



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

# IJDR

International Journal of Development Research

Vol. 10, Issue, 08, pp. 39556-39562, August, 2020

<https://doi.org/10.37118/ijdr.19668.08.2020>



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

## OZONIZAÇÃO DE CASTANHAS DE CAJU E DO BRASIL PARA O CONTROLE DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Midian Nikel Alves de Souza<sup>1</sup>, Gisele Herbst Vazquez<sup>2</sup>, Juliana Heloisa Pinê Américo-Pinheiro<sup>2</sup> and Danila Fernanda Rodrigues Frias<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Discentado Programa de Mestrado em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, Campus Fernandópolis.

<sup>2</sup>Docente titular do Programa de Mestrado em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, Campus Fernandópolis

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 11<sup>th</sup> May 2020

Received in revised form

15<sup>th</sup> June 2020

Accepted 20<sup>th</sup> July 2020

Published online 30<sup>th</sup> August 2020

#### Key Words:

Fungicida, Micotoxinas,  
Ozônio,  
Segurança dos Alimentos.

#### \*Corresponding author:

Danila Fernanda Rodrigues Frias

### ABSTRACT

**Resumo:** A contaminação de castanhas por fungos produtores de micotoxinas é considerado um grave problema de saúde pública. **Objetivo:** Avaliar o efeito fungicida do ozônio contra fungos filamentosos isolados de castanhas de caju e do Brasil. **Metodologia:** Utilizou-se 10 amostras de castanhas comercializadas a granel. A pesquisa de fungos foi realizada por meio do método de diluição seriada e plaqueamento em ágar Batata Dextrose. A identificação dos gêneros foi realizada pela observação das características macroscópicas e micromorfológicas. Para teste da eficácia do ozônio, 25g de castanhas foram diluídas em 225 mL de água peptonada (1%), e foi exposto ao ozônio nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Em cada tempo, alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar Batata Dextrose, para determinação da concentração fungicida mínima. Os dados foram analisados por análise estatística descritiva e inferencial. **Resultados:** A microbiota fúngica foi detectada em todas as amostras analisadas, sendo isolados *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Absidia* e *Rhizopus*. Com a utilização do ozônio pode-se constatar redução média de 96,5% dos fungos em até 30 minutos de exposição. **Conclusão:** A ozonização se mostrou eficiente na inativação de fungos filamentosos e consequentemente, na prevenção da síntese de micotoxinas.

Copyright © 2020, Midian Nikel Alves de Souza et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Midian Nikel Alves de Souza, Gisele Herbst Vazquez, Juliana Heloisa Pinê Américo-Pinheiro et al. "Ozonização de castanhas de caju e do Brasil para o controle de fungos filamentosos", *International Journal of Development Research*, 10, (08), 39556-39562.

### INTRODUCTION

As espécies de fungos produtoras de micotoxinas são encontradas em todas as partes do mundo e podem se desenvolver em inúmeros substratos, e sob variadas condições de temperatura, umidade e pH. Desta forma, as castanhas tornam-se sujeitas à ação desses fungos, durante sua colheita, beneficiamento, transporte e armazenamento, quando em condições satisfatórias para o seu crescimento. As micotoxinas compreendem um conjunto de substâncias tóxicas, produzidas especialmente por espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, que dependendo da quantidade encontrada nos alimentos, causam graves problemas à saúde humana e animal, por serem capazes de induzir efeitos carcinogênicos, hepatotóxicos e mutagênicos. São conhecidos cerca de 400 tipos de micotoxinas, porém apenas algumas são profundamente estudadas.

Dentre elas, as aflatoxinas, produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, por serem consideradas as mais tóxicas (Pinheiro, 2004). Dentre todos os produtos agrícolas produzidos no mundo, sabe-se que cerca de 25% estão contaminados por alguma micotoxina (EMBRAPA, 2007). Os mais suscetíveis à contaminação, especialmente por aflatoxinas, são o amendoim, milho, algodão e castanhas, em especial, a castanha-do-Brasil (COELHO, 2012). Devido a ocorrência de sérios problemas causados pelas micotoxinas, os consumidores estão cada vez mais preocupados com a qualidade do alimento que consomem e acabam exigindo produtos mais seguros e que produzam menor impacto ao meio ambiente e à saúde humana. Assim, a elaboração de legislações, no que se refere aos níveis máximos de micotoxinas permitidos, estão cada vez mais rígidas. Com o objetivo de evitar a contaminação das castanhas por essas toxinas e atender os padrões para consumo e comercialização, é fundamental o controle adequado durante todas as etapas da

