

JOEL GUIMARÃES DE BRITO JÚNIOR

**OZÔNIO COMO AGENTE FUNGICIDA E SEU EFEITO NA QUALIDADE
DOS GRÃOS DE MILHO**

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
2013

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

T

B862
2013

Brito Júnior, Joel Guimarães de, 1959-

Ozônio como agente fungicida e seu efeito na qualidade dos
grãos de milho / Joel Guimarães de Brito Júnior. – Viçosa,
MG, 2013.

x, 56 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Lêda Rita D'Antonino Faroni.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 42-53.

1. Milho - Armazenamento - Efeito do ozônio. 2. Fungicidas.
3. Ozônio. 4. Milho - Armazenamento - Doenças e danos.
5. *Aspergillus*. 6. *Penicillium*. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Engenharia Agrícola. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 633.1594

JOEL GUIMARÃES DE BRITO JÚNIOR

**OZÔNIO COMO AGENTE FUNGICIDA E SEU EFEITO NA QUALIDADE
DOS GRÃOS DE MILHO**

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 abril de 2013.

Rogério Amaro Gonçalves

Ernandes Rodrigues de Alencar

Paulo Roberto Cecon
(Coorientador)

Wellington C. Almeida do Nascimento
(Coorientadora)

Lêda Rita D'Antonino Faroni
(Orientadora)

A Deus, Inteligência Suprema, causa primária de todas as coisas,
Pela oportunidade de, neste momento e lugar, vivenciar mais uma etapa de
aprendizado no infinito Universo do Conhecimento,
À mãezinha querida, expressão encarnada do amor sem limites,
À esposa amorosa, Maria Angélica, parceira e cúmplice leal em mais essa
conquista empreendida sob inesgotáveis admoestações motivacionais,

DEDICO

Ao meu avô, Jayme Ferreira de Brito (*in memorian*), pelo exemplo de
caráter, pelo incentivo e orientação, norteando sempre minha formação
profissional.

À avó querida, Maria José dos Santos Leite (*in memorian*), expressão
singela de amor, doação e acolhimento maternal.

Aos irmãos queridos, Zulma, Ronney, Waldo, Soraya e Robson, pelo apoio
constante e amizade sincera.

Aos filhos queridos, Tatiana, Luciana, Daniel, Mariana e Ana Júlia,
motivadores valorosos na busca permanente do aprimoramento moral e
profissional.

À Tânia, ex-consorte, companheira e amiga dedicada de tantos anos, pelo
apoio incondicional, a quem devo grande parcela dessa valorosa conquista,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar-me possibilidades novas de aperfeiçoamento intelecto-moral.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), por conceder-me o ensejo de participar de seu privilegiado corpo discente.

Ao Departamento de Engenharia Agrícola dessa Universidade, pela oportunidade de usufruir de seus valiosos recursos para a conclusão de mais uma etapa de formação acadêmica.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus Bambuí, pela valiosa oportunidade de realização do Doutorado junto à UFV.

Ao corpo de professores e funcionários administrativos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus Bambuí, a quem agradeço na pessoa de seu diretor geral e prestimoso amigo, Professor Flávio Vasconcelos Godinho, pelo apoio e incentivos constantes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Programa Institucional de Qualificação Docente para a Rede Federal de Educação Profissional e Tecnológica (CAPES/PIQDTEC), pela concessão de bolsa de apoio financeiro.

Ao Professor Dr. Neimar de Freitas Duarte, pelo empenho e dedicação exemplar para a efetivação do Convênio firmado entre o IFMG e a Universidade Federal de Viçosa em prol da criação do Programa de Doutorado Interinstitucional – DINTER.

À Professora Dra. Lêda Rita D'Antonino Faroni, pela orientação nos trabalhos e apoio nas atividades de pesquisa.

À Co-orientadora Professora Dra. Wellington Cristina A. do Nascimento Benevenuto, pela orientação prestada no âmbito de sua especialidade.

Ao Co-orientador Professor Dr. Paulo Roberto Cecon e ao colega e amigo Professor Dr. Rogério Amaro Gonçalves, pela valiosa contribuição prestada no processamento das análises estatísticas.

Aos professores do Departamento de Engenharia Agrícola, pela dedicação incansável e pela constante demonstração de amizade e competência profissional, ao longo de todo o Curso.

A toda equipe de funcionários (administrativos, laboratoristas, assistentes de laboratório, auxiliares de limpeza e demais serviços) do Departamento de Engenharia Agrícola que, de maneira direta ou indireta, estiveram ligados à concretização deste projeto de pesquisa.

Aos amigos pós-graduandos, estagiários e servidores do Setor de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas da UFV, Romenique, Juliana, Tales, Rodrigo, Ricardo, Adriano, Patrícia, Gutierrez, André, Luz Paola, Juliane, Hanny, Mariane, Raquel, Tatiana, Marcela, Paula, Vanessa, Marcus Vinicius, Andressa, Uálisson, Luis, Daniel, Luane, Rita Cristina e José Geraldo, com os quais desfrutei a grata satisfação de conviver, usufruindo da amizade, confiança e prestação de auxílio, em prol da efetivação dos trabalhos experimentais.

Ao Departamento de Microbiologia, em especial à Profª Dra. Maria Cristina Dantas Vanetti e à laboratorista Adriana que, sempre com muita presteza, atenderam as solicitações demandadas em função de nossos trabalhos experimentais.

Ao colega doutorando e amigo Augusto Aloísio Benevenuto Júnior, pela amizade, apoio e companherismo vivenciados durante todo o período de atividades acadêmicas.

BIOGRAFIA

JOEL GUIMARÃES DE BRITO JÚNIOR, filho de Joel Guimarães de Brito e Maria Josefina Leite Brito, nasceu em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, no dia 08 de março de 1959.

Concluiu o curso de Licenciatura em Ciências Agrárias, em dezembro de 1983 pela Universidade Federal de Lavras, MG.

Atuou como professor do curso técnico em agropecuária, de 1984 a 1989, na Escola Nazareth, em Araçuaí, MG e de 1993 a 2002, na Escola Agrotécnica Federal de Salinas, MG. A partir de 2002, foi lotado no Centro Federal de Educação Tecnológica, hoje Instituto Federal de Ensino, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus Bambuí, onde exerce o cargo de professor do curso Técnico em Agropecuária, Agronomia e Licenciatura em Ciências Biológicas.

Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, na área de concentração Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras, em março de 2005, defendendo sua dissertação em maio de 2007.

Em março de 2009, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Engenharia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, área de concentração Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas, submetendo-se à defesa da tese em abril de 2013.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Fungos de armazenamento em grãos de milho.....	3
2.2 Ozônio como alternativa no controle de fungos de armazenamento .	5
2.3 Utilização do ozônio como agente desinfetante em diversos países. 7	
2.4 Toxicidade do ozônio.....	8
3 MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1 Obtenção e quantificação do gás ozônio.....	9
3.2 Processo de ozonização dos grãos de milho	11
3.3 Determinação da concentração residual de ozônio.....	12
3.4 Tempo de saturação do gás ozônio nos grãos de milho	12
3.5 Avaliação do efeito fungicida do gás ozônio	13
3.6 Avaliação qualitativa dos grãos de milho.....	14
3.6.1 Teor de água.....	14
3.6.2 Condutividade elétrica.....	15
3.6.4 Teor de proteínas.....	16
3.6.5 Índice de peróxido.....	16
3.7 Delineamento experimental e análises estatísticas	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Tempo de saturação e concentração residual de ozônio	18
4.2 Análises microbiológicas dos grãos de milho	20
4.2.1 Quantificação de fungos filamentosos e leveduras	20
4.3 Características fisiológica e físico-químicas dos grãos de milho	31
5 CONCLUSÕES	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
APÊNDICES	54

RESUMO

BRITO JÚNIOR, Joel Guimarães de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2013. **Ozônio como agente fungicida e seu efeito na qualidade dos grãos de milho.** Orientadora: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Coorientadores: Paulo Roberto Cecon e Wellington Cristina Almeida do Nascimento.

Os fungos são capazes de ocasionar sérios danos aos grãos durante o armazenamento, podendo comprometer as características organolépticas e nutritivas, bem como o aproveitamento industrial dos grãos e seus subprodutos. Além disso, podem produzir micotoxinas que são metabólitos secundários potencialmente danosos à saúde humana e animal. Desta forma, é fundamental o controle de fungos nas unidades armazenadoras. Dentre as tecnologias apontadas como promissoras no controle de microrganismos, destaca-se a ozonização. O ozônio é um poderoso agente oxidante que promove estresses oxidativos em células vivas e vem sendo indicado como alternativa no controle de microrganismos. No entanto, pouco se conhece a respeito do potencial desse gás como agente redutor de populações microbianas em milho armazenado. Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho determinar a concentração e o tempo de saturação do ozônio em massa de grãos de milho, definir o tempo de ozonização eficaz para a desinfecção microbiológica dos grãos, bem como avaliar o efeito da ozonização nas características físico-químicas do produto. Utilizou-se nos ensaios grãos de milho (*Zea mays* L.), com teor de água de 14,4% b.u., contendo 94 e 97% de infecção natural por *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp, respectivamente. Durante a ozonização, amostras de 2,0 kg de grãos foram acondicionadas em recipientes cilíndricos de PVC (19,3 x 23,0 cm). Para determinação da concentração e do tempo de saturação dos grãos de milho pelo ozônio, aplicou-se o gás na concentração de 2,14 mg L⁻¹ e fluxo de 5,8 L min⁻¹. Considerou-se como tempo de saturação o momento a partir do qual os valores de concentração residual do ozônio se mantiveram praticamente constantes. A concentração residual obtida neste ponto foi considerada como a concentração de saturação. Foram estabelecidos cinco períodos de exposição ao ozônio, com a finalidade de

avaliar o efeito do gás na desinfecção microbiológica e na qualidade dos grãos de milho. Os períodos de exposição adotados foram 0, 10, 20, 30 e 50 h. No controle, grãos de milho foram submetidos ao tratamento com ar atmosférico, em condições semelhantes ao tratamento com gás ozônio. A quantificação de fungos filamentosos e leveduras em meio de cultura e a ocorrência dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* nos grãos foram avaliadas com a adoção de dois diferentes métodos. O primeiro método foi o da contagem em placas para fungos filamentosos e leveduras e, o segundo, o plaqueamento direto sobre papel de filtro (*Blotter test*). Ao final de cada período de exposição, os grãos de milho foram avaliados quanto ao teor de água, à condutividade elétrica, ao teor de lipídeos, ao teor de proteínas e ao índice de peróxido. Observou-se que a concentração e o tempo de saturação do gás ozônio nos grãos de milho foi de 0,9874 mg L⁻¹ e 138,56 min, respectivamente. Ocorreu redução em 2,0 ciclos log na contagem de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de milho ozonizadas. O ozônio reduziu em 78,5 e 98,0% o índice de ocorrência de *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp. Com relação às características qualitativas, verificou-se que o ozônio reduziu o teor de água e elevou o índice de peróxido dos grãos de milho. No entanto, a ozonização não alterou a condutividade elétrica, o teor de lipídios e o teor de proteínas. Os resultados demonstrados neste estudo confirmam o potencial efeito fungicida do gás ozônio em grãos de milho, nas condições adotadas.

ABSTRACT

BRITO JÚNIOR, Joel Guimarães de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2013. **Ozone as an antifungal agent and its effect on the quantity of maize grains.** Advisor: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Co-advisors: Paulo Roberto Cecon and Wellingta Cristina Almeida do Nascimento.

Fungi are capable of causing serious damage to the grains during storage; they can compromise the organoleptic and nutritional characteristics, as well as the industrial use of grains and their by-products. In addition, fungi may produce mycotoxins, which are secondary metabolites potentially harmful to the human and animal health. Thus, it is essential to control the fungi in storage facilities. Among the technologies considered to be promising in the control of microorganisms, ozonation stands out. Ozone is a powerful oxidizing agent that promotes oxidative stress in live cells and has been indicated as an alternative in microorganism control. However, little is known about the potential of this gas as a reducer of microbial populations in stored maize. Given the above, the objectives of this study were to determine the concentration and time of saturation of ozone in the mass of maize grains; to define the effective ozonation time for the microbiological disinfection of the grains; and to evaluate the effect of ozonation on the physicochemical characteristics of the product. In the trials we used maize grain (*Zea mays* L.) with a moisture content of 14.4% wb., containing 94 and 97% of natural infection by *Penicillium* spp and *Aspergillus* spp, respectively. During ozonation, samples of 2.0 kg of grains were conditioned in cylindrical PVC containers (19.3 × 23.0 cm). To determine the concentration and time of saturation of the maize grains by ozone, we applied the gas at a concentration of 2.14 mg L⁻¹ and flow of 5.8 L min⁻¹. The time of saturation was considered to be the moment from which the values of residual concentration of ozone remained practically constant. The residual concentration obtained at this point was considered the concentration of saturation. Five periods of exposure to ozone were established for evaluation of the effect of the gas on the microbiological disinfection and on the quality of maize grains. The periods of exposure adopted were 0, 10, 20, 30 and 50 h. In control, the grain corns were subjected to the treatments with

atmospheric air, in similar conditions to the treatment with ozone gas. The quantification of filamentous fungi and yeasts in a culture medium and the occurrence of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* in the grains were evaluated by adopting two different methods: counting on plates for filamentous fungi and yeasts and direct plating on filter paper (Blotter test). At the end of each period of exposure, the maize grains were assessed as to the moisture content, the electric conductivity, the lipid content, the protein content and the peroxide value. The concentration and the time of saturation of ozone gas in the maize grains were 0.9874 mg L⁻¹ and 138.56 min, respectively. There was reduction of 2.0 log cycles in the count of filamentous fungi and yeast in the ozonated samples. The ozone reduced the rate of occurrence of *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp by 78.5 and 98.0%. Regarding the qualitative traits, ozone reduced the moisture content and elevated the peroxide value of maize grains. However, ozonation did not affect the electric conductivity, the lipid content or the protein content. The results obtained in this study confirm the potential fungicidal effect of ozone gas on maize grain under the conditions adopted.

