciado a eficiência do ozônio no processo de detoxificação de aflatoxinas é o teor de água do produto. No processo de geração do gás ozônio, utilizou-se oxigênio isento de umidade, e dessa forma, os grãos de amendoim apresentaram decréscimo no teor de água, uma vez que apresentam alta higroscopicidade. Sabe-se que o teor de água do produto afeta sobremaneira a eficiência do ozônio como agente antimicrobiano (RAILA et al., 2006), entretanto o efeito dessa variável no processo de detoxificação de aflatoxinas precisa ser elucidado.

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir, pelos resultados obtidos, que o gás ozônio, nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹, é eficiente como agente fungicida, atuando no controle das espécies potencialmente produtoras de aflatoxinas *A. flavus* e *A. parasiticus*. Quanto ao teor de aflatoxinas totais e aflatoxina B1, o decréscimo mais acentuado foi obtido para os grãos de amendoim ozonizados na concentração de 21 mg L⁻¹. A maior redução nos teores de aflatoxinas totais e de aflatoxina B1 ocorreu nos grãos expostos ao gás ozônio de 21 mg L⁻¹, por 96 h.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

AKBAS, M.Y.; OZDEMIR, M. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. **Food Microbiology**, New York, v.25, p.386–391, 2008.

ASAE. Moisture measurement - Peanuts. p. 600-601. In: **Standards**, 2002. St. Joseph: American Society of Agricultural Engineers.

BAGLEY, E.B. Decontamination of corn containing aflatoxin by treatment with ammonia. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.56, n.9, p.808-811, 1979.

BATTILANI, P.; BARBANO, C.; LOGRIECO, A. Risk assessment and safety evaluation of mycotoxins in fruits. In: BARKAI-GOLAN, R.; PASTER, N. **Mycotoxins in Fruits and Vegetables**. London: Academic Press, 2008, p.1-26.

BEUCHAT, L.R.; CHMIELEWSKI, R.; KESWANI, J.; LAW, S.E.; FRANK, J.F. Inactivation of aflatoxigenic *Aspergilli* by treatment with ozone. **Letters in Applied Microbiology**, v.99, p.202-205, 1999.

BLESA, J.; SORIANO, J.M.; MOLTO, J.C.; MARIN, R.; MANES, J. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1011, p.49-54, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. **Resolução - RDC nº 274 de 15 de outubro de 2002**, Diário Oficial da União. 16.10.2002, Brasília, DF.

CHIOU, R.Y. Estimation of fungal infection of peanut kernels by determination of free glutamic acid content. **Applied and Environmental Microbiology**, p. v.63, n.3, p. 1083–1087, 1997.

CICCARESE, F.; SASANELLI, N.; CICCARESE, A.; ZIADI, T.; AMBRICO, A.; MANCINI, L. Seed disinfection by ozone treatments. In: IOA Conference and Exhibition, 2007, Valência, Espanha, **Proceedings...** 2007. Valência: International Ozone Association.

CLESCERL, L.S.; GREENBERG, A.E. EATON, A.D. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Denver: American Water Works Association, 1220p, 2000.

CRAUFURD, P.Q.; PRASAD, P.V.V.; WALIYAR, F.; TAHERI, A. Drought, pod yield, pre-harvest *Aspergillus* infection and aflatoxin contamination on peanut in Niger. **Field Crops Research**, v.98, p.20–29, 2006.

CUCULLU, A.F.; LEE, L.S.; YATSU, L.Y.; GOLDBLATT, L.A. Determination of aflatoxins in individual peanuts and peanut sections. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.43, n.2, p.89-92, 1966.

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

DESHPANDE, S.S. **Handbook of Food Toxicology**. New York: Marcel Dekker, 2002. 920p.

DIENER, U.L.; DAVIS, N.D. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.44, n.4, p.259-263, 1967.

DOWENS, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 676p. 2001.

EHRlich, K.C.; KOBbEMAN, K.; MONTALBANO, B.G.; COTTy, P.J. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 2, p.153-159, 2007.

FAO. **Food and Agriculture Organization**. Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. Roma. Editora das Nações Unidas, 2001. 124p.

GQALENI, N. SMITH, J.E.; LACEY, J.; GETTINBY, G. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate *Aspergillus flavus* in surface agar culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.3, p.1048-1053, 1997.

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

HUDSON, J.B.; SHARMA, M. The practical application of ozone gas as an anti-fungal (anti-mold) agent. **Ozone-Science & Engineering**, v.31, n.4, p.326-332, 2009.

IGURA, N.; FUJII, M.; SHIMODA, M.; HAYAKAWA, I. Inactivation efficiency of ozonated water for *Fusarium oxysporum* conidia under hydroponic greenhouse conditions. **Ozone-Science & Engineering**, v.26, n.5, p.217-221, 2004.

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

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.

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

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. **Journal of Food Science**, v.65, n.3, p.521-528, 2000.

LEE, L.S.; YATSU, L.Y.; GOLDBLATT, L.A. Aflatoxin contamination. Electron microscopic evidence of mold penetration. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.44, n.5, p.331-332, 1967.

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.

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

OZDEMIR, M.; OZILGEN, M. **Mycotoxins in grains and nuts: II) Decontamination and detoxification methods**. Disponível em: <<http://www.okyanusbilgiambari.com/Bilim/Mycotoxin-Detoxification.pdf>>. Acesso em: 10 agosto 2007.

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.K.; BHATNAGAR, D. **Mycotoxins in Agriculture And Food Safety**. New York: Macel Dekker, 1998, p.279-306.

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.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D.; GLENN, D.R. An improvement medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.54, p.109-114, 1983.

PITT, J.I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, v.38, Supplement 1, p.17–22, 2000.

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

PRADO, G.; CARVALHO, E.P.; MADEIRA, J.E.C.G.; MORAIS, V.A.D.; OLIVEIRA, M.S.; CORREA, R.F.; CARDOSO, V.N. Efeito da irradiação gama (60Co) na frequência fúngica de amendoim in natura em função do tempo de prateleira. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.5, p. 930-936, 2006.

PROCTOR, A.D.; AHMEDNA, M.; KUMAR, J.V.; GOKTEPE, I. Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. **Food Additives & Contaminants**, v.21, n.8, p.786 – 793, 2004.

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

PRUDENTE, A.D. **Evaluation of aflatoxin-related products from ozonated corn**. 99p. Thesis (Doctor of Philosophy) - Louisiana State University - Baton Rouge, Louisiana. 2008.

QUINN, C.M.; ARCHER, G.P.; BETTS, W.B.; O'NEILL, J.G. Dose-dependent dielectrophoretic response of *Cryptosporidium* oocysts treated with ozone. **Letters in Applied Microbiology**, v.22, p.224-228, 1996.