produção. No Brasil a Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (ANVISA, 2011). Além da ANVISA, o PNCRC (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes) também inspeciona e fiscaliza as cadeias produtivas de alimento, por meio da verificação da presença e dos níveis de resíduos de substâncias nocivas à saúde do consumidor (BRASIL, 2018). Dentre as novas tecnologias no controle de microrganismos o ozônio é uma alternativa ecologicamente correta e economicamente viável no contexto da manutenção e preservação da qualidade dos produtos de origem vegetal. Isso se deve ao fato do mesmo ser um produto seguro, não deixando resíduos nos alimentos, diferente de outros produtos utilizados na desinfecção (CHIATTONE *et al.*, 2008). Quando comparado a outros agentes oxidantes, o ozônio se destaca por ser o sanitizante que além de potencial de oxidação, pode entrar em contato com alimento. Em relação ao potencial de oxidação só perde para o flúor, dessa forma, sua elevada capacidade de desinfecção e esterilização lhe permitem uma ação sanitizante em menor tempo de contato e concentração (SILVA *et al.*, 2011). Sendo assim, investigações de sua atuação sobre uma grande variedade de microrganismos, na forma de células vegetativas ou esporos, em ambientes industriais e também nos alimentos, têm despertado especial atenção de pesquisadores em todo o mundo (CHIATTONE *et al.*, 2008). Por isso, o objetivo neste trabalho foi avaliar o efeito fungicida do gás ozônio sobre fungos filamentosos presentes em castanhas de caju (*Anacardium occidentale* L.) e do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), visando a oferta de alimentos mais seguros ao consumidor.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Obtenção e preparo das amostras e análises microbiológicas:** Foram adquiridas 10 amostras de castanha de caju e castanha-do-Brasil, sendo 5 de cada tipo, obtidas em todos os pontos que comercializam esses produtos no município de Fernandópolis, São Paulo, no período de outubro a dezembro de 2019, sendo estas vendidas a granel, sem casca. As castanhas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, armazenadas em caixas isotérmicas e transportadas até o laboratório de Microbiologia. A identificação das amostras foi realizada da seguinte forma: de 1 a 5 - castanhas de caju e de 6 a 10 - castanhas-do-Brasil. Para isolamento da microbiota fúngica foi utilizado o método de diluição seriada e plaqueamento. Foram pesados de forma asséptica 25 g de cada amostra de castanha, em seguida foram trituradas manualmente e diluídas em 225 mL de água peptonada a 1%, e depois procederam-se as diluições decimais seriadas consecutivas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ), sendo inoculadas alíquotas de 0,1 mL nas placas de Petri contendo o meio de cultura Agar Batata Dextrose, em triplicata. As mesmas foram incubadas em condições de temperatura controlada em estufa B.O.D. a 25° C por 7 dias.

**Contagem e identificação de fungos filamentosos:** Após o período de incubação, foi realizada a contagem de colônias e a correção pelo fator de diluição, a fim de obter o número de unidades formadoras de colônia por grama de castanha (UFC/g). Visando a identificação dos gêneros de fungos filamentosos, foram observadas as características macroscópicas das colônias (diâmetro, textura, forma, aspecto da superfície e do reverso, pigmentação dos conídios,

produção e cor do exsudado). As estruturas micromorfológicas, foram observadas por meio da confecção de lâminas coradas com Azul de Algodão, onde observou-se em microscópio óptico, com aumento total de 400 vezes estruturas como hifas, corpo de frutificação e esporos.

**Processo de ozonização das castanhas:** Para realização do processo de ozonização, o ozônio foi obtido por meio de um gerador corona (Ozone & Life<sup>®</sup>, MODELO O&L 3.0.RM). O oxigênio puro foi suprido via cilindro de oxigênio. O ozônio produzido de forma constante pelo equipamento foi conduzido por um tubo de silicone para o difusor por meio de pedra porosa, gerando assim 28 mg.L<sup>-1</sup>, em temperatura controlada de 22° C. As amostras de castanhas (25g) assepticamente pesadas e trituradas foram diluídas em 225 mL de água peptonada a 1%. O material diluído foi exposto ao ozônio em diferentes tempos (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos), e em cada intervalo de tempo determinado, alíquotas de 0,1 mL foram retiradas e inoculadas em triplicata, em placas de Petri contendo ágar Batata Dextrose, para determinação da concentração fungicida mínima (CFM). Após a inoculação, as placas foram incubadas em temperatura de 25° C por 7 dias, para realização da quantificação de fungos filamentosos, utilizando-se o método de contagem em placa, com a correção pelo fator de diluição, a fim de obter o número de unidades formadoras de colônia por grama de castanhas (UFC/g).

**Análise estatística:** Após a tabulação dos dados coletados posteriormente a ozonização, foram exercidas duas funções de análises estatísticas: descritiva e inferencial. Dessa forma, de maneira descritiva, foi traçado o perfil da amostra estudada, contemplando as variáveis analisadas e seus desdobramentos. Os dados foram replicados de forma absoluta e relativa. No âmbito inferencial, foi traçado como objetivo estatístico, a análise de independência e predição entre as variáveis propostas no escopo do trabalho. Para isso, utilizou-se, dentro dos padrões esperados, o Teste de T Pareado. Vale ressaltar, que os resultados de independência entre as variáveis propostas, se deram por meio de análise entre os valores de p (significância). Todas estas análises foram obtidas pelo uso do *Software* SPSS Statistics (Versão 23) atreladas às funcionalidades da ferramenta Excel (versão 2.016).