1 INTRODUÇÃO

A produção brasileira de milho, na safra 2012/2013, é estimada em mais de 76 milhões de toneladas, para uma área de plantio em torno de 15,4 milhões de hectares. Essa produção de grãos de milho representa um crescimento percentual, da ordem de 4,2% em relação à safra anterior (CONAB, 2013).

A importância econômica deste cereal é explicada em função de sua utilização diversificada, que se estende desde a alimentação animal na forma de ração, até a indústria de alta tecnologia. A alimentação animal constitui a mais importante via de consumo de milho, sendo esta responsável por cerca de 70% de toda sua utilização no mundo. Enquanto nos Estados Unidos essa participação ocorre por volta de 50%, no Brasil a mesma acontece entre 60 e 80% (DUARTE, 2006).

O armazenamento de grãos no Brasil, mesmo com o expressivo aumento da produção graneleira nacional e a elevação da capacidade estática observada nos últimos anos, tem contado com um sistema armazenador deficiente, tanto no âmbito da distribuição espacial quanto no aspecto do manejo da referida produção (SILVA *et al.*, 2008). A interação de fatores abióticos com organismos vivos, dentre estes, microrganismos como fungos e bactérias, concorre para a efetiva promoção de danos aos grãos armazenados, dependendo, naturalmente, das condições de armazenagem, ambientais e da espécie ou variedade vegetal. A presença destes microrganismos, além da possibilidade de produção de micotoxinas por alguns gêneros fúngicos, contribui para o comprometimento das características organolépticas, valor nutritivo e posterior aproveitamento industrial dos grãos e seus subprodutos (FARONI & SILVA, 2008).

Diversos estudos incluem espécies fúngicas pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, como agentes micotoxigênicos de considerada importância em produtos alimentícios, especialmente em grãos de cereais e oleaginosos (RESTAINO *et al.*, 1995; MCKENZIE *et al.*, 1998; KELLS *et al.*, 2001; MURPHY *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2008; KORZUN *et al.*, 2008; MCDONOUGH *et al.*, 2011; SILVA, 2011, ALENCAR *et al.*, 2012). Esses dois gêneros, juntamente o *Fusarium*, têm sido citados por diferentes

pesquisadores como aqueles em que se encontram as espécies de maior predominância em grãos de milho armazenado (LAZZARI, 1997; SCUSSEL, 1998; KAWASHIMA & SOARES, 2006), com significativo potencial micotoxigênico.

A busca constante por redução de perdas, tanto no aspecto quantitativo, quanto qualitativo, tem se tornado preocupação cada vez mais expressiva, e tem motivado esforços direcionados à implementação de condições seguras e eficazes de armazenamento de grãos. Várias questões, como a legislação alimentar em vigor, a crescente resistência de pragas em relação aos fumigantes convencionais, bem como o aumento da demanda por produtos alternativos de uso ecologicamente correto, têm incentivado órgãos de pesquisa e até mesmo a iniciativa privada a buscarem inovações tecnológicas que satisfaçam a necessidade presente (TIWARI *et al.*, 2010).

Dentre as diversas alternativas em estudo, com o propósito de se reduzir os danos causados aos grãos armazenados pela presença de microrganismos fúngicos, especialmente os dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, destaca-se o uso do gás ozônio (RESTAINO, 1995; RAILA, 2006). Por ser altamente reativo, atua como agente desinfetante de elevado valor potencial, promovendo estresses oxidativos em células vivas, sendo indicado como alternativa na utilização de oxidantes químicos (LI *et al.*, 2012).

Trabalhos realizados com trigo, envolvendo aplicação de gás ozônio em mistura com ar atmosférico ou com oxigênio puro (WU *et al.*, 2006), em fumigação ou aplicado à água, em processo de lavagem dos grãos (IBANOGLU, 2002), puderam demonstrar eficiência na desinfestação fúngica e bacteriana deste cereal, sem promover alterações significativas em sua composição bioquímica, no rendimento da farinha procedente dos grãos ozonizados, assim como de sua qualidade nutricional (IBANOGLU, 2001, 2002; MENDEZ *et al.*, 2003). Estudos desenvolvidos por ZOTTI *et al.*, (2008), comprovaram o efeito fungistático do ozônio na inativação de duas espécies de *Aspergillus*, tendo constatado a redução expressiva no crescimento de *A. flavus* e a total paralisação do crescimento de *A. niger*.

Embora vários estudos tenham sido realizados utilizando o gás ozônio como agente sanificante e microbiocida, poucas informações foram

disponibilizadas em relação ao seu potencial redutor de populações microbianas em milho armazenado. Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho determinar a concentração e o tempo de saturação do gás ozônio na massa de grãos de milho, definir o tempo de ozonização eficaz para a desinfecção microbiológica dos grãos, bem como avaliar o efeito do processo de ozonização nas características físico-químicas do produto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fungos de armazenamento em grãos de milho

O milho (*Zea mays* L.) é considerado um dos cereais mais suscetíveis ao desenvolvimento de fungos micotoxigênicos (ZUMMO & SCOTT, 1992). O processo infeccioso e a consequente deterioração dos grãos pode iniciar-se no campo, potencializando-se ao longo das diversas operações às quais são submetidos, desde a colheita até seu armazenamento, afetando a qualidade sanitária, físico-química e nutricional destes grãos (LAZZARI, 1997; SCUSSEL, 1998).

A ocorrência de um surto na Inglaterra, conhecido como “*turkey-X disease*”, transcorrido no ano de 1960, constituiu episódio histórico marcante que chamou a atenção de diversos pesquisadores. O fato resultou na morte de cerca de 100.000 perus que foram alimentados com ração específica, que tinha como ingrediente constituinte, torta de amendoim proveniente do Brasil. Resultados de análises laboratoriais confirmaram a presença de quatro substâncias micotoxigênicas, atribuídas à espécie fúngica *Aspergillus flavus*, presente no ingrediente brasileiro, denominadas Aflatoxina B1 (AFB1), Aflatoxina B2 (AFB2), Aflatoxina G1 (AFG1) e Aflatoxina G2 (AFG2) (JEWERS, 1990). Tanto a espécie citada, quanto *A. parasiticus*, potenciais organismos produtores de micotoxinas, possuem estruturas de propagação que podem estar presentes tanto no solo quanto no ar atmosférico,

favorecendo-lhes a possibilidade de colonizarem os grãos quando ainda no campo, especialmente em regiões de clima tropical (PAYNE, 1998).

Ressalta-se que a ocorrência de micotoxinas em milho armazenado, como resultado da incidência natural de fungos toxicogênicos, tem se manifestado como um problema em diversos países no mundo (ABBAS *et al.*, 2006; BINDER *et al.*, 2007; CASTELLS, *et al.*, 2008). No Brasil, alguns estudos têm demonstrado situação similar de contaminação deste cereal (ONO, *et al.*, 2001; MACHINSKI *et al.*, 2001; KAWASHIMA & SOARES, 2006), especialmente, quando em condições de armazenamento inadequadas. As micotoxinas mais comumente encontradas em grãos de cereais são produzidas especialmente pelas espécies fúngicas pertencentes aos gêneros *Fusarium* (fumonisina e zearalenona), *Aspergillus* (aflatoxinas e ocratoxina) e *Penicillium* (ocratoxina) (ALI *et al.*, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2000; MACHINSKI *et al.*, 2001; SCUDAMORE & PATEL, 2000). *Aspergillus* e *Penicillium* constituem, portanto os gêneros fúngicos de maior predominância em grãos de milho, sendo superado apenas por espécies do complexo *Fusarium* (CASTRO *et al.*, 1995; ALMEIDA *et al.*, 2000; CICCARESE *et al.*, 2007).

Diversos métodos físicos, químicos e biológicos têm sido avaliados, na tentativa de se minimizar as consequências da presença fúngica nos ingredientes de rações (PLACINTA *et al.*, 1999; BACON *et al.*, 2001; PRUDENTE JÚNIOR & KING, 2002; RAILA *et al.*, 2006; BINDER *et al.*, 2007; SAMAPUNDO *et al.*, 2007; MENNITI *et al.*, 2010; TAYEL, 2010a; WHITE *et al.*, 2010). No entanto, alguns fatores têm influenciado consideravelmente na efetivação e no desempenho dos diversos procedimentos metodológicos, tais como temperatura ambiente, teor de água presente no grão, reações químicas com formação de compostos indesejáveis, dentre outros.

2.2 Ozônio como alternativa no controle de fungos de armazenamento

O ozônio é considerado uma forma alotrópica do oxigênio. Na forma gasosa, apresenta coloração de tonalidade levemente azulada, possuindo odor pungente bastante característico (KIM *et al.*, 1999). Segundo os mesmos autores, o potencial de oxidação do ozônio (-2,07 V) supera o do cloro (-1,36 V) e até mesmo o do ácido hipocloroso (-1,49 V). Seu elevado potencial oxidante lhe confere alto poder de desinfecção e esterilização (GONÇALVES, 2009).

A tecnologia de utilização do ozônio, como agente sanitizante, apresenta diversas vantagens em relação aos demais procedimentos alternativos, a começar pela possibilidade de ser gerado no próprio local de atuação, além de ser considerado um dos mais efetivos agentes oxidantes. Sua decomposição ocorre rapidamente em oxigênio, deixando o ambiente livre de qualquer resíduo tóxico, em poucos minutos. Com relação ao seu efeito desinfetante, possui ação mais rápida e mais eficaz que outros produtos com a mesma função (RICE *et al.*, 1982; XU, 1999; IBANOGLU, 2002; YOUNG & SETLOW, 2004)

A atuação biológica do ozônio se dá em duas modalidades, agindo diretamente sobre as moléculas alvo ou de forma indireta, via radicais livres resultantes de processos de peroxidação de ácidos graxos polinsaturados e de oxidações de grupos sulfidrilas e aminoácidos de enzimas, proteínas e peptídeos (VICTORIN, 1992).

A progressiva oxidação de componentes vitais da célula alvo é citada por VICTORIN, (1992), como processo desencadeador da destruição de microrganismos. O mesmo autor descreve o processo microbiocida, pela atuação de dois mecanismos. O primeiro, representado pela oxidação dos grupos sulfidrilas e aminoácidos de enzimas, peptídeos e proteínas em peptídeos mais curtos. O segundo mecanismo, segundo o autor, se dá quando o ozônio oxida ácidos graxos polinsaturados, resultando na formação de peróxidos ácidos. Dessa forma, a conseqüente destruição de lipídios insaturados presentes no invólucro celular resulta na ruptura e escoamento do conteúdo citoplasmático, provocando a lise celular.

Considerando, portanto que o mecanismo de ação do ozônio promove efeitos de oxidação e destruição da membrana citoplasmática e parede celular, entende-se que, a diferença entre a maior e a menor tolerância ao ozônio ocorre, provavelmente em função da estrutura da parede e da membrana celular (NAITO & TAKAHARA, 2006). Em decorrência, portanto, desse mecanismo de atuação tem-se que, para cada microrganismo existe uma sensibilidade ao ozônio que lhe é inerente. Dessa forma, bactérias apresentam maior vulnerabilidade que leveduras e fungos filamentosos, sendo que, bactérias gram-negativas são menos sensíveis que as gram-positivas e os esporos fúngicos são mais tolerantes que células vegetativas (PASCUAL *et al.*, 2007). Segundo os mesmos autores, em função da natureza do mecanismo de ação do ozônio na destruição das células dos microrganismos, o desenvolvimento de resistência por parte destes ao agente oxidante não ocorre. Seu amplo espectro de ação lhe permite atuar sobre bactérias, fungos, partículas virais, protozoários e esporos fúngicos e bacterianos (RESTAINO *et al.*, 1995; KHADRE *et al.*, 2001; CULLEN *et al.*, 2009). Além de atuar na inativação de uma diversidade de microrganismos, o ozônio apresenta também, elevado potencial no controle de pragas de armazenamento, bem como na degradação de micotoxinas, especialmente em grãos armazenados (TIWARI & MUTHUKUMARAPPAN, 2012).

O interesse na utilização do gás ozônio como importante agente fungicida no controle dos principais fungos de armazenamento tem sido demonstrado por diversos pesquisadores, bem como o efeito das condições de ozonização na eficiência do gás, em relação aos grãos armazenados (LULLIEN-PELLERIN, 2012).