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.

RESTAINO, L.; FRAMPTON, E.W.; HEMPHILL, J.B.; PALNIKAR, P. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.9, p.3471-3475, 1995.

RITCHIE, J.C. AFLATOXIN. IN: WARING, R.H.; STEVENTON, G.B.; MITCHELL, S.C. **Molecules of Death**. London: Imperial College Press, p. 1-18, 2002.

SAEG **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SCHROEDER, H.W.; HEIN JR, H. Aflatoxins: production of the toxins in vitro in relation to temperature. **Applied Microbiology**, v.15, n.2, p.441-445, 1967.

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, p.426–438, 2005.

- VICTORIN, K. Review of genotoxicity of ozone. **Mutation Research**, v.277, p.221-238, 1992.
- WHANGCHAI, K.; SAENGNIL, K.; UTHAIBUTRA, J. Effect of ozone in combination with some organic acids on the control of postharvest decay and pericarp browning of longan fruit. **Crop Protection**, v.25, p.821–825, 2006.
- WOGAN, G.N.; EDWARDS, G.S.; NEWBERNE, P.N. Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. **Cancer Research**, v.31, p.1936-1941, 1971.
- 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.; 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 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.

Terceiro Capítulo

EFEITO DO PROCESSO DE OZONIZAÇÃO NA QUALIDADE DOS GRÃOS E DO ÓLEO BRUTO DE AMENDOIM

ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR¹

¹ Departamento de Engenharia Agrícola

Universidade Federal de Viçosa, CEP 36.570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

e-mail: ernandes.alencar@ufv.br

RESUMO

Considerando o potencial do gás ozônio na prevenção e na redução dos níveis de aflatoxinas em alimentos, o propósito desse trabalho foi avaliar o efeito imediato do ozônio na qualidade dos grãos de amendoim e do óleo bruto extraído desses grãos. Utilizaram-se amostras de 1 kg de amendoim, com teor de aproximadamente 8,0% b.u., acondicionadas em recipientes de vidro com capacidade de 3 L. No processo de ozonização utilizaram-se as concentrações do gás ozônio de 13 e 21 mg L⁻¹, temperatura de 25 °C, períodos de ozonização de 0, 24, 48, 72 e 96 h e vazão do gás de 1,0 L min⁻¹. No tratamento controle, os grãos foram expostos ao gás oxigênio. Para avaliação da qualidade dos grãos de amendoim foram analisados os parâmetros de teor de água, condutividade elétrica da solução que continha os grãos, teor de lipídios e coloração dos grãos. Para a avaliação da qualidade do óleo bruto extraído dos grãos de amendoim quantificaram-se o teor de ácidos graxos livres, o índice de peróxido e o índice de iodo. Em geral, não ocorreu alteração da qualidade do amendoim devido à exposição ao ozônio, exceto para a variável coloração dos grãos, sendo a descoloração observada atribuída a despigmentação da película que envolve os grãos. Com relação aos parâmetros relacionados ao óleo bruto extraído dos grãos de amendoim, não ocorreram alterações qualitativas devido à exposição ao gás ozônio, independentemente da concentração e período de exposição. Concluiu-se que, apesar de ocorrer despigmentação da película que envolve os grãos de

amendoim, a qualidade dos grãos e do óleo bruto extraído não é afetada pela exposição ao gás ozônio em concentrações de até 21 mg L⁻¹, por até 96 h.

Palavras-chave: Ozonização, qualidade dos grãos, qualidade do óleo bruto.

EFFECT OF THE OZONATION PROCESS ON THE QUALITY OF PEANUTS AND CRUDE OIL

ABSTRACT

Considering the potential of ozone gas in the prevention and reduction of aflatoxins in foods, the purpose of this study was to evaluate the immediate effect of ozone on the quality of peanuts and crude oil extracted from peanuts. Peanut samples of 1 kg were used, with a moisture content of 8.0% w.b. and stored in 3 L glass recipients. The ozonation process utilized ozone gas concentrations of 13 and 21 mg L⁻¹, temperature of 25 °C, exposure periods of 0, 24, 48, 72 and 96 h, and a flow rate of 1.0 L min⁻¹. In the control treatment, peanuts were exposed to oxygen gas. Evaluation of peanut quality consisted of analysis for moisture content, electrical conductivity of the solution containing the peanuts, lipid concentration and peanut color. The qualitative parameters of the crude oil extracted from the peanuts analyzed were the concentration of free fatty acids, peroxide index and iodine index. In general there was no alteration in peanut quality due to ozone, except for the coloration of the peanuts, being that discoloring observed was attributed to depigmentation of the skin which surrounds the peanut. In regards to parameters related to the crude oil extracted from the peanut, there were no qualitative alterations due to ozone gas exposure, independent of concentration and exposure period. It was concluded that, despite depigmentation of the skin surrounding the peanuts, quality of the peanuts and the extracted crude oil is not affected by exposure to ozone gas at concentrations up to 21 mg L⁻¹, for up to 96 h.

Keywords: Ozonation, peanut quality, crude oil quality.

1. INTRODUÇÃO

O gás ozônio (O_3) é uma forma alotrópica do oxigênio que pode ser produzida sinteticamente por descarga eletroquímica. Durante o processo de produção desse gás, moléculas de oxigênio (O_2) são dissociadas, produzindo radicais livres altamente reativos, os quais reagem com outras moléculas de oxigênio, resultando no gás ozônio (NOVAK E YUAN, 2007).

Características como alta reatividade e penetrabilidade e decomposição espontânea em um produto não tóxico (oxigênio) fazem do gás ozônio uma importante alternativa na indústria de alimentos. Outra característica fundamental é o seu alto potencial oxidativo, o que o torna um dos mais potentes sanitizantes conhecidos e um forte agente antimicrobiano. Em 2001, o FDA (US Food and Drug Administration) aprovou o uso do ozônio como agente antimicrobiano em alimentos, tanto na fase gasosa como dissolvido em água (FDA, 2001). O tempo de exposição necessário para inativação de microrganismos depende da espécie microbiana e da concentração do ozônio, e uma concentração menor que $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ é suficiente para tratar água pura. O gás age diretamente sobre os microrganismos e destrói seu envoltório celular (SUSLOW, 2004; STUCKI et al., 2005).

