

Bárbara Nantua Evangelista Giordano

**EFEITO DO OZÔNIO SOBRE A MICROFLORA E AFLATOXINAS DURANTE A
ARMAZENAGEM DE CASTANHA-DO-BRASIL COM CASCA (*BERTHOLLETIA
EXCELSA* H.B.K.)**

**Florianópolis
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS**

Bárbara Nantua Evangelista Giordano

**EFEITO DO OZÔNIO SOBRE A MICOFLORA E AFLATOXINAS DURANTE A
ARMAZENAGEM DE CASTANHA-DO-BRASIL COM CASCA (*BERTHOLLETIA
EXCELSA* H.B.K.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Ph.D. Vildes Maria Scussel

**Florianópolis
2009**

**EFEITO DO OZÔNIO NA CONTAMINAÇÃO POR FUNGOS E AFLATOXINAS NA
ARMAZENAGEM DE CASTANHA-DO-BRASIL (*BERTHOLLETIA EXCELSA* H.B.K.)**

Por

Bárbara Nantua Evangelista Giordano

Dissertação aprovada como requisito para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela Comissão formada por:

Presidente:

Profa. PhD Vildes Maria Scussel (UFSC)

Membro:

Profa. Dra. Elisa Helena Siegel Moecke (UNISUL)

Membro:

Profa. Dra. Evanilda Teixeira (UFSC)

Membro:

Prof. Dr. César Damian (UFSC)

Coordenadora:

Profa. Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni (UFSC)

Florianópolis, julho de 2009.

Dedico

*À Deus, pela presença
constante em minha vida.*

*Aos queridos mestres de minha vida, meus pais, que
sempre me impulsionaram na busca de novas
oportunidades e melhores caminhos.*

*Ao Chico, pelo amor, força e companheirismo,
mesmo que a longas distâncias.*

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para realização dessa etapa de minha vida, meu sincero reconhecimento e agradecimento, em especial:

À Deus pela força e presença na minha vida.

À minha família pelo amor incondicional.

Ao meu grande companheiro Chico pelo amor, apoio, companheirismo, força, incentivo.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À professora Vildes Maria Scussel, pela orientação na realização dessa dissertação do mestrado.

Aos professores Ivan Gonçalves de Souza, Cleide Batista, Evanilda Teixeira, César Damian, Pedro Barreto, Elisa Moecke pela ajuda, colaboração para a realização do trabalho.

Ao sempre prestativo Luciano Gonzaga por toda ajuda concedida.

À Ariane Pacheco e Estela Nunes pela força, ajuda, amizade, colaboração na realização do trabalho.

Aos técnicos administrativos Maria Inêz e Sérgio de Souza por toda ajuda e compreensão.

A todos aqueles que contribuem para a preservação e higiene do nosso local de trabalho, em especial ao seu Bento e Dona Sônia.

Ao pessoal do Laboratório de Micotoxicologia pelo companheirismo durante a realização do trabalho.

Às colegas de Laboratório Vanessa Simão e Mariana Wagner Rocha pela ajuda, amizade, apoio e inestimável contribuição na elaboração deste trabalho.

À Empresa TUBOZAN pela doação dos tubos e tampas de PVC.

A todas as pessoas citadas e aquelas que possa ter esquecido o meu carinho e amizade.
MUITO OBRIGADA!

Alguns colaboraram o tempo todo, **outros** em algum intervalo de tempo, também houve **aqueles** que em um breve momento me brindaram com uma idéia, uma pergunta ou simplesmente um sorriso, **AGRADEÇO A TODOS.**

“Em nossas vidas há momentos de alegria e de sofrimento. Se conseguirmos entender que sempre haverá bons e maus podemos gradualmente a não o esperar somente bons momentos, e nem a detestar os maus.”
(Daisaku Ikeda)

GIORDANO, Bárbara Nantua Evangelista. **Efeito do ozônio sobre a micoflora e aflatoxinas durante a armazenagem de castanha-do-Brasil com casca (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

RESUMO

Foram realizados dois trabalhos (1) [Título: **Efeito do gás ozônio sobre castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) redução micoflora e aflatoxina durante o armazenamento**]; (2) [Título: **Avaliação do tratamento de ozônio e embalagem a vácuo para castanha-do-Brasil inativação de fungos e degradação de aflatoxina durante a armazenagem**]. Em (1) foram avaliados o efeito do ozônio (O₃) em castanha-do-Brasil sobre a carga fúngica, degradação de aflatoxinas, oxidação lipídica e avaliação sensoriais. Grupos de castanhas com casca foram submetidos ao O₃, em diferentes concentrações e armazenados por 180 dias. As amostras foram coletadas logo após a exposição do gás e a cada 30 dias durante o período de armazenamento, para exames micológicos, aflatoxinas, oxidação lipídica e avaliação sensorial. O tratamento com O₃ afetou a micoflora, reduzindo a sua contagem total e assim o conteúdo de umidade (de 9,43 a 5,32%, respectivamente). O tratamento com O₃ de 5 horas a 31 mg/L foi capaz de destruir com sucesso os fungos (inicial ufc/g: 6.9x10⁴). Espécies de *Aspergillus*, *flavus* e *parasiticus*, foram capazes de crescer até 14 mg/L de O₃ e 30 dias de armazenamento. A redução de fungos logo após a colheita, aplicando O₃ certamente irá reduzir a possibilidade de uma maior proliferação fungos e assim aflatoxinas formação. No que diz respeito à oxidação lipídica e avaliação sensorial, a partir dos dados obtidos não foi observada alteração significativa após os tratamentos de O₃ e tempo de armazenamento. Aflatoxinas apresentaram degradação com O₃ no Grupo II (14mg/L), após 30 dias de armazenamento. Como conclusão, O₃ foi eficaz para a castanha-do-Brasil em relação à contagem total de fungos, conteúdo de umidade, oxidação lipídica, análise sensorial e à redução da aflatoxina. Em (2) foram relatados a avaliação O₃ sob a influência nas embalagens à vácuo com relação a carga fúngica, redução de aflatoxinas, oxidação lipídica e aceitação consumidor durante o armazenamento. Grupos de castanhas com casca, foram submetidos a tratamento de O₃ com 31,5 mg/L de concentração e armazenados durante 2 meses. As amostras foram analisadas cada 30 dias, as castanhas foram submetidas a testes micológicos, aflatoxinas, oxidação lipídica e avaliação sensorial. O tratamento com O₃ afetou a micoflora, reduzindo a sua contagem total e assim o conteúdo de umidade. O tratamento de O₃ foi aplicado dentro de 5 horas a 31 mg/L foi capaz de destruir com sucesso contaminação fúngica (inicial ufc/g: 6.9x10⁴). Bem como desenvolvimento de qualquer espécie aflatoxigênicas (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*). A redução de fungos logo após a colheita, aplicando O₃ certamente irá reduzir a possibilidade de uma maior proliferação fungos e assim formação de aflatoxinas. No que diz respeito à oxidação lipídica e avaliação sensorial, a partir dos dados obtidos não foi observada alteração significativa após o O₃ e tempo de armazenamento. Aflatoxinas apresentou degradação com tratamento em O₃ (31,5mg/L), castanha-do-Brasil embaladas á vácuo. O₃ foi eficaz em relação à contagem total de fungos, conteúdo de umidade, oxidação lipídica, análise sensorial e à redução da aflatoxina.

Palavras-chave: castanha-do-Brasil, ozônio, micoflora, aflatoxina, oxidação lipídica, armazenamento, embalagem, vácuo.

GIORDANO, Bárbara Nantua Evangelista. **Effect of ozone on the mycoflora and aflatoxins during storage of in shell Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. 2009. Dissertation (Master on Food Science) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

ABSTRACT

We works were performed (1) [Title: **Effect of ozone gas on brazil nut (*bertholletia excelsa* h.b.k.) mycoflora and aflatoxin reduction during storage**] on storage of Brazil nut treated with O₃; (2) [Title: **Evaluation of ozone treatment and vaccum packaging for in-shell brazil nut fungi inactivation and aflatoxin degradation during storage**] In (1) the work of storage reports an evaluation of the ozone (O₃) gas influence during Brazil nut storage on fungi load, aflatoxins degradation, lipid oxidation and sensory attributes. Groups of *in-shell* Brazil nuts, were submitted to O₃ atmosphere at different concentrations and stored for 180 days. Samples were collected just after the gas exposure and every each 30 days during the storage period, for mycological tests and analysed for, aflatoxins, lipid oxidation and sensory evaluation. The O₃ treatment affected the mycoflora growth, lowering their total count and so the moisture content (mc) (from 9.43 to 5.32 % respectively). The O₃ treatment applied within 5 hours at 31 mg/L was able to successfully destroy nuts fungi contamination (initial cfu/g: 6.9x10⁴). *Aspergillus*, species *flavus* and *parasiticus*, were able to grow up to 14 mg/l O₃ concentration and 30 days of storage. Fungi reduction just after harvesting by applying O₃ will certainly reduce the possibility of further fungi proliferation and so aflatoxins formation. As far as lipid oxidation and sensory evaluation are concerned, from the data obtained it was not observed significant changes after the O₃ treatments and time of storage. aflatoxins presented degradation with O₃ at Group II (14mg/L) after 30 day of storage. In conclusion, O₃ is effective for the nut with respect to the total count of fungi, mc, lipid oxidation, sensory analysis and reduction of aflatoxin. In (2) study about packaging vaccum reports an evaluation of the O₃ gas influence Brazil nut packaging vacuum on fungi load, aflatoxins reduction, lipid oxidation and consumer acceptance during the storage. Groups of *in-shell* Brazil nuts, were submitted to O₃ treatment at 31,5mg/L concentration and stored for 2 month. Samples were analysed each 30 days, nuts were submitted to mycological tests and analysed for, aflatoxins, lipid oxidation and sensory evaluation. The O₃ treatment affected the mycoflora growth, lowering their total count and so the mc. The O₃ treatment applied within 5 hours at 31 mg/L was able to successfully destroy nuts fungi contamination (initial cfu/g: 6.9x10⁴). As well as no development of species aflatoxigenic (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*). Fungi reduction just after harvesting by applying O₃ will certainly reduce the possibility of further fungi proliferation and so aflatoxins formation. As far as lipid oxidation and sensory evaluation are concerned, from the data obtained it was not observed significant changes after the O₃ treatments and time of storage. Aflatoxins presented degradation with O₃ treatment at (31.5mg/L) at the Brazil nuts packaging vacuum. In conclusion, O₃ is effective for the nut with respect to the total count of fungi, mc, lipid oxidation, sensory analysis and reduction of aflatoxin.

Key words: Brazil nut, ozone, mycoflora, aflatoxin, lipid oxidation, storage, packaging, vacuum.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. A castanha-do-Brasil: (a) árvore da castanha-do-Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>); (b) fruto (ouriço) e sementes; (c) castanha-do-Brasil com casca; (d) castanha-do-Brasil sem casca.....	18
Figura 2. Fluxograma de beneficiamento da castanha-do-Brasil [*] etapas de seleção.....	24
Figura 3. Fluxograma de processo de beneficiamento da castanha com e sem casca.....	26
Figura 4. Áreas produtoras de castanha-do-Brasil	32
Figura 5. Estruturas químicas das Aflatoxinas.....	41
Figura 6. Armazém convencional	54
Figura 7. Armazém tipo silo-bolsa.....	54
Figura 8. Armazém granelizado.....	55
Figura 9. Armazém graneleiro.....	56
Figura 10. Alguns exemplos de silos (a) metálicos, (b) de concreto (c) secador.....	57
Figura 11. Exemplo de armazenamento de silo hermético – tipo <i>silos bag</i>	58
Figura 12. Armazenamento da castanha-do-Brasil na área de produção na floresta	63
Figura 13. Armazenamento da castanha-do-Brasil na unidade de beneficiamento.....	64
Figura 14. Formas canônicas do híbrido de ressonância representativo da molécula de ozônio.....	73
Figura 15. Reação direta do ozônio com a matéria orgânica: mecanismo de Criegee Exemplo do ataque eletrofílico do ozônio a um composto aromático	74
Figura 16. Esquema do sistema tipo descarga corona de geração de ozônio.....	78
Figura 17. Mecanismo de degradação da aflatoxina B ₁ com a adição de ozônio.....	84
Figura 18. Reação do ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o complexo colorido, medido espectrofotometricamente a 532 nm.....	92

ARTIGO I

Figure 1. Brazil nut ozone treatment and storage study system: (a) PVC silos (n=7) and O ₃ generator; (b) silo details and dimensions.....	121
Figure 2. Flowchart of the in-shell Brazil nuts storage under ozone atmosphere study, (*after shelling the weight reduced to c.a. 80 g of edible part).....	122
Figure 3. Relative humidity and temperature (averages/month) during the storage of in-shell Brazil nut ozone treated experiments (May to October -2008) in the site of study.....	131

ARTIGO II

Figure 1. Flowchart of the in-shell Brazil nuts storage under O ₃ treatment with vacuum and packaging.....	146
Figure 2. Evaluation lipid oxidation by acid 2-thiobarbituric (TBA method) of in-shell Brazil nuts of vacuum packaged treated with ozone and stored for 60 days.....	151
Figure 3. Effect of ozone treatment after vacuum packaged and after stored for 60 days on the sensory attributes of in-shell Brazil nuts (hedonic scale of 5 points (1-dislike very much, 2- dislike, 3- indifferent, 4- like, 5- like very much).....	152

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Composição química centesimal, teor de selênio e valor calórico da amêndoa e torta de amêndoa de castanha-do-Brasil.....	19
Tabela 2. Etapas da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil.....	23
Tabela 3. Ocorrência de danos em castanhas-do-Brasil e suas causas.....	28
Tabela 4. Limites máximos permitidos para aflatoxinas em alimentos em diversos países.	44
Tabela 5. Fungos identificados em castanha-do-Brasil <i>in natura</i> e pós-processamento com ou sem casca, reportados na literatura.....	47
Tabela 6. Contaminação por aflatoxinas em castanha-do-Brasil.....	50
Tabela 7. Classificação relativa dos filmes de acordo com a barreira ao oxigênio.....	71
Tabela 8. Propriedade física do ozônio	75
Tabela 9. Agente oxidante e seus potenciais de oxidação	76
Tabela 10. Aplicações do ozônio em diversas matrizes reportados na literatura	82
Tabela 11. Categorias de testes e exemplos de métodos usados na análise sensorial.....	86

ARTIGO I

Table 1. Total fungi count, <i>Aspergillus</i> aflatoxigenic species, moisture content and evaluation AFLs levels in-shell and after shelling Brazil nut stored under ozone treatment	127
Table 2. Fungi development on in-shell Brazil nuts treated at different ozone concentrations and time of exposure during storage	128
Table 3. Evaluation lipid oxidation by acid 2-thiobarbituric (TBA method) of Brazil nuts stored under different concentrations of ozone atmosphere	132
Table 4. Effect of different ozone concentrations and time of storage on the sensory attributes of in-shell Brazil nuts.....	134