A eficácia do efeito fungicida do gás ozônio sobre a contaminação de grãos de milho com *Aspergillus parasiticus* foi constatada por KELLS *et al.* (2001), quando obteve redução de 63% na viabilidade das unidades de propagação daquele fungo. Os autores trataram 8,9 toneladas de milho com 0,107 mg L⁻¹ (50 ppm) de ozônio, por 3 dias consecutivos. Em cevada, ALLEN *et al.* (2003), comprovaram a inativação de 96% dos esporos fúngicos, utilizando também ozônio gasoso, testando as concentrações de 0,2434 mg L⁻¹ (160 ppm) e 0,214 mg L⁻¹ (100 ppm). Além disso, os mesmos autores tiveram a oportunidade de observar que o efeito fungicida do gás

ozônio se elevava com o aumento da temperatura e da atividade de água nos grãos de cevada. Em trabalhos experimentais desenvolvidos por WU *et al.* (2006), envolvendo grãos de trigo ozonizados, foi constatado que a dose de 0,7062 mg L⁻¹ (330 ppm) de ozônio gasoso foi suficiente para inativar 96,9% dos esporos fúngicos presentes naqueles grãos. Ozonizando grãos de amendoim, ALENCAR *et al.* (2012) constataram redução de aproximadamente 3 ciclos log na contagem de unidades formadoras de colônia de fungos totais presentes nos grãos, após submeterem os grãos ao gás ozônio, na concentração de 21 mg L⁻¹, por 96 h. Os autores puderam observar também uma redução, por volta de 60 e 80%, no índice de ocorrência de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* nos grãos, respectivamente.

2.3 Utilização do ozônio como agente desinfetante em diversos países

Segundo GONÇALVES (2009), o uso do ozônio na indústria alimentícia já conquistou o amparo legal em alguns países, permitindo sua aplicação segura nos diversos setores desse segmento industrial. De acordo com o mesmo autor, a aprovação do uso do ozônio como agente antimicrobiano nos Estados Unidos da América se deu pela Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (Food and Drug Administration - FDA), em junho de 2001. Em dezembro do mesmo ano, o Ministério da Agricultura daquele país legitimou sua aplicação como agente antimicrobiano em contato direto com carnes e, mais especificamente com aves, peixes, moluscos e crustáceos. O governo japonês, por sua vez, aprovou, no ano de 1996, a utilização do ozônio com o mesmo propósito, para contato direto com os mais diversos tipos de alimentos. Também em 1996, o governo da Austrália legalizou o uso do ozônio para contato com todo e qualquer alimento. Assim procedeu, de igual forma o governo canadense (Canadian Food Inspection Agency – CFIA), para limpeza de superfícies de contato de alimentos, o governo alemão, com a utilização água ozonizada para limpeza de barcos de pesca e produção de gelo e o governo norueguês na preservação de produtos de origem pesqueira.

2.4 Toxicidade do ozônio

A concentração e o período de exposição constituem fatores determinantes da maior ou menor toxicidade do gás ozônio (PASCUAL *et al.*, 2007). Em períodos de exposição mais reduzidos, concentrações de 0,000214 a 0,214 mg L⁻¹ (0,1 a 100 ppm) podem produzir sintomas diversos, desde dores de cabeça, sangramentos nasais, irritações oculares até secura na garganta e irritação respiratória. Em níveis de concentração superiores a 0,214 mg L⁻¹ (1 ppm), os sintomas tendem à maior severidade, envolvendo riscos diversos como bronquite asmática, cansaço, perda de apetite e câncer de pulmão (VICTORIN, 1992; PASCUAL *et al.*, 2007).

Os níveis aceitáveis de concentração do gás ozônio, bem como o período máximo de exposição em ambientes de trabalho com o gás são regulamentados em alguns países, dentre os quais os Estados Unidos, onde o nível máximo autorizado é de 0,000214 mg L⁻¹ (0,1 ppm) por período de até 8 h por dia (CFR, 1997). Na Europa, segundo WHO (2000), citado por ALENCAR (2009), o valor máximo regulamentado por lei, tolerado por um indivíduo, em 8 h de contínua exposição é de 0,000128 mg L⁻¹ (0,06 ppm). Já no Brasil, o limite máximo de exposição ao gás foi regulamentado em 0,000171 mg L⁻¹, ou seja, 0,08 ppm, em jornada semanal de trabalho de até 48 h, conforme Norma Regulamentadora N° 15, Portaria N° 3.214/78 (BRASIL, 1978).

A exposição ao gás ozônio, portanto deve ser monitorada e o ambiente de trabalho com o referido gás deve atender às mínimas exigências de segurança necessárias (KHADRE *et al.*, 2001). Sistemas de detecção e de destruição do ozônio, aliados à disponibilidade de respiradores no ambiente da indústria alimentícia que utiliza o gás em procedimentos sanitizantes tornam-se, portanto, imprescindíveis para a segurança de trabalhadores do setor de produção (KIM *et al.*, 1999).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Setor de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Microbiologia (DMB), ambos na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG.

Para realização dos ensaios experimentais, foram utilizados grãos de milho (*Zea mays* L.) obtidos na unidade armazenadora (silo) da fábrica de ração da UFV, cujo teor de água foi quantificado em 14,4% e a qualidade classificada como “abaixo do padrão”.

3.1 Obtenção e quantificação do gás ozônio

O gás ozônio (O_3) foi obtido por intermédio do gerador de ozônio O&LM, desenvolvido pela empresa Ozone & Life[®], São Paulo (Figura 1). No processo de geração do gás é utilizado oxigênio como insumo primário, livre de umidade, obtido pelo concentrador do próprio gerador de ozônio. Este oxigênio, no gerador, passa por um reator refrigerado, onde recebe uma descarga por barreira dielétrica (DBD). A referida descarga ocorre como resultado da aplicação de uma elevada voltagem entre dois eletrodos paralelos, tendo, posicionado entre os mesmos, um dielétrico (vidro) e um espaço livre, por meio do qual ocorre o fluxo do ar seco. Uma descarga, em forma de filamentos é produzida no espaço livre, onde são gerados elétrons, cuja energia liberada se torna suficiente à produção e quebra das moléculas de oxigênio, dando origem, portanto ao ozônio.



Figura 1 – Gerador de ozônio O&LM (Ozone & Life®)

O gerador de ozônio O&LM apresenta duas saídas, sendo uma delas responsável pelo fluxo do ozônio gerado e, a outra, pelo ar atmosférico pré-armazenado em um compressor acoplado ao equipamento. Durante o processo experimental, tanto o gás ozônio quanto o ar atmosférico foram direcionados, em distribuição uniforme, aos cilindros contendo os grãos de milho (Figura 2).



Figura 2 – Recipientes cilíndricos utilizados no sistema de ozonização.

3.2 Processo de ozonização dos grãos de milho

Os grãos foram acondicionados em seis recipientes cilíndricos de cloreto de polivinil (PVC), com 19,3 cm de diâmetro e 23,0 cm de altura, contendo, cada um deles, 2,0 kg de grãos. Posicionada a 0,10 m do fundo de cada recipiente, uma tela metálica foi fixada para sustentação dos grãos e formação de uma câmara para melhor distribuição do ozônio, no interior dos cilindros. Nas tampas inferior e superior dos mesmos foram instaladas conexões para injeção e exaustão do gás. Três cilindros foram utilizados para o tratamento com o gás ozônio e três para o ar atmosférico (Figura 3).



Figura 3 – Recipientes cilíndricos utilizados para acondicionamento dos grãos de milho submetidos ao ozônio e ao ar atmosférico: A) Entrada de ozônio; B) Saída de ozônio; C) Entrada de ar atmosférico; D) Saída de ar atmosférico.

A injeção de gás ozônio foi efetuada na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, em fluxo contínuo de $5,8 \text{ L min}^{-1}$ e à temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Com o objetivo de se determinar a concentração no meio poroso, procedeu-se à determinação do tempo de saturação da massa de grãos pelo gás ozônio. Foram estabelecidos cinco períodos de exposição ao ozônio (0, 10, 20, 30 e 50 h), com a finalidade de avaliar o efeito do gás na desinfecção microbiológica e na qualidade dos grãos de milho.

Com o intuito de se estabelecer comparação dos resultados, grãos de milho foram submetidos ao tratamento com ar atmosférico (controle), em condições semelhantes ao tratamento com gás ozônio.

3.3 Determinação da concentração residual de ozônio

Utilizou-se o método iodométrico para a determinação da concentração do gás ozônio, adotando a titulação direta, conforme recomendação da *International Ozone Association* (IOA). Este método, descrito por CLESCERL *et al.* (2000), consiste no borbulhamento do gás ozônio em uma solução de 50 mL de iodeto de potássio (KI) 1 N. A reação química ocorrente nesse procedimento resulta na oxidação do KI pelo ozônio (Equação 1), promovendo a liberação de iodo (I_2).



Com a finalidade de assegurar a produção de I_2 , fez-se necessário acidificar o meio, adicionando-se à solução de KI, 2,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4), 1 N. Posteriormente, titulou-se com tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$), 0,01 N, até que a coloração amarelada do iodo se tornasse pouco perceptível. Na sequência, adicionou-se 1 mL de solução indicadora, de amido, 1%, retomando a titulação, até que a coloração azul da solução desaparecesse. Em função da instabilidade do ozônio, se faz necessário proceder à quantificação de sua concentração no meio, imediatamente após o borbulhamento.

3.4 Tempo de saturação do gás ozônio nos grãos de milho

Com a finalidade de determinar o tempo de saturação da massa de grãos com o gás ozônio, utilizou-se de três amostras de 2 kg de milho, com teor de água médio de 14,4% b.u.

O tempo de saturação dos grãos de milho pelo O_3 foi definido, determinando-se a concentração residual do gás em intervalos de tempo regulares, utilizando o método iodométrico, até que a concentração do ozônio se mantivesse constante.

3.5 Avaliação do efeito fungicida do gás ozônio

Para avaliação do efeito fungicida do gás ozônio utilizou-se grãos de milho com teor de água médio de 14,4% b.u., naturalmente contaminados com *Aspergillus* spp (97%) e *Penicillium* spp (94%).

A quantificação de fungos filamentosos e leveduras em meio de cultura e a ocorrência dos gêneros fúngicos *Aspergillus* e *Penicillium*, nos grãos foi avaliada com a adoção de metodologias específicas a cada situação. Na quantificação de fungos filamentosos e leveduras utilizou-se o método de contagem em placas e na detecção dos gêneros fúngicos *Aspergillus* e *Penicillium*, o plaqueamento direto sobre papel de filtro (*Blotter test*).

Para a quantificação de fungos filamentosos e leveduras nos grãos de milho, utilizou-se a técnica de contagem em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) acidificado. Em conformidade com procedimentos descritos por DOWNES & ITO (2001), amostras de $25 \pm 0,2$ g de grãos de milho foram devidamente homogeneizadas em sacos plásticos esterilizados, contendo 225 mL de solução salina peptonada 0,1%, em movimentos intermitentes, por 60 s. Diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) foram preparadas em solução salina esterilizada para as referidas análises. O resultado foi expresso em Unidades Formadoras de Colônia por grama de amostra (UFC g⁻¹).

Na detecção dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram utilizados 400 grãos por amostra, composta por 8 subamostras de 50 grãos, acondicionados em placas de Petri, contendo três discos de papel de filtro esterilizados e umedecidos em água destilada e esterilizada (BRASIL, 2009). Estas foram colocadas em câmara de incubação, tipo BOD, por 24 h, com temperatura regulada em 20 ± 2 °C e sob regime de 12 h de luz e 12 h de escuro, de maneira intermitente. Em seguida, as placas contendo os grãos foram acondicionadas em congelador (-20 °C), por 24 h. Ao término do período de congelamento, as placas foram levadas novamente à câmara de incubação, nas mesmas condições anteriores, por mais 5 dias (Figura 4). Após o período complementar de incubação, as amostras foram examinadas

sob estereomicroscópio para a identificação e quantificação das estruturas fúngicas relacionadas aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.



Figura 4 – Câmara de incubação, com fotoperíodo, tipo B.O.D., para desenvolvimento de estruturas fúngicas presentes nos grãos de milho.

3.6 Avaliação qualitativa dos grãos de milho

Com o intuito de se avaliar a qualidade dos grãos de milho, depois de submetidos aos tratamentos com gás ozônio e com ar atmosférico, realizou-se análise fisiológica e físico-química, determinando-se teor de água, condutividade elétrica, teor de lipídios, teor de proteína e índice de peróxidos.

3.6.1 Teor de água

O teor de água dos grãos foi determinado utilizando-se o método de estufa, segundo as normas da ASAE (2000), as quais prescrevem a utilização de estufa com circulação de ar forçado a 103 ± 3 °C, durante 72 h. Foram utilizadas três repetições de 30 g de grãos para cada período de exposição. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.6.2 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica da solução contendo grãos de milho foi medida utilizando-se o Sistema de Copo ou Condutividade de Massa (VIEIRA, 1994). Os testes foram realizados com três repetições de 50 grãos para cada período de exposição. Os grãos foram pesados em balança com precisão de 0,01 g e colocados em copos de plásticos com capacidade para 200 mL, aos quais foram adicionados 75 mL de água deionizada. Em seguida, os copos foram postos em câmara climática do tipo BOD à temperatura de 25 °C, durante 24 h. Depois desse período os copos foram retirados da câmara, para que fossem feitas as medições da condutividade elétrica da solução contendo os grãos. As leituras foram feitas com um medidor de condutividade elétrica da marca Tecnocon, modelo CA-150, com ajuste para compensação de temperatura e eletrodo, com a constante da célula de 1 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Antes de realizar as leituras, o aparelho foi calibrado com uma solução-padrão de cloreto de sódio com condutividade elétrica conhecida à temperatura de 25 °C. O valor da condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) fornecido pelo aparelho foi dividido pela quantidade de matéria seca dos grãos, obtendo-se então o valor expresso em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de matéria seca.