A ozonização tem sido utilizada na Europa para sanitizar água destinada ao consumo humano. Atualmente, utiliza-se essa tecnologia para outros fins, como para o tratamento de água de piscinas; para a sanitização de galões de água, de superfícies de alimentos, de plantas e de equipamentos de processamento de alimentos; para a desinfecção de carcaças; na conservação de frutas e de verduras; no controle de insetos-praga de grãos armazenados; e na redução dos níveis de aflatoxinas em alimentos (MCKENZIE et al., 1997; MCKENZIE et al. 1998; HSIEH et al., 1998; PRUDENTE e KING, 2002; MENDEZ et al., 2003; PEREIRA et al., 2008; SOUSA et al., 2008).

A capacidade do ozônio de inativar ou inibir o desenvolvimento de microrganismos e reduzir os níveis de aflatoxinas em alimentos torna esse gás uma importante alternativa para o amendoim, sob o ponto de vista de segurança alimentar. O amendoim, que apresenta alto valor nutricional, é tido como substrato ideal para o desenvolvimento dos fungos produtores de aflatoxinas *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, e a presença dessa

micotoxina é um dos fatores que mais comprometem a qualidade do amendoim (SABINO et al., 1989; PITT, 2000; BLESÁ et al., 2003; EHRLICH et al., 2007; NAKAI et al., 2008). As aflatoxinas produzidas por esses fungos são compostos altamente carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos, sendo que as quatro principais micotoxinas primárias são aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (LI et al., 2009). Dessas quatro micotoxinas primárias, a aflatoxina B1 apresenta maior toxicidade e é considerada a de maior potencial carcinogênico, classificada pela Agência Internacional de Pesquisa de Câncer como composto do grupo I, ou seja, com potencial para causar carcinoma hepatocelular primário em humanos (IARC, 1993; WILLIAMS et al., 2004; BAIRD et al., 2006).

Tendo em vista que o ozônio pode ser uma alternativa para o controle de qualidade do amendoim, sob o ponto de vista de segurança alimentar, atuando tanto na inibição de fungos potencialmente aflatoxigênicos como na redução dos níveis de aflatoxinas, são necessários trabalhos nos quais se avalie o efeito desse gás na qualidade dos grãos e subprodutos do amendoim. Justifica-se essa necessidade pelo fato de o gás ozônio ser capaz, segundo Victorin (1992), de oxidar componentes celulares orgânicos, como aminoácidos e ácidos graxos poli-insaturados. Diante disso é necessário que sejam estabelecidas concentrações do gás e períodos de exposição adequados, de tal forma que a qualidade do amendoim seja preservada, no que tange aos aspectos físicos e químicos. Sendo assim, objetivou-se, com esse trabalho, avaliar a qualidade de grãos amendoim e do óleo bruto extraídos desses grãos após o processo de ozonização em diferentes combinações de concentração e período de exposição.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Setor de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola – DEA e no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos – DTA, ambos na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

Para avaliar o efeito imediato da aplicação do gás ozônio em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) foram utilizados grãos com teor de aproximadamente

8,0% b.u. A determinação do teor de água dos grãos de amendoim foi realizada em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 130 ± 2 °C por 6 h (ASAE, 2002).

O gás ozônio foi obtido por meio de um gerador de ozônio baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica (DBD) desenvolvido pelo Departamento de Física do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA), São José dos Campos, SP. No processo de geração do ozônio, foi utilizado como insumo o oxigênio com grau de pureza de $90\pm 3\%$, isento de umidade, obtido do concentrador Mark 5 Plus Oxygen Concentrator.

A concentração de ozônio foi determinada pelo método iodométrico, descrito por Clescerl et al. (2000), que consiste no borbulhamento do 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 , foi necessário acidificar o meio com 2,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 N. A solução foi então titulada com tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) 0,005 N, com uso de solução de amido 1% como indicador.

No processo de ozonização, 1 kg de grãos de amendoim, acondicionados em frascos de vidro com capacidade de 3 L, à temperatura de 25 °C, foram ozonizados nas concentrações de 13 e 21 $mg\ L^{-1}$, vazão do gás de $1,0\ L\ min^{-1}$, por períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 h. No tratamento controle (0 $mg\ L^{-1}$), os grãos foram expostos ao gás oxigênio.

2.1. Análises qualitativas dos grãos de amendoim ozonizados

Teor de água

Para determinação do teor de água dos grãos de amendoim, utilizou-se o método de estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 130 ± 1 °C, por 6 h, conforme recomendações da ASAE (2002), método S401.1.

Teor de lipídios

A determinação do teor de lipídios dos grãos de amendoim, previamente moídos, foi realizada de acordo com as normas AOCS (1993), método Ac 3-44, em aparelho de soxhlet, durante 6 h, utilizando éter de petróleo como solvente. Depois da extração da fração lipídica, foi feita a remoção do solvente residual, colocando-se os balões contendo o óleo de amendoim extraído em estufa com

recirculação de ar, por cerca de uma hora. A massa de lipídios foi obtida pela diferença entre a massa do balão com e sem o óleo extraído dos grãos de amendoim.

Para a correção de possíveis distorções na quantificação do teor de lipídios em razão da variação do teor de água dos grãos durante o processo de ozonização, determinou-se o teor de água da farinha de amendoim, de tal forma que o teor de lipídios fosse expresso em relação à massa da matéria seca utilizada na extração. Para determinação do teor de água da farinha de amendoim, utilizou-se o método 930.15 (AOAC, 2000), em estufa com circulação forçada de ar e temperatura de 135 ± 1 °C, por 2 h.

O teor de lipídios foi calculado em função da massa da matéria seca da amostra e da fração lipídica extraída, de acordo com a Equação 1,

$$\% \text{ de Lipídios} = \frac{L}{m} * 100 \quad (1)$$

em que:

L = massa de lipídios na amostra, g; e

m = massa da amostra em termos de matéria seca, g.

Condutividade elétrica

A condutividade elétrica da solução contendo os grãos de amendoim foi feita utilizando-se o “Sistema de Copo” ou “Condutividade de Massa” (VIEIRA et al., 2001), tendo como finalidade avaliar o aumento da permeabilidade da membrana, à medida que o grão se deteriora. Os testes foram realizados em três repetições, com 50 grãos para cada combinação de concentração do gás *versus* período de exposição. Os grãos foram pesados e colocados em copos de plástico de 200 mL, aos quais foram adicionados 75 mL de água destilada. Em seguida, os copos foram colocados em uma câmara climática do tipo B.O.D., em temperatura de 25 °C, durante 24 h. Imediatamente após este período, os copos foram retirados da câmara para medições da condutividade elétrica da solução que continha os grãos. As leituras foram feitas em medidor de condutividade elétrica da marca Tecnopon, modelo CA-150. O valor da condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) fornecido pelo aparelho foi dividido pela massa da matéria seca dos grãos (g), obtendo-se valor expresso em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

Cor dos grãos

A avaliação da cor dos grãos de amendoim foi realizada com o auxílio do colorímetro triestímulo ColorQuest™ II, obtendo-se os valores das coordenadas **L**, **a** e **b** do sistema Hunter.

Com os valores das coordenadas **L**, **a** e **b** foi possível obter parâmetros relacionados à tonalidade **h** (Equação 2), à saturação da cor ou croma **C** (Equação 3) e à diferença de cor ΔE (Equação 4) (LITTLE, 1975, FRANCIS, 1975, MCLELLAN et al., 1995, MASKAN, 2001).

$$h = \arctang(b/a) \quad (2)$$

$$C = \sqrt{(a^2 + b^2)} \quad (3)$$

$$\Delta E = \sqrt{((L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2)} \quad (4)$$

em que:

h = tonalidade da cor;

C = saturação da cor ou croma;

ΔE = diferença de cor;

L = mensurável em termos de intensidade de branco a preto;

a = mensurável em termos de intensidade de vermelho e verde; e

b = mensurável em termos de intensidade de amarelo e azul.

L_0 , a_0 e b_0 são as coordenadas obtidas antes do tratamento dos grãos de amendoim.

2.2. Análises qualitativas do óleo bruto extraído dos grãos amendoim ozonizados

Ácidos graxos livres

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

$$AGL = \frac{N \cdot f \cdot 28,2 \cdot (V_a - V_s)}{m} \quad (5)$$

em que,

N = normalidade da solução de NaOH;

f = fator de correção da solução de NaOH;

Va = volume de NaOH 0,01 N gasto para a amostra, mL;

Vs = volume de NaOH 0,01 N gasto na titulação sem amostra de óleo, mL; e

m = massa da amostra, g.

Índice de peróxido

Determinou-se o índice de peróxido de acordo com as normas AOCS (1993), Método Cd 8-53. O índice de peróxido (IP) foi calculado por meio da Equação 6,

$$IP = \frac{N f 1000 (Va - Vs)}{m} \quad (6)$$

em que,

IP = Índice de peróxido, mEq kg⁻¹;

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

Vs = volume de Na₂S₂O₃ 0,1N padronizada gasto para na 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 foi realizada segundo as normas AOCS (1993), Método Cd 1b-87. O índice de iodo foi obtido pela Equação 7,

$$I = \frac{1,27 f (Vs - Va)}{m} \quad (7)$$

em que,

I = massa de iodo absorvido por 100 g da amostra, g;

f = fator de correção da solução titulante;

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

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

m = massa da amostra, g.

2.3. Delineamento Experimental

O experimento foi realizado em esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas as concentrações (0, 13 e 21 mg L⁻¹) e nas subparcelas os períodos de exposição ao gás (0, 24, 48, 72 e 96 h), no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Inicialmente realizou-se análise de variância a 5% de probabilidade e, posteriormente, análise de regressão. Na análise de variância, utilizou o Software SAEG 9.0 (SAEG, 2007). Para a obtenção das equações de regressão e plotagem dos gráficos, utilizou-se o software SigmaPlot 2001.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Qualidade dos grãos de amendoim ozonizados

Apresenta-se, na Figura 1, a curva de regressão que descreve o comportamento do teor de água dos grãos de amendoim nos diferentes períodos de exposição. Independentemente da exposição dos grãos de amendoim ao gás oxigênio (controle) e ao gás ozônio, ocorreu decréscimo significativo ($p < 0,05$) do teor de água dos grãos nos diferentes períodos de exposição. O valor médio estimado do teor de água dos grãos reduziu de 7,6% para 4,4% quando o período de exposição foi de 96 h.

A redução do teor de água dos grãos de amendoim (Figura 1) pode ser explicada pela utilização do oxigênio, isento de umidade, como insumo na geração do ozônio e no tratamento controle. A perda de água durante o processo de ozonização se deve à alta higroscopicidade dos grãos de amendoim. É importante salientar que em outros produtos, como em frutas, o ozônio pode reagir com a cutícula, estrutura cuja função principal é controlar a perda de água por transpiração, e com componentes lipoproteicos, acelerando a perda de água (RAO et al., 2000).

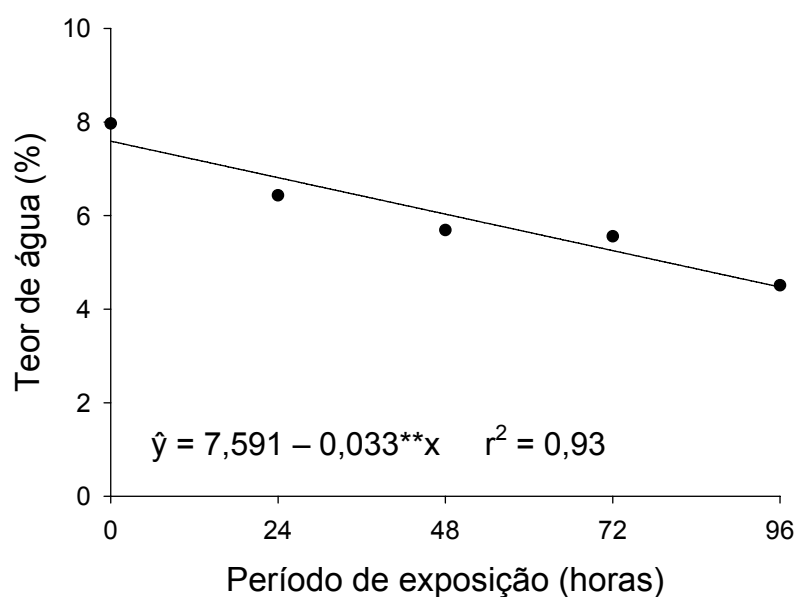


Figura 1 - Teor de água dos grãos de amendoim expostos ao oxigênio e ao gás ozônio, nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição.

**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

O teor de lipídios nos grãos de amendoim permaneceu em torno de 45%, independentemente da exposição ao gás oxigênio e ao gás ozônio, nos diferentes períodos de exposição ($p > 0,05$). Infere-se, com esse comportamento, que o gás ozônio não afeta a constituição química dos grãos de amendoim. Mendez et al. (2003), ozonizaram grãos de milho, soja e trigo, na concentração de 50 ppm, por 30 dias. Esses autores também não observaram variação na constituição química dos grãos ozonizados, não sendo verificadas alterações no teor de aminoácidos e de lipídios.

No que se refere à variável condutividade elétrica da solução que continha os grãos de amendoim, não ocorreu variação significativa pela interação concentração do gás ozônio e períodos de exposição e por esses dois fatores quando analisados separadamente ($p > 0,05$). Os valores médios da condutividade elétrica da solução que continha os grãos, expostos ou não ao gás ozônio, nos diferentes períodos de exposição, permaneceram na faixa entre 80 e 90 $\mu\text{S g cm}^{-1}$.