ARTIGO II

Table 1. Total fungi count, <i>Aspergillus</i> aflatoxigenic species, moisture content and evaluation AFLs levels in-shell and after shelling Brazil nut stored under vacuum packaging after ozone treatment.....	149
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLs	Aflatoxinas
AFB₁	Aflatoxina B ₁
AFB₂	Aflatoxina B ₂
AFG₁	Aflatoxina G ₁
AFG₂	Aflatoxina G ₂
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemistry</i>
Aw	Atividade de Água
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetros
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FD	<i>Fluorescence detector</i>
HPLC	<i>High Performace Liquid Chromatography</i>
Kg	Kilograma
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i>
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mc	<i>Moiture content</i>
ml	Mililiter, milímetro
MRL	<i>Maximum Residue Level</i>
N	Normal
nm	Nanômetro
ppb	<i>Parts-per-million</i>
ppm	<i>Parts-per-billion</i>
ton	Tonelada
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Castanha-do-Brasil	16
2.1.1 Características botânicas.....	16
2.1.2 Composição nutricional	18
2.1.3 Cadeia produtiva da Castanha-do-Brasil	21
2.1.4 Processamento da castanha nas usinas de beneficiamento	24
2.1.5 Fatores ambientais da região Amazônica versus cultura da castanha-do-Brasil	26
2.1.6 Qualidade da castanha-do-Brasil	29
2.1.7 Produção e Mercado	30
2.2 Fungos e Aflatoxinas	35
2.2.1 Fungos.....	35
2.2.2 Aflatoxinas.....	40
2.3 Contaminação da castanha-do-Brasil por fungos e aflatoxinas	44
2.3.1 Fungos e aflatoxinas em castanha-do-Brasil	45
2.5 Armazenagem como método de conservação da qualidade	52
2.5.1 Tipos de armazenagem	53
2.5.2 Controle das condições de armazenagem	58
2.5.3 Armazenamento da Castanha-do-Brasil	62
2.6 Uso de atmosfera na armazenagem e em embalagem	64
2.6.1 Dióxido de carbono, Nitrogênio e Oxigênio.....	68
2.6.2 Vácuo	70
2.7 Ozônio	71
2.7.1 História	71
2.7.2 Alternativa	72
2.7.3 Características.....	
2.7.4 Poder oxidante e desulfetante.....	75
2.7.5 Geração de ozônio	76
2.7.6 Aplicações.....	79
2.7.7 Mecanismos de reação	83
2.7.8 Método de quantificação do ozônio.....	84
2.7.9 Legislação	85
2.8 Análise sensorial	85

2.9. Oxidação Lipídica	88
2.10 Referências Bibliográficas	92
3. ARTIGO	113
EFFECT OF OZONE GAS ON BRAZIL NUT (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.) MYCOFLORA AND AFLATOXIN REDUCTION DURING STORAGE	
3.1 Abstract	114
3.2 Introduction	114
3.3 Materials and Methods	115
3.4 Results and Discussion	123
3.5 Conclusion.....	135
3.6 Literature Cited.....	136
4. ARTIGO	140
EVALUATION OF OZONE TREATMENT AND VACCUM PACKAGING FOR IN-SHELL BRAZIL NUT FUNGI INACTIVATION AND AFLATOXIN DEGRADATION DURING STORAGE	
4.1 Abstract	141
4.2 Introduction	142
4.3 Materials and Methods	144
4.4 Results and Discussion	147
4.5 Conclusion.....	152
4.6 Literature Cited.....	153
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	157
APÊNDICES	158
ANEXOS.....	181

1. INTRODUÇÃO

A castanha, pertencente à espécie *Bertholletia excelsa* H.B.& K, conhecida popularmente como castanha-do-Brasil, castanha-do-Pará e *Brazil nut*, é nativa da Amazônia e representa uma grande importância econômica para a região.

O produto principal dessa espécie é a amêndoa, porém outros subprodutos também podem ser explorados comercialmente, como óleos, farelo ou torta, leite de castanha e ouriço. A castanha pode ser encontrada em diversos tamanhos, sendo comercializada segundo sua classificação (grande, média e miúda), e pode ser comercializada *com* e *sem* casca.

Após a decadência da borracha, a castanha-do-Brasil passou a constituir o principal produto extrativo para exportação da região norte brasileira. A exploração de exemplares nativos dessa árvore é protegida por lei, porém é permitido seu plantio em sistema de monocultivo ou consorciado (LOCATELLI et al., 2008).

Já na década de 1970, o volume das exportações brasileiras de castanha sofreu uma queda, devido à exigências da Europa no que se refere aos seus padrões higiênico-sanitários, principalmente em função das aflatoxinas, toxinas causadas pelo fungo *Aspergillus flavus*. No final da década de 90, esse volume reduziu ainda mais chegando a zero em 2007.

O fungo que provoca a formação das aflatoxinas é originário do solo e se desenvolve nas castanhas tanto após a queda no solo, durante a primeira e segunda armazenagem na floresta, bem como, no transporte fluvial até as beneficiadoras. Também pode se desenvolver em sacas nos ambientes úmidos dos porões dos navios durante o transporte, bem como na comercialização sob má condições de armazenagem.

Os diferentes fungos produtores de micotoxinas são encontrados em todas as regiões do mundo e podem crescer em uma grande variedade de substratos e sob várias condições de umidade, pH e temperatura comuns na floresta amazônica. Assim, as castanhas também estão sujeitas à invasão por fungos e à contaminação pelas toxinas na floresta, durante sua colheita, beneficiamento, transporte e principalmente na armazenagem (na floresta e após beneficiamento), quando em condições favoráveis para o seu crescimento.

A armazenagem na floresta acontece de maneira rústica, em paióis de madeira com pequenas aberturas até seu transporte por barcos para serem beneficiadas. Já na beneficiadora ficam em silos, também de madeira, por pequeno período de tempo. Após o beneficiamento, são embaladas em sacas de juta e ficam armazenadas em um período de no máximo 30 dias para serem então transportadas para os navios (exportação) ou para comercialização interna. O transporte e qualidade da armazenagem dessas castanhas para os Estados brasileiros são podem ser precárias, podendo ficar a mercê das intempéries e longas distâncias dentro do país até chegar

ao comerciante/consumidor. Portanto há necessidade do aprimoramento das condições de armazenagem, tanto na floresta, quanto no beneficiamento, bem como durante o transporte em navios e principalmente dentro de nosso país.

Existem vários tipos de armazenagem para alimentos seja à granel ou embalados, acondicionados em silos ou em armazéns graneleiros, em atmosferas naturais ou controladas. Das atmosferas controladas e dentre os gases mais usados estão o nitrogênio, gás carbônico e ozônio.

Devido às condições deficientes de armazenagem da castanha, o ozônio ser um gás com características antimicrobianas, ter alto potencial oxidante e não deixar resíduos nos alimentos, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do gás ozônio durante sua armazenagem na redução da contaminação fúngica e degradação das aflatoxinas na castanha-do-Brasil com casca. Estudar o efeito desse gás na estabilidade dos lipídios presentes na castanha, e sua aceitação pelo consumidor, bem como avaliar sua ação em castanhas com casca embaladas à vácuo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Castanha-do-Brasil

Pertencente ao grupo das nozes de árvores, a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) foi descrita pela primeira vez em 1808, quando Humboldt e Bompland, e posteriormente Kunth, denominaram a árvore majestosa presente na Floresta Amazônica (MENNINGER, 1977; Nybg, 2006). O Ministério da Agricultura por meio do Decreto 51209 de 18/09/1961, para efeito de comércio exterior, regulamentou a denominação de Castanha-do-Brasil (BRASIL, 1961).

A castanheira (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é conhecida também como castanha-do-Brasil e castanha-do-Pará e Brazil nut ou Para nut. Na 3ª Convenção mundial de Frutos Secos ocorrida em 1992 em Manaus, com a participação de mais de 300 empresários, convencionou-se de chamá-la de castanha-da-Amazônica (LOCATELLI, 2008).

2.1.1 Características botânicas

A classificação botânica é descrita como: Divisão: Angiospermae → Classe: Dicotiledônea → Ordem: *Myrtiflorae* → Família: Lecythidaceae → Gênero: *bertholletia* → Espécie: *excelsa*. A família tem 325 tipos de árvores nos trópicos americanos, divide-se em 15 gêneros, em que o *Bertholletia* é dominante com 75 espécies (BRASIL, 2002).

A castanheira-do-Brasil é originária da região Amazônica. Apresenta porte majestoso e frondoso (Figura 1), com copa dominante na região onde se encontra, chegando a medir cerca de 30 – 50 metros de altura e 5 metros de diâmetro na base do tronco (ALMEIDA, 1963; BORGES, 1967; CAVALCANTE, 1972; LOUREIRO, 1968; MELLO, 1977). Possui casca escura e fendida, ramos encurvados nas extremidades, folhas esparsas, alternadas, pecioladas (pecíolo cilíndrico-caniculado), oblondas ou ovalado-oblondas, curto acuminadas, onduladas, verde-escuras na parte superior e pálida na parte inferior (BRASIL, 1976). Plantas provenientes de sementes podem iniciar a frutificação aos oito anos e somente aos doze anos, atingem a produção normal, desde que sejam plantadas a *céu aberto*, enquanto as castanheiras enxertadas podem iniciar a produção de frutos aos 3,5 anos (MÜLLER, 1995).

A floração de um exemplar adulto, no Pará, ocorre entre os meses de outubro a dezembro, e o fruto costuma amadurecer em período correspondente ao inverno amazônico. Na Amazônia Oriental chama-se inverno à estação chuvosa, que se inicia no Pará e Amapá em dezembro,

prolongando-se até o final de março e meados de abril. A Região está em dois hemisférios, cortada pela linha do Equador (Nota da SUREG/PA)

A colheita, normalmente tem início também no inverno quando os rios estão cheios e podem ser navegados e dura de quatro a cinco meses, sobretudo no período que vai de janeiro a abril de cada ano.

A castanheira apresenta várias aplicações: a) “ouriços” como combustível ou na confecção de objetos, mas o maior valor é a amêndoa, alimento rico em proteínas, lipídios e vitaminas podendo ser consumida ou usada para extração de óleo; b) do resíduo da extração do óleo obtém-se torta ou farelo usada como misturas em farinhas ou rações; c) “leite” de castanha, que é de grande valor na culinária regional; c) madeira com boas propriedades, sendo indicada para reflorestamento e empregada tanto na construção civil como naval (EMBRAPA, 2008).

O fruto da castanheira é chamado de “ouriço”, constituindo-se uma camada de substância lenhosa (Figura 1). É uma cápsula (pixídio) globosa deprimida, quase esférica, de 08 a 16 cm de diâmetro, tendo visível na parte superior o resto do cálice. A casca do fruto é espessa, lenhosa, dura, de cor castanha, repleta de células resinosas. Podem pesar de 0,5 a 5 kg e conter de 10 a 25 sementes, angulosas, agudas, mais ou menos triangulares, transversalmente rugosas, estreitamente comprimidas, envoltas em polpa amarela, dispostas em três séries (BRASIL, 2002).

A amêndoa é encontrada em diversos tamanhos, e comercializada/beneficiada de acordo com a classificação do Ministério da Agricultura, Pecuária e de Abastecimento (BRASIL, 1998) em: com casca e sem casca (Figura 1). Comercialmente, considera-se que cada hectolitro de castanha pesa de 47 a 60 kg (TUPIASSU; OLIVEIRA, 1967).

O suco do fruto é popularmente usado contra hepatite e o chá preparado com a casca é indicado para doenças crônicas do fígado, além disso, considerado agente antimalarial (VIEIRA, 1992; BRANDÃO et al., 1991).



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 1 - A castanha-do-Brasil: (a) árvore da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*); (b) fruto (ouriço) e sementes; (c) castanha-do-Brasil com casca; (d) castanha-do-Brasil sem casca

2.1.2 Composição nutricional

A amêndoa constitui um alimento bastante apreciado não só pelo seu sabor, como também pelas suas qualidades nutritivas. Sua composição tem sido amplamente estudada e demonstrada ser rica fonte nutricional, e é popularmente chamada de “carne vegetal”, por ser um alimento energético, rico em proteínas e valorizado pela presença de antioxidantes (COZZOLINO, 2001).

A castanha-do-Brasil contém uma amêndoa com elevado teor de proteínas de alto valor biológico, lipídios, fibras (PACHECO; SCUSSEL, 2006; SOUZA, 2003), vitamina E e, em ordem decrescente, minerais como fósforo, potássio, magnésio, cálcio e selênio (CHUNHIENG et al., 2004; SOUZA; MENEZES, 2004). Este último é um oligo elemento presente em maior quantidade na castanha-do-Brasil dentre todos os alimentos conhecidos (PACHECO; SCUSSEL, 2007).

A amêndoa de castanha-do-Brasil apresenta a seguinte composição química centesimal: umidade 3,13%; proteína bruta 14,26%; lipídios 67,3%; carboidratos 3,42%; valor energético 676,56 kcal (Tabela 1) (SOUZA; MENEZES, 2004).

No estudo realizado por Souza e Menezes (2004), o percentual de umidade da amêndoa (3,13%) mostrou-se abaixo dos valores recomendados para a castanha-do-Brasil com casca (5%) e sem casca (4,5%), a fim de evitar o crescimento de fungos toxigênicos (ARRUS et al., 2005a).

Tabela 1 - Composição química centesimal, teor de selênio e valor calórico da amêndoa e torta de amêndoa de castanha-do-Brasil

Componente	Castanha-do-Brasil	
	Amêndoa	Torta
Umidade (%)	3,13	6,7
Cinzas (%)	3,84	8,85
Lipídios (%)	67,3	25,13
Proteínas (%)	14,26	40,23
Carboidratos (%)	3,42	3,37
Fibra total (%)	8,02	15,72
Fibra indolúvel (%)	4,89	12,67
Fibra solúvel (%)	3,12	3,04
Valor calórico (kcal)	676,56	400,6
Selênio (mg/kg)	2,04	7,13

Fonte: SOUZA e MENEZES (2004).

É uma amêndoa oleaginosa de elevado valor energético, rica em proteínas de alto valor biológico. Apresenta muitos outros constituintes indispensáveis a uma boa alimentação, como o selênio, antioxidante que vem sendo referido na prevenção de câncer, doenças cardiovascular e muitas outras. A concentração desse elemento na amêndoa varia de região para região onde a planta vegeta. Para redução do elevado valor energético e/ou calórico das amêndoas de castanha-do-Brasil, se faz necessário a obtenção da torta parcialmente ou completamente desengordurada, através da extração do material graxo. A torta apresenta inúmeras possibilidades de aplicação, visando o enriquecimento de uma grande variedade de grupos de alimentos, tais como: produtos para panificação, bebidas, embutidos, farinhas, leites, cereais, *snacks*, salgados, doces, sorvetes, chocolates, biscoitos, bombons, além de muitos outros (SOUZA; MENEZES, 2004).