3.6.3 Teor de lipídios

A determinação do teor de lipídios presente na amostra de milho foi realizada após moagem dos grãos em moinho de facas, marca FRITSCH, modelo Pulverisette 14, utilizando o método AC 3-49 da AOCS (1993). A extração do óleo ocorreu por meio de aparelho extrator tipo Soxhlet, adotando, como solvente, éter de petróleo.

O processo de extração teve duração de seis horas, ao final do qual, promoveu-se a remoção do solvente residual presente na fração lipídica. Para tal, utilizou-se de uma estufa com recirculação de ar, à temperatura de 105 ± 3 °C, por período de 60 min. A obtenção da massa de lipídios se deu

pela diferença entre a massa do balão volumétrico contendo o óleo extraído e sua respectiva tara. O teor de lipídios foi expresso em valor percentual e foi calculado em função da massa da amostra e da fração lipídica extraída.

3.6.4 Teor de proteínas

O teor de proteínas foi obtido pela determinação do nitrogênio total, empregando-se a técnica Kjeldahl, conforme método nº 46-13 da AACC (1999), utilizando o fator 5,7 para a conversão em proteína bruta. A análise foi realizada em triplicatas, utilizando-se destilador para extração de nitrogênio, marca Marconi, modelo MA – 036.

3.6.5 Índice de peróxido

Determinou-se o índice de peróxido de acordo com as normas AOCS (1993), utilizando-se o método cd 8-53. Os peróxidos foram medidos por meio da técnica baseada em sua capacidade de liberar o iodeto de potássio e seu teor expresso em miliequivalentes (meq) de peróxido por quilograma de óleo.

Caracterização dos grãos de milho antes da ozonização

A caracterização dos grãos de milho, antes de serem submetidos ao tratamento com o gás ozônio está representada na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização dos grãos de milho, antes da exposição ao gás ozônio.

Análise	Valor
Teor de água (% b.u.)*	14,4
Condutividade elétrica ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	41,11
Teor de lipídios (% b.s.)**	3,4
Índice de peróxido do óleo bruto (meq kg^{-1})	5,84
Contagem de fungos filamentosos e leveduras ($\log \text{UFC g}^{-1}$)	3,767
Teor de proteína (% b.s.)	7,48
Ocorrência de <i>Aspergillus</i> spp (%)	97,00
Ocorrência de <i>Penicillium</i> spp (%)	94,00

* b.u. – base úmida; ** b.s. – base seca

O aspecto visual da massa de grãos de milho utilizada no experimento com gás ozônio pode ser observada na Figura 5.



Figura 5 – Aspecto visual dos grãos de milho naturalmente contaminados por *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp, utilizados no experimento com ozônio.

3.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi instalado segundo um esquema de parcela subdividida, tendo nas parcelas dois tratamentos (ar atmosférico e gás ozônio) e nas subparcelas os tempos de exposição (0, 10, 20, 30 e 50 h), no Delineamento Inteiramente Casualizado (D.I.C.), com três repetições, exceto para índice de ocorrência de *Aspergillus* e *Penicillium*, em que se utilizou quatro repetições. De posse dos resultados, realizou-se análise de variância e de regressão. Para o fator qualitativo as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade. Para o fator quantitativo os modelos foram adotados com base na significância dos coeficientes de regressão, com aplicação do teste “t” e utilizando-se o nível de até 5% de probabilidade, no coeficiente de determinação e no fenômeno biológico. Independentemente da interação ser ou não significativa, optou-se pelo desdobramento da mesma, devido ao interesse em estudo. O software SAEG 9.1 (SAEG, 2007) foi utilizado para realização das análises estatísticas e o SigmaPlot, versão 11.0 (SPSS, 2008), para a representação gráfica dos dados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tempo de saturação e concentração residual de ozônio

O comportamento da concentração residual do gás ozônio em função do tempo de exposição da massa de grãos de milho, ao longo do processo de saturação, sob concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, é apresentado na Figura 6. A equação que descreve o referido comportamento, com respectivo coeficiente de determinação, encontra-se na Tabela 2.

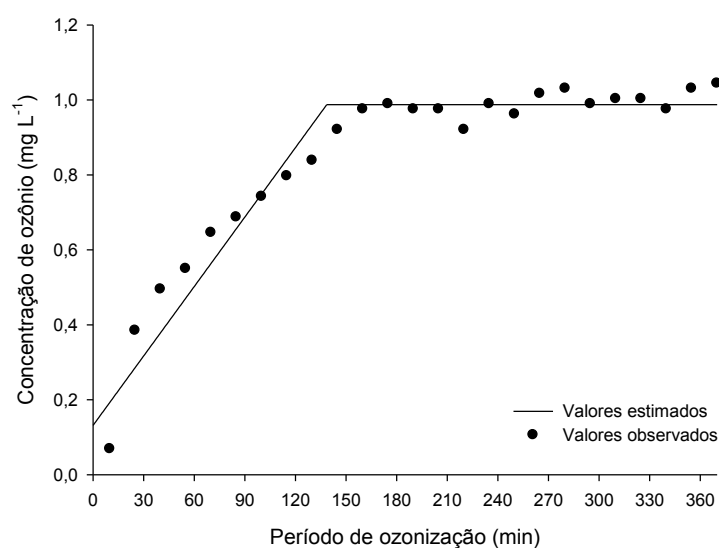


Figura 6 – Concentração residual do gás ozônio (mg L^{-1}) em função do período de ozonização (min) durante o processo de saturação dos grãos de milho, na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$.

Tabela 2 – Equação de regressão ajustada da concentração residual de ozônio em função do período de ozonização, e respectivo coeficiente de determinação (r^2).

Equação ajustada	Intervalo	r^2
$\hat{y} = 0,13151 + 0,00617708^{**} X$	$0,00 \leq X \leq 138,56$	0,89
$\hat{y} = 0,9874$	$138,56 < X \leq 370,00$	

******Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F; X = período de ozonização (h); $\hat{y}$ = concentração residual de ozônio (mg L^{-1}).

Para a massa de grãos de milho ozonizada, à concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, foi constatado um tempo de saturação de 138,56 min, a partir do qual os valores de concentração residual do gás ozônio se mantiveram constantes. A concentração de saturação do referido gás foi de $0,9874 \text{ mg L}^{-1}$, o que corresponde a cerca de 46,1% da concentração inicial adotada (Tabela 2).

Em trabalhos desenvolvidos por SANTOS *et al.* (2007), obteve-se o tempo de saturação de 70 min para uma massa de 1,0 kg de grãos de milho, sob fluxo contínuo de 4,6 L min⁻¹, à concentração de 0,21 mg L⁻¹. Utilizando procedimentos metodológicos semelhantes, ALENCAR (2009), submetendo 1 kg de grãos de amendoim ao gás ozônio, sob concentração de 0,45 mg L⁻¹ (450 µg L⁻¹), ao fluxo de 3,0 L min⁻¹, registrou a obtenção do tempo de saturação da ordem de 192 min. Do mesmo modo, SILVA (2011), ao ozonizar 7,5 kg de grãos de trigo, nas concentrações de 0,54, 1,07, 1,61 e 2,14 mg L⁻¹, adotando o fluxo de injeção de 2,0 L min⁻¹, obteve os tempos de saturação de 100, 90, 75 e 36 h, respectivamente.

4.2 Análises microbiológicas dos grãos de milho

4.2.1 Quantificação de fungos filamentosos e leveduras

Os valores médios da quantificação de fungos filamentosos e leveduras nos grãos de milho após os tratamentos nos referidos períodos de exposição, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores médios referentes à contagem (log UFC g⁻¹) de fungos filamentosos e leveduras em grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio na concentração de 2,14 mg L⁻¹, nos diversos períodos de exposição (PE).

Período de exposição (h)	Controle (log UFC g ⁻¹)	Ozônio (log UFC g ⁻¹)
0	3,7671a	3,7671a
10	3,7791a	2,9119b
20	3,7612a	2,2724b
30	3,7282a	2,1497b
50	3,7570a	1,7570b

Médias seguidas de uma mesma letra na linha não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Observou-se redução significativa ($p < 0,05$) na contagem de fungos filamentosos e leveduras, com o aumento do período de exposição. Foram constatadas reduções equivalentes a 0,8672; 1,4888; 1,5785 e 2,0 ciclos log, em relação ao milho controle, quando se submeteu os grãos de milho ao processo de ozonização, por períodos de 10, 20, 30 e 50 h, respectivamente, o que significa que, em relação ao milho controle, o processo de ozonização permitiu uma redução de 99,0% na contagem de fungos totais (Tabela 3).

Observando a Figura 7 e Tabela 4, percebe-se a redução ocorrida na contagem de fungos nos grãos submetidos ao ozônio, enquanto no milho controle a contagem se manteve constante.

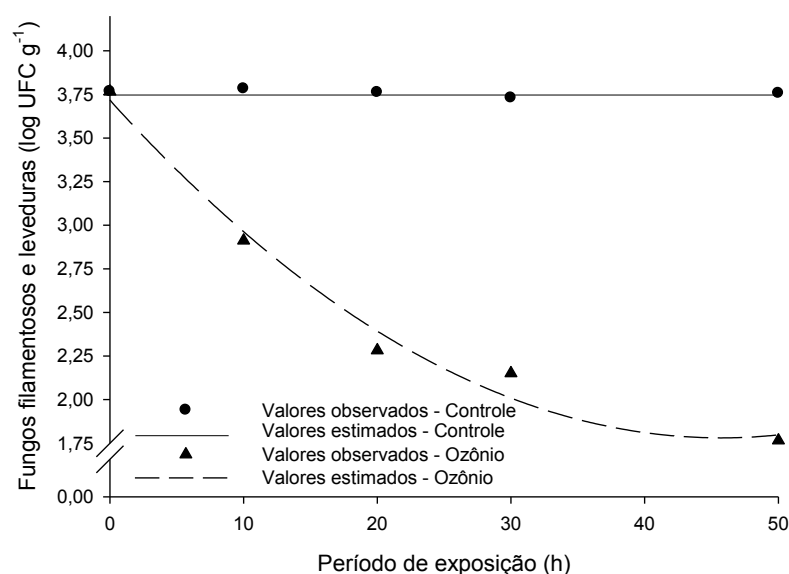


Figura 7 – Valores estimados e observados referentes à contagem (log UFC g⁻¹) de fungos filamentosos e leveduras em grãos de milho expostos ao ar atmosférico e ao gás ozônio, na concentração de 2,14 mg L⁻¹, nos diversos períodos de exposição.

Tabela 4 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (r^2) para contagem (log UFC g⁻¹) de fungos filamentosos e leveduras, em grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio, na concentração de 2,14 mg L⁻¹, em função dos períodos de exposição.

Tratamento	Equações ajustadas	r^2
Controle	$\hat{Y} = 3,7585$	
Ozônio	$\hat{Y} = 3,71838 - 0,0851728^{**}PE + 0,000932249^{*} PE^2$	0,9835

^{**}Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste “t”; ^{*}Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste “t”

Com relação à contagem de fungos filamentosos e leveduras do milho tratado com ar atmosférico, não foi constatado efeito do período de exposição, sendo a média e o desvio padrão de 3,7585±0,0189 ciclos log de UFC g⁻¹. No entanto, no que se refere ao milho tratado com ozônio, os dados ajustaram-se ao modelo quadrático, tendo como menor valor estimado de contagem de fungos filamentosos e leveduras, 1,773 log UFC g⁻¹, com 45,7031 h de exposição ao gás (Tabela 4).

Nas Figuras 8 e 9, é possível observar a diferença ocasionada pela ozonização na contagem de fungos filamentosos e leveduras quando se adotou a concentração do gás de 2,14 mg L⁻¹ e períodos de 30 e 50 h, respectivamente.

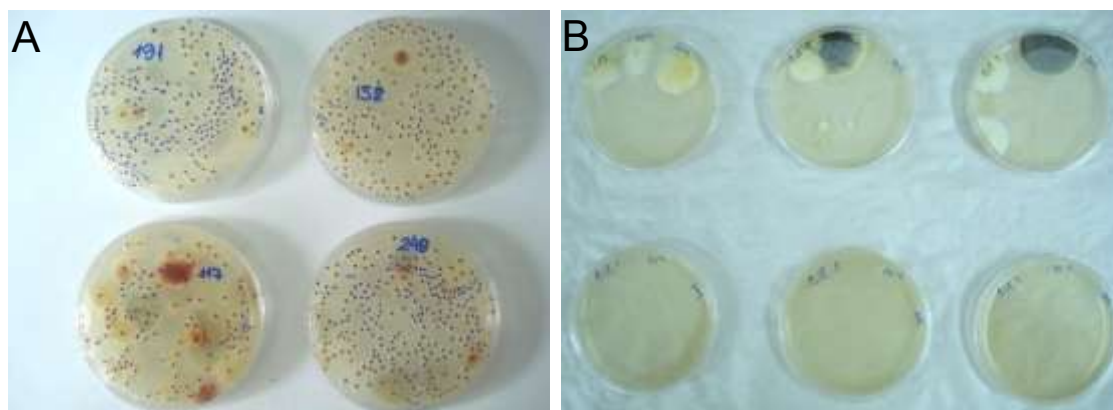


Figura 8 – Placas de Petri, contendo fungos filamentosos e leveduras em meio de cultura BDA, provenientes de grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (A) e ao gás ozônio (B), na concentração de 2,14 mg L⁻¹, por período de 30 h.