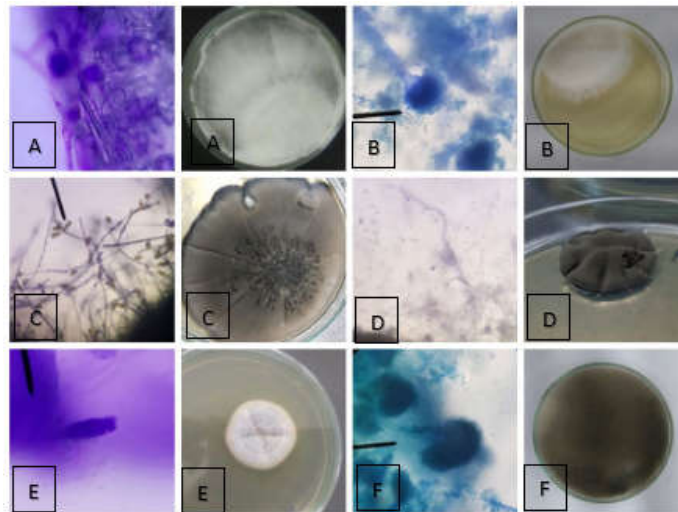
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Isolamento e identificação de fungos filamentosos provenientes de amostras de castanha de caju e castanha-do-Brasil:** A microbiota fúngica foi detectada em todas as amostras analisadas, sendo que em 70% destas, mais de um gênero foi isolado (Tabela 1). Em pesquisa realizada por Lopes *et al.* (2017) também foi detectado 100% das amostras de castanhas contaminadas com fungos filamentosos. A distribuição dos fungos em relação ao tipo de castanha se mostrou semelhante no presente trabalho, com uma leve tendência de maior incidência do fungo *Penicillium* sp nas castanhas-do-Brasil (amostras 6 a 10), como pode ser observado na Tabela 1. Santurio (2000) afirmou que a contaminação depende do tipo de alimentos, já que alguns grãos são substratos mais aptos que outros para o crescimento de determinados fungos. O isolamento e a caracterização morfológica dos fungos filamentosos encontrados revelaram a presença dos seguintes gêneros: *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Cladosporium* sp, *Curvularia* sp, *Absidia* sp e *Rhizopus* sp (Figura 1).

**Tabela 1. Gênero de fungosfilamentosos, por amostra, isolados de castanha de caju e castanha-do-Brasil comercializadas a granel no município de Fernandópolis, São Paulo, 2019**

AMOSTRA	GÊNERO ISOLADO
1	<i>Aspergillus</i> sp.
2	<i>Aspergillus</i> sp.; <i>Cladosporium</i> sp.
3	<i>Penicillium</i> sp.; <i>Aspergillus</i> sp.
4	<i>Curvularia</i> sp.; <i>Cladosporium</i> sp.; <i>Aspergillus</i> sp.
5	<i>Aspergillus</i> sp.; <i>Cladosporium</i> sp.
6	<i>Curvularia</i> sp.; <i>Cladosporium</i> sp.; <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.
7	<i>Absidia</i> sp.
8	<i>Penicillium</i> sp.; <i>Aspergillus</i> sp.; <i>Cladosporium</i> sp.
9	<i>Penicillium</i> sp.; <i>Rhizopus</i> sp.
10	<i>Penicillium</i> sp.

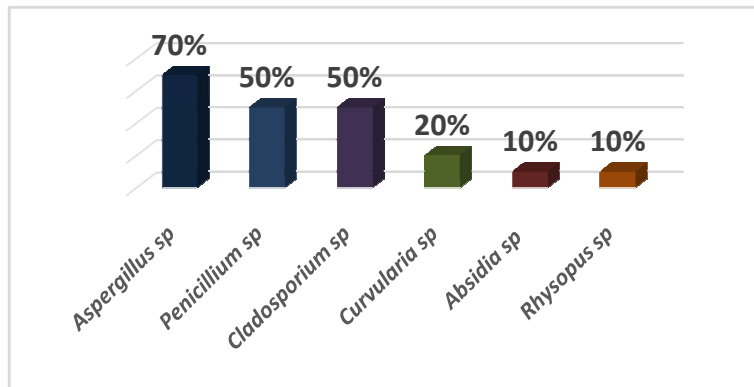
Fonte: Elaborada pelos autores



Legenda: \*A: *Absidia* sp.; B: *Aspergillus* sp.; C: *Curvularia* sp.; D: *Cladosporium* sp.; E: *Penicillium* sp.; F: *Rhizopus* sp. Obs: As micrografias, que estão à esquerda da cultura vista a olho nu, possuem aumento total de 400X.

Fonte: Elaborada pelos autores

**Figura 1. Gêneros de fungosfilamentosos isolados em castanhas-do-Brasil e de caju comercializadas a granel no município de Fernandópolis, São Paulo, 2019**



Fonte: Elaborada pelos autores

**Figura 2. Gêneros de fungosfilamentosos em porcentagem média de isolamento encontrado em castanhas-do-Brasil e de caju comercializadas a granel no município de Fernandópolis, São Paulo, 2019**

**Tabela 2. Valores médios referentes à contagem (UFC/g) de fungosfilamentosos presentes em castanha de caju e castanha-do-Brasil comercializadas a granel no município de Fernandópolis, submetidas ao tratamento com ozônio, 2019.**

