

EFICÁCIA DO OZÔNIO NO CONTROLE DE FUNGOS EM AMENDOIM

ERNANDES R DE ALENCAR¹, WALLAS F. S. FERREIRA², HANNA ALVES²,
MATHEUS A. ROBERTO², MARCIO A. MENDONÇA³

¹ Eng. Agrícola, Prof. Dr., Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV/UnB), Fone: (0XX61) 31077560, ernandesalencar@unb.br

² Estudante de Agronomia, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV/UnB), Fone: (0XX61) 31077560, wallasfelippe@gmail.com, hannaalves@hotmail.com, matheus.ar@hotmail.com.br

³ Tecnólogo de Laticínios, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV/UnB), Fone: (0XX61) 31077560, marcioamen@gmail.com

Apresentado no
XLIII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola - CONBEA 2014
27 a 31 de julho de 2014- Campo Grande- MS, Brasil

RESUMO: Objetivou-se com este trabalho avaliar a eficácia do ozônio como agente fungicida e possíveis alterações qualitativas em grãos de amendoim. Na ozonização dos grãos foram utilizadas amostras de 300 g, adotando-se a concentração do gás de 3.960 ppm, por períodos de exposição de 0, 120 e 240 min. Na análise microbiológica dos grãos ozonizados foi utilizado o método de diluição em placas. Para avaliação da qualidade dos grãos de amendoim foram analisados os parâmetros de teor de água e condutividade elétrica. Para a avaliação da qualidade do óleo bruto extraído dos grãos de amendoim quantificaram-se o teor de ácidos graxos livres e o índice de peróxido. O gás ozônio foi eficiente no controle de fungos totais e das espécies potencialmente aflatoxigênicas *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* em grãos de amendoim, com redução superior a 2,4 e 3,0 ciclos log na contagem dos microorganismos, na concentração de 3.960 ppm e 240 min de exposição. A qualidade dos grãos e do óleo bruto não foi afetada significativamente em decorrência da exposição ao ozônio, na concentração de 3.960 ppm, por até 240 min. Concluiu-se que o ozônio é uma importante alternativa no controle de fungos, incluindo espécies potencialmente aflatoxigênicos, em grãos de amendoim.

PALAVRAS-CHAVE: ozonização, controle de fungos, qualidade

EFFICACY OF OZONE ON CONTROL OF FUNGI IN PEANUT

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate the efficacy of ozone as a fungicidal agent and possible qualitative changes in peanut. In the ozonation, peanut samples of 300 g were used, adopting the gas concentration of 3,960 ppm, for exposure periods of 0, 120 and 240 min. The effect of ozone gas on the total fungal count and potentially aflatoxigenic species *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* was evaluated by the dilution technique. Evaluation of peanut quality consisted of analysis for moisture content and electrical conductivity. The qualitative parameters of the crude oil extracted from the peanuts analyzed were the concentration of free fatty acids and peroxide index. Ozone was efficient for the control of total fungi and *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* in peanuts, with reduction greater than 2.4 and 3.0 log cycles at the concentration of 3,960 ppm and exposure period of 240 min, respectively. The quality of grain and crude oil was not significantly affected as a result of exposure to ozone at a concentration of 3,960 ppm for up to 240 min. It was concluded that ozone is an important alternative in the control of fungi, including potentially aflatoxigenic species in peanut kernels.

KEYWORDS: ozonation, fungi control, quality

INTRODUÇÃO

Os grãos de amendoim são substratos ideais para o desenvolvimento de fungos, que, além de causar degradação dos nutrientes, podem produzir as aflatoxinas, metabólitos secundários tóxicos aos homens e animais (SABINO et al., 1989). Os fungos das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, segundo PAYNE (1998), são principais produtores de aflatoxinas em grãos e subprodutos agrícolas e podem ser encontradas tanto no solo como no ar, sendo classificados como fungos de campo e de armazenamento.

No campo, os dois principais parâmetros que afetam a produção de aflatoxinas em amendoim são temperatura e estresse hídrico. De acordo com CRAUFURD et al. (2006), temperaturas na faixa de 28 e 34 °C associadas a estresse hídrico durante a formação das vagens do amendoim são favoráveis à infecção pelos fungos e à produção de aflatoxinas. Durante o armazenamento, a produção de aflatoxinas é afetada por diversos parâmetros, dentre os quais atividade de água, temperatura, presença de danos mecânicos e ocasionados por insetos, composição nutricional, composição do ar intergranular, dentre outros (SHAPIRA e PASTER, 2004).