Conforme se observa, na Figura 8 e 9, o número de UFC de fungos filamentosos e leveduras por grama de milho é bastante expressivo nas placas correspondentes ao milho controle, em relação ao milho ozonizado. Neste segundo, o desenvolvimento de fungos filamentosos, além de ocorrer em número bastante reduzido, não foi observado crescimento de nenhuma levedura em qualquer placa, o que sugere maior intolerância ao gás ozônio em relação aos fungos filamentosos, na situação apresentada.

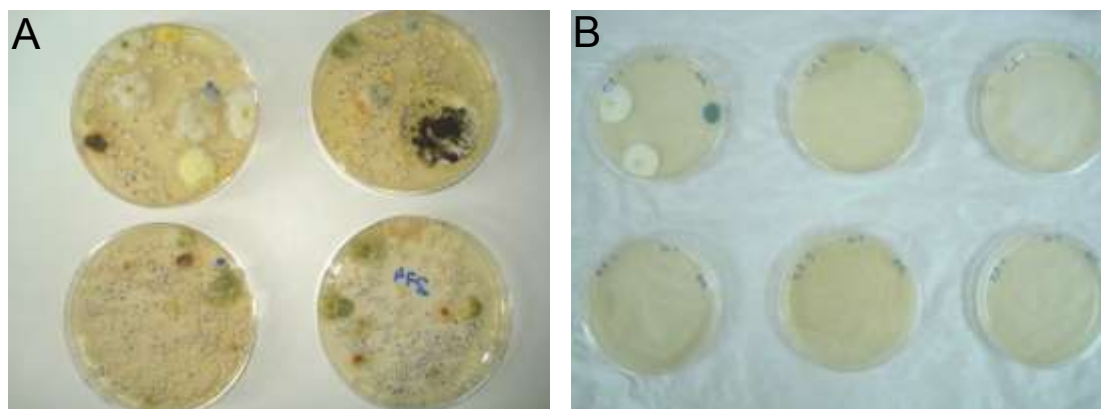


Figura 9 – Placas de Petri, contendo fungos filamentosos e leveduras em meio de cultura BDA, provenientes de grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (A) e ao gás ozônio (B), na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, por período de 50 h.

Tendência semelhante à observada na contagem de fungos filamentosos e leveduras foi verificada na quantificação dos gêneros fúngicos *Aspergillus* e *Penicillium* nos grãos de milho ozonizados (Tabela 5). Observou-se redução significativa ($p < 0,05$) no percentual de grãos contaminados à medida que se elevou o tempo de exposição dos grãos ao gás ozônio, quando comparado ao tratamento controle (ar atmosférico).

Tabela 5 - Valores médios referentes à ocorrência (%) de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio na concentração de 2,14 mg L⁻¹, nos diversos períodos de exposição.

Período de exposição (h)	<i>Aspergillus</i> spp		<i>Penicillium</i> spp	
	Controle	Ozônio	Controle	Ozônio
0	97,00a	97,00a	94,00a	94,00a
10	100,00a	95,00b	90,25a	30,00b
20	100,00a	89,50b	91,00a	14,00b
30	98,00a	44,00b	95,00a	3,75b
50	95,50a	20,50b	99,75a	2,00b

Médias seguidas de mesma letra na linha para cada variável não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Comparando-se aos índices médios de ocorrência da espécie fúngica *Aspergillus* spp. no milho controle, observou-se reduções da ordem de 5,0, 10,5, 55,1 e 78,5%, para os tempos de ozonização de 10, 20, 30 e 50 h, respectivamente. Com relação a *Penicillium* spp., constatou-se reduções de 66,8, 84,6, 96,1 e 98,0%, para os mesmos períodos de exposição. Para as condições mencionadas, os resultados apresentados sugerem, portanto, que as espécies do gênero *Aspergillus* são mais tolerantes ao efeito fungicida do gás ozônio do que as espécies do gênero *Penicillium*. Destaca-se que, enquanto que para o gênero *Aspergillus* houve leve decréscimo na contagem depois de 10 h de ozonização, para o gênero *Penicillium* detectou-se redução acentuada.

As alterações no índice de ocorrência fúngica nos grãos, nos diferentes períodos de exposição estão representados nas Figuras 10 e 11.

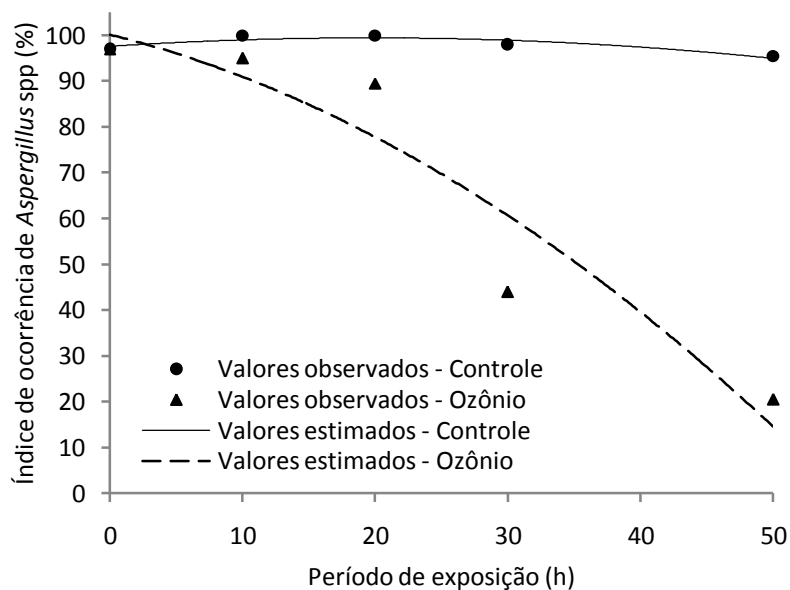


Figura 10 – Valores estimados e observados referentes ao índice de ocorrência de *Aspergillus* spp em grãos de milho expostos ao ar atmosférico e ao gás ozônio, na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, nos diversos períodos de exposição.

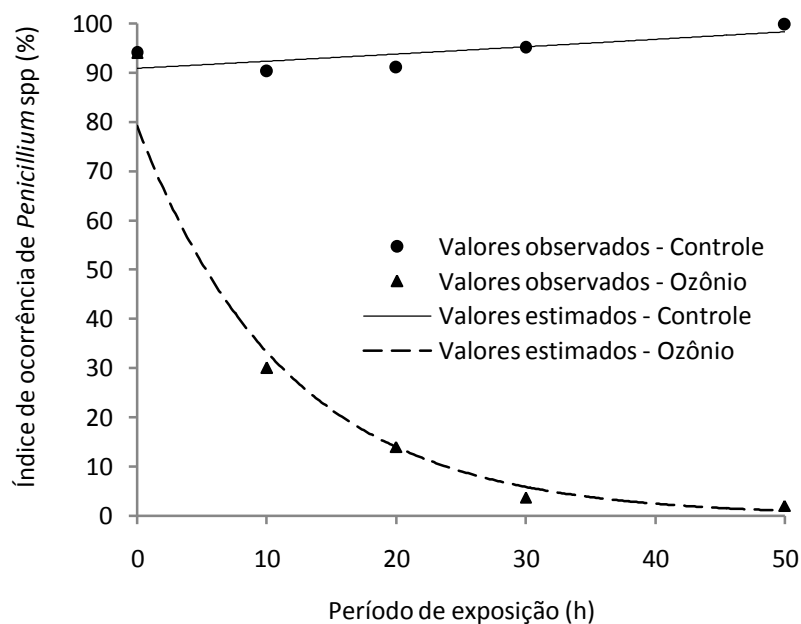


Figura 11 – Valores estimados e observados referentes ao índice de ocorrência de *Penicillium* spp em grãos de milho expostos ao ar atmosférico e ao gás ozônio, na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, nos diversos períodos de exposição.

Encontram-se representadas na Tabela 6, as equações de regressão ajustadas e seus respectivos coeficientes de determinação referentes ao índice de ocorrência de *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp em grãos de milho expostos ao ar atmosférico e ao ozônio, em diferentes períodos de exposição.

Tabela 6 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (r^2) para índice de ocorrência (%) de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio, na concentração de 2,14 mg L⁻¹, em função dos períodos de exposição.

Variável	Tratamento	Equações ajustadas	r^2
<i>Aspergillus</i>	Controle	$\hat{Y} = 97,0073 + 1,95096^{**} \sqrt{PE} - 0,308293^{**}PE$	0,9732
	Ozônio	$\hat{Y} = 97,69 + 7,96521 \sqrt{PE} - 2,75645^{***}PE$	0,9256
<i>Penicillium</i>	Controle	$\hat{Y} = 93,9598 - 2,83555^{**} \sqrt{PE} + 0,522091^{**}PE$	0,9752
	Ozônio	$\hat{Y} = 94,2234 - 26,5496^{**} \sqrt{PE} + 1,89523^{**}PE$	0,9990

Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste “t”; *Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste “t”; *Significativo a 6% de probabilidade, pelo teste “t”.

No que diz respeito ao índice de ocorrência de *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp nos grãos de milho submetidos ao gás ozônio, em função do período de exposição, os dados ajustaram-se ao modelo raiz quadrada, em que os menores valores estimados foram de aproximadamente 15,51 e 1,25%, ambos com 50 h de exposição ao ozônio, para as duas espécies fúngicas, respectivamente (Tabela 6).

Na Figura 12 é apresentado o elevado índice de ocorrência de fungos de armazenamento nos grãos de milho, após tratamento com ar atmosférico, contrastando com os grãos ozonizados, nos quais não foi constatado crescimento fúngico.

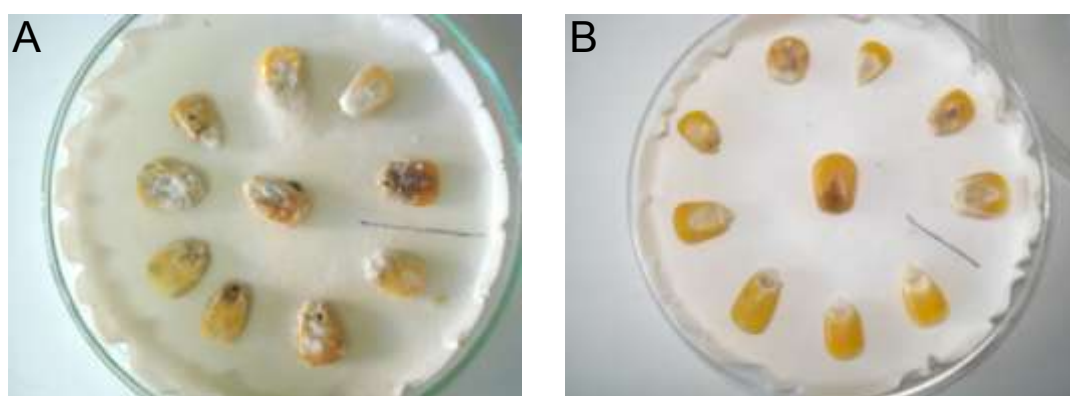


Figura 12 - Grãos de milho após exposição ao ar atmosférico (A) e ao gás ozônio (B), por período de 50 h.

Vale destacar que, nos grãos de milho ozonizados, nem todos os esporos fúngicos deixaram de germinar, contudo, aqueles que, de algum modo resistiram ao efeito fungicida do gás oxidante, produziram colônias de tamanho bastante reduzido, esparsas, pouco espessas e com estruturas vegetativas aparentando aspecto anatômico destituído de vigor, conforme avaliação utilizando microscópio estereoscópio. As características citadas ocorreram de maneira generalizada, porém muito mais acentuada em colônias de *Penicillium* spp. Ao estudar o efeito do ozônio sobre *Aspergillus niger*, agente causal da podridão negra em cebola, VIJAYANANDRAJ *et al.* (2006), perceberam alterações na morfologia do fungo. Os autores observaram que os conídios tratados com ozônio, à concentração de $4,8 \text{ mg L}^{-1}$, por 5, 10 e 15 min e, subsequente cultivo em meio de cultura

batata-dextrose-ágar (BDA), produziram colônias não-esporulantes, constituídas, possivelmente de micélio estéril, como resultado do processo de ozonização.

Observando com o auxílio de microscópio estereoscópio, percebe-se, com maior clareza o efeito fungicida do processo ozonizante, em relação à condição do milho controle, quase que totalmente infestado por fungos filamentosos, dentre os quais, *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp (Figura 13).