A proteína da amêndoa e torta de amêndoa de castanha-do-Brasil é rica em todos os aminoácidos essenciais, com elevado teor dos sulfurados (metionina e cisteína), geralmente insuficientes em proteínas vegetais. Sugere-se sua mistura com outras matérias-primas com o objetivo de enriquecê-las em qualidade e quantidade protéicas. Na torta de amêndoa, os aminoácidos essenciais encontra-se em valores acima do padrão teórico da FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO-1985), com exceção de treonina,

isoleucina, lisina e triptofano, entretanto o escore químico inferior ao estabelecido pelo padrão da FAO foi apenas em relação ao aminoácido lisina (SOUZA; MENEZES, 2004).

Os teores de fibras insolúveis foram maiores do que os de fibras solúveis na amêndoa e torta de castanha (CAMARGO, 1968; SOUZA; MENEZES, 2004).

Em relação ao valor calórico, a torta de castanha apresenta cerca de 500,60 kcal/100g e a amêndoa 676,56 kcal/100g. O maior valor correspondente a amêndoa é devido ao alto percentual de lipídio que contribuiu para elevar o seu valor energético, enquanto que a torta, devido à extração de lipídios, o valor calórico ficou reduzido (SOUZA; MENEZES, 2004; PACHECO; SCUSSEL, 2006).

O alto teor de lipídio da amêndoa (67,3%) e da torta (25,1%) de castanha-do-Brasil é um constituinte importante do ponto de vista nutricional, de modo que grande parte da fração graxa da amêndoa de castanha-do-Brasil é o ácido graxo linoléico (35,48%), reconhecido universalmente como ácido graxo essencial, de grande relevância para a alimentação humana (SOUZA et al., 1987; RODRIGUES et al., 2005).

Estudos sugerem que pode haver relação entre a frequência de consumo de nozes com redução da incidência de doenças do coração, constituindo uma fonte alimentar, benéfica à saúde apesar de as nozes serem reconhecidamente ricas em teor lipídico (KOCYIGIT et al., 2006). Na castanha-do-Brasil, o teor atinge 60-70%, bem como o teor de ácidos graxos saturados e insaturados, com nível de 73% (ácido oléico e linoléico) superior a outras nozes (RYAN et al., 2006).

A castanha do Brasil tem pesquisa focada na presença de selênio, devido à ação antioxidante nos processos metabólicos (PACHECO; SCUSSEL, 2006). A atuação do selênio está relacionada com a enzima glutathiona-peroxidase, dependente do Se, no que se refere à formação de radicais livres no organismo (HOLBEN; SMITH, 1999), proteção contra a ação nociva de metais pesados, prevenção de doenças crônicas não transmissíveis e aumento da resistência do sistema imunológico (COZZOLINO, 2001; GONZAGA, 2002).

A quantidade de selênio encontrada na torta de castanha-do-Brasil (7,13 mg/kg) foi 3,5 vezes maior que o teor da amêndoa (2,04 mg/kg). Isto pode ser explicado pela grande quantidade de amêndoas com película utilizada para obtenção da torta e ao seu menor percentual de lipídio, sugerindo-se que a película da amêndoa poderá possivelmente, conter elevada concentração de selênio (SOUZA; MENEZES, 2004).

Souza e Menezes (2004) destacam que além do selênio, outro apelo muito forte para a utilização da castanha do Brasil é a quantidade e a qualidade da proteína contida na amêndoa e o baixo emprego no mercado interno pelas indústrias processadoras de alimentos.

Selênio funciona como um componente de vários selenoproteínas em antioxidantes e reações redox, hormônio tireoidiano, metabolismo da função imunológica e reprodução (KRYUKOV et al., 2003).

Além disso, não existe crescente evidência de que doses superiores às recomendadas maior conferem benefícios adicionais de saúde, tais como redução na doença crônica e melhoria da função imunológica (RAYMAN, 2000; THOMSON, 2004).

As fontes alternativas são preferíveis para práticas de suplementação para melhorar o estado nutricional de uma população, porque eles são sustentáveis, menos caros, e têm menor risco de toxicidade (FINLEY, 2005). A biodisponibilidade de selênio é variável em alimentos e sua eficácia para aumentar o selênio foi investigado, incluindo o selênio em alta de trigo pão (THOMSON et al., 1985), peixe (FOX et al., 2004), carne (VAN DER TORRE et al., 1991). Devido ao teor baixo de selênio em alguns destes alimentos, porém, necessitam ser consumidos em grandes quantidades para melhorar selênio. Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, família *Lecythidaceae*) são os mais ricos alimentares conhecidos fonte de selênio, com concentrações médias relatadas na literatura entre 8 e 83µg Se/g (VONDERHEIDE; WROBEL, 2002; DUMONT et al., 2006; CHANG et al., 1995; KANNAMKUMARATH, et al., 2002; BODÓ et al., 2003). Concentrações em nozes com casca são relatados a ser maior do que em nozes sem casca (VONDERHEIDE; WROBEL, 2002; DUMONT et al, 2006; CHANG et al., 1995).

2.1.3 Cadeia produtiva da Castanha-do-Brasil

Grande parte da produção da castanha é originária de coleta nativa, isto é, e por isso Brasil, Bolívia e Peru, dotados de grandes áreas de floresta amazônica. No Estado do Amazonas há plantações, estas experimentais, mas a grande maioria é nativa. O processo produtivo da castanha é relativamente simples. Entre dezembro e abril o ouriço da castanha amadurece e, graças à chuva e ao vento, cai da sua árvore. Coletores autônomos (seringueiros, povos indígenas, camponeses e, na Bolívia, trabalhadores contratados) circulam pela floresta, de árvore em árvore, recolhendo os ouriços, partindo-os com a ajuda de um facão, e levando a castanha bruta para um paiol na floresta. Os coletores só começam a trabalhar após receberem um adiantamento do comprador, e quando acumulam castanhas suficientes no paiol, levam-nas para a beneficiadora para saldar o contrato e, em alguns casos, receber o saldo.

Nas localidades extrativistas os métodos de manejo, transporte e quebra são artesanais, e as condições higiênicas, muitas vezes, precárias e caracterizam-se por iniciar entre os meses de janeiro a maio, período de coleta dos "ouriços", quando caem ao solo na estação chuvosa. Nesta etapa, de cata dos ouriços (frutos), o extrator os coloca em um cesto que leva às costas. Quando o

cesto está carregado, são transportados aos barracões (de palha ou cobertos com lonas), denominadas de "região de quebramento" ou "comunidades", destinadas à operação de extração das sementes. A segunda parte consiste na quebra manual dos ouriços, para a retirada das castanhas. Uma vez extraídas, são lavadas para eliminar impurezas, classificadas e armazenadas a granel, para transporte até o beneficiamento. O produtor colhe 2.000 e 3.000 ouriços na sua área e nesta etapa de duas a três pessoas recolhem, cortam, lavam, secam e ensacam a castanha em um período de aproximadamente 20 dias. Posteriormente, a produção é vendida no mercado, geralmente local (BRASIL, 2002).

O produto é armazenado em barracões e levado aos portos primários de comercialização e levado até a sede do município, sendo o transporte feito por embarcações de pequeno porte, devido à difícil navegabilidade dos rios. Nesta etapa, as maiores dificuldades de transposição surgem em trechos de cachoeiras dos rios, sendo possível somente na estação chuvosa, quando o nível das águas o permite, apesar do que em algumas localidades, o transporte ocorre via terrestre, como o Estado do Acre (PACHECO; SCUSSEL, 2006). Dos portos de convergências secundários, a castanha é transportada em embarcações (ex. "alvarengas", balsas e barcos de passeio) até a usina, e após o desembarque, e ficará disposta em "montanhas", ou irá direto para o beneficiamento, onde passará por diversos processos.

O beneficiamento pode ou não ser feito. Nas usinas de beneficiamento possuem etapas distintas de produção em que, principalmente, selecionam e promovem a secagem da castanha, de forma que os lotes sejam trabalhados e preparados o mais rápido possível, em temperaturas controladas (CAMPOS/PAS, 2004). As castanhas com casca podem ser vendidas desidratadas ou semidesidratadas ou ainda a granel (sem beneficiamento). As castanhas sem casca (amêndoas) são obtidas quebrando-se manualmente e podem ser vendidas com ou sem película. Devido ao formato irregular, há uma grande porcentagem que se quebra (VIANNA, 1972). Segundo Sant'anna (1985), aproximadamente 10% delas se quebram, reduzindo seu valor comercial a apenas 60% do das castanhas perfeitas e a utilização dessa quantidade, bem como parte da produção na forma de subprodutos, é alternativa para o aproveitamento dessa matéria-prima de alto valor agroindustrial. Yokoya et al. (1971) consideram que o armazenamento e a conservação da castanha-do-Pará constituem os problemas mais importantes para sua comercialização (EMBRAPA, 2008). Um fluxograma do beneficiamento está apresentado na Tabela 2, apesar de que, a sequência de procedimentos de procedimentos é variável de acordo com a usina.

Após o beneficiamento, o produto *com casca* é acondicionado em *big bags*, de 500 a 1000 kg em sacos de juta ou de polietileno, e o produto *sem casca* são pesadas e embaladas em embalagem aluminizada a vácuo com capacidade de 20 kg, de forma a retardar o processo de oxidação. Como a maioria dos mercados compradores consiste de outros países, o transporte é

normalmente efetuado em *containers* em navios (refrigerados ou não), já que o transporte aéreo é mais aplicável em pequenos lotes. A castanha descascada e em pedaços (ferida ou quebrada), por sua vez, possui como destino também o mercado interno, em que as indústrias de alimentos representam os principais compradores, existindo ainda as empresas de varejo (CAMPOS/PAS, 2004).

Tabela 2 - Etapas da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil

Etapa	Fase
Etapa 1: Desde a caída natural dos ouriços até a venda ao intermediário ou à cooperativa, compondo-se de cinco principais fases:	<ol style="list-style-type: none"> 1) Preparo do castanhal 2) Colheita: coleta, amontoa 3) Pré-beneficiamento: corte, lavagem 4) Primeiro transporte: terrestre, fluvial 5) Primeiro armazenamento
Etapa 2: Inicia com o segundo transporte, feito pelo intermediário que compra as castanhas do extrativista. Composta de duas fases:	<ol style="list-style-type: none"> 1) Segundo transporte: fluvial, terrestre 2) Segundo armazenamento
Etapa 3: O beneficiamento com casca inicia com a chegada para o beneficiamento, composta das seguintes fases:	<ol style="list-style-type: none"> 1) Recepção 2) Terceiro armazenamento 3) Beneficiamento: lavagem/peneiramento, secagem, resfriamento, primeira seleção (manual), ensaque das castanhas com casca
Etapa 4: O beneficiamento sem casca é a etapa mais longa, composta pela maior número de fases:	<ol style="list-style-type: none"> 1) Autoclavagem 2) Segundo resfriamento 3) Descascamento 4) Segunda seleção por tamanho (mecânica ou manual) 5) Desidratação 6) Terceiro resfriamento 7) Terceira seleção 8) Embalagem
Etapa 5: Industrialização da amêndoa: é realizada com castanhas sem casca, sendo considerada a última etapa da cadeia produtiva, tendo em vista que o processo de industrialização para a obtenção de subprodutos e derivados (óleo, torta/farelo, farinha, leite, biscoito, doces, etc) As principais fases são:	<ol style="list-style-type: none"> 1) A recepção 2) A seleção 3) O armazenamento
Etapa 6: Comercialização: Esta etapa é considerada importante do ponto de vista da valorização do produto e acompanhado o mercado a que se destina verificam-se dois segmentos: o mercado externo e o interno.	

Fonte: BRASIL (2002)

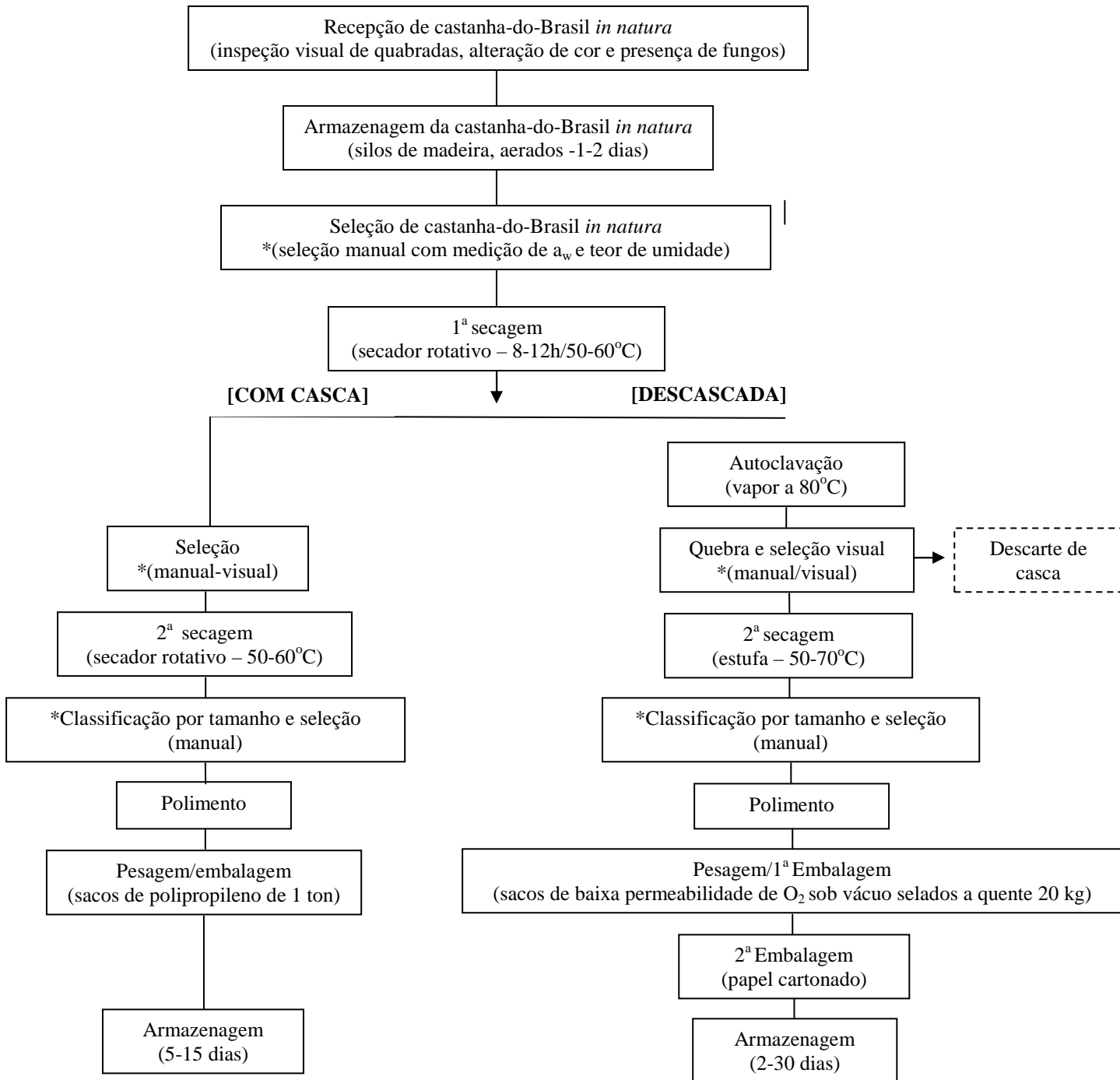


Figura 2 - Fluxograma de beneficiamento da castanha-do-Brasil [*] etapas de seleção PACHECO e SCUSSEL (2006)

2.1.4 Processamento da castanha nas usinas de beneficiamento

A castanha é beneficiada em usinas com equipamentos para a produção em larga escala, sendo obtidas com e sem casca. Nas etapas de beneficiamento devem ser observadas certas recomendações para a preservação da qualidade da castanha tais como (Figura 3): a) recepção e seleção: na chegada ao armazém da usina de beneficiamento, a castanha-do-Brasil é pesada, procedendo-se uma amostragem para a análise visual quantitativa da qualidade da castanha

recebida. As castanhas devem estar limpas, secas, em boas condições de sanidade e isentas de matérias estranhas; b) armazenamento na usina: as castanhas com casca são armazenadas em galpões com boa ventilação. Embaladas em sacos de polipropileno ou aniagem são mantidas sobre estrados limpos evitando o contato com o piso e umidade. Os lotes a granel são mantidos em baias ou silos igualmente impermeáveis e de fácil limpeza e sanitização; c) lavagem: objetiva a retirada de excesso de matéria orgânica, identificando e descartando as castanhas chocas, promovendo choque térmico antes da quebra; d) tratamento térmico: dois métodos são utilizados. Ou a castanha lavada é tratada por imersão em água em ebulição, durante 1 a 2 minutos ou é autoclavada por um período de 2 a 5 segundos imediatamente após a lavagem. Esse processo além de reduzir a carga microbiológica da matéria prima, facilita a retirada da casca; e) descasque: as castanhas ainda quentes são descascadas manualmente com o auxílio de um pequeno aparelho de ferro, que as comprime pelas extremidades, quebrando a casca e deixando a amêndoa livre; f) seleção: feita manualmente para identificar castanhas deterioradas ou danificadas e/ou tamanhos diferentes; g) classificação: as castanhas são manualmente classificadas por tamanho, conforme as especificações para padronização, comercialização e classificação definidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que determina seis classes (extra grande, grande, semigrande, extra média, média e pequena) para castanha em casca e oito classes (grande, extra média, média, pequena, miúda, miudinha, ferida e quebrada) para amêndoa descascada; h) desidratação: as castanhas sem casca são levadas à estufa com circulação forçada de ar, com temperatura de 60°C por 24 horas ou até atingirem entre 11 a 15% de umidade. Já as castanhas com casca, podem ser secas em secadores rotativos ou em estufas obedecendo-se ao mesmo teor de umidade; i) polimento: após classificadas, as castanhas com casca são polidas mecanicamente em polidores com superfície interna áspera para melhoria da aparência da casca através da eliminação das arestas. As amêndoas são polidas através de rolos de escova ou espuma para a retirada de resíduos de película; j) pesagem e embalagem: as amêndoas são pesadas e embaladas a vácuo por processo semi-automático em sacos aluminizados, e/ou organizados em caixas de papelão. As castanhas com casca são embaladas em sacos de propileno de 60 kg ou em grandes sacos de ráfia (*big bags*) de 500 a 1000 kg; l) armazenamento do produto final: os sacos e caixas com castanhas ou amêndoas desidratadas são empilhados sobre estrados de madeira que deve obedecer as BPF, em depósito arejado, limpo e com iluminação natural; m) etapa de expedição: tornou-se foco da atenção das usinas exportadoras brasileiras, principalmente quanto ao controle de temperatura, umidade e tempo de transporte até o mercado de destino, sem afetar negativamente a qualidade do produto (BRASIL, 2002; CAMPOS/PAS, 2004; PACHECO; SCUSSEL, 2006).

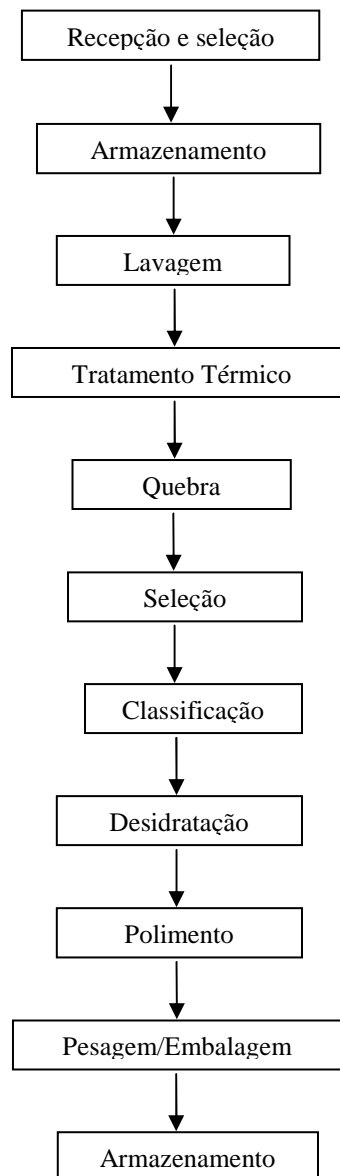


Figura 3 - Fluxograma de processo de beneficiamento da castanha com e sem casca (CAMPOS/PAS, 2004).

2.1.5 Fatores ambientais da região Amazônica versus cultura da castanha-do-Brasil

Na Floresta Amazônica os fatores que influenciam os fungos na produção de AFLs estão presentes em maior ou menor escala, de forma que é necessário que desde a disposição dos ouriços na floresta, até o beneficiamento seja evitado favorecer as condições necessárias às cepas aflatoxigênicas (CAMPOS/PAS, 2004). A contaminação da castanha-do-Brasil por AFLs tem afetado as exportações brasileiras. Assim, estudos sobre a natureza da contaminação são necessários e tem sido desenvolvido a fim de administrar o problema e melhorar a qualidade da castanha brasileira (MAPA, 2002; PACHECO, 2003; ARRUS et al., 2005a; ARRUS et al., 2005b).

Dentre os fatores intrínsecos que podem afetar a produção de AFLs em castanha-do-Brasil há o conteúdo de umidade que durante a colheita na floresta possui um conteúdo de umidade elevado (30%) propício ao desenvolvimento de fungos. É necessário reduzir esta umidade durante o armazenamento na floresta para evitar a proliferação durante seu transporte até as usinas de beneficiamento. Durante seu processamento, ela é seca atingindo conteúdo de umidade que varia de 3 a 6,5%. Faixa considerada segura para controlar a proliferação fúngica. Mas durante o processamento de secagem da castanha no beneficiamento pode ocorrer variação de temperatura, causando distribuição heterogênea do calor/vapor do interior da massa de castanha (dentro de secadores). Isto pode causar uma secagem deficiente, levando as castanhas a terem conteúdo de umidade das castanhas heterogêneo, ocasionando problemas na armazenagem e no transporte devida à: (a) produto armazenado com elevado conteúdo de umidade, devido a secagem ineficiente do produto; (b) presença de umidade secundária, devido à precipitação ou absorção dos vapores de água no lote parado; (c) difusão do calor e umidade nas castanhas não completamente secas causando por gradiente de temperatura; (d) atividade vital de microrganismos, aumentando a temperatura e o conteúdo de umidade no interior da massa de castanhas não completamente secas (e) mistura de lotes com umidades diferentes e (f) períodos chuvosos (BRASIL, 2004; CAMPOS/PAS, 2004).

A presença de insetos que levam a ruptura da casca favorecendo a absorção de umidade, quando elas ainda estão no ouriço. Ocorre infestação de formigas e cupins que atacam o ouriço e a casca das castanhas na floresta (PACHECO; SCUSSEL, 2006). Importante salientar que a etapa de lavagem das castanhas ainda na floresta deve ser evitada, pois a superfície de contato das castanhas é favorável à contaminação por fungos, e o processamento deve ocorrer no menor tempo possível, tão logo as castanhas cheguem à usina, para não haver condições favoráveis aos fungos para a síntese das AFLs (BRASIL, 2002).

As elevadas temperaturas, em torno de 30 a 40°C, e umidade relativa (UR) entre 60 e 90%, com grande alternância de períodos de chuva e sol da região Amazônica, dificultam o controle dos fatores determinantes para o metabolismo do fungo aflatoxigênico, juma vez que os níveis de produção de AFLs em nozes podem ocorrer na faixa de UR de 85-98% (SCUSSEL, 1998).

A estabilidade da castanha é assegurada quando é seca abaixo de 6,5% ou seja 1-2% abaixo da umidade crítica. Além disso, deve ser seca uniformemente, evitar quebra de amêndoas durante o descasque, secagem e armazenagem e manter o ambiente bem ventilado (PACHECO; SCUSSEL, 2006). As amêndoas de castanha-do-Brasil desidratada (até 3%), portanto embaladas em a_w abaixo do nível crítico ($<0,60$), permanecem durante todo o armazenamento estáveis, principalmente, se embalada em sacos de polietileno com baixa permeabilidade a oxigênio e à

vácuo. Nessas condições sua estabilidade se prolonga por até 180 dias, independente do processo de secagem utilizado (SILVA; MARSAIOLI, 2003).

Também um fator que pode afetar a produção de AFLs em castanha-do-Brasil é o pH, levemente ácido (5,6 a 6,0) que possibilita um ambiente favorável ao desenvolvimento de fungos. O tempo que a castanha fica armazenada pode favorecer o desenvolvimento de fungos, principalmente na floresta, durante seu transporte nos barcos. Em alguns trabalhos foram encontrados fungos do gênero *Aspergillus* em castanhas que foram submetidas ao tratamento térmico e somente em amostras pré-beneficiadas foi detectado *Fusarium*. O período na floresta até o beneficiamento, que é o período entre a extração/coleta até o transporte, seja nas embarcações ou caminhões, em ambientes com elevada umidade relativa, pode ser superior a 50 dias. Considerando as condições de temperatura e umidade ambiente da região, mesmo a armazenagem por 30 dias ou menos é para ser considerada preocupante. Portanto, necessita ações para controlar a proliferação de fungos (BRASIL, 2002). No que se diz respeito ao potencial de oxi-redução e o consumo de oxigênio, observou-se que mesmo em castanha descascada embaladas à vácuo pode apresentar contaminação por leveduras remanescentes do beneficiamento (PITT, 2005).

Quanto aos danos mecânicos eles podem ocorrer (a) na floresta durante a queda, do corte do ouriço para a retirada das castanhas e pela ação de insetos (b) durante o transporte e (c) nas usinas de beneficiamento (etapa de secagem até o descasque). Eles favorecem a absorção de umidade e facilitam a invasão e a penetração dos esporos de fungos no interior altamente nutritivo. Isto pode ocorrer quando elas já estão embaladas durante o transporte nos *containers* até a chegada no país importador, levando ao desenvolvimento rápido dos fungos e conseqüentemente aumento de toxinas (Tabela 3). No entanto o uso do vácuo eficiente pode reduzir a velocidade da proliferação (PACHECO, 2003).

Tabela 3 - Ocorrência de danos em castanhas-do-Brasil e suas causas

Local	Causa
Na floresta	Queda de ouriços Quebra do ouriço para extração das sementes Ação de insetos (cupim e formigas) em ouriços deixados no solo
Durante o transporte	Movimento dos lotes nas descargas de barcos e/ou caminhões
Usina de beneficiamento	Castanha com casca durante a secagem Amêndoas no descasque e secagem

Fonte: PACHECO; SCUSSEL (2006).

AFLs produzem espécies de fungos como *A. flavus* e *A. nomius*, estes têm a sua produção para o crescimento e aflatoxina em temperaturas e umidades relativas ao redor de 30°C e 97%,

respectivamente (PITT; MISCAMBLE, 1995; ROSSO; ROBINSON, 2001), coincidindo com as condições normais da Amazônia. Os ouriços e as nozes podem ocasionalmente ser armazenados por longos períodos de tempo na floresta ou nas aldeias do coletor (SAV, 2003). Assim, pode passar vários meses antes das nozes secas são microbiologicamente seguros para um teor de umidade para o armazenamento. De acordo com dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia do Brasil (INMET), a temperatura média diária para a colheita estações do ano (dezembro a maio, 2004 - 2007) no estado do Pará foi de 26,9°C (intervalo de 23-30°C) e os umidade relativa 85% (intervalo de 65-97%).

2.1.6 Qualidade da castanha-do-Brasil

Por ser um produto extrativista, a produção de castanha-do-Brasil é considerada orgânica e sua extração ambientalmente correta e, uma vez que não são utilizados defensivos químicos para controle de pragas, plantas daninhas ou adubação, há uma grande redução de perigos químicos comuns a produtos cultivados, pelo menos no tocante à contaminação por substâncias químicas (EMBRAPA, 2006). O manejo adequado inclusive em embarcações é necessário também para evitar contaminação por substâncias químicas durante o transporte. Entretanto, tais situações ocorrem de forma isolada, pois, como produto do extrativismo, a castanha-do-Brasil deve adquirir a classificação de Produto Orgânico, exigência de alguns mercados relacionados ao *comércio justo*.

Dentre os principais problemas identificados na produção da castanha-do-Brasil está a elevada contaminação por bactérias do grupo coliforme, devido à sua prolongada exposição a fatores ambientais e às condições de manipulação na indústria, além da contaminação por fungos produtores de toxinas, no caso a aflatoxina. Esses problemas têm se constituído em forte entrave para a comercialização do produto, principalmente no mercado externo, dado ao rigoroso controle de países europeus e Estados Unidos em relação aos níveis de toxinas presentes nos alimentos (EMBRAPA, 2006).

Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC (Programa Alimentos Seguros – PAS) - A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) vem desenvolvendo ações de apoio ao setor produtivo para implementação desse sistema, criado para identificação e controle dos pontos mais vulneráveis à contaminação dos alimentos. Envolve toda a cadeia produtiva – do campo à mesa do consumidor. O sistema é obrigatório na Comunidade Européia e nos Estados Unidos e recomendado pela Organização Mundial do Comércio – OMC (é considerado pré-requisito entre os países signatários da Organização para comercialização de produtos alimentícios) e Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO. É aprovado pelo Codex Alimentarius. No campo, especificamente, trata da normatização das

práticas agrícolas, visando à certificação do produto final. Reconhece as ações mais fomentadas e implantadas por produtores e implementa o sistema de boas práticas na agricultura, diminuindo impactos ambientais adversos (EMBRAPA, 2006).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e o Ministério da Saúde estão empenhados na aplicação do sistema. A Embrapa e parceiros estão promovendo cursos para capacitar o produtor rural a controlar a contaminação por microrganismos, agroquímicos, toxinas e outros riscos à segurança dos produtos, contribuindo para que ele se torne apto a atender às exigências das indústrias processadoras de alimentos, das redes de distribuição e do mercado externo. Protocolos como o sistema APPCC são considerados garantia da produção de alimentos de qualidade e mais seguros à saúde do consumidor, da elevação da competitividade das empresas, do aperfeiçoamento dos processos produtivos e da redução dos custos de produção (EMBRAPA, 2006).