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

Uma alternativa que vem sendo apresentada para a prevenção e o controle de contaminação de alimentos por aflatoxinas é o gás ozônio. O ozônio (O₃) é uma forma alotrópica do oxigênio, que pode ser produzida naturalmente como resultado de relâmpagos ou radiação ultravioleta (KIM et al., 1999). Em se tratando de grãos de amendoim, o ozônio pode atuar como agente fungicida (ZOOTI et al., 2009). Esse gás pode evitar e/ou inibir o desenvolvimento dos fungos potencialmente aflatoxigênicos e, conseqüentemente, diminuir o risco de produção de aflatoxinas durante as etapas pós-colheita.

Encontram-se, na literatura, diversos relatos que descrevem o efeito do ozônio sobre microrganismos, dentre os quais, os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Botrytis* e *Mucor* (RAILA et al., 2006; ZOTTI et al., 2009), além de vírus, protozoários e bactérias (KHADRE et al., 2001). A inativação de microrganismos pelo gás ozônio, segundo CULLEN et al. (2009), é atribuída, principalmente, à ruptura do envoltório celular e posterior dispersão dos constituintes citoplasmáticos, uma vez que esse gás apresenta alto poder oxidante. Essa capacidade do ozônio de inativar ou inibir o desenvolvimento dos microrganismos é fundamental sob ponto de vista de segurança alimentar, pois pode representar uma forma de controle de fungos potencialmente aflatoxigênicos e, conseqüentemente, de prevenção da síntese de aflatoxinas. Destaca-se que o ozônio, dentre os compostos geralmente utilizados como sanitizantes, apresenta o segundo maior potencial de oxidação (2,07 mV), sendo superado somente pelo flúor (MUSTAFA, 1990; GUZEL-SEYDIM et al., 2004).

Em vista do exposto, objetiva-se com este trabalho avaliar a eficácia do ozônio como agente fungicida em grãos de amendoim e possíveis alterações qualitativas no produto.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas e de Microbiologia e Alimentos, da Faculdade de Agronomia e Medicina

Veterinária da Universidade de Brasília, UnB.

Utilizaram-se dois lotes de grãos de amendoim no experimento. O primeiro lote, com teor de água em torno de 10,0% (b.u.) e que apresentava elevada contagem de fungos totais e de fungos potencialmente aflatoxigênicos, foi utilizado na avaliação do efeito fungicida do gás ozônio. O segundo lote, com teor de água em torno de 6,6%, foi utilizado na avaliação qualitativa do produto exposto ao ozônio.

Na ozonização dos grãos foram utilizadas amostras de 300 g, adotando-se a concentração do gás equivalente a 3.960 ppm, e valores de umidade relativa de 75%, por períodos de exposição ao gás de 0, 120 e 240 min. Para a obtenção do valor de umidade relativa (UR) desejado, após a geração do gás, a mistura gasosa passou por solução saturada de Cloreto de Sódio (NaCl, 75% de UR), seguindo metodologia proposta por OZKAN et al. (2011).

Nas análises microbiológicas dos grãos de amendoim ozonizados foi utilizado o método de diluição em placas (PITT e HOCKING, 2009). No método de diluição em placas, 25 g de grãos foram previamente diluídos em 225 mL de água peptonada a 0,1%. Para a quantificação de fungos totais nos grãos de amendoim, tanto no método de diluição em placas quanto no de plaqueamento direto, utilizou-se o meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) acidificado com ácido tartárico a 10%, tendo sido as placas incubadas por 5 dias em câmaras climáticas a 25 °C (DOWNES e ITO, 2001). Para a quantificação das espécies potencialmente aflatoxigênicas, *A. flavus* e *A. parasiticus*, foi utilizado o meio de cultura *Aspergillus flavus* e *parasiticus* Agar (AFPA), e as placas incubadas por 42 h a 30 °C (PITT et al., 1983). Os resultados foram obtidos em termos de unidades formadoras de colônias por grama (UFC g⁻¹).