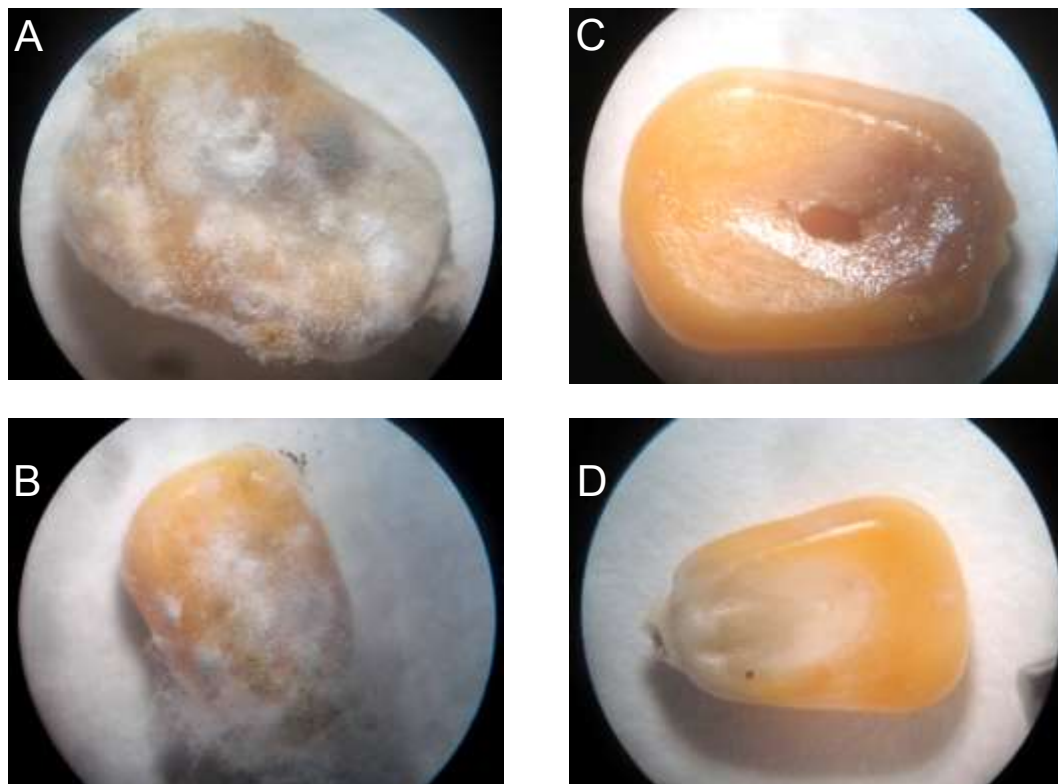


Figura 13 - Grãos de milho observados em estereomicroscópio, após exposição ao ar atmosférico (A e B) e ao gás ozônio (C e D), por período de 50 h.

É importante ressaltar que o gás ozônio, além de atuar como agente inibidor na proliferação de *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp, teve seu efeito fungicida estendido também aos demais fungos presentes na superfície dos grãos, como pode ser observado nas Figuras 12 e 13. Este efeito, no entanto, não foi analisado estatisticamente, por fugir ao escopo deste trabalho.

O efeito fungicida do gás ozônio foi avaliado por KELLS *et al.* (2001), no controle de *Aspergillus parasiticus* em grãos de milho, obtendo 63% de redução na população da referida espécie fúngica, tendo usado a concentração de 0,107 mg L⁻¹ (50 ppm), por 3 dias de exposição ao gás. Com propósito semelhante, ALLEN *et al.* (2003), relataram inativação de 96% de esporos fúngicos de espécie indeterminada, em grãos de cevada, em concentração de 0,3424 mg L⁻¹ (0,16 mg O₃ g⁻¹ min⁻¹), por período de 5 min de ozonização. Resultados análogos foram obtidos por WU *et al.* (2006), ao submeterem grãos de trigo ao gás ozônio, por 5 min, à concentração de 0,7062 mg L⁻¹ (0,33 mg O₃ g⁻¹ min⁻¹), resultando em inativação de 96,9% de esporos fúngicos de espécies não identificadas. Em estudos mais recentes, ALENCAR *et al.* (2012), demonstraram efeito fungicida do gás ozônio em grãos de amendoim, representado pela redução aproximada de 3 ciclos log, após ozonização por 96 h, à concentração de 21 mg L⁻¹. Por outro lado, SILVA (2011), ao ozonizar grãos de trigo, à concentração de 0,54 mg L⁻¹, por período de 100 h, não obteve resultados significativos de efeito fungicida, em relação à inativação de esporos de *Penicillium* spp.

A atuação do ozônio como poderoso agente antimicrobiano de largo espectro tem lhe facultado posição de destaque em estudos envolvendo ação microbiocida, onde se fazem presentes fungos, bactérias, vírus, protozoários, além de esporos fúngicos e bacterianos (KHADRE *et al.*, 2001). Há que se ressaltar que a inativação microbiana pelo ozônio ocorre em função da interação de uma série de fatores que resultam num processo de considerada complexidade (GREENE *et al.*, 2012). Segundo os mesmos autores, o ozônio age sobre diversos constituintes da parede e da membrana celular, bem como em componentes do conteúdo da célula, dentre outros, enzimas e ácidos nucleicos. Essa ação é atribuída à atuação de ozônio molecular e radicais livres que são liberados durante o rápido processo de sua decomposição (GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2004). A ruptura ou lise do envoltório celular, levando ao escoamento do conteúdo citoplasmático, é referenciada por diversos pesquisadores como o desfecho culminante da morte celular microbiana (SCOTT & LESHER, 1963; GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2004; PASCUAL *et al.*, 2007; CULLEN *et al.*, 2009).

4.3 Características fisiológica e físico-químicas dos grãos de milho

O efeito fumigante e sanitizante do gás ozônio deve atender, em princípio, à condição de inalterabilidade das características físicas e fisiológicas dos grãos, atestando assim sua eficiência como produto de ação biocida.

Resultados relativos ao teor de água e teor de lipídios dos grãos de milho expostos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio na concentração de 2,14 mg L⁻¹, até 50 h de exposição, são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores médios referentes ao teor de água (% b.u.) e teor de lipídios (%) dos grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio na concentração de 2,14 mg L⁻¹, nos diversos períodos de exposição (PE).

Período de exposição (h)	Teor de Água		Teor de Lipídios	
	Controle	Ozônio	Controle	Ozônio
0	14,3a	14,3a	3,41a	3,41a
10	14,5a	13,7b	3,32a	3,38a
20	14,7a	13,7b	3,33a	3,38a
30	14,6a	13,3b	3,32a	3,37a
50	14,5a	13,6b	3,32a	3,38a

Médias seguidas de mesma letra na linha para cada variável não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

O teor de água apresentou variação significativa ($P<0,05$) entre os tratamentos com o ar atmosférico e com o gás ozônio, nos períodos de exposição de 10, 20, 30 e 50 h (Tabela 7). A análise de regressão dos dados permitiu o ajuste de equações quadráticas, em função do período de exposição, tanto com relação aos grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) quanto àqueles expostos ao gás ozônio. O ponto máximo estimado do teor de água para o milho controle foi de 14,6%, com

29,7 h e o ponto mínimo para o milho ozonizado foi de 13,4%, com 33,78 h de exposição ao gás (Tabela 8).

Tabela 8 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (r^2) para a variável teor de água (%), em grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio, na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, em função dos períodos de exposição (PE).

Tratamento	Equações ajustadas	r^2
Controle	$\hat{Y} = 14,2941 + 0,0221822* \text{PE} - 0,000373472* \text{PE}^2$	0,8667
Ozônio	$\hat{Y} = 14,2703 - 0,0523655* \text{PE} + 0,000775173* \text{PE}^2$	0,9494

*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste "t".

A Figura 14 apresenta o comportamento dos valores médios do teor de água dos grãos de milho expostos ao gás ozônio e ao ar atmosférico, nos períodos de exposição considerados.

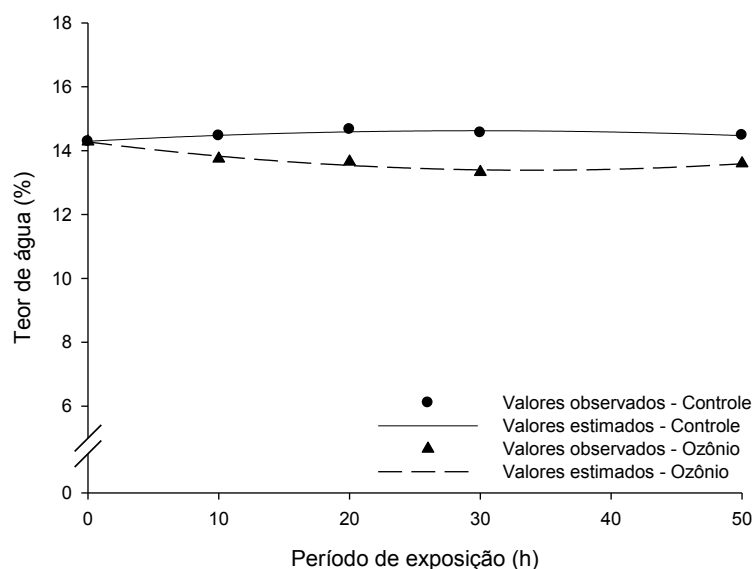


Figura 14 – Valores estimados e observados referentes ao teor de água em grãos de milho expostos ao ar atmosférico e ao gás ozônio, na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, nos diversos períodos de exposição

A alteração do teor de água observada se deu, provavelmente, devido à utilização do oxigênio isento de umidade, como elemento primordial na

geração do ozônio. Portanto, o equilíbrio higroscópico entre a massa de grãos e seu ambiente intersticial pode ser um dos fatores responsáveis pela citada oscilação, quando as pressões de vapor do grão e do ar que o envolve tendem ao equilíbrio (CORRÊA *et al.*, 2005). Resultados análogos foram obtidos por WANG *et al.* (2010), ao detectarem redução no teor de água do milho ozonizado (12,86%) em relação ao milho controle (15,56%), após exposição à concentração de 4,8 mg L⁻¹ de gás ozônio, ao fluxo contínuo de 0,4 L min⁻¹, por período de 12 h. Estas constatações reforçam a afirmativa de RAILA *et al.* (2006) que, ao utilizarem mistura de ar e gás ozônio sob concentração de 0,001498 mg L⁻¹ (700 ppb), com o propósito de acelerar o processo de secagem de grãos de trigo, obtiveram confirmação favorável desse efeito. A redução do teor de água nos grãos de trigo, citada pelos mesmos autores se deu em torno de 4,2% para os grãos ventilados com a mistura (ar + ozônio), nos três primeiros dias, enquanto aqueles que receberam simplesmente o agente secante (ar atmosférico) apresentaram redução de apenas 1,1%, no mesmo período.

Com relação ao teor de lipídios nos grãos de milho, este permaneceu entre 3,3 e 3,4%, independentemente da exposição ao ar atmosférico e ao gás ozônio, nos diversos períodos de exposição ($p > 0,05$), conforme demonstrado na Tabela 7. O comportamento praticamente inalterado do teor de lipídios nos grãos está retratado na Figura 15. Resultados semelhantes foram encontrados por MENDEZ *et al.*, (2003) ao ozonizarem milho a 0,107 mg L⁻¹ (50 mg kg⁻¹) e DUBOIS *et al.*, 2006 quando submeteram grãos de trigo ao gás ozônio, na concentração de 25,68 mg L⁻¹ (12 g kg⁻¹). Do mesmo modo, FARONI *et al.* (2007) também relataram ausência de alteração no teor de lipídios em milho tratado com 0,107 mg L⁻¹ (50 ppm) de ozônio, por 168 h. A ausência de alterações nos parâmetros qualitativos dos grãos, dentre os quais, teores de ácidos graxos livres, óleo bruto e peróxido foram também apontados por ALENCAR *et al.* (2011), ao ozonizar amendoins, utilizando concentrações da ordem de 13 e 21 mg L⁻¹, por período de 96 h.

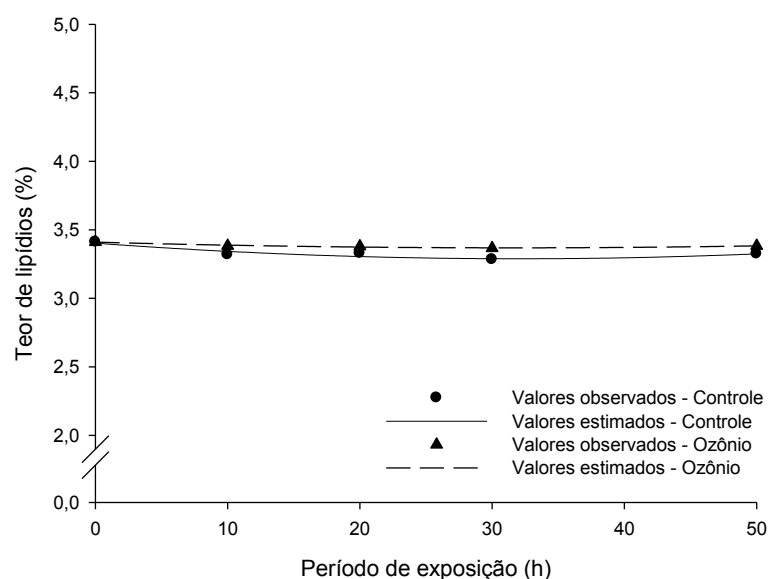


Figura 15 – Valores estimados e observados referentes ao teor de lipídios de grãos de milho expostos ao ar atmosférico e ao gás ozônio, na concentração de 2,14 mg L⁻¹, nos diversos períodos de exposição

Na Tabela 9 encontram-se as equações de regressão ajustadas e seus respectivos coeficientes de determinação, referentes ao comportamento do teor de lipídios dos grãos de milho expostos ao ar atmosférico e ao gás ozônio, em função dos períodos de exposição. Os dados ajustaram-se ao modelo raiz quadrada.

Tabela 9 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (r^2) para a variável teor de lipídios (%), em grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio, na concentração de 2,14 mg L⁻¹, em função dos períodos de exposição (PE).