		AMOSTRAS									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TEMPO	0	2000 A	2000 A	100 A	700 A	601 A	81 A	200 A	701 A	100 A	5 A
	5	2 B	2 B	75 A	1 B	1 B	20 B	50 B	10 B	7 B	3 A
	10	1 B	2 B	2 B	1 B	1 B	2 C	48 B	3 C	1 C	2 A
	15	1 B	2 B	2 B	1 B	1 B	1 C	45 BC	1 C	1 C	1 A
	20	1 B	1 B	1 B	1 B	1 B	1 C	36 CD	1 C	1 C	1 A
	25	0 B	0 B	1 B	0 B	0 B	1 C	30 DE	1 C	1 C	1 A
	30	0 B	0 B	1 B	0 B	0 B	1 C	24 E	1 C	1 C	1 A
	Média	340,48	316,14	41,1	100,62	102,14	12,52	61,86	101,24	3,14	2
	DP	703,18	707,96	36,53	250,9	212,23	28,68	58,9	250,77	3,58	1,58
	CV	206,53%	223,94%	88,89%	249,35%	207,78%	228,96%	95,22%	247,70%	113,96%	79,06%

Legenda: \*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas na contagem microbiana, relacionada aos minutos de exposição ao ozônio quando comparados pelo Teste de T pareado a p<0,05.

Fonte: Elaborada pelos autores

**Tabela 3. Evolução do tratamento com o gás ozônio, mensurado em porcentagem, de amostras de castanhas-do-Brasil e de caju comercializadas a granel no município de Fernandópolis, São Paulo, 2019**

	A1 (%)	A2 (%)	A3 (%)	A4 (%)	A5 (%)	A6 (%)	A7 (%)	A8 (%)	A9 (%)	A10 (%)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	0,1	0,1	75	0,14	0,16	24,7	25	1,4	7	60
10	0,05	0,1	2	0,14	0,16	2,5	24	0,4	1	40
15	0,05	0,1	2	0,14	0,16	1,25	22,5	0,14	1	20
20	0,05	0,05	1	0,14	0,16	1,25	18	0,14	1	20
25	0	0	1	0	0	1,25	15	0,14	1	20
30	0	0	1	0	0	1,25	12	0,14	1	20

Fonte: Elaborada pelos autores

A Figura 2 apresenta a microbiota em porcentagem média de isolamento, ressaltando que em 70% das amostras mais de um gênero fúngico foi isolado. De acordo com a prevalência de fungos filamentosos isolados das amostras analisadas, em 70% isolou-se o gênero *Aspergillus* sp, em 50% *Penicillium* sp e o mesmo para *Cladosporium* sp. Resultados semelhantes foram encontrados por Calderari (2011), que analisou amostras de amêndoas e cascas de castanha do Brasil, coletadas em diferentes etapas de processamento no Estado do Amazonas. Em ambas as amostras coletadas (amêndoas e cascas) os gêneros mais frequentes foram: *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor*. Martins Junior et al. (2011), estudando a microbiota do ouriço (fruto) e da amêndoa (semente) com casca e sem casca, oriundos de castanheiras do estado do Amapá, isolaram também com maior incidência o gênero *Aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp.). É importante ressaltar que esse gênero tem representantes produtores de aflatoxinas, que podem desencadear, por efeito cumulativo, processos carcinogênicos tanto no ser humano como em animais (PITT & HOCKING, 2009; MARTINS JUNIOR et al., 2011; SILVA et al., 2015; LOPES et al., 2017). De acordo ainda com Pitt & Hocking (2009) algumas espécies de *Penicillium* são importantes produtoras de micotoxinas, como a patulina, encontrada frequentemente em frutas e a citrinina em cereais utilizados para alimentação animal.

Moreira et al. (2016) investigando a presença de aflatoxinas em 23 amostras de castanha-do-Brasil, comercializadas na cidade de Fortaleza, em 2013, identificaram por meio de caracterização morfológica as seguintes espécies: *Aspergillus flavus* (21,4 %), *Aspergillus niger* (21,4 %), *Mucor* sp (14,3%), *Cladosporium sphaerospermum* (14,3%), *Cladosporium cladosporioides* (7,1 %), *Fusarium* sp (7,1%), *Aspergillus terreus* (7,1%). Desta forma, como no presente trabalho, os gêneros *Aspergillus* e *Cladosporium* estão entre os mais frequentes. O gênero *Cladosporium*, isolado de 50% das amostras nesta pesquisa, é normalmente encontrado como contaminante e agente de deterioração nos alimentos ou produtos industriais (GUTAROWSKA, 2014). Para os seres humanos e animais, nem todas as cepas são patogênicas, entretanto algumas podem provocar ocasionalmente feohifomicose cutânea e cerebral independentemente do estado imunitário do hospedeiro (SOUMAGNE et al., 2015). Pesquisa realizada por Rodrigues (2016) também corroborou com o presente trabalho. Avaliando amêndoas de castanha-do-Brasil, o autor identificou os gêneros *Aspergillus* spp. (87,55 %), *Rhizopus* spp. (3,07 %), *Penicillium* spp. (6,86%), *Curvularia* spp. (1,62%), *Paecilomyces* spp. (0,36%), *Trichoderma* spp. (0,18%), *Acremonium* spp. (0,18%) e *Verticillium* spp. (0,18%). *Rhizopus* spp. e *Curvularia* spp. foram isolados com prevalência mais baixa, assim como nessa pesquisa.