Apesar de o MAPA ter estabelecido regulamentos técnicos (BRASIL, 2003) e instruções normativas (BRASIL, 2004), para certificação do extrativismo e beneficiamento, referentes às medidas básicas de higiene e manejo na cadeia produtiva, muitos estudos ainda precisam ser aplicados. A monitoração da execução das normas tanto por castanheiros quanto por usineiros deve ser uma realidade aplicada no dia a dia. Sem dúvida que já são observadas melhoras significativas, tanto no aspecto estrutural de algumas comunidades e usinas, como na preocupação pela prevenção de fungos e conscientização de pessoal na aplicação de medidas controle de pontos críticos (CPC), como na recepção e a secagem da castanha. Quanto à questão analítica, a necessidade de laboratórios que avaliassem a qualidade da castanha-do-Brasil iniciou com a questão nutricional, nos primeiros trabalhos que estudaram o alto valor biológico da proteína da castanha. Já os estudos da contaminação por AFLs eram as análises laboratoriais de amostras de lotes das usinas exportadoras, realizadas em laboratórios particulares que emitiam resultados documentais, por exigência de países importadores. Contudo, com os problemas dos lotes brasileiros exportados para a Europa resultando nas diretivas da Comunidade Européia em 1998, surgiu a necessidade de harmonização de protocolos analíticos e qualificação de laboratórios. Principalmente na região Norte onde estão localizadas as usinas de beneficiamento e comunidades extrativistas, para obter um controle de qualidade efetivo quanto à análise de aflatoxinas, inclusive para atender a legislação quanto à obtenção de resultados tecnicamente válidos em nível internacional (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

2.1.7 Produção e Mercado

A demanda global da castanha-do-Brasil é muito variável em função da forte competição comercial com outras nozes e outros países exportadores além do Brasil (SIMÕES, 2004). Grande

parte da produção é exportada e este fato é atribuído à estabilidade do mercado externo, ao qual, principalmente se direciona a produção, onde cerca de 90% das aquisições da castanha-do-Brasil, são negociadas antecipadamente, as indústrias adiantam o valor das compras, cuja entrega do produto ocorre posteriormente em prazos que vão de 30 a 60 dias. (CONAB, 2009).

Com relação à demanda nacional, estima-se que o consumo interno de castanha-do-Brasil ainda seja muito pequeno, onde 5% da produção é a ele destinada (ENRÍQUEZ et al., 2003). Uma boa parte, geralmente extrativista, é exportada in natura, principalmente para os países da Europa (Alemanha, Reino Unido e Itália) e América do Norte (Estados Unidos). A castanha representa entre 25 a 30 milhões de dólares anuais de exportação. Os derivados como a farinha, o óleo e a torta não têm preço fixo, não apresentando produção significativa (CHAVES, 2007).

O Brasil, até 1990, ocupou posição de liderança no mercado mundial, com 80% do comércio internacional. Atualmente, com a redução da produção brasileira para cerca de 30.000 toneladas, a Bolívia passou a ser o maior exportador mundial, com volume da ordem de 50.000 toneladas anuais. Esta produção é proveniente de sete Estados, o principal é o Acre (36%), seguido pelo Amazonas (28%) e Pará (22%), totalizando 86% da oferta nacional (ENRÍQUEZ et al., 2003). Na Figura 4 mostra que o Acre é o maior produtor de castanha, mas na verdade ele compra do estado do Amazonas e beneficia, por isso o Acre é considerado o maior produtor. O Amazonas também fornece castanhas para o Pará. As maiores áreas de extrativismo é o Amazonas. O sistema tradicional de coleta e pós-colheita impera e a resistência à adoção de novas práticas ainda é grande. Como resultado tem-se ainda problemas de contaminação da amêndoa que leva à perda da qualidade do produto e a barreiras comerciais, principalmente no mercado externo (CHAVES, 2007).

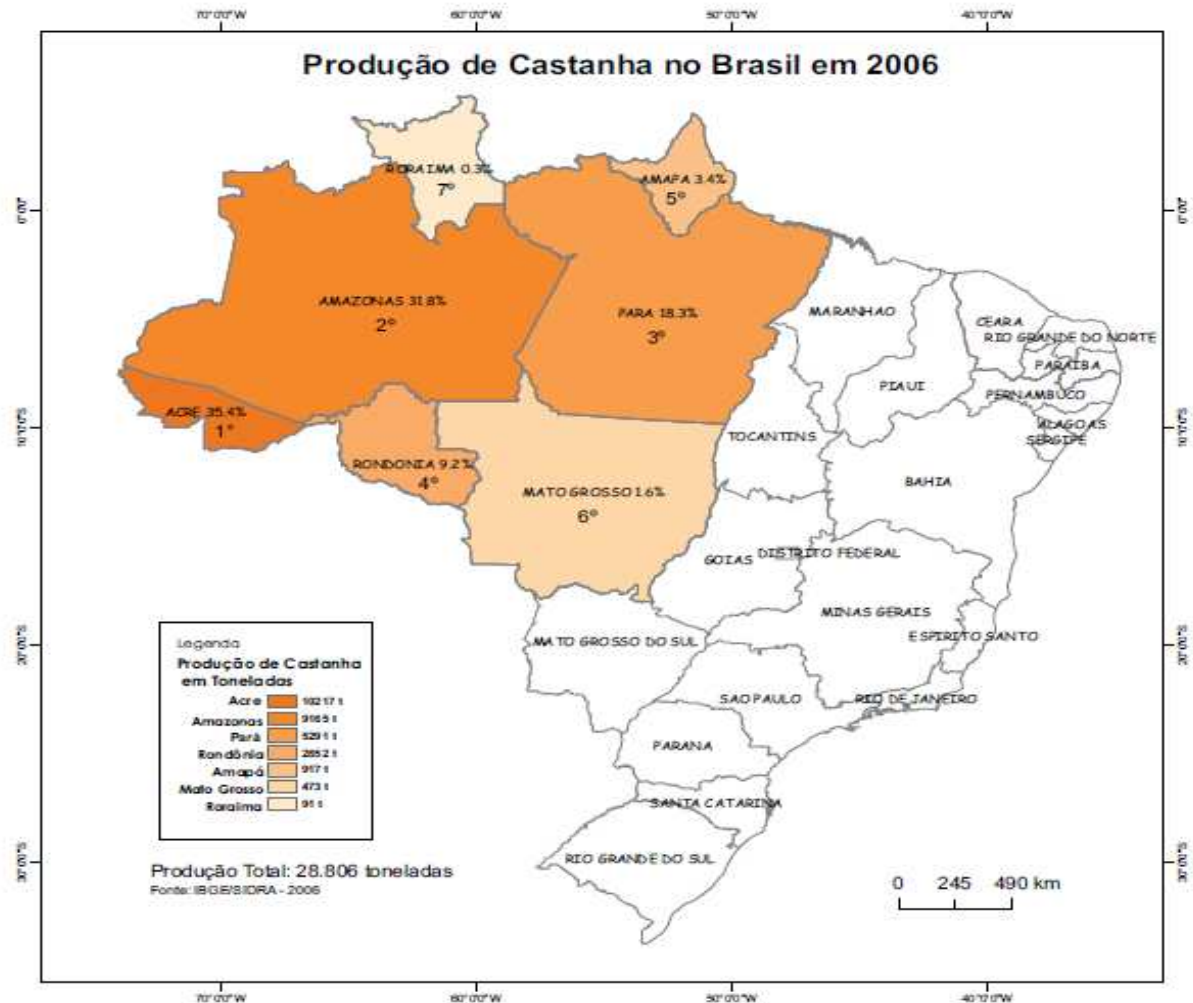


Figura 4 - Áreas produtoras de castanha-do-Brasil

Fonte: ZORÓ et al., (2008)

Tem-se observado que as exportações brasileiras diminuíram gradativamente de 51.195 ton (1990) e 19.301 (1995/1996) (EC, 2003). Uma das causas, além da diminuição da oferta do produto e destruição dos castanhais nativos (PERES et al., 2003) foi o surgimento de barreiras não-tarifárias, pela imposição de padrões fitossanitários mais rígidos por parte dos países exportadores, como os da União Européia (EU, 2003). Dessa forma, as empresas de beneficiamento, procuraram aprimorar os padrões de qualidade e passaram inclusive, a buscar novos mercados, já que a tecnologia de processamento da castanha é variada e utiliza, em sua maioria, grande contingente de mão-de-obra (BRASIL, 2002).

Dentre os fatores que justificam a redução das exportações brasileiras de castanha-do-Brasil são:

- a) Concorrência intensa: concorrência com outros países e com outras amêndoas como uma das causas da redução das exportações brasileiras de castanha. Concorrência com a Bolívia, que mantém o preço em patamares menores que o Brasil, com um dos principais fatores de

redução nas exportações. O preço baixo das castanhas bolivianas se justifica pelo baixo custo com a mão-de-obra (salários muito baixos) e pelo intensivo investimento da ONU, na década de 1990, em projetos sócio-econômicos em comunidades extrativistas, o que melhorou o sistema de coleta e a qualidade do produto.

- b) Barreiras não-tarifárias: estudos realizados a partir de 1982, sobre a produção de aflatoxinas em rações produzidas com amendoim, e detectaram que esta substância extrapolou para castanha-do-Brasil. Com isso os países importadores impuseram padrões fitossanitários rígidos, acirrando as barreiras sanitárias aos países exportadores e reduzindo a oferta de castanha brasileira para o mercado externo (SIMÕES, 2004). Segundo o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio (2006), no período de 2003 a 2005, a Alemanha, a Bolívia, os Estados Unidos, a Holanda e a Itália foram os maiores importadores de castanha brasileira, absorvendo, juntos, 84,15% das exportações nacionais. Neste período, compraram 31.013 toneladas, pagando US\$ 21.961.333,00, o que representa 0,008% do valor total das exportações brasileiras. Embora estes países participaram, conjuntamente, no período de 2003 a 2005, com 77,25% das exportações brasileiras. Os Estados Unidos compram as castanhas para consumo, porém, a Bolívia as compra para completar suas exportações, isto é, adquire as castanhas *in natura* dos estados do Acre e Rondônia e agrega valor para exportações. Em 2004, este país comprou do Brasil 6,30 toneladas de castanha, pagando, em média, US\$ 0,31 o quilo (MDI, 2006) e exportou 29,92 toneladas, ao preço médio de US\$ 1,80 o quilo (FAO, 2005), o que representa uma agregação de valor de 480%. As exportações tornaram a crescer a partir de 2004. No entanto, quando se compara a exportação de castanha com casca e sem casca verifica-se que as amêndoas sem casca decaíram em 2005, enquanto que as castanhas com casca continuaram subindo. Isso ocorreu devido à procura de castanha com casca pelo mercado internacional (PACHECO; SCUSSEL, 2006).
- c) Colapso da concorrência brasileira: a produção brasileira de castanhas brutas era concentrada no chamado “polígono das castanhas”, próximo da cidade de Marabá, no sul do Pará. Graças à uma série de eventos externos (discutidos mais adiante) essa floresta foi totalmente dizimada e, sem matéria prima, a indústria castanhanheira brasileira enfraqueceu-se.
- d) Abundância de dinheiro na Bolívia: produtores bolivianos têm muito dinheiro fácil, seja do Banco Mundial, BID e USAID (que investiria como parte da campanha americana de combate às drogas), ou do próprio tráfico de drogas (nesse caso, a indústria castanheira estaria sendo usada como um mecanismo de lavagem de dinheiro). Graças à esse dinheiro todo, a indústria boliviana floresceu.

- e) Macroeconomia: Bolívia estabilizou sua economia em 1984, enquanto o Brasil só estabilizou a sua dez anos depois, e ainda assim o R\$ ficou sobrevalorizado até janeiro de 1999. A situação macroeconômica teria tornado o produto boliviano mais competitivo.
- f) Bolívia tem custos baixos: Na Bolívia não há muitos impostos e quase não se paga direitos trabalhistas. Por isso o produto boliviano é mais barato e assim domina os mercados internacionais.
- g) Bolívia: recebe verba e profissionalizaram a produção. A usina investiu na capacitação pessoal e nos sistemas operacionais, onde que no Brasil a grande maioria são artesanais.

Dentre os fatores que determinaram a perda da posição desta liderança estão a redução dos castanhais produtivos; as deficiências na cadeia produtiva, em especial nas logísticas de transporte e de armazenamento; a ausência de políticas e de programas de incentivo à produção, de apoio direto à comercialização e de sustentação de renda ao extrativista; as dificuldades de atendimento às exigências fitossanitárias para exportação, especialmente quanto aos limites de tolerância para presença de aflatoxina (CHAVES, 2007).

Embora haja incidência de castanha em toda a Amazônia continental, somente no Brasil, Bolívia e Peru a produção tem representação econômica internacional, fato que fica evidente no estudo sobre este produto, realizado pela FAO (2005), que apontam estes três países como os principais produtores mundiais (ONU, 2005).

A exploração de exemplares nativos da castanha-do-Brasil é protegida por lei (Decreto 1282 de 19 de outubro de 1994) e somente poderá ocupar um local de destaque na pauta de exportações e de mercado interno a partir do momento em que houver uma política de estímulo destinada ao produtor extrativista, mantendo o homem na floresta e aumentando a produção extrativista.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) e a Associação Brasileira de Empresas de Assistência Técnica e Extensão Rural (Asbraer) firmaram, em 2006, convênio que visa capacitar extrativistas da cadeia produtiva da castanha-do-brasil nos estados da Região Norte. Segundo a diretora do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal (Dipov) do Mapa, Angela Peres, a capacitação dos extrativistas tem como objetivo melhorar a qualidade do produto a ser disponibilizado para o mercado interno e também para o mercado externo, especialmente a União Européia.

De acordo com a diretora, a UE é bastante exigente no que se refere aos padrões higiênico-sanitários da castanha, principalmente em função da aflatoxina, toxina causada pelo fungo *Aspergillus flavus*. O MAPA explica que para fornecer castanha para o mercado europeu o Brasil deve se adequar às exigências quanto aos padrões de aflatoxina. O fungo que provoca a aflatoxina é originário do solo e se armazena nas sacas e porões dos navios. "A castanha não é colhida no pé,

ou seja, o extrativista espera a fruta cair no solo para recolher. Por isso, o problema ocorre na armazenagem do produto", esclareceu a técnica. Ao capacitar os extrativistas, a expectativa do MAPA é de que haja uma queda na contaminação.