Tratamento	Equações ajustadas	r^2
Controle	$\hat{Y} = 3,40950 - 0,0361747 \cdot \sqrt{PE} + 0,00347096 \cdot PE$	0,9617
Ozônio	$\hat{Y} = 3,40989 - 0,00260099 \cdot PE + 0,000041331 \cdot PE^2$	0,9414

*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste "t".

Os resultados referentes ao teor protéico dos grãos de milho expostos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio na concentração de 2,14 mg L⁻¹, até 50 h de exposição, encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores médios referentes ao teor de proteína (%) dos grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio na concentração de 2,14 mg L⁻¹, nos diversos períodos de exposição (PE).

Período de Exposição (h)	Teor de Proteína	
	Controle	Ozônio
0	41,1a	41,1a
10	41,5a	41,8a
20	42,9a	43,5a
30	43,6a	43,8a
50	44,1a	45,8a

Médias seguidas de mesma letra na linha, para cada variável, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

No tocante ao teor protéico do milho, nenhuma alteração foi encontrada, seja nos grãos expostos ao gás ozônio ou naqueles submetidos ao ar atmosférico, tampouco em relação à variação do período de exposição (Tabela 10). Infere-se, portanto, que o gás ozônio, nas condições apresentadas, não afeta a constituição de proteínas do milho tratado. Os resultados obtidos coincidem com aqueles apontados por MENDEZ *et al.* (2003), onde não se constatou qualquer diferença entre os teores de proteína de grãos de trigo ozonizados e não ozonizados. Por outro lado, ao analisar cinco diferentes proteínas, em relação à sua reatividade com ozônio, CATALDO (2003) atestou a ocorrência de efeito de desestruturação de unidades de aminoácidos e proteínas em meio líquido. No entanto, o mesmo autor salienta que as proteínas, em estado sólido, se tornam completamente resistentes à ação do referido gás.

São apresentados na Tabela 11, os resultados relativos à condutividade elétrica e índice de peróxido dos grãos de milho expostos ao

ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio na concentração de 2,14 mg L⁻¹, até 50 h de exposição.

Tabela 11 – Valores médios referentes à condutividade elétrica ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) e índice de peróxido (meq kg^{-1}) dos grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio na concentração de 2,14 mg L⁻¹, nos diversos períodos de exposição (PE).

PE (h)	Condutividade Elétrica		Índice de Peróxido	
	Controle	Ozônio	Controle	Ozônio
0	41,1a	41,1a	5,84a	5,84a
10	41,5a	41,8a	6,72b	7,62a
20	42,9a	43,5a	7,81b	8,78a
30	43,6a	43,8a	8,06b	9,88a
50	44,1a	45,8a	9,69b	11,48a

Médias seguidas de mesma letra na linha, para cada variável, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A avaliação da condutividade elétrica de grãos de milho constitui um dos procedimentos analíticos com o propósito de se analisar o vigor e, portanto, a condição fisiológica destes grãos. Seus resultados expressam a quantidade de íons lixiviados do interior dos grãos para o meio externo, ou seja, a solução na qual estão mergulhados, retratando, diretamente seu grau de deterioração (VIEIRA, 1994).

As equações de regressão ajustadas e seus respectivos coeficientes de determinação, referentes ao comportamento da condutividade elétrica dos grãos de milho expostos ao ar atmosférico e ao gás ozônio, em função dos períodos de exposição, encontram-se representadas na Tabela 12. A análise de regressão dos dados permitiu o ajuste de equações lineares em ambos os tratamentos.

Tabela 12 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (r^2) para a variável condutividade elétrica ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$), em grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio, na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, em função dos períodos de exposição (PE).

Tratamento	Equações ajustadas	r^2
Controle	$\hat{Y} = 41,2394 + 0,0635135^{**} \text{ PE}$	0,9154
Ozônio	$\hat{Y} = 41,0954 + 0,0953604^{**} \text{ PE}$	0,9729

******Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste “t”.

Na Tabela 11, observa-se não ter ocorrido variação dos valores de condutividade elétrica na solução contendo os grãos de milho, entre os tratamentos com o gás ozônio e o ar atmosférico, nos diferentes períodos de exposição. No entanto, observou-se um aumento significativo nos valores de condutividade elétrica dos grãos, à medida que se elevava o tempo de exposição, sendo este de 0,0635135 para cada 1 h de variação, para o milho controle e de 0,095360, para o milho ozonizado (Tabela 12). Apesar de significativa, a variação ocorreu entre os valores 41 e 46 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$.

Na Figura 16, observa-se leve alteração para os dois tratamentos (ozônio e ar atmosférico), nos diferentes períodos de exposição.

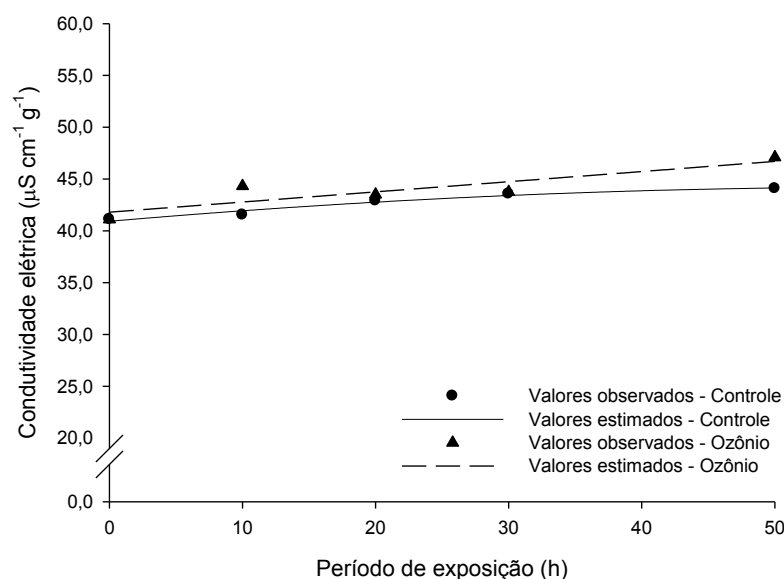


Figura 16 – Valores estimados e observados referentes à Condutividade elétrica de grãos de milho expostos ao ar atmosférico e ao gás ozônio, na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, nos diversos períodos de exposição.

Em estudos conduzidos por MENDEZ *et al.*, (2003), ao submeterem trigo, milho e arroz à atmosfera modificada com $0,107 \text{ mg L}^{-1}$ (50 mg kg^{-1}) de ozônio, por 30 dias, não observaram alteração significativa na qualidade dos referidos grãos. Da mesma forma, SANTOS (2008), ao ozonizar grãos de milho, na concentração de $0,214 \text{ mg L}^{-1}$ (100 ppm), por 180 min, não constatou variação nas características fisiológicas dos grãos submetidos ao ozônio, em relação ao milho controle. Resultados semelhantes foram obtidos por ROZADO (2008), quando observou que o processo de ozonização de grãos de milho, sob concentração de $0,107 \text{ mg L}^{-1}$ (50 mg kg^{-1}), por 360 h, não afetou a qualidade fisiológica dos grãos. Ao contrário, SILVA (2011), observou aumento significativo de valores referentes à condutividade elétrica em grãos de trigo ozonizados, na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, por períodos de 20, 40 e 60 h.

No que se refere ao índice de peróxido, os valores correspondentes ao óleo extraído dos grãos tratados com ar atmosférico e aos expostos ao ozônio apresentaram valores crescentes, conforme se aumentava o tempo de exposição. No entanto, observou-se maior elevação nos índices

referentes aos grãos ozonizados, o que sugere possível oxidação induzida pela exposição ao gás.

Observa-se que, até 30 h de ozonização, os valores médios do índice de peróxido permaneceram abaixo de 10 meq kg⁻¹, limite máximo definido pela ANVISA (1999), como parâmetro de comercialização de óleo bruto de milho (Figura 17).

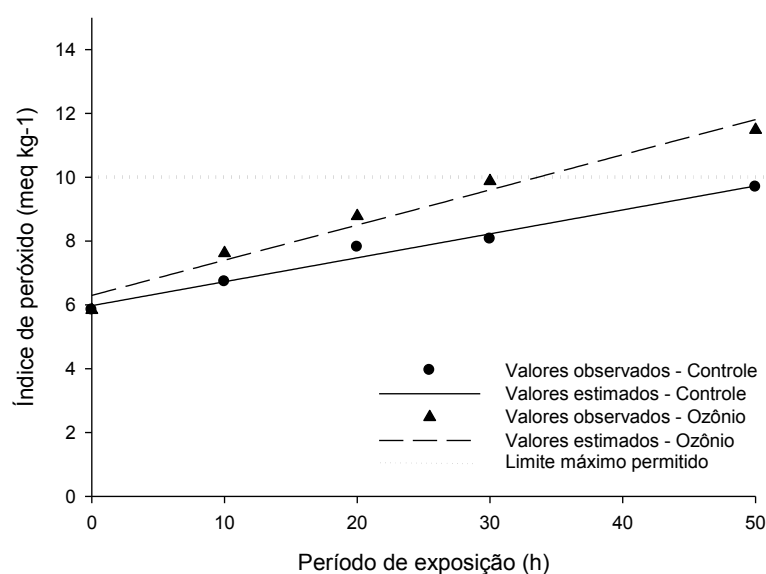


Figura 17 – Valores estimados e observados referentes ao Índice de peróxido de grãos de milho expostos ao ar atmosférico e ao gás ozônio, na concentração de 2,14 mg L⁻¹, nos diversos períodos de exposição.

Na Tabela 13 são apresentadas as equações de regressão ajustadas e seus respectivos coeficientes de determinação, referentes ao comportamento do índice de peróxido e do teor de proteína dos grãos de milho expostos ao ar atmosférico e ao gás ozônio, em função dos períodos de exposição.

Tabela 13 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (r^2) para a variável índice de peróxido (meq kg^{-1}) em grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio, na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, em função dos períodos de exposição (PE).

Tratamento	Equações ajustadas	r^2
Controle	$\hat{Y} = 0,597493 + 0,075028^{**} \text{ PE}$	0,9816
Ozônio	$\hat{Y} = 6,297840 + 0,110182^{**} \text{ PE}$	0,9722

^{**}Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste “t”.

Para o índice de peróxidos, a análise de regressão dos dados permitiu o ajuste de equações lineares em ambos os tratamentos. O aumento no índice de peróxido, com a elevação do tempo de exposição (para o milho controle e para o milho ozonizado) foi de 0,075028 para cada 1 h de variação no valor correspondente ao tempo de exposição ao ar atmosférico e de 0,110182 para cada 1 h de variação no valor referente ao período de exposição ao gás ozônio.

Resultados diferentes foram obtidos por BARBOSA *et al.* (2005) que, ao ozonizarem grãos de milho, sob concentração de $0,0132 \text{ kg O}_3 \text{ m}^{-3}$ de ar, por 120 h, não detectaram alteração no índice de peróxido dos grãos ozonizados, em relação ao tratamento controle. Do mesmo modo, ALENCAR *et al.* (2011), constataram que o gás ozônio não afetou o índice de peróxido de grãos de amendoim ozonizados, à concentração de 21 mg L^{-1} , por período de 96 h de exposição ao gás.

5 CONCLUSÕES

Conforme os resultados apresentados neste trabalho e os objetivos propostos, conclui-se que:

- i. A concentração e o tempo de saturação do gás ozônio nos grãos de milho foi de 0,9874 mg L⁻¹ e 138,56 min, respectivamente.
- ii. O gás ozônio reduziu em 2,0 ciclos log a contagem de fungos filamentosos e leveduras em amostras de milho ozonizadas, à concentração de 2,14 mg L⁻¹, por período de 50 h.
- iii. O processo de ozonização promoveu redução de 78,5 e 98,0% no índice de ocorrência de *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp, em grãos de milho expostos ao gás ozônio, à concentração de 2,14 mg L⁻¹, por período de 50 h.
- iv. O ozônio promoveu alteração da característica física teor de água nos grãos de milho, com redução de 0,9% em relação ao milho controle, após 50 h de exposição.
- v. A ozonização não alterou a característica fisiológica condutividade elétrica dos grãos de milho em relação ao milho controle, nas condições relatadas.
- vi. A ozonização influenciou o índice de peróxido nos grãos de milho, elevando de 5,84 para 11,48 meq kg⁻¹, em 50 h de exposição, à concentração de 2,14 mg L⁻¹.
- vii. As características químicas teor de lipídios e teor de proteínas nos grãos de milho não foram afetadas pelo processo de ozonização.

Os resultados demonstrados neste estudo confirmam a eficiência do efeito fungicida do gás ozônio no controle de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, em grãos de milho, sem afetar, de maneira geral, a qualidade destes grãos. Por outro lado, novas pesquisas se fazem necessárias com o propósito de se avaliar o efeito do ozônio no controle dos demais gêneros fúngicos provenientes do campo, presentes nos grãos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC. American Association of Cereal Chemists. **Approved methods of AACC**. 10.ed. Saint Paul: AACC, 1999.

ABBAS, H. K.; CARTWRIGHT, R. D.; XIE, W.; SHIER, W. T. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (*Zea mays*) hybrids in Arkansas. **Crop Protection**, v.25, n.1, p.1-9, 2006.

ACHEN, M. & YOUSEF, A. E. Efficacy of ozone against *Echerichia coli* O157:H7 on apples. **Food Microbiology and Safety**, v.66, n.9, p.1380-1384, 2001.