Os fungos do gênero *Rhizopus* são considerados seguros para uso alimentar e são comumente utilizados na Ásia para produzir produtos alimentícios, e por sua capacidade de produção de compostos fenólicos (RANDHIR & SHETTY, 2007). Os fungos do gênero *Curvularia* spp, são amplamente distribuídos ao redor do mundo, associados a espécies vegetais, na forma saprofítica, endofítica ou como parasita (MOURÃO et al., 2017). Maia (2014), avaliando o efeito da doença oídio na qualidade da castanha e amêndoa de caju, encontrou esse gênero nas amostras analisadas, indicando relação com a referida doença, que nos últimos anos vem provocando graves perdas para a cultura do cajueiro. A contaminação das castanhas por esse fungo pode estar relacionada desse modo com as etapas de pré-colheita, já que o mesmo foi associado a essa fitopatologia na referida cultura.

Observou-se no presente trabalho uma possível relação entre a alta ocorrência de fungos filamentosos nas castanhas (positividade em 100% das amostras) com a forma com que são comercializadas, pois nos locais de venda de produtos naturais e supermercados em que foram adquiridas, as mesmas estavam em constante contato e manipulação, já que são vendidas a granel. De acordo com a Instrução Normativa nº 13 de 27/05/2004/MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) as castanhas podem ser vendidas a granel, portanto, como qualquer outro alimento, deve-se atender as condições higiênicas-sanitárias especificadas na portaria nº 326 de 30 de julho de 1997 da Vigilância sanitária, visando a proteção da saúde da população (BRASIL, 2002; BRASIL, 2004). Mesmo observando essas condições, o risco de contaminação existe, pois, o manuseio constante do local onde as mesmas são acondicionadas e a exposição dos pegadores do produto são fatores críticos.

**Avaliação do efeito do ozônio frente aos fungos filamentosos isolados de castanha de caju e castanha-do-Brasil:** Os valores médios da quantificação de fungos filamentosos nas castanhas frente ao tratamento com ozônio nos períodos de exposição 0; 5; 10; 20; 25 e 30 minutos estão apresentados na Tabela 2, respectivamente. Os resultados apresentados na Tabela 02 sugerem uma contaminação inicial maior (UFC/g) nas amostras de castanha-de-caju (1 a 5). Segundo Lima (2013), as amêndoas de castanha-de-caju apresentam problemas de estabilidade durante o armazenamento, sendo que o desenvolvimento de microrganismos pode ocorrer em função do aumento de umidade. Para minimizar tal circunstância, deve-se utilizar embalagens adequadas, que limitem a absorção de umidade do ambiente. Esse procedimento, porém, não foi realizado nas amostras analisadas neste trabalho, pois eram comercializadas a granel. Observou-se nas amostras 1; 2; 4; 5; 6; 7; 8 e 9 (Tabela 2) redução significativa na contagem de fungos filamentosos após 5 minutos de exposição ao ozônio, diferentemente das amostras 3 e 10 que não apresentaram tal redução. Um fato importante a salientar é que para as amostras

1; 2; 4 e 5 que possuíam fungos dos gêneros *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp. e *Aspergillus* sp., o ozônio apresentou ação fungicida após 25 minutos de exposição, porém, com 5 minutos já apresentou ação fungistática por não apresentar diferença significativa na quantidade de colônias entre os tempos seguintes. Vijayanandrajet *et al.* (2006), estudando o efeito do ozônio sobre *Aspergillusniger*, notaram alterações na morfologia do fungo, sendo que os conídios tratados com ozônio, produziram colônias não-esporulantes, fato este que pode explicar o efeito fungicida do ozônio frente a este gênero nesse trabalho. Realizando testes *in vitro*, Silva & Venâncio (2008) avaliaram a sensibilidade de *A. flavus* e *A. parasiticus* ao ozônio e obtiveram resultados semelhantes a esta pesquisa pois as taxas de inativação dos fungos variaram entre 98 e 100%, para as concentrações de 10 e 20 mg.L<sup>-1</sup> de ozônio em tempo de exposição de 10 minutos. Os autores concluíram dessa forma que o ozônio é eficaz no controle de conídios das estirpes testadas. Hsieh *et al.* (1998) relataram a eficácia de água ozonizada para o controle do fungo *Curvulariapallescens* por meio da inibição da germinação de seus esporos. Já Hudson & Sharma (2009), constataram o efeito fungicida do ozônio frente a alguns gêneros fúngicos, dentre eles o *Cladosporium* sp. Com relação as amostras 3; 6; 8 e 9 cujos gêneros de fungos isolados foram *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp e *Rhizopus* sp., o ozônio apresentou efeito fungistático após 10 minutos de ação, porém sem apresentar efeito fungicida, pois não ocorreu inibição total do crescimento fúngico. A colônia que não foi afetada pelo ozônio foi identificada como fungo do gênero *Penicillium* sp, comprovando novamente a ação fungicida do ozônio frente aos outros gêneros presentes. Esses resultados corroboram com de outros autores como Pascual *et al.* (2007) que relataram a sensibilidade de microrganismos ao ozônio e a tolerância maior dos esporos fúngicos do que as células vegetativas. Segundo Naito & Takahara (2006) isso ocorre provavelmente em função da estrutura da parede e da membrana celular. Provavelmente característica presente no gênero *Penicillium* sp.