2.2 Fungos e Aflatoxinas

2.2.1 Fungos

Segundo Heathcote (1984), as AFLs são metabólicos secundários, tóxicos, produzidos por algumas linhagens de fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, são as que podem causar maiores danos aos seres humanos e animais. Pela sua alta toxicidade e ampla ocorrência, possuindo inclusive propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas (SIMIONATO et al., 2003). Recentemente, foram notificadas no Quênia surtos de AFLs em uma grande área geográfica e causando mais de 123 mortes (CDC, 2004).

Durante muito tempo os fungos foram considerados vegetais. A partir de 1960 passaram a ser classificados como reino à parte - Fungi. Os fungos são seres vivos eucarióticos unicelulares como as leveduras, ou pluricelulares como os fungos filamentosos ou bolores e os cogumelos. Os fungos não sintetizam clorofila nem qualquer pigmento fotossintético (TRABULSI et al., 1999).

Os esporos dos fungos são abundantes e amplamente encontrados na natureza, germinam rapidamente no solo, em plantas, em alimentos, em papel e até em vidros. Os alimentos armazenados representam excelente campo para a proliferação dos fungos, principalmente quando os princípios básicos de secagem adequada e armazenamento correto são desconhecidos ou desprezados (FONSECA, 2009). Sob condições favoráveis de temperatura e umidade, estes fungos podem crescer em certos alimentos, resultando na produção de AFLs (FORTNUM, 1986; LILLEHOJ, 1986).

Alguns fatores intrínsecos dos alimentos, como composição nutricional, o teor de umidade e a atividade de água (a_w) podem fornecer substratos para os fungos produtores de AFLs. Outros fatores (externos) como: temperatura, umidade relativa (UR), tempo de armazenagem, microclima, competição microbiológica e o uso de fungicidas, também precisam ser controlados para a segurança do alimento (KLISCH, 2007; KABAK; DOBSON; VAR, 2006).

- Conteúdo de umidade: é expresso em termos de umidade absoluta do material e das exigências mínimas apresentadas pelos fungos com relação ao seu desenvolvimento. A baixa umidade não garante armazenagem segura, pois outros fungos podem crescer e liberar água e calor, aumentando a temperatura e umidade nos grãos adjacentes. O ideal é manter um baixo

teor de umidade (<1-2%) na armazenagem, secagem homogênea, aeração dos grãos, e a adequada ventilação para a qualidade dos produtos (LORINI, 2002).

- Composição nutricional: A composição dos alimentos, em termos de teor de proteínas, carboidratos, lipídios e outros componentes, inclusive antioxidantes, influenciam diretamente na curva de crescimento de microrganismos, assim como no processo de deterioração dos alimentos (PACHECO; SCUSSEL, 2006). Também as características genéticas de algumas plantas, mais especificamente nozes, têm maior resistência a ação de insetos, contaminação fúngica e produção de AFLs (KABAK; DOBSON; VAR, 2006).
- Teor de atividade de água (a_w): É a água disponível para a ação dos microrganismos, onde é medido em escala de 0 a 1. É a relação entre a pressão de vapor de água do substrato e a pressão de vapor de água pura, reflete o grau em que a água está ligada aos componentes do material, não se encontrando disponível para as reações bioquímicas (ex. oxidação lipídica, reações enzimáticas, reações de Maillard, etc) e para o crescimento de microrganismos. A maioria das leveduras não cresce a a_w abaixo de 0,65 e os fungos em a_w abaixo de 0,70. Co poucas exceções, é possível considerar um alimento estável em relação a deterioração de microrganismos, quando a $a_w < 0,60$ e estes são classificados como desidratados (PACHECO; SCUSSEL, 2006).
- pH: os fungos normalmente desenvolve-se a pH ácido. A faixa de pH ótimo, tanto para a formação de AFLs quanto pra o crescimento do fungo PE de 5 a 6 (SCUSSEL, 1998).
- Temperatura: para várias espécies de fungos a temperatura de 30°C, típica de regiões tropicais, é uma temperatura ideal para o crescimento. Porém estas faixas são afetadas por outros fatores como umidade, concentração de oxigênio e disponibilidade de nutrientes (LORINI et al., 2002).
- Umidade relativa: é a umidade de equilíbrio entre o ambiente e o alimento, e pode ser expressa por $UR = a_w \cdot 100$. Em condições de equilíbrio, a a_w relaciona-se com a UR do ambiente. Dependendo da umidade presente no alimento e da umidade presente no ambiente, haverá ganhado ou perda de umidade do produto, favorecendo ou impedindo a proliferação de fungos (ARRUS et al., 2005a). A UR mínima onde os fungos crescem é de 70%, e a UR ótima é de 80-85%, contudo eles também podem crescer a UR de 90-100%. A faixa de umidade relativa para a produção de AFLs é de 80-85%, umidade relativa ótima para esporulação de 85%, umidade relativa máxima para produção de AFLs 95-99%, este último percentual corresponde ao conteúdo de umidade de 18,0-18,5% (SCUSSEL, 2002).
- Tempo de armazenamento: pode favorecer o desenvolvimento de fungos que exigem umidade baixa e tempo prolongado para que seus danos sejam observados. A preocupação

com a flora microbiana em nozes, por exemplo, tem aumentado devido ao grande volume de comercialização desses produtos, e tem gerado, novos métodos de detecção e inibição de fungos e AFLs (CANDLISH, 2001; ROJAS-DURAN et al., 2007).

- Microclima: o crescimento de fungos depende de outras condições ambientais que envolvem o substrato, tais como, o ambiente gasoso (composição da atmosfera gasosa). Eles podem crescer em baixas concentrações de O₂, sendo afetados somente a concentrações inferiores a 0,2%. Ocorre pouco crescimento em ambientes com dióxido de carbono (CO₂) ou nitrogênio (N₂), portanto essas misturas de gases podem ser usadas para reduzir a concentração de O₂. Ambientes com atmosfera controlada podem ser usados durante o transporte e armazenamento de produtos para prevenir o crescimento fúngico e formação de toxinas (SCUSSEL, 1998).
- Competição microbiológica: a existência de amendoim atóxico, apesar de estar altamente contaminado por fungos, bem como a queda abrupta da quantidade após a produção máxima, levam a pensar na existência de microrganismos resistentes a toxina e aptos a inibir sua produção e degradá-la. Existem linhagens de fungos mais produtoras que irão depender, também, da temperatura, substrato, umidade e microrganismos capazes de degradar a toxina (SCUSSEL, 1998).
- Fungicidas: são bastante utilizados para controlar e prevenir o crescimento de fungos nos produtos agrícolas. Contudo, existem limitações no uso destes compostos tais como: toxicidade para animais, excessivo custo, dificuldade de aplicação, efeitos indesejáveis na qualidade dos grãos e pouca toxidez para os fungos de estocagem (LORINI et al., 2002).
- Danos mecânicos: favorecem a absorção de umidade e facilitam a invasão e a penetração dos esporos de fungos no interior altamente nutritivo, desses substratos, levando ao desenvolvimento rápido dos fungos e conseqüentemente aumento dos níveis de toxinas (PACHECO; SCUSSEL, 2006).
- Luz: a produção de toxina é inibida na presença de luz ultravioleta e infravermelha (SCUSSEL, 1998).

As AFLs são produzidas por espécies de fungos, essencialmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. O gênero *Aspergillus* pertence ao grupo dos *Hyphomycetos* que se caracteriza pela formação de conidióforos, ou seja, hifas especializadas e produtoras de conídios com formas e arquitetura variáveis (PITT e HOCKING, 1997). Através de estudo de prevalência concluiu-se que a contaminação de grãos por fungos aflatoxigênicos como *A. flavus* é predominantemente sobre o *A. parasiticus* e sua produção é favorecida por temperaturas entre 23-26°C e umidade relativa do ar acima de 75%, sendo que a umidade relativa do ar acima de 85% e

temperatura em torno de 27°C favorecem o crescimento e a produção de aflatoxinas. (PEREIRA et al., 2002).

Os fungos crescem e se proliferam bem em cereais, principalmente, no amendoim, milho, trigo, cevada, sorgo e arroz, onde geralmente encontram um substrato altamente nutritivo para o seu desenvolvimento. O crescimento fúngico e produção de micotoxinas em cereais podem ocorrer em diversas fases do desenvolvimento, maturação, colheita, transporte, processamento ou armazenamento dos grãos.

A contaminação e a deterioração dos alimentos causados por fungos são mais comuns que as originadas por qualquer outro grupo de microrganismos. A contaminação por fungos é importante não apenas sob o ponto de vista sensorial, mas também pelo perigo que a produção de micotoxinas representa para o consumidor (MUNINBAZI e BULLERMAN, 1996). Os fungos podem promover prejuízos significativos aos alimentos. Podendo alterar as condições físicas dos produtos, reduzir o valor nutritivo, alterar o aspecto externo, produzir aflatoxinas e favorecer a ação de outros agentes de deterioração, como leveduras, bactérias e insetos (FONSECA, 2009). Quando presentes em sementes ocasionam perda do poder germinativo, no arroz e na manteiga de cacau afetam a qualidade, promovendo descoloração, e no café produzem aromas desagradáveis.

A produção de micotoxinas está ligada ao crescimento do fungo, entretanto, a presença do fungo produtor não indica a presença da micotoxina, especialmente se o crescimento não ocorrer. O entendimento dos fatores que permitem o crescimento do fungo e a produção de micotoxinas é de grande importância para o desenvolvimento de métodos de controle (BULLERMAN et al., 1984).

Condições de umidade e temperatura aumentam a probabilidade de desenvolvimento do *Aspergillus* e produção de aflatoxinas, situação agravada no período chuvoso. A biodegradação de sementes e grãos, no campo e durante o armazenamento, limita o acondicionamento seguro e o valor nutricional desses alimentos. (TEIXEIRA, 2008)

Os fungos que invadem sementes e grãos em geral são freqüentemente divididos em dois grupos: fungos do campo, que infectam o produto ainda no campo e fungos de armazenamento, como aqueles que invadem o milho pouco antes e durante o armazenamento. A distinção entre fungos de campo e de armazenamento não é baseada na classificação taxonômica, mas de acordo com as condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o crescimento dos mesmos. Os fungos do campo requerem um teor de umidade em equilíbrio com uma umidade relativa de 90% – 100% para crescerem. Os principais gêneros são *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Nigrospora*, *Helminthosporium*, *Alternaria* e *Cladosporium* que invadem grãos e sementes durante o amadurecimento e o dano é causado antes da colheita. Estes fungos não se desenvolvem

normalmente durante o armazenamento, exceto em milho armazenado com alto teor de umidade (ATUI; LAZZARI, 1998).

Os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas. Causam danos ao produto somente se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do produto. Os fungos do gênero *Aspergillus* (*A. halophilicus*, *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. alutaceus* (*A. ochraceus*) e *A. flavus*) e os do gênero *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. verrucosum*) são os indicadores de deterioração em sementes e grãos, causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica (ATUI; LAZZARI, 1998).

Aspergillus flavus e *Aspergillus parasiticus*, são saprófitas naturais do solo e ar, e em condições ideais são capazes de contaminar os alimentos. A ocorrência e magnitude da contaminação por essas micotoxinas variam de acordo com os fatores geográficos e sazonais, com as condições locais de crescimento do vegetal e ainda com as práticas de colheita e estocagem utilizadas. As culturas em áreas tropicais e subtropicais como o Brasil estão mais sujeitas à contaminação, pois as melhores condições para o desenvolvimento dos fungos e, conseqüentemente, para a produção das aflatoxinas são encontradas em áreas com alta temperatura (25 a 30°C) e umidade elevada (80% a 90%) (BULLERMAN; SCHOEREDER; PARK, 1984). Por isso, a redução da umidade através da secagem é de fundamental importância para reduzir os níveis de contaminação (DILKIN, 2002).

A contaminação dos produtos agrícolas ocorre através do contato com os esporos do fungo presentes no ambiente, sobretudo no solo, durante os procedimentos de colheita e secagem. O armazenamento em locais úmidos e sem ventilação, bem como o transporte inadequado favorecem não apenas a contaminação com esporos, mas também o crescimento fúngico nos produtos já contaminados (CHU, 1991).

Perdas econômicas associadas ao descarte do alimento ou ração, contaminada, são facilmente detectadas quando se mantém controle e levantamentos representativos. A perda econômica total é a somatória de vários fatores e compreende perdas diretas de produtos agrícolas, perdas de animais acompanhada de diversas taxas de mortalidade, doenças em humanos, diminuição da produtividade, animais com redução na velocidade de crescimento e produtividade, custos indiretos de sistemas de controle, custos de remoção da toxina para recuperar produtos rejeição de produtos pelo mercado importador (SCUSSEL, 1998).

2.2.2 Aflatoxinas

O nome micotoxina é derivado da palavra grega “*Mykes*” que significa fungo e “*Toxicum*” que significa veneno ou toxina. A doença ou síndrome (condição patológica) decorrente da ingestão de micotoxinas é denominada micotoxicose (SCUSSEL, 2002). O conhecimento que as micotoxicoses são os resultados do metabolismo fúngico é uma descoberta relativamente recente, isto porque a doença causada não está diretamente relacionada à presença ou contaminação por fungos, mas sim ao consumo de alimentos contaminados por toxinas produzidas por estes.

As AFLs são as micotoxinas mais estudadas, seu descobrimento ocorreu durante o estudo das causas de um acidente econômico, em 1960, na Inglaterra, com a morte de 400.000 perus devido a uma doença sem causa aparente, chamada de *Turkey X Disease*, e que posteriormente foi associada ao consumo de ração contaminada (ZOLLNER, 2006). Em 1961 responsabilizou-se a ração proveniente do Brasil de conter o princípio tóxico causador da doença. Entretanto, o composto foi detectado também em rações de outros países. Estudos em 1962 identificaram a ingestão do alimento contaminado com grande número de hifas de *Aspergillus flavus* como causa da doença, sendo então, um fator tóxico detectado por cromatografia em camada delgada (CCD) e denominado de aflatoxina. Na detecção foram observados compostos com fluorescência azul e verde, sob luz ultravioleta (UV), isto é, Aflatoxina B (Blue) e G (Green) e suas frações AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, em que a AFB₁ é considerado o composto mais tóxico (KELLER; TURNER; BENNET, 2005). Duas outras micotoxinas são derivadas hidroxiladas resultantes do metabolismo das toxinas AFB₁ e AFB₂ são elas: aflatoxina M₁ (AFM₁) e M₂ (AFM₂). Foram detectadas no leite e seus derivados, urina e fezes de mamíferos. A toxicidade da AFM₁ e AFM₂ é menor que da AFB₁, porém a maior preocupação está no consumo principalmente por crianças (SCUSSEL, 2002; SILVA, 2005; KAMIKAR, 2006). A Figura 5 mostra a estrutura química das AFLs.