Na avaliação de possíveis alterações qualitativas nos grãos em função da exposição ao gás ozônio, analisou-se a qualidade dos grãos, pelas variáveis: teor de água e condutividade elétrica, e do óleo bruto extraído do amendoim ozonizado, pelas variáveis teor de ácidos graxos livres, índice de peróxido e índice fotométrico de cor.

Para determinação do teor de água dos grãos de amendoim, utilizou-se o método de estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 130±1 °C, por 6 h, conforme recomendações da ASAE (2002), método S401.1. A condutividade elétrica da solução contendo os grãos de amendoim foi feita utilizando-se o “Sistema de Copo” ou “Condutividade de Massa” (VIEIRA et al., 2001).

O óleo bruto foi obtido de acordo com as normas AOCS (1993), método Ac 3-44, em aparelho de soxhlet, durante 6 h, utilizando éter de petróleo como solvente. As variáveis qualitativas do óleo bruto teor de ácidos graxos livres e índice de peróxido foram avaliadas de acordo com as normas AOCS (1993), Métodos Ca 5a-40 e Cd 8-53, respectivamente.

O experimento será realizado no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Com relação aos dados referentes às variáveis qualitativas, inicialmente realizou-se análise de variância a 5% de probabilidade e, posteriormente, teste de média (Teste de Tukey), quando obtida diferença significativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios de contagem log(UFC g⁻¹) de fungos totais e de fungos potencialmente aflatoxigênicos *A. flavus* e *A. parasiticus* em grãos de amendoim ozonizados, na concentração de 3.960 ppm, na temperatura de 25 °C, por até 4 horas.

Verificou-se reduções de 1,75 e 2,45 ciclos log na contagem de fungos totais nos grãos ozonizados por 120 e 240 min, respectivamente. Com relação à contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos *A. flavus* e *A. parasiticus*, obteve-se redução máxima de 3,08 ciclos log para grãos ozonizados por 240 min.

TABELA 1. Valores médios de log (UFC g⁻¹) para fungos totais e fungos potencialmente aflatoxigênicos referentes aos grãos de amendoim ozonizados na concentração de 3.960 ppm, na temperatura de 25 °C, por até 240 min

Tempo de ozonização (min)	Contagem log(UFC g ⁻¹)	
	Fungos totais	<i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>
0	6,58	6,57
120	4,83	4,65
240	4,13	3,49

Os resultados obtidos referentes à redução na contagem de fungos totais e de *A. flavus* e *A. parasiticus* nos grãos de amendoim ozonizados podem ser atribuídos ao alto poder oxidativo do gás ozônio. CICCARESE et al. (2007) também observaram redução significativa da infecção fúngica em grãos de trigo, aveia e ervilha devido à exposição ao gás ozônio. Dentre os fungos avaliados por esses autores, destacam-se os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Fusarium*. ALENCAR et al. (2012) obtiveram decréscimo na contagem de *A. flavus* e *A. parasiticus* de aproximadamente 3 ciclos log quando os grãos de amendoim foram ozonizados na concentração de 9.828 ppm e período de exposição de 96 h. Entretanto, esse autores não aumentaram a umidade relativa da mistura gasosa depois da geração do ozônio. Destaca-se que umidade relativa é um parâmetro que afeta a eficácia do ozônio como agente antimicrobiano (OZKAN et al., 2011). Maiores valores de umidade relativa possibilita maior eficácia do ozônio na inibição dos microrganismos.

A inativação ou inibição do desenvolvimento de microrganismos pelo ozônio, a partir da oxidação de componentes celulares vitais, é um processo complexo, em que o gás atua sobre constituintes da membrana e da parede celular, como os ácidos graxos insaturados; assim como elementos do conteúdo celular, como enzimas e ácidos nucléicos. Os microrganismos são inativados pelo rompimento da célula, em decorrência da ação do ozônio molecular ou dos radicais livres gerados durante a decomposição do gás (GUZEL-SEYDIM et al., 2004; PASCUAL et al., 2007; CULLEN et al., 2009).