Corroborando com o resultado nessa pesquisa, Silva (2011), ao ozonizar grãos de trigo, à concentração de 0,54 mg.L<sup>-1</sup>, por período de 100 h, não obteve resultados significativos de efeito fungicida, em relação à inativação de esporos de *Penicillium* sp. Assim como Beber-Rodrigues (2013) que também verificou redução na quantidade total de fungos, mas a resistência do gênero *Penicillium* sp. Brito Júnior (2013) destacou que em seu trabalho com grãos de arroz ozonizados, nem todos os esporos fúngicos deixaram de germinar, contudo produziram colônias de tamanho bastante reduzido, esparsas e com baixo vigor. Mesmo o ozônio não apresentando efeito fungicida frente ao *Penicillium* sp., esse fator não inviabiliza o respectivo tratamento, pois apenas uma UFC permaneceu na amostra. A legislação não indica a quantidade mínima permitida dos fungos filamentosos em castanhas, apenas a quantidade de micotoxinas que os mesmos podem produzir. A quantidade de micotoxina presente nas amostras de castanhas analisadas nesse trabalho não foi pesquisada, porém, Sahabet *et al.* (2013) afirmaram que a exposição das castanhas a 40 ppm de ozônio por 10 minutos causa degradação significativa das aflatoxinas, indicando assim o uso do ozônio para descontaminação de sementes contaminadas. A amostra 7, cujo gênero fúngico isolado foi *Absidia* sp foi a que apresentou maior resistência ao ozônio, pois ocorreu diminuição significativa de colônias após 5 minutos de exposição, porém o número manteve-se constante com pouca variação até os 30

minutos finais do tratamento, sem apresentar efeito fungicida. De acordo com Khadreet *et al.* (2001), a inativação dos microrganismos durante a ozonização ocorre a partir da oxidação de constituintes da parede, membrana e componentes do conteúdo celular, podendo ocorrer sua lise durante a exposição a esse gás. Dentre os compostos capazes de serem oxidados pelo ozônio tem-se ácidos graxos poli-insaturados, polissacarídeos, enzimas e componentes nucleicos, como as bases timina e citosina. Pascual *et al.* (2007) também destacaram que o ozônio molecular e/ou radicais gerados durante sua decomposição podem atuar no processo de oxidação desses componentes celulares. Dessa forma, notou-se que o gênero *Absidia* sp. demonstrou-se resistente aos mecanismos de ação do ozônio. Em relação ao gênero *Absidia*, algumas espécies como *A. corymbifera* e *A. Nidulans* são descritas como agentes de infecções, podendo causar a zigomicose em pessoas imunodeprimidas, como pacientes com Aids, neutropênicos, transplantados e leucêmicos e ainda, infecção pulmonar em humanos e animais. A segunda espécie citada é produtora de esterigmatocistina, uma micotoxina hepatocarcinogênica que inibe a síntese de DNA (Hooget *et al.*, 2004).

A contaminação das castanhas por esses fungos está associada principalmente as etapas de pré-colheita e armazenamento, já que os mesmos estão associados ao solo e excrementos de animais herbívoros, como também a alimentos estocados (Alves, 2016). A Tabela 3 apresenta uma análise descritiva da evolução do tratamento com ozônio. Esta tabela contém a porcentagem de fungos que se manteve viável a cada tempo de exposição, considerando-se o tempo 0 como 100% de UFC viáveis. A partir da análise dos resultados apresentados na Tabela 3, pode-se constatar que houve redução média de fungos filamentosos com a utilização do ozônio em concentração de 28 mg.L<sup>-1</sup>, por tempo máximo de 30 minutos em 96,5% das UFC. Este tempo máximo foi escolhido com o propósito de viabilizar o uso desse método de descontaminação, pois o tempo muito prolongado pode ser visto como impedimento a adoção desse procedimento, além de induzir a uma possível alteração na qualidade do produto final. Quanto a concentração do ozônio utilizada no tratamento, foi baseada em outros trabalhos semelhantes a este, levando-se em consideração que uma concentração maior tende a exigir um tempo de exposição menor. Oliveira (2018), avaliando a cinética de decomposição do ozônio e seu efeito fungicida na castanha-do-Brasil chegou à conclusão de que concentração inicial do ozônio influencia o tempo de saturação do meio contendo a castanha. À medida que se eleva a concentração inicial do gás, ocorre decréscimo linear do tempo de saturação e aumento linear da concentração de saturação.

Outros estudos também confirmam a eficiência do ozônio como agente fungicida. Alencar *et al.* (2012) comprovaram esse fato em grãos de amendoim, com inativação do fungo *Aspergillus spp.*, reduzindo aproximadamente 3,0 ciclos log na concentração de 21 mg.L<sup>-1</sup>, por 96 h. Brito Júnior (2013) constatou uma redução de 78,5 e 98,0% no índice de ocorrência de *Penicillium spp* e *Aspergillus spp* em grãos de milho submetidos a ozonização à concentração de 2,14 mg.L<sup>-1</sup>, por um período de 50h, além disso, houve também redução em 2,0 ciclos log na contagem de outros fungos filamentosos e leveduras. Oliveira (2018) realizou um estudo que obteve expressiva redução na contagem de *Aspergillus flavus* em castanhas-do-Brasil, ozonizadas nas concentrações de 8,88 e 13,24 mg.L<sup>-1</sup>, em período de exposição de 240 min. A redução