A série G das AFLs difere quimicamente da série B pela presença de um anel 3-lactona, no lugar do anel ciclopentanona. Uma dupla ligação 8, 9 é encontrada na forma de um éter vinil no anel terminal furano nas AFLs AFB₁ e AFG₁, mas não em AFB₂ e AFG₂. Essas variações que diferem as AFLs estruturalmete estão associadas também a suas atividades, sendo as AFB₁ e AFG₁ carcinogênicas e consideravelmente mais tóxicas que AFB₂ e AFG₂ (JAIMEZ et al., 2000).

As AFLs são furomarinas complexas contendo intensa fluorescência quando expostas à luz ultravioleta (UV) com comprimento de onda longo (365 nm). Esta propriedade é aproveitável para sua identificação e quantificação, quando presentes em diversos tipos de alimentos (PELLETIER; REIZNER, 1992). São substâncias apolares, solúveis em solventes como o clorofórmio, metanol, benzeno, acetonitrila, etc. São instáveis a luz UV, mas bastante estáveis a

temperatura acima de 250°C e não são afetadas pelo frio. Pequena ou nenhuma decomposição de AFLs é obtida sob condições normais de cozimento, pasteurização e torrefação de alguns tipos de alimentos (PATERSON, 2006). Além disso, são incolores, inodoras e não alteram o sabor dos alimentos (PÁDUA; SILVEIRA; MARTINS, 2002). Agentes oxidantes, como água oxigenada e hipoclorito de sódio, reduzem o teor de AFLs no alimento, mas a utilização de tais soluções é impraticável, uma vez que ocorre, além da destruição de nutrientes, “flavor”, cor, textura e propriedades funcionais do alimento, a formação de resíduos tóxicos (PÁDUA; SILVEIRA; MARTINS, 2002).

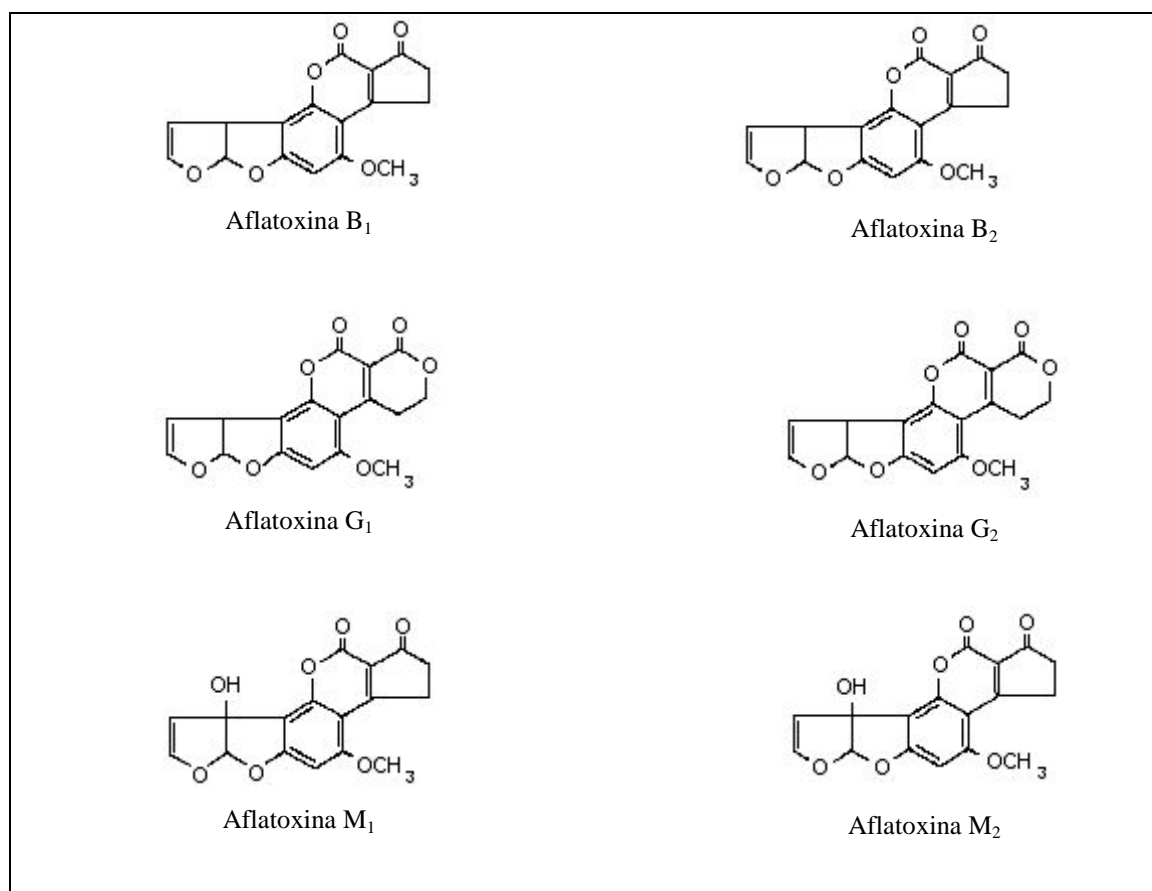


Figura 5 - Estruturas químicas das aflatoxinas

a) Toxicidade

Há mais de 20 tipos de moléculas de AFLs e seus derivados isolados, porém os principais tipos estudados continuam sendo a AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ (HUSSEIN e BRASEL, 2001), deido à elevada toxicidade apresentando efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos (ROSA, 1995). As aflatoxinas presentes nos alimentos contaminados têm sido identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem sendo a AFB₁ é o composto com maior potencial toxigênico (hepatocarcigênico) conhecido em mamíferos. A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou essa toxina como carcinógeno humano do Grupo I. e

a exposição crônica na dieta, a pequenas quantidades desse composto, é considerada prejudicial à saúde humana (CALONI et al., 2006; GIRAY, 2007; MCLEAN e DUTON, 1995).

A AFB₁ é a AFL que apresenta o binômio causa/efeito (ingestão de alimentos contaminados/efeitos tóxicos) bem determinado. A ingestão de alimentos com baixos teores de AFLs com uma dada frequência e por tempo prolongado determinada aflatoxicose crônica (SCUSSEL, 2002), pode levar ao aparecimento de carcinoma hepático, devido às mutações no gene de supressão P53 e pela ativação de oncogenes dominantes (GIRAY, 2007). Por outro lado a ingestão de alimentos com alto grau de contaminação á curto prazo, determinada aflatoxicose aguda produz, efeitos agudos, caracteristicamente hepatotóxicos (HAAS, 2000). Esta hepatotoxicidade se deve a alta reatividade da 8,9-epóxido-AFB₁ no metabolismo no fígado mediado pelo sistema do citocromo P450. Os efeitos metabólicos incluem inibição da síntese protéica, DNA e RNA, redução de atividade enzimática, depressão do metabolismo de glicose, inibição de síntese de lipídeos, fosfolipídios, ácidos graxos livres, entre outros, interferindo no sistema imunológico e conseqüentemente, reduzindo a resitência às doenças (TEIXEIRA, 2008).

O efeito agudo de aflatoxicose em homens e animais é de manifestação e percepção rápidas, podendo levar à morte, pois causa alterações irreversíveis. O efeito subagudo é o resultado da ingestão de doses não elevadas que provoca distúrbios e alterações nos órgãos, especialmente no fígado. Ambos os casos dependem da susceptibilidade da espécie animal, da idade, onde os mais jovens são mais afetado, do estado nutricional e do sexo. Sabe-se, também, que ela pode provocar cirrose, necrose do fígado, proliferação dos canais biliares, síndrome de Reye (encefalopatia com degeneração gordurosa do cérebro), hemorragias nos rins e lesões sérias na pele, pelo contato direto. (TEIXEIRA, 2008).

Estudos epidemiológicos mostraram que a exposição à AFLs associada com o vírus da hepatite B aumenta o risco de carcinoma hepatocelular, e a presença desse vírus parece aumentar a potência das AFLs (IARC/WHO, 1993). Por seu efeito mutagênico e carcinogênico, os testes de laboratório e os estudos epidemiológicos ligam o consumo de AFLs ao aumento da incidência do câncer de fígado (HAAS, 2000). Foi esta descoberta que estimulou a revalidação dos padrões internacionais para os níveis de AFLs em alimentos (NEWING; HARROP, 2000).

b) Legislação Nacional

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. O Ministério da Saúde estabelece através da resolução RDC n° 274 em concordância com o Ministério da Agricultura o limite de 30 µg/kg AFB₁+AFG₁ em alimentos de consumo humano (BRASIL, 2002) e o Ministério da Agricultura e do Abastecimento estabelece o de 20 µg/kg de aflatoxinas totais para matérias-primas de alimentos e rações

(BRASIL, 1996). Este limite é comparável ao estabelecido por outros países (DOLL; PETO, 1981) e recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização para Alimentação e Agricultura (OMS/FAO, 1998).

c) Legislação Internacional

Seguindo a consideração da toxicidade de AFLs em 1997 pelo Comitê Científico de Alimentação, em 16 de julho de 1998, a CE (Comunidade Européia) adotou o regulamento da comissão 1525/98 reduzindo os Limites Máximos de Resíduo (LMR) para as AFLs em alimentos, e a comissão diretiva 98/53/EC detalhando procedimentos com relação a amostragem e métodos para análise de amostras. Os limites para a castanha brasileira (para consumo humano direto ou como ingredientes de gêneros alimentícios) foram estabelecidas em $4\mu\text{.kg}^{-1}$ para AFLs totais ($\text{AFB}_1 + \text{AFB}_2 + \text{AFG}_1 + \text{AFG}_2$) e $2\mu\text{.kg}^{-1}$ para AFB_1 (EC, 1998; NEWING; HARROP, 2000). Isto levou o governo brasileiro a definir legislações com normas para a cadeia produtiva, envolvendo a amostragem (coleta, preparo e tamanho da amostra), método analítico e de preparo, bem como diretrizes para aplicação dos princípios de Boas Práticas de Fabricação/Manejo (BPF/BPM) e do Sistema de Análises e Pontos Críticos de Controle (APPCC) pelos extrativistas e usinas de beneficiamento (BRASIL, 2004).

Devido a potenciais riscos para os seres humanos, níveis regulamentares foram recentemente documentados. Os níveis da regulamentação para AFB_1 e aflatoxinas totais foram de 0 a 30 $\mu\text{g/kg}$ e de 0 a 50 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente (FAO, 1997). Os países do Mercosul estabelecem o limite máximo de 20 $\mu\text{g/kg}$ para as AFLs totais (MERCOSUR, 1994). Na União Europeia, níveis de aflatoxinas AFB_1 e humanos *commodities* estão regulamentados com Limites Máximos de Resíduos (LMR), que não pode ser superior a 2 e 4 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente (CEE 1998). Recentemente, a Comissão do *Codex Alimentarius*, Joint FAO/WHO Food Standards Program aprovou um limite de 15 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas (CODEX, 2001). Na Coréia, um resíduo limite de 10 $\mu\text{g/kg}$ para os gêneros alimentícios AFB_1 foi estabelecido desde 1989 (KFDA, 2000). A União Europeia estabeleceu um limite máximo legislativo para as aflatoxinas em nozes e produtos com nozes destinados ao consumo direto a 2 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxina B_1 e 4 $\mu\text{g/kg}$ para o somatório das aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 (EC, 2006).

Como ainda não há harmonização dos limites de AFLs em castanha-do-Brasil para todos os países importadores, na Tabela 4, estão citados os limites máximos permitidos utilizados em alguns países, incluindo a América Latina e Mercosul, para AFLs em alimentos em geral.

Tabela 4 - Limites máximos permitidos para aflatoxinas em alimentos em diversos países

País	Limite máximo (μkg)	Alimentos
África do Sul	5 (AFB ₁) 10 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Todos os alimentos
Austrália	5 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Todos os alimentos
Canadá	15 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Nozes e seus produtos
Estados Unidos	20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Todos os alimentos
Filipinas	20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Nozes e seus produtos
Índia	30 (AFB ₁)	Todos os alimentos
Israel	5 (AFB ₁) 15 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Nozes, amendoim, farelo de milho, figos e seus produtos
Japão	10 (AFB ₁)	Alimentos em geral
Nova Zelândia	5 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Todos os alimentos
União Européia	2 (AFB ₁) 4 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Amendoim, nozes em geral e frutas secas para consumo direto ou como ingrediente de alimentos
América Latina		
Argentina	Zero (AFB ₁) 20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 5 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 30 (AFB ₁)	Alimento infantil Derivados de amendoim Milho Farinha de soja
Brasil	20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Amendoim (<i>toasted, roasted</i> , com/sem pele) Pasta de amendoim Farinha de milho Milho (integral/quebrado/moído)
Bolívia ^a	20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	(integral/sem gérmen)
Colômbia	NH ^b 20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 30 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 10 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	NH ^b Alimentos Cereal (sorgo, mileto) Oleaginosas Sementes de gergelim
Mercosul	20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Amendoim (com/sem pele) Amendoim (torrado) Pasta de amendoim Farinha de milho (integral/sem gérmen) Milho Corn meal
Peru	20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Alimentos
Suriname	10 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 5 (AFB ₁)	Amendoim Produtos de amendoim Leguminosas
Uruguay	5 (AFB ₁) 30 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 30 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 30 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 10 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 3 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Milho Amendoim Produtos de amendoim Alimentos e especiarias Derivados de soja Frutas secas Côco Alimento infantil

Fonte: PACHECO; SCUSSEL (2006).

^amaior exportador de castanha-do-Brasil

^bnão há legislação

2.3 Contaminação da castanha-do-Brasil por fungos e aflatoxinas

A castanha-do-Brasil, durante toda a sua trajetória comercial, sofre ação depredatória. O atrito das sementes, por ocasião do transporte, produz rachaduras na casca. O clima e o grau pluviométrico na época da safra são fatores que favorecem a penetração de insetos, parasitas e microorganismos atuando junto à amêndoa deteriorando-a total ou parcialmente. Dentre os microorganismos responsáveis, os fungos filamentosos saprófitas, são os que mais participam do

processo. Presentes no solo, água, vegetais e veiculados pelo ar, encontram-se em permanente contato com o produto, constituindo-se em principal ameaça à sua integridade (CASTRILLÓN, 1988).

Árvores de nozes estão sujeitos a infecção por uma variedade de microorganismos que podem provocar deterioração ou produzir metabólitos que são tóxicos para os seres humanos, animais e aves. Embora em muitos casos, as fontes de infecção ainda não são conhecidas, são agravados por fatores como danos mecânicos, ataque de insetos, seca e temperaturas elevadas. Um levantamento da incidência estabelecido que os mais freqüentemente encontrados foram gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Penicillium* (BAYMAN et al., 2002).