ALENCAR, E. R. **Processo de ozonização de amendoim (*Arachis hypogaea* L.): cinética de decomposição, efeito fungicida e detoxificante de aflatoxinas e aspectos qualitativos**. 2009. 92f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

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

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

ALI, N.; SARDJONO; YAMASHITA, A.; YOSHIZAWA, T. Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. **Food Additives and Contaminants**, v.31, n.4, p.377-384,1998.

ALLEN, B.; WU, J.; DOAN, H. Inactivation of fungi associated with barley grain by gaseous ozone. **Journal of Environmental Science and Health**, v.B38, n.5, p.617-630, 2003.

ALMEIDA, A. P.; CORRÊA, B.; MALLOZZI, M. A. B.; SAWAZAKI, E.; VALENTE SOARES, L. M. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.4, p.321-326, 2000.

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 CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 16.ed. Washington, DC.: AOAC, 1995.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 4. ed. Champaign: AOCS Press, 1993. 2v.

ASAE. AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERING. Moisture measurement – Unground grain and seed. Page 563 in: **Standards**, 2000. St. Joseph: American Society of Agricultural Engineers.

BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON, D. M.; MEREDITH, F. 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environment Health Perspective**, v.109(suppl 2), p.325–332, 2001.

BARBOSA, G. N. O.; FARONI, L. R. A.; SARTORI, M. A.; SILVA, M. T. C.; ROZADO, A. F. Avaliação do óleo obtido a partir de grãos de milho tratados com ozônio. **Engenharia na Agricultura**, v.13, p.173-177, 2005.

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.29, p.202-205, 1999.

BINDER, E. M.; TAN, L. M.; CHIN, L. J.; HANDL, J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, n.3, p.265–282, 2007.

BINDER, E. M. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. **Animal Feed Science and Technology**, v.133, n.1, p.149-166, 2007.

BRASIL. Ministério do Trabalho e do Emprego. **NR 15 – Atividades e Operações Insalubres – Portaria GM nº 3.214, de 8 de junho de 1978**, Diário Oficial da União. 06.07.1978, Brasília, DF.

BRASIL. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 200p.

CASTELLS, M.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Distribution of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.123, n.1, p.81-87, 2008.

CASTRO, M. F. P.; SOARES, L. M. V.; FURLANI, R. P. Z. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays* L.): a preliminary study. **Revista de Microbiologia**, v.2, n.4, p.289-295, 1995.

CATALDO, F. (2003). On the action of ozone on proteins. **Polymer Degradation and Stability**, v.82, p.105-114, 2003.

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

CICCARESE, F.; SASANELLI, N.; CICCARESE, A.; ZIADI, T.; AMBRICO, A.; MANCINI, L. Seed disinfestation by ozone treatments. In: IOA

Conference and Exhibition, 2007, Valência, Espanha, **Pocceedings...** 2007. Valência: International Ozone Association.

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

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: 5º levantamento, fevereiro de 2013**. Brasília: CONAB, 2013. 27p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 16 fev. 2013.

CORRÊA, P. C.; GONELI, A. L. D.; RESENDE, O.; RIBEIRO, D. M. Obtenção e modelagem das isotermas de dessorção e do calor isotérmico de dessorção para grãos de trigo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.7, n.1, p.39-48, 2005.

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

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

DUARTE, J. O. **Introdução e importância econômica do milho**, EMBRAPA, 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>. Acesso em: 21/03/2013.

DUBOIS, M.; COSTE, C.; DESPRES, A. G.; EFSTATHIOU, T.; NIO, C.; DUMONT, E.; PARENT-MASSIN, D. Safety of Oxygreen, an ozone treatment on wheat grains. Part 2. Is there a substantial equivalence between

Oxygreen-treated wheat grains and untreated wheat grains? **Food Additives and Contaminants**, v.23, p.1-15, 2006.

FARONI, L. R. A.; PEREIRA, A. M.; SOUZA, A. H.; SILVA, M. T. C.; URRUCHI, 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, Valencia, Espanha. **Proceedings...** Valencia. IOA: 2007, v.1, p.1-6.

FARONI, L. R. A. & SILVA, J. S. **Manejo de pragas no Ecossistema de Grãos Armazenados**. In: SILVA, J. S. (Ed.). Secagem e Armazenamento de Produtos Agrícolas, 2 ed. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, 2008, v.1, p.371-406.

GONÇALVES, A. A. Ozone: an emerging technology for the seafood industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.6, p.1527-1539, 2009.

GREENE, A. K.; GÜZEL-SEYDIM, Z. B.; SEYDIM, A. C. **Chemical and physical properties of ozone**. In: O'DONNELL, C.; TIWARI, B.; CULLEN, P. J.; RICE, R. G. (Eds.) Ozone in food processing. West Sussex, UK: The Atrium, 2012, p. 19-29.

GÜZEL-SEYDIM, Z. B.; 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, p.326-332, 2009.

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

IBANOGLU, S. Wheat washing with ozonated water: effects on selected flour properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, p.579–584, 2002.

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

KAWASHIMA, L. M. & SOARES, L. M. V. Incidência de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.516-521, 2006.

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

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**, v.66, 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, p.1071–1087, 1999.

KORZUN, W.; HALL, J.; SAUER, R. The effect of ozone on common environmental fungi. **Clinical Laboratory Science**, v.21, n.2, p.107-111, 2008.

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

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2 ed. Curitiba: edição do autor. 1997. 134p.

LI, M.; ZHU, K. X.; WANG, B. W.; GUO, X. N.; PENG, W.; ZHOU, H. M. Evaluation the quality characteristics of wheat flour and shelf-like of fresh noodles as affected by ozone treatment. **Food Chemistry**, v.135, p.2163-2169, 2012.

LULLIEN-PELLERIN, V. **Ozone in grain processing**. In: O'DONNELL, C.; TIWARI, B.; CULLEN, P. J.; RICE, R. G. (Eds.) *Ozone in food processing*. West Sussex, UK: The Atrium, 2012, p. 81-96.

MACHINSKI JÚNIOR, M.; VALENTE SOARES, L. M.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J. L.; BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, n.10, p.1001-1007, 2001.

MCDONOUGH, M. X.; CAMPABADAL, C. A.; MASON, L. J.; MAIER, D. E.; DENVIR, A.; WOLOSHUK, C. Ozone application in a modified screw conveyor to treat grain for insect pests, fungal contaminants, and mycotoxins. **Journal of Stored Products Research**, v.47, p.249-254, 2011.

MENNITI, A. M.; GREGORI, R.; NERI, F. Activity of natural compounds on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production in stored maize kernels. **International Journal of Food Microbiology**, v.136, p.304-309, 2010.

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

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

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

ONO, E. Y. S.; ONO, M. A.; FUNO, F. Y.; MEDINA, A. E.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; KAWAMURA, O.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. Evaluation of fumonisin–aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. **Food Additives and Contaminants**, v.18, p.719–729, 2001.

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

PAYNE, G. A. Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. In: SINHA, K. K. & BHATNAGAR, D. **Mycotoxins in Agriculture And Food Safety**. New York: Macel Dekker, 1998, p.279-306.

PLACINTA, C. M.; MELLO, J. P.; MACDONALD, A. M. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Food Science Technology**, v.78, p.21-37, 1999.

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

RAILA, A.; STEPONAVIČIUS, D.; RAILIENĖ, M.; STEPONAVIČIENĖ, A.; ZVICEVIČIUS, E. Investigation of physical prevention means to reduce mycological contamination of grain surface. **Ecologija**, v.3, p.88-95, 2006.

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

RICE, R. G.; FARQUHAR, J. W.; BOLLYKY, J. Review of the applications of ozone for increasing storage times of perishable foods. **Science and Engineering**, v.4,p.147-163, 1982.

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.

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

SAMAPUNDO, S.; MEULENAER, B.; OSEI-NIMOH, D.; LAMBONI, Y.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F. Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? **Food Microbiology**, v.24, p.465-473, 2007.

SANTOS, J. E.; MARTINS, M. A.; FARONI, L. R. D.; ANDRADE, M. P.; CARVALHO, M. C. S. Ozonation process: saturation time, decomposition kinetics and quality of maize grains (*Zea mays* L.) In: Sustainable Agri-Food Industry Use of Ozone & Related Oxidants, Valencia, Espanha. 2007, **Proceedings...** Valencia: IOA, 2007. P.1-6.

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.

SCOTT, D. B. M. & LESHER, E. C. Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.85, n.3, p.567-576, 1963.

SCUDAMORE, K. A. & PATEL, S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.5, p.407-416, 2000.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144p.

SILVA, J. S.; CAMPOS, M. G.; SILVEIRA, S. F. R. Armazenagem e Comercialização de Grãos no Brasil. In: SILVA, J.S. (Ed.). **Secagem e Armazenamento de Produtos Agrícolas**, 2 ed. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, 2008, v.1, p.1-17.

SILVA, T. A. **Processo de ozonização dos grãos de trigo**: cinética de reação e efeito na qualidade destes e da farinha. (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011. 118 f. Dissertação.

SPSS. **Sigma Plot user's guide**. Version 11.0 (Revised Edition). SPSS Inc., Chicago, USA. 2008.

TAYEL, A. A. Innovative system using smoke from smoldered plant materials to control *Aspergillus flavus* on stored grain. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.64, p.114-118, 2010a.

TAYEL, A. A. Controlling deterioration of high-moisture maize with ozone treatment. **Journal of Stored Products Research**, v.46, p.7-12, 2010b.

TIWARI, B. K.; BRENNAN, C. S.; CURRAN, T.; GALLAGHER, E.; CULLEN, P. J.; O' DONNELL, C. P. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v.51, p.248-255, 2010.

TIWARI, B. K. & MUTHUKUMARAPPAN. **Ozone in fruit and vegetable processing**. In: O'DONNELL, C.; TIWARI, B.; CULLEN, P. J.; RICE, R. G.

(Eds.) Ozone in food processing. West Sussex, UK: The Atrium, 2012, p. 55-80.

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

VIEIRA, R. D. **Teste de condutividade elétrica**. In: VIEIRA, R. D. & CARVALHO, N. M. Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1994, p.103-132.

VIJAYANANDRAJ, V. R.; PRASAD, D. N.; MOHAN, N; GUNASEKARAN, M. Effect of ozone on *Aspergillus niger* causing black rot disease in onion. **Ozone: Science and Engineering**, v.28, p.347-350, 2006.

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

YOUNG, S. B. & SETLOW, P. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.1133-1142, 2004.

WANG, S.; LIU, H.; LIN, J; CAO, Y. **Can ozone fumigation effectively reduce aflatoxin B1 and other mycotoxins contamination on stored grain?** In: Proceedings of the 10th International Working Conference on Stored-Product Protection. Estoril, Portugal, p. 582-588. 2010.

WHITE, S. D.; MURPHY, P. T.; BERN, C. J.; LEEUWEN, J. V. Controlling deterioration of high-moisture maize with ozone treatment. **Journal of Stored Products Research**, v.46, p.7-12, 2010.

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

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

ZUMMO, N. & SCOTT, G. E. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. **Plant Disease**, v.76, n.8, p.771-773, 1992.

APÊNDICES

Tabela 1a – Resumo da análise de variância referente ao teor de água (%), TA, condutividade elétrica ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), CE e teor de lipídios (%), TL, nos grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, nos períodos de exposição de 0, 10, 20, 30 e 50 h.

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios		
		TA	CE	TL
Tratamento (TR)	1	4,4222**	2,3241 ^{ns}	0,0152**
Resíduo (a)	4	0,0088	4,2915	0,0010
Exposição (EXP)	4	0,0992**	14,5159**	0,0046 ^{ns}
TR x EXP	4	0,3293**	0,7512 ^{ns}	0,0010 ^{ns}
Resíduo (b)	16	0,0120	1,5786	0,0022
CV (%) Parcela		0,66	4,82	0,94
CV (%) Subparcela		0,77	2,93	1,40

**Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F; CV = coeficiente de variação; ^{ns} Não significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 1b – Resumo da análise de variância referente ao índice de peróxido (meq kg^{-1}), IP, e teor de proteína (%), TP, nos grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, nos períodos de exposição de 0, 10, 20, 30 e 50 h.

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios	
		IP	TP
Tratamento (TR)	1	9,0141**	0,0043 ^{ns}
Resíduo (a)	4	0,2770	0,0049
Exposição (EXP)	4	19,3792**	0,0058 ^{ns}
TR x EXP	4	0,8479**	0,0022 ^{ns}
Resíduo (b)	16	0,0479	0,0036
CV (%) Parcela		6,43	0,93
CV (%) Subparcela		2,68	0,80

**Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F; CV = coeficiente de variação. ^{ns} Não significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 1c – Resumo da análise de variância referente à contagem (UFC g⁻¹) de fungos filamentosos e leveduras, BL, incidência (%) de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em grãos de milho submetidos ao ar atmosférico (controle) e ao gás ozônio, na concentração de 2,14 mg L⁻¹, nos períodos de exposição de 0, 10, 20, 30 e 50 h.

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios		
		BL	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>
Tratamento (TR)	1	10,5633**	8352,1**	42575,62**
Resíduo (a)	6	0,0022	14,1667	10,225
Exposição (EXP)	4	0,9514**	2622,4**	2797,938**
TR x EXP	4	0,9058**	2250,1**	3076,438**
Resíduo (b)	24	0,0037	6,5833	7,2875
CV (%) Parcela		1,47	4,50	5,21
CV (%) Subparcela		1,91	3,07	4,40

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