A variável condutividade elétrica está diretamente relacionada à integridade da membrana celular e à qualidade fisiológica dos grãos;

membranas mal estruturadas e células danificadas estão associadas ao processo de deterioração (HESLEHURST, 1988). Os grãos de amendoim expostos ao gás ozônio nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹, por até 96 h, não foram afetados fisiologicamente. Resultados semelhantes referentes à qualidade fisiológica de grãos foram obtidos por Santos (2008) para milho exposto ao gás ozônio na concentração de 100 ppm, por 180 min. Ao contrário, Rozado et al. (2008) observaram aumento significativo da condutividade elétrica da solução que continha os grãos expostos ao gás ozônio na concentração de 50 ppm, por 264 h.

Com relação ao parâmetro saturação de cor, não ocorreu variação significativa pela interação concentração do gás ozônio e período de exposição e por esses dois fatores quando analisados separadamente ($p > 0,05$). Entretanto, o processo de ozonização dos grãos de amendoim, nas diferentes combinações de concentração do gás e períodos de exposição, ocasionou variação significativa ($p < 0,05$) dos parâmetros tonalidade e diferença de cor. As alterações nos tonalidade e diferença de cor, referentes aos grãos expostos ao oxigênio e ao gás ozônio, nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹, em diferentes períodos de exposição, são apresentados nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

As equações de regressão ajustadas e seus respectivos coeficientes de determinação referentes à tonalidade e à diferença de cor dos grãos de amendoim expostos ao oxigênio e ao gás ozônio, nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹, nos diferentes períodos de exposição, são apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

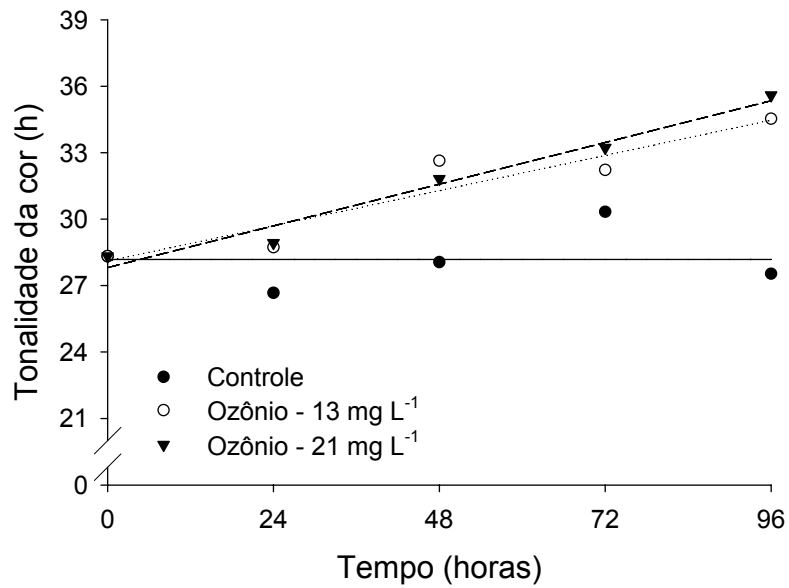


Figura 2 - Curvas de regressão de tonalidade de cor (h) dos grãos de amendoim expostos ao oxigênio e ao gás ozônio, nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição (horas).

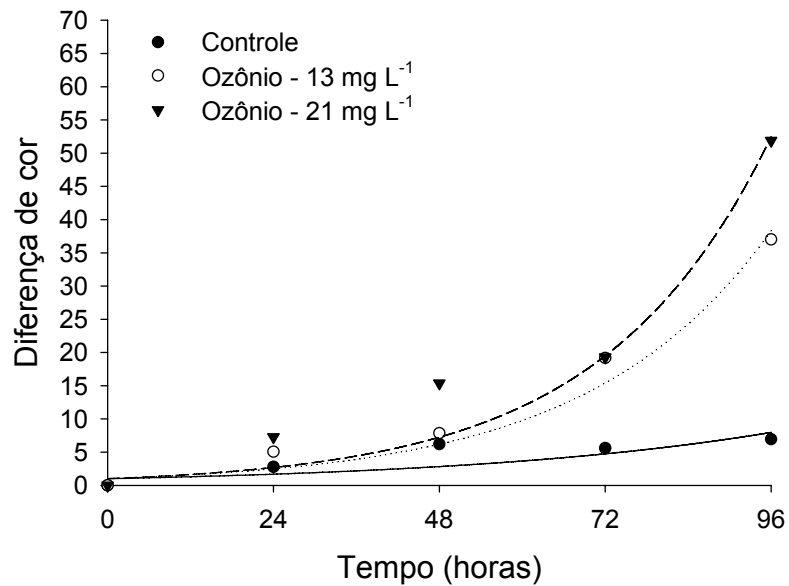


Figura 3 - Curvas de regressão de diferença de cor dos grãos (ΔE) de amendoim expostos ao oxigênio e ao gás ozônio, nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição (horas).

Tabela 1 - Equações de regressão ajustadas e seus respectivos coeficientes de determinação (r^2) referentes à tonalidade de cor (h) dos grãos de amendoim expostos ao oxigênio e ao gás ozônio, nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição (horas)

Tratamento	Equações ajustadas	r^2
Oxigênio	$\hat{y} = 28,184$	
Ozônio – 13 mg L ⁻¹	$\hat{y} = 28,107 + 0,066^{**}x$	0,89
Ozônio – 21 mg L ⁻¹	$\hat{y} = 27,812 + 0,079^{**}x$	0,97

**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 2 - Equações de regressão ajustadas e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) referentes à diferença de cor (ΔE) dos grãos de amendoim expostos ao oxigênio e ao gás ozônio, nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e em diferentes períodos de exposição (horas)

Tratamento	Equações ajustadas	R^2
Oxigênio	$\hat{y} = e^{0,022x}$	0,53
Ozônio – 13 mg L ⁻¹	$\hat{y} = e^{0,038x}$	0,97
Ozônio – 21 mg L ⁻¹	$\hat{y} = e^{0,041x}$	0,94

A alteração na cor dos grãos de amendoim pode ser explicada pela despigmentação de sua película, de coloração avermelhada, pelo gás ozônio. Na película desses grãos são encontrados pigmentos como taninos, leucoantocianinas, flavanona e flobafeno (STANSBURY e HOFFPAUIR, 1952). A despigmentação observada na película dos grãos pode ser atribuída ao alto potencial de oxidação do ozônio, equivalente a 2,07 mV. Vale ressaltar que o gás ozônio é capaz de degradar diversos compostos orgânicos em alimentos, dentre os quais os carotenoides e as antocianinas (MUSTAFA, 1990; HENRY et al., 2000; GUZEL-SEYDIM et al., 2004; TIWARI, et al., 2009). Outro aspecto importante é que a capacidade do ozônio de descoloração ou despigmentação torna esse gás, inclusive, uma alternativa na indústria de alimentos, como o

branqueamento da farinha de trigo e do açúcar refinado (FERNÁNDEZ et al., 2006; LÁSZLÓ et al., 2008).

Destaca-se, entretanto, que a alteração observada na coloração da película que envolve os grãos não é determinante do ponto de vista qualitativo, uma vez que uma das técnicas adotadas para agregar valor ao produto é o despeliculamento ou blanchamento. Essa técnica é definida por Brasil (2009) como o procedimento que consiste na eliminação, por processo térmico e mecânico, da película que envolve os grãos de amendoim, para atendimento ao mercado consumidor ou redução dos níveis de contaminação e de defeitos.

3.2. Qualidade do óleo bruto extraído de grãos de amendoim ozonizados

O percentual de ácidos graxos livres do óleo bruto permaneceu na faixa entre 0,90 e 1,10%, independentemente do tratamento com o oxigênio e o gás ozônio, nos diferentes períodos de exposição ($p > 0,05$). Tem-se que os valores médios obtidos de ácidos graxos livres do óleo bruto extraído dos grãos expostos ou não com gás ozônio permaneceram abaixo do limite exigido pela Anvisa (1999) para comercialização de óleo bruto de amendoim, que é de 2,00%. Esses resultados confirmam os obtidos por Akbas e Ozdemir (2004), que não observaram aumento do percentual de ácidos graxos livres no óleo bruto extraído de pistaches ozonizados nas concentrações de 5,0, 7,0 e 9,0 mg L⁻¹, por períodos de exposição de até 420 min.

O índice de peróxido do óleo bruto extraído dos grãos de amendoim não variou significativamente em decorrência da interação concentração do gás ozônio e período de exposição e desses dois fatores quando analisados separadamente ($p > 0,05$). Ressalta-se que os valores médios do índice de peróxido permaneceram abaixo de 10 meq kg⁻¹ de amostra, limite estabelecido no Brasil para comercialização de óleo bruto de amendoim (ANVISA, 1999). Resultados semelhantes foram obtidos por Faroni et al. (2007) para óleo bruto extraído de grãos de milho ozonizados na concentração de 50 ppm, por 168 h.

No que se refere ao parâmetro índice de iodo do óleo bruto extraído dos grãos de amendoim, a interação concentração do gás ozônio e período de exposição não foi significativa ($p > 0,05$). Também não ocorreu variação

significativa devido aos fatores concentração do gás ozônio e período de exposição quando analisados separadamente. O valor médio do índice de iodo foi de $96,8 \text{ g I}_2/100 \text{ g}^{-1}$ de amostra, permanecendo, dessa forma, entre os limites máximo e mínimo estabelecidos pela legislação brasileira para comercialização desse subproduto, apesar da alta capacidade do ozônio de oxidar ácidos graxos insaturados (GÓMEZ et al., 2008). De acordo com a legislação nacional, o índice de iodo do óleo bruto de amendoim deve permanecer na faixa entre 80 e $105 \text{ g I}_2/100 \text{ g}^{-1}$ de amostra (ANVISA, 1999). Esses resultados confirmam Mendez et al. (2003), que não verificaram variação significativa no perfil de ácidos graxos saturados e insaturados do óleo bruto extraído de grãos de milho, de soja e de trigo ozonizados na concentração de 50 ppm, por 30 dias.

4. CONCLUSÕES

A análise e interpretação dos dados permitiram concluir que, apesar do alto poder oxidante do gás ozônio e de sua capacidade de despigmentação da película que envolve os grãos de amendoim, a qualidade dos grãos e do óleo bruto não é afetada pelo ozônio em concentrações de até 21 mg L^{-1} e período de exposição de até 96 h.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBAS, M.Y.; OZDEMIR, M. Effect of different ozone treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.86, p.2090-2104, 2006.

ANVISA. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais**. Resolução nº 482, de 23.09.1999.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17^a ed. Arlington: 2000. 2000p.

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

ASAE. Moisture measurement - Peanuts. p. 600-601. In: **Standards**, 2002. St. Joseph: American Society of Agricultural Engineers.

BAIRD, R.E.; TRIGIANO, R.N.; WINDHAM, G.; WILLIAMS, P.; KELLEY, R.; ABBAS, H.K.; MOULTON, J.K.; SCRUGGES, M.L. Comparison of aflatoxigenic and nonaflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* using DNA amplification fingerprinting techniques. **Mycopathologia**, v.161, p.93-99, 2006.

BLESA, J.; SORIANO, J.M.; MOLTO, J.C.; MARIN, R.; MANES, J. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase q dispersion and liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.1011, p.49-54, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 3, de 28 de janeiro de 2009**, Diário Oficial da União. 29.01.09, Brasília, DF.

CLESCERL, L.S.; GREENBERG, A.E. EATON, A.D. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Denver: American Water Works Association, 1220p, 2000.

EHRlich, K.C.; KOBEMAN, K.; MONTALBANO, B.G.; COTTY, P.J. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 2, p.153-159, 2007.

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. 2007, Valência, Espanha. **Proceedings...** Valência, Espanha: 2007. v.1, p.1-6.

FDA. Food and Drug Administration. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. **Federal Register**, v.66, n.123, p.33829-33830, 2001.

FERNÁNDEZ, L.A.; BATALLER, M.; REY, R.P.; VÉLIZ, E.; HERNÁNDEZ, C.; ALVAREZ, C. Use of ozone in the decolorization of sugar industry liquors. **Ozone: Science and Engineering**, v.28, p.261-267, 2006.

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

GOMEZ, M.F.D.; TÉLLEZ, G.M.; HERNÁNDEZ, R.I.M.; ALAIZ, M.; GARCÉS, R. Estudio analítico de especies oxigenadas en el aceite de teobroma ozonizado. **Química Nova**, v.31, n.3, p.610-613, 2008.

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

HENRY, L.K.; PUSPITASARI-NIENABER, N.L.; MANUEL JARÉN-GALÁN, M.; BREEMEN, R.B.V.; CATIGNANI, G.L.; SCHWARTZ, S.J. Effects of ozone and oxygen on the degradation of carotenoids in an aqueous model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.5008-5013, 2000.

HESLEHURST, M.R. Quantifying initial quality and vigour of wheat seeds using regression analysis of conductivity and germination data from aged seeds **Seed Science and Technology**. v.16, p.75-85, 1988.

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.

IARC. International Agency for Research on Cancer. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. IARC: Lyon, v.56, p.26–32, 1993.

LÁSZLÓ, Z.; HOVORKA-HORVATH, Z.; BESZEDES, S.; KERTESZ, S.; GYIMES, E.; HODUR, C. Comparison of the effects of ozone, UV and combined ozone/UV treatment on the color and microbial counts of wheat flour. **Ozone: Science and Engineering**, v.30, n.6, p.413-417, 2008.

LI, P.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; ZHANG, J.; CHEN, X.; JIANG, J.; XIE, L.; ZHANG, D. Development of class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut. **Food Chemistry**, v.115, p. 313-317, 2009.

LITTLE, A. Off on a tangent. **Journal of Food Science**, Chicago, v.40, p.410-411, 1975.

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

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.

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.

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

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.

MUSTAFA, M.G. Biochemical basis of ozone toxicity. **Free Radical Biology and Medicine**, v.9, p.245–265, 1990.

NAKAI, V.K.; ROCHA, L.O.; GONÇALEZ, E.; FONSECA, H.; ORTEGA, E.M.M.; CORRÊA, B. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. **Food Chemistry**, v.106, p.285-290, 2008.

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, 2007, p.185-193.

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.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D.; GLENN, D.R. An improvement medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.54, p.109-114, 1983.

PRUDENTE, A.D.; KING, J.M. Efficacy and Safety Evaluation of Ozonation to Degrade Aflatoxin in Corn. **Journal of Food Science**, v.67, n.8, 2002.

RAO, M.V.; KOCH, J.R.; DAVIS, K.R. Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. **Plant Molecular Biology**, v.44, p.345–358, 2000.

ROZADO, A. F. ; FARONI, L.R.D.; URRUCHI, W.M.I.; GUEDES, R.N.C.; PAES, J. L. Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em

milho armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, p. 282-285, 2008.

SABINO, M.; ZORBETT, M.A. P.; PEDROSO, M.O.; MILANEZ, T.V. Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de São Paulo, no período de 1980 a 1987. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.49, n.1, p.41-44, 1989.

SAEG **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SANTOS, J.E. **Difusão e cinética de decomposição do ozônio no processo de fumigação de grãos de milho (*Zea mays*)**. (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008. 54f. Tese.

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.

STANSBURY, M.F.; HOFFPAUIR, C.L. Estimation of skin content of peanut meals and relative skin pigment content of isolated proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.29, n.9, p.370-372, 1952.

STUCKI, S.; SCHULZE, D.; SCHUSTER, D.; STARK, C. Ozonization of purified water systems. **Pharmaceutical Engineering**, v.25, n.1, p.1-7, 2005.

SUSLOW, T.V. **Ozone applications for postharvest disinfection of edible horticultural crops**. Oakland: University of California - Division of Agriculture and Natural Resources, 2004. Publication 8133, 8p.

TIWARI, B.K.; DONNELL, C.P.O.; CULLEN, P.J. New challenges in food science and technology: an industrial perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, p.180-181, 2009.

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

VIEIRA, R.D.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B.; RUCKER, M. Electrical conductivity of soybean seeds after storage in several environments. **Seed Science and Technology**, v. 29, p. 599-608, 2001.

WILLIAMS, J.H.; PHILLIPS, T.D.; JOLLY, P.E.; STILES, J.K.; JOLLY, C.M.; AGGARWAL, D. Human aflatoxicoses in developing countries: a review of

toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, p.1106-1122, 2004.

RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho foi conduzido no Setor de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola – DEA e no Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos – DTA, ambos na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

Objetivou-se com este trabalho avaliar a cinética de decomposição do gás ozônio; analisar o efeito fungicida e detoxificante do gás ozônio sobre as aflatoxinas; e avaliar a qualidade de grãos de amendoim e do óleo bruto extraído desses grãos durante o processo de ozonização.

O gás ozônio foi obtido por meio de um gerador de ozônio baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica (DBD) desenvolvido pelo Departamento de Física do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA), São José dos Campos, SP.

Para avaliar a cinética de decomposição do ozônio, foram utilizadas amostras de 1 kg de amendoim, com teores de 7,1 e 10,5% b.u., acondicionadas em recipientes de vidro com capacidade de 3 L. Os grãos de amendoim foram ozonizados na concentração de $450 \mu\text{g L}^{-1}$, nas temperaturas de 25 e 35 °C e vazões do gás de 1,0 e 3,0 L min^{-1} . Determinou-se o tempo de saturação, quantificando-se a concentração residual do ozônio, pelo método iodométrico, após a passagem do gás pela massa de grãos, até que ela se mantivesse constante. A cinética de decomposição do ozônio foi avaliada depois da saturação da massa de grãos com o gás. Obteve-se a concentração residual do ozônio, depois dos períodos de repouso, durante os quais o gás reagia no meio poroso, e, dessa forma, era decomposto. O modelo cinético de primeira ordem foi ajustado aos dados da concentração residual de ozônio em função do tempo, após linearização. A partir dos valores da constante da taxa de decomposição, foi possível obter a meia vida do ozônio em grãos de amendoim.

O efeito fungicida do gás ozônio em grãos de amendoim foi avaliado pelos métodos de diluição em placas e de plaqueamento direto. Grãos de amendoim com teor de água de aproximadamente 9,0% b.u. foram expostos ao gás ozônio nas concentrações de 13 e 21 mg L^{-1} , temperatura de 25 °C, vazão

do gás de $1,0 \text{ L min}^{-1}$ e períodos de ozonização de 0, 24, 48, 72 e 96 h. Observaram-se, em microscópio óptico, as alterações morfológicas ocorridas nos fungos devido à exposição ao gás ozônio. Para avaliar a capacidade detoxificante do ozônio, quantificou-se o teor de aflatoxinas totais e de aflatoxina B1 nos grãos de amendoim após cada período de exposição ao gás por cromatografia líquida de alta eficiência.

Na avaliação da qualidade dos grãos de amendoim ozonizados, foram utilizados grãos com teor de água em torno de 8,0% b.u., adotando-se no processo de ozonização concentrações do gás de 0, 13 e 21 mg L^{-1} , vazão de $1,0 \text{ L min}^{-1}$ e períodos de exposição de 0, 24, 48, 72 e 96 h. Para os grãos, os parâmetros analisados foram teor de água, condutividade elétrica da solução que continha os grãos, teor de lipídios e coloração dos grãos. Para o óleo bruto extraído dos grãos, foram avaliados o teor de ácidos graxos livres, o índice de peróxido e o índice de iodo.

As análises e a interpretação dos resultados obtidos relacionados à saturação e à cinética de decomposição permitiram concluir que o comportamento do ozônio durante o processo de saturação em grãos de amendoim depende dos parâmetros teor de água do produto, temperatura e vazão de entrada do gás. No processo de decomposição do gás ozônio em grãos de amendoim, o fator determinante é a temperatura. Um aumento de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ na temperatura dos grãos implica decréscimo de pelo menos 43% no tempo de meia vida do gás.

Conclui-se, a partir dos dados obtidos referentes ao efeito fungicida e detoxificante do gás ozônio sobre as aflatoxinas em grãos de amendoim que o processo de ozonização de grãos de amendoim é eficiente como agente fungicida, atuando inclusive no controle das espécies potencialmente produtoras de aflatoxinas, *A. flavus* e *A. parasiticus*, com redução superior a 3 ciclos log depois 96 h de exposição ao gás, na concentração de 21 mg L^{-1} . Quanto ao teor de aflatoxinas totais e aflatoxina B1, a redução máxima obtida no amendoim exposto ao gás ozônio, na concentração de 21 mg L^{-1} depois de 96 h, foi de aproximadamente 30 e 25%, respectivamente.

Com relação ao efeito do gás ozônio na qualidade dos grãos de amendoim e do óleo bruto extraído desses grãos, apesar do alto poder oxidante desse gás e de sua capacidade de despigmentação da película que

envolve os grãos de amendoim, a qualidade dos grãos e do óleo bruto extraído não é afetada pelo gás ozônio em concentrações de até 21 mg L⁻¹ e períodos de exposição de 96 h.

Com base no presente estudo, sugerem-se outros trabalhos, entre eles a avaliação do efeito latente do gás ozônio sobre os fungos ao longo do armazenamento de grãos de amendoim. Além disso, é importante que se estude a capacidade detoxificante do gás ozônio sobre aflatoxinas em grãos de amendoim, adotando-se concentrações mais elevadas do gás, objetivando o aumento da eficiência da remoção da micotoxina.

APÊNDICE

Tabela 1 - Resumo da análise de variância referente contagem (UFC g⁻¹) de fungos totais (FT) e de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (AFP) nos grãos de amendoim ozonizados nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e períodos de exposição de 0, 24, 48, 72 e 96 h

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios	
		FT	AFP
Concentração do ozônio (CO)	1	1,05*	2,72**
Resíduo (a)	4	0,13	0,09
Período de exposição (P)	4	9,00**	7,81**
CO x P	4	0,29**	0,19*
Resíduo (b)	16	0,02	0,05
CV (%) Parcela		17,70	15,12
CV (%) Subparcela		6,62	11,23

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância referente à infecção interna (%) por fungos e por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (AFP) nos grãos de amendoim ozonizados nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e períodos de exposição de 0, 24, 48, 72 e 96 h

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios	
		FT	AFP
Concentração do ozônio (CO)	1	5.000**	5.796,06**
Resíduo (a)	4	66	102,17
Período de exposição (P)	4	4.292**	10.847,17**
CO x P	4	620**	1.702,17**
Resíduo (b)	16	81	173,73
CV (%) Parcela		11,47	18,19
CV (%) Subparcela		12,71	23,72

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância referente ao teor de aflatoxinas totais e aflatoxina B1 nos grãos de amendoim ozonizados nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹ e períodos de exposição de 0, 24, 48, 72 e 96 h

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios	
		AFT	AFB1
Concentração do ozônio (CO)	1	158,32**	155,51**
Resíduo (a)	4	17,86	21,15
Período de exposição (P)	4	2.358,12**	2.419,12**
CO x P	4	333,94**	353,45**
Resíduo (b)	16	47,66	49,79
CV (%) Parcela		2,66	3,17
CV (%) Subparcela		4,34	4,87

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 4 - Resumo da análise de variância referente ao teor de água (%), TA, teor de lipídios (%), TL, e condutividade elétrica ($\mu\text{S cm g}^{-1}$) da solução que continha os grãos de amendoim ozonizados nas concentrações de 0, 13 e 21 mg L⁻¹ e períodos de exposição de 0, 24, 48, 72 e 96 h

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios		
		TA	TL	CE
Concentração do ozônio (CO)	2	0,64 ^{ns}	0,25E-04 ^{ns}	80,37 ^{ns}
Resíduo (a)	6	0,57	0,28E-03	56,54
Período de exposição (P)	4	15,46**	0,38E-04 ^{ns}	39,64 ^{ns}
CO x P	8	0,49 ^{ns}	0,98E-04 ^{ns}	10,33 ^{ns}
Resíduo (b)	24	0,23	0,94E-04	53,23
CV (%) Parcela		12,67	3,69	8,88
CV (%) Subparcela		8,10	2,13	8,62

^{ns} Não Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 5 - Resumo da análise de variância referente à saturação (C), à tonalidade (h) e à diferença de cor dos grãos de amendoim ozonizados nas concentrações de 0, 13 e 21 mg L⁻¹ e períodos de exposição de 0, 24, 48, 72 e 96 h

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios		
		C	h	ΔE
Concentração do ozônio (CO)	2	7,30 ^{ns}	58,16**	810,78**
Resíduo (a)	6	6,17	9,79	17,74
Período de exposição (P)	4	3,30 ^{ns}	34,41**	1.194,75**
CO x P	8	2,32 ^{ns}	7,83*	338,56**
Resíduo (b)	24	2,32	3,31	25,62
CV (%) Parcela		12,05	10,28	34,28
CV (%) Subparcela		7,39	5,98	41,18

^{ns} Não Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

** Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 6 - Resumo da análise variância referente ao percentual de ácidos graxos livres, AGL, ao índice de peróxido, IP, ao índice de iodo, II, do óleo bruto extraído dos grãos de amendoim ozonizados nas concentrações de 0, 13 e 21 mg L⁻¹ e períodos de exposição de 0, 24, 48, 72 e 96 h

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios		
		AGL	IP	II
Concentração do ozônio (CO)	2	0,57E-02 ^{ns}	0,14 ^{ns}	3,80 ^{ns}
Resíduo (a)	6	0,12E-01	2,32	8,56
Período de exposição (P)	4	0,32E-02 ^{ns}	1,59 ^{ns}	4,42 ^{ns}
CO x P	8	0,12E-01 ^{ns}	0,83 ^{ns}	3,08 ^{ns}
Resíduo (b)	24	0,16E-01	3,32	6,82
CV (%) Parcela		11,04	17,07	3,02
CV (%) Subparcela		12,83	20,39	2,70

^{ns} Não Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.