Apresentam-se, na Tabela 2, os valores médios referentes às variáveis qualitativas dos grãos, teor de água e condutividade elétrica dos grãos, e do óleo bruto, teor de ácidos graxos livres e índice de peróxido. A qualidade dos grãos não foi afetada significativamente ($p > 0,05$) pela exposição ao ozônio, na concentração de 3.960 ppm, por até 240 min, de acordo com as variáveis teor de água e condutividade elétrica. Da mesma forma, as variáveis qualitativas do óleo bruto extraído dos grãos ozonizados não variaram significativamente ($p > 0,05$) em decorrência da ozonização. Resultados semelhantes foram obtidos por ALENCAR et al. (2011) que ozonizaram grãos de amendoim nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹, por até 96 h. AKBAS e OZDEMIR (2004) também não observaram aumento do percentual de ácidos graxos livres no óleo bruto extraído de pistaches ozonizados nas concentrações de 5,0, 7,0 e 9,0 mg L⁻¹, por períodos de exposição de até 420 min. FARONI et al. (2007) ozonizaram grãos de milho, na concentração de 50 ppm, por até 168 h, e não observaram incremento do índice de peróxido do óleo bruto.

Tabela 2. Valores médios de teor de água, condutividade elétrica (CE), teor de ácidos graxos livres (AGL) e índice de peróxido (IP), referentes aos amendoins ozonizados na concentração de 3.960 ppm, na temperatura de 25 °C, por até 4 horas

Tempo de ozonização (min)	Teor de água (%) b.u.	CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)	AGL (%)	IP (meq kg^{-1})
0	6,58	56,31	1,04	2,51
120	6,53	54,45	1,04	3,37
240	6,60	55,05	0,94	3,30

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, nas condições adotadas no trabalho, permitiram concluir que o ozônio é capaz de provocar redução de até 3 ciclos log em contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos. Além disso, a exposição ao ozônio não afeta a qualidade dos grãos de amendoim e do óleo bruto dos grãos, sendo uma importante alternativa no controle de fungos, incluindo os potencialmente aflatoxigênicos, em grãos de amendoim.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAPDF e DPP/UnB pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- ABDULKADAR, A.H.W.; AL-ALI, A., AL-JEDAH, J. Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. *Food Control*, v.11, p.157-160, 2000.
- AKBAS, M.Y.; OZDEMIR, M. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. *Food Microbiology*, v.25, p.386–391, 2008.
- ALENCAR, E.R.; FARONI, L.R.D.; SOARES, N.F.F.; CARVALHO, M.C.S.; PEREIRA, K.F. Effect of the ozonization process on the quality of peanuts and crude oil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.15, p.154-160, 2011.
- AOCS. Official methods and recommended practices. 4^a ed. Champaign: AOCS, 1993. 2 v.
- ASAE. Moisture measurement - Peanuts. p. 600-601. In: Standards, 2002. St. Joseph: American Society of Agricultural Engineers.
- 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, Proceedings... 2007. Valência: International Ozone Association.
- COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. (Eds.). *Mycotoxins and phytoalexins*. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.103-144.
- CRAUFURD, P.Q.; PRASAD, P.V.V.; WALIYAR, F.; TAHERI, A. Drought, pod yield, pre-harvest *Aspergillus* infection and aflatoxin contamination on peanut in Niger. *Field Crops Research*, v.98, p.20–29, 2006.
- CULLEN, P.J.; TIWARI, B.K.; O'DONNELL, C.P.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. *Trends in Food Science & Technology*, v.20, p.125-136, 2009.
- DESHPANDE, S.S. *Handbook of Food Toxicology*. New York: Marcel Dekker, 2002. 920p.
- DOWENS, F.P.; ITO, K. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: American Public Health Association, 676p. 2001.
- FARONI, L.R.D.; PEREIRA, A.M.; SOUSA, A.H.; SILVA, M.T.C.; URRICHI, W.I. Influence of corn grain mass temperature on ozone toxicity to *Sitophilus zeamais* (Coleoptera:

Curculionidae) and quality of oil extracted from ozonized grains. In: IOA Conference and Exhibition. 2007, Valência, Espanha. Proceedings... Valência, Espanha: 2007. v.1, p.1-6.

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

KHADRE, M.A.; YOUSEF, A.E.; KIM, J.G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. *Journal of Food Science*, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001.

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

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

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

OSKAN, R.; SMILANICK, J.L.; KARABULUT, O.A. Toxicity of ozone gas to conidia of *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, and *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, v.60, p.47-51, 2011.

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

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

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

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

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

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

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