nessas condições foi superior a 3,1 ciclos log., dessa forma, o ozônio demonstrou eficácia na inativação de microrganismos potencialmente aflatoxigênicos. Como as amostras coletadas para essa pesquisa estavam sendo comercializadas a granel, sugere-se que os pontos de comercialização das castanhas, tratassem as mesmas com o ozônio e as embalsassem à vácuo posteriormente, para garantir assim um produto de melhor qualidade, já que esse desinfetante tem se mostrado muito eficiente na inativação de espécies aflatoxigênicas e também na degradação de micotoxinas, como constatado neste trabalho e já relatado por outros autores (SILVA & VENÂNCIO, 2008; TIWARI & MUTHUKUMARAPPAN, 2012; BRITO JÚNIOR, 2013; SAHAB *et al.*, 2013). É importante destacar que para o uso eficaz e seguro no processamento de alimentos, a concentração de ozônio, tempo de exposição e outras condições de tratamento, devem ser definidos para cada produto, com avaliações preliminares antes do início de sua aplicação comercial (COELHO *et al.*, 2015).

## Conclusão

Conclui-se que as amostras de castanhas apresentaram alto índice de contaminação por fungos filamentosos, pois todas as amostras continham pelo menos um gênero fúngico. Desta forma, representam risco potencial a saúde pública, já que alguns gêneros encontrados são possíveis produtores de micotoxinas. A alta incidência destes fungos nas castanhas demonstra a importância do monitoramento dos mesmos em toda a sua cadeia produtiva, até a comercialização. A adoção de boas práticas devem ser realizadas e podem auxiliar na redução de espécies toxigênicas, assim como a legislação deve ser mais criteriosa, discriminando valores limites desses fungos nas castanhas, não apenas das toxinas que os mesmos podem produzir. Estudos com esse cunho chamam a atenção para uma reflexão quanto à atuação da vigilância sanitária e demais órgãos competentes que objetivem o controle sanitário dos gêneros alimentícios destinados ao consumo humano, bem como para a sensibilização da sociedade quanto à segurança alimentar, principalmente quando se refere a um alimento tão apreciado pela população. Os resultados desta pesquisa também demonstraram que o ozônio se mostrou eficiente na inativação dos gêneros de fungos filamentosos. Assim, a ozonização é uma técnica efetiva e segura que pode atuar na descontaminação das castanhas e conseqüentemente, na prevenção da síntese das micotoxinas. Por fim, sugere-se que os pontos de comercialização das castanhas, principalmente as vendidas a granel, utilizem a técnica de ozonização nas mesmas e posteriormente as embalem à vácuo, garantindo assim um produto de melhor qualidade e segurança alimentar para o consumidor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alencar, E.R., Faroni, L.R.A., Soares, N.F.F., Silva, W.A., e Carvalho, M.C.S. 2012. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.92, n.4, pp.899–905.
- Alves, A. L. S. M. 2016. Diversidade de mucorales em solos de brejo de altitude do semiárido de Pernambuco. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.
- Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2011). Resolução RDC Nº7 de 18 de fevereiro de 2011. Diário Oficial da União. n. 37, seção 1, 22 de fevereiro de 2011.
- Beber-Rodrigues, M. 2013. Efeito do gás ozônio na qualidade micotoxicológica de arroz (*Oryza sativa* L.) em casca durante a armazenagem. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2004). Instrução Normativa nº 13, de 30 de Novembro de 2004. D.O.U. de 01/12/2004.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2002). Portaria no 326, de 30 de julho de 1997. D.O.U. n 206, de 23/10/2002, Seção 1, pág. 126.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2018). Instrução Normativa nº 20, de 26 de julho de 2018. DOU de 31/07/2018.
- Brito Júnior, J.G. (2013). Ozônio como agente fungicida e seu efeito na qualidade dos grãos de milho. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Brasil.
- Calderari, T.O. (2011). Biodiversidade de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em castanha do Brasil. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- Chiattone, P. V., Torres, L. M., eZambiasi, R. C. (2008). Application of ozone in industry of food. *Alimentos e Nutrição*, v.19, pp.341-349.
- Coelho, C. C.S., Freitas-Silva, O., Campos, R. S., Bezerra, V.S., e Cabral, L. M. C. (2015). Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.19, n.4, pp.369–375.
- Coelho, E. A. A. (2012). Efeitos da radiação gama e feixe de elétrons sobre amostras de castanhas-do-Brasil inoculadas artificialmente com *Aspergillus flavus*. Dissertação (Mestre em Ciências). Universidade de São Paulo, Brasil.
- Embrapa. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2007). *Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal*. Fortaleza, Brasil, 48 p.
- Gutarowska, B. (2014). Moulds in biodeterioration of technical materials. *Folia Biologica et Oecologica*, v.10, n.1, pp. 27–39.
- Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J., e Figueras, M. J. (2004). *Atlas of clinical fungi*. 2. ed. Washington: ASM Press, EUA.
- Hsieh, S.P.Y., Ninq, S.S., e Tzeng, D.S. (1998). Control of turf grass seedborne pathogenic fungi by ozone. *Plant Pathology Bulletin*, v.7, pp.105-112.
- Hudson, J.B., e Sharma, M. (2009). The practical application of ozone gas as an anti-fungal (anti-mold) agent. *Ozone-Science & Engineering*, v.31, n.4, pp.326-332.
- Khadre, M. A., Yousef, A. E., e Kim, J. G. (2001). Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *Journal of Food Science*, v. 66, n. 9, pp. 1242–1252.
- Lima, J. R. (2013). Valor nutricional da amêndoa de castanha-de-caju e seu processamento e embalagem. In: Araújo, J. P. P. de (Ed.). *Agronegócio caju: práticas e inovações*. Brasília, DF: Embrapa, parte 6, cap. 2, pp. 389-393.
- Lopes, L.O., Anjos, V.G., e Vasconcelos, V.M.S. 2017. Fungos em castanhas de caju comercializadas por ambulantes em Teresina-PI: uma análise microbiológica. *Revista Interdisciplinar*, v. 10, n. 4, pp. 105-111.
- Maia, L. K. R. 2014. Influência do oídio no fruto de cajueiro anão. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia). Universidade Federal do Ceará, Brasil.
- Martins Junior, P.O., Sousa, V.Y.K., Correia, A.F., Mata, E.C.G., eKanzaki, L.I.B. (2011). Fontes de