Os primeiros relatos de problemas da segurança toxicológica da castanha-do-Brasil datam da década de 60, em que foi relatada a “podridão da castanha” causada por fungo do gênero *Aspergillus* (ALMEIDA, 1963). A castanha-do-Brasil que é mais consumida no estrangeiro, começou a sofrer medidas restritivas após o evento de 1960 na Inglaterra, em parte, por ser o alimento proveniente do Brasil (LIRA, 1976).

A presença de fungos nos alimentos alertou os países importadores de grãos, no sentido de fiscalizar mais intensamente estes produtos adquiridos, estabelecendo, padrões tolerância dos níveis de contaminação. Produtos como milho, amendoim, castanha-do-brasil e outros contaminados, por AFLs, vem dificultando a exportação dos mesmos a países desenvolvidos, onde há rígido controle dos limites de tolerância desta toxina (da SILVA et al., 2007). Considerando-se a importância dos fungos nos processos de deterioração dos produtos alimentícios e de produção de aflatoxinas nas amêndoas, torna-se necessário a realização de pesquisas sobre as espécies fúngicas contaminantes e um estudo sobre a freqüência de *Aspergillus* sp. produtores de AFL nesse substrato (CASTRILLÓN, 1988).

2.3.1 Fungos e aflatoxinas em castanha-do-Brasil

a) Fungos

A armazenagem é considerada uma etapa crítica, pois dependendo de sua duração e condução, poderá ocorrer o desenvolvimento do fungo e a produção de AFLs (CAMPOS/PAS, 2004). Consideram-se os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* os principais envolvidos com castanha-do-Brasil, entretanto, nem sempre a presença de fungos aflatoxigênicos está diretamente relacionada à presença da AFLs em castanha-do-Brasil, pois em amostras coletadas diretamente da floresta havia ausência de AFLs, apesar da presença de cepas aflatoxigênicas (CARTAXO et al., 2004; ARRUS et al., 2005a). Em castanhas retiradas diretamente da floresta foi constatada a presença de fungos filamentosos, porém, AFLs, não foram detectadas (CARTAXO et al., 2004).

Por outro lado, pode ocorrer a interação de cepas de *Aspergillus flavus* não-toxigênicas com *Aspergillus parasiticus*, com sinergismos na produção de AFLs (Martins et al., 2000). A casca da castanha, por ser rígida e rugosa pode conferir proteção contra o ataque de fungos à amêndoa, enquanto rachaduras na casca permitem a entrada de microrganismos causadores de contaminação (FREIRE et al., 2000). Foram identificadas espécies de *Aspergillus* em castanha de unidades de beneficiamento (SOUZA et al., 2003) e em castanha com casca adquirida no varejo (BAYMAN et al., 2002). Já em amostras procedentes de Belém-PA, foram identificadas bolores e leveduras, como por exemplo, *Pichia* sp e *Rhodotorula* sp. (FREIRE; OFFORD, 2000). Alguns dos fungos isolados da castanha-do-Brasil estão sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5 - Fungos identificados em castanha-do-Brasil *in natura* e pós-processamento com ou sem casca, reportados na literatura

Tipo de Castanha	Procedência	Local de coleta	N° Amostras	Fungos	Autores
[A] NÃO PROCESSADA (COM CASCA)					
[A.1] Da Floresta					
	Peru	Peru	15 ^a	<i>A.Wentii, Penicillium sp</i>	Arrus et al. (2005a)
	Acre	Acre	4 ^b	<i>A.flavus, A.niger</i>	Cartaxo et al. (2003)
[A.2] Das Comunidades					
Antes das BPM ^c	Amazonas	Amazonas	- ^d	<i>A.zonatus, A.flavus, A.awamon, A.ficcum, A.tubingensis, a.oryzae, A.japonicus, A.fetidus, A.flavofurcatis, a.niger, a.pulverulentus, A.parasiticus, Fusarium sp, Iddriela lunata, Gliocadium, Trichoderma harzianum, Scopulanopsis brumotii, Mortierella, Verticitiadiela, Micelia sterilia</i>	Simões (2004)
Após as BPM ^c	Amazonas	Amazonas	-	<i>Acremonium strictum, A.itaconicus, A.ficcum, A.japonicus, A.niger, A.oryzae, Cladosporium sphaerospermum, Trichoderma hamatum, P.glabrum, P.fellutano, Micelia sterilia, Gliocadium viridi, Exophiala, eupenicilium, Cyllindrocarpon magnudianum, Colletotrichum</i>	
.....	-	-	-	<i>A.flavus, A.niger, A.fumigatus, A.clavatus, P.verrucosum, P.viridicatum, P.citrinum, F.sacchari, F.oxysporum, F.vercitoliodis, Alternaria alternata</i>	CAMPOS/PAS (2004)
[A.3] Feira Livre					
	-	Amazonas	Ouriço	<i>Aspergillus sp, Candida sp, Cladosporium sp, Fusarium sp, Geotrichum sp, Penicillium sp, Cephalosporium sp, Phialoopora sp, Torulopsis sp, Trichodermasp, Verticillium sp</i>	Castrillon e Purchio (1988)
[B] PROCESSADA (DESIDRATADA)					
[B.1] Com casca					
No beneficiamento	-	Amazonas	12 ^e	<i>Pichia sp, Rhodotorula sp, sacharomyces sp, Candida sp</i>	Pacheco e Scussel (2007) ^c
	Acre	Acre	72 ^f	<i>A.niger, A.flavus, Rhizopus sp, Trichoderma sp, Fusarium sp, F.sacchari, T.viridi, P.citrinum, a.clavatus, F.oxysporum, Trichoderma harzianum</i>	Souza et al. (2003)
	-	Amazonas	30 ^g	<i>A.flavus, A.niger, Penicillium sp, Fusarium sp, Gliocadium sp, Chalara sp, Syncephalostrum sp,</i>	Pacheco (2003)

				<i>Absidia sp</i>		
<hr/>						
<i>[B.2] Sem casca</i>						
Embalagem comercial não-esterilizada	-	Belém (PA)	2 ^h	<i>Acinetobacter baumannii, B.cereus, B.macerans, B.subtilis, E.coli, E.sakazakii, Pichia sp, Rothayibacter tritici, Rhodotorula sp</i>	Freire e Offord (2002)	
Esterilizada ⁱ	-	Belém (PA)	2 ^h	<i>B.macerans, B.pumilis, S.aureus, Pichia sp</i>	Freire e Offord (2002)	
	-	Belém (PA)	4 ^j	<i>Acremonium curvulum, A.flavus, A.fumigatus, A.niger, A.tamaraii, Cunninghamella elegans, Exophiala sp, Fusarium oxysporum, P.citrinum, P.glabrum, Phialophora sp, Phoma sp Pseudallescheria boydii, Scopulariopsis sp, Thielavia terricola, T. citrinoviride,</i>	Freire; Kozaiewicz e Paterson (2000)	e
Não-esterilizada	-	Califórnia	59 ^k	<i>A.flavus, A.niger, A.fumigatus, A.nidulans, A.tamaraii, Penicillium sp, Rhizopus</i>	Bayman, Baker e Mahooney (2002)	e
Esterilizada	-	Califórnia	51 ^k	<i>A.flavus, A.niger, A.fumigatus, A.nidulans, A.tamaraii, Penicillium sp, Rhizopus</i>	Bayman, Baker e Mahooney (2002)	e

Fonte: PACHECO (2007).

^a total de frutos (ouriços) analisados; ^b amostras de 1,5 kg com análises efetuadas em diferentes tempos de armazenamento (0,30,60 e 90 dias) em que *A.flavus* e *A.niger* foram predominantes, entretanto com 60 dias houve presença de *F.sachari* e *F.oxysporum*; ^c boas práticas de manejo; ^d não informado; ^e 40 kg cada; ^f 1 kg cada; ^g 2,5 kg cada; ^h 2,0 kg cada; ⁱ amostra passou por processo de esterilização antes da análise; ^j 500g; ^k unidades.

b) Aflatoxinas

Com relação à presença de aflatoxinas em castanhas, tem sido observado, de maneira geral, que em castanha com casca há maior probabilidade de encontrar unidades contaminadas quando comparadas com as castanhas descascadas. A porcentagem de contaminação em castanhas avaliadas em alguns estudos realizados na região amazônica foi de 3 a 9% sendo que algumas amostras apresentaram contaminação acima do permitido pela União Européia (2 e $4\mu\text{g.kg}^{-1}$ para AFB_1 e AFLs total, respectivamente) (CASTILLON, 1994). Os resultados das análises do Projeto de Monitoramento da castanha-do-Brasil na cadeia produtiva mostraram situação preocupante, onde 44% das amostras apresentaram contaminação por AFLs e dessas, 40% estavam acima do limite de $30\mu\text{g.kg}^{-1}$. Ao considerar os níveis de contaminação por etapa da cadeia produtiva foi observado que as amostras procedentes dos extrativistas e das empresas apresentaram níveis de contaminação acima do limite permitido em 50 % e 36 % das amostras, respectivamente (SOUZA et al., 2006). Da Gloria et al. (2006) verificaram que castanhas da linha de beneficiamento, com amostras visualmente classificadas como (“primeira”, avariada”, “cascuda” e “pedaços”), foi observado que 0, 3, 5, 10 amostras dos tipos primeira, cascuda, pedaços e avariada, respectivamente apresentaram contaminação por AFLs. Os níveis de contaminação por AFLs foram de 2-36, 3-58 e 2-529 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para os tipos cascuda, pedaços e avariada, respectivamente. Estes resultados mostraram que houve diferença nos níveis de contaminação entre os tipos visuais estudados e que a separação destes constitui-se em um instrumento efetivo para redução dos níveis de contaminação. MARKLINDER et al. (2005) verificaram que o consumidor tem habilidade para distinguir castanhas de qualidade das castanhas contaminadas, e selecioná-las visualmente.

STEINER et al. (1992) observaram que castanhas-do-Brasil contaminadas por AFLs apresentaram fluorescência sob luz UV, e quando essas castanhas fluorescentes foram removidas, as castanhas restantes (87,7%) ficaram livres da contaminação por AFLs. Já Pacheco (2003) não detectou nenhuma amostra AFL positiva em amostras do beneficiamento (recém processadas) sem casca.

As várias pesquisas sobre a presença de AFLs em castanha-do-Brasil e seus resultados estão na Tabela 6.

Tabela 6 - Contaminação por aflatoxinas em castanha-do-Brasil

Tipo	Procedência	Local de Coleta	Nº de amostras	Quantidade (Kg)	Σ AFLs (µg/Kg)			Método	Detecção ΣAFLs (µg/Kg)		Autores	
					Média	Min.	Máx.		LD	LQ		
[A] Não Processada (crua e com casca)												
A.1 Floresta	Peru	Ouriço da árvore	15	- ^a	ND ^b	NA	NA	ELISA	1.75	NI	Arrus et al., (2005a)	
	Brasil	Chão da Floresta	4	1.5	ND	NA	NA	CCD	NI	NI	Cartaxo et al., (2003)	
A.2 Comunidades	Brasil	Após estocagem ^c	1 ^a	40	30	4.9	2.0	11.5	LCMS/MS	0.195	0.39	Pacheco e Scussel (2007a)
	Brasil	Após estocagem ^d	1 ^a	40	30	2.0	1.2	4.5	LCMS/MS	0.195	0.39	Pacheco e Scussel (2007a)
	Brasil	Após estocagem ^e	1 ^a	NI	NI	20.5	0.6	16.0	CCD	0.8	NI	Simões (2004)
	Brasil	Após estocagem ^f	1 ^a	NI	NI	1.0	1.0	1.1	CCD	0.8	NI	Simões (2004)
Após 2ª estocagem	Brasil	Embarcações	120	30	105.23 ^g	4.0 ^g	250 ^g	CCD	2.0	NI	Pacheco (2003)	
	Brasil	Porto da usina	16	1	11.13	4.8	19.2	CCD	1.5	NI	Pacheco e Scussel (2006)	
[B] Processada (Desidratada)												
[B.1] Fábrica												
Com casca (tipo exportação)	Brasil	Área de expedição ^h	de 36	12	1.2	1.6	6.0	LCMS/MS	0.195	0.39	Pacheco e Scussel (2007b)	
	Brasil	Área de expedição	de 3 ⁱ	15	5.616	NA	NA	LCMS/MS	0.195	0.39	De Mello Robert e Scussel (2007)	
	Itália ^l	Suécia	100	0.3	-	1.4	557	HPLC	NI	NI	Marklinder et al., (2005)	
	Brasil	Depósito da usina	10	-	-	0.1 ^e	2.25 ^g	CCD	NI	NI	Castrillon e Purchio (1988)	
Sem casca	Brasil	Área de classificação	de 27	6.0	1.1	1.4	7.4	LCMS/MS	0.195	0.39	Pacheco e Scussel (2007b)	
	Brasil	Área de classificação	de 30	2.5	ND	NA	NA	CCD	2.0	1.5	Pacheco (2003)	
[B.2] Comércio												
Com casca	NI	Inglaterra	1	1-2	ND	NA	NA	CCD	5	NI	Kershaw (1985)	
	NI	Reino Unido (Glasgow)	-	0-1	ND	NA	NA	CLAE	2	NI	Candlish et al. (2001)	
	Brasil	Japão	4	0.2-1	14.5	NI	NI	HPTLC	0.6	NI	Tabata et al. (1993)	
	Brasil	Suíça	1 ^m	8	-	1.88	79.8	CCD	0.5-2	NI	Steiner et al. (1992)	
	NI	Suécia	17	0.1-1	-	0.01	2500	CLAE	0.01	NI	Thuvander et al. (2001)	

Sem casca	Brasil	Manaus	27	0.2-0.5	1.1	1.4	7.4	LCMS/MS	0.195	0.390	Pacheco e Scussel (2007b)
	Brasil	Manaus	30	0.2-0.5	45.2	8.0	630	CCD	2.0	NI	Pacheco (2003)
		África do Sul	51	20	21.0	8.3 ^g	20 ^g	HPTLC	0.1	NI	Ioannou-Kakouri et al., (1999)
	Brasil	Brasília	9	Mínimo 1	27.0	48	294	CCD	8	NI	Caldas et al., (2002)
	Brasil	Acre	-	-	ND	NA	NA	CCD	10	NI	Souza e Menezes (2004)
	Brasil	Belém (PA)	22 ⁿ	-	-	66	21.679	CCD	0.2	0.2	Da Glória et al., (2006)
	Brasil	Santa Catarina	63	-	ND	ND	ND	CCD	2	2	Scussel (2004)
	Brasil	Belém (PA) ^o	4	0.5	ND	NA	NA	CLAE	-	NI	Freire e Offord (2002)
Brasil	Belém (PA) ^p	-	-	29.2	NI	NI	-	-	-	Freire e Offord (2002)	

Fonte: PACHECO (2007)

^a não informado; ^