- contaminação microbiana da castanha-do-pará. Amazônia. Ciência & Desenvolvimento, v. 6, n. 12.
- Moreira, M. F., Oliveira, T. R., Vieira, I. G. P., Freire, F. C. O., Silva, S.C., e Ribeiro, L. M. (2016). Occurrence of fungi and aflatoxins B in nuts and products marketed the Brazilian northeastern regions. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.75, pp.01-06.
- Mourão, D. S. C., Ságio, S. A., Souza, M. R., e Santos, G. R. (2017). Identificação morfológica e molecular de *Curvularia* sp. agente causal da mancha foliar do milho. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.16, n.1, pp. 1-12.
- Naito, S., e Takahara, H. (2006). Ozone contribution in food industry in Japan. Ozone: Science & Engineering, v.28, n.6, pp.425-429.
- Oliveira, J.M. (2018). Cinética de decomposição do ozônio, efeito fungicida e na qualidade de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de Brasília, Brasil.
- Pascual, A., Llorca, I., e Canut, A. (2007). Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. Food Science & Technology, v.18, pp.29-35.
- Pinheiro, M. (2004). Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* como base para o desenvolvimento de PCR multiplex para a detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha-do-brasil e castanha-de-caju. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas, Genética Molecular e de Populações, Biotecnologia Molecular). Universidade Católica de Brasília, Brasil.
- Pitt, J.I., e Hocking, A.D. (2009). Fungi and Food Spoilage. 3<sup>a</sup> ed. Springer: US.
- Randhir, R., e Shetty, K. (2007). Mung beans by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. Innovative Food Science Emerging Technologies, v.8, n.2, pp.197-204.
- Rodrigues, K.S. (2016). Ocorrência de fungos com potencial toxigênico em castanha-do-Brasil no Estado de Roraima. Dissertação (Mestrado em Agroecologia). Universidade Estadual de Roraima, Brasil.
- Sahab, A.F., Hassanien, F.R., El-Nemr, S.E., Abdel-Alim, H.A., e Abdel-Wahhab, M.A. (2013). Effect of ozone gaseous on aflatoxin degradation and fat and protein content in peanut seeds. Journal of Applied Sciences Research, v.9, n.3, pp. 2170-2175.
- Santurio, J. M. (2000). Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. Revista Brasileira de Ciência Avícola, v.2, n.1, pp.01-12.
- Silva, M. V., Janeiro, V., Bando, E., e Machinski Jr., M. (2015). Occurrence and estimative of aflatoxin M1 intake in UHT cow milk in Paraná State, Brazil. Food Control, v.53, pp. 222-225.
- Silva, O.F., Venâncio, A. (2008). Supressão de *Aspergillus* produtores de aflatoxinas e ácido ciclopiazonico por ozônio. Revista de Ciências da Vida, v.28, pp.198-200.
- Silva, S.B., Luvielmo, M.M., Geyer, M.C., Prá, I. (2011). Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. Semina: Ciências Agrárias, v. 32, n. 2, pp. 659-682.
- Silva, T.A. (2011). Processo de ozonização dos grãos de trigo: cinética de reação e efeito na qualidade destes e da farinha. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Brasil.
- Soumagne, T., Pana-Katatali, H., Degano, B., e Dalphin, J.C. (2015). Combined pulmonary fibrosis and emphysema in hypersensitivity pneumonitis. BMJ Case Reports, v. 2015.
- Tiwari, B. K., e Muthukumarappan. (2012). Ozone in fruit and vegetable processing. In: O'donnell, C.; Tiwari, B.; Cullen, P.J.; Rice, R.G. (Eds.) Ozone in food processing. UK: The Atrium, pp.55-80.
- Vijayanandraj, V.R., Prasad, D.N., Mohan, N., e Gunasekaran, M. (2006). Effect of ozone on *Aspergillus niger* causing black rot disease in onion. Ozone: Science and Engineering, v.28, pp.347-350.

\*\*\*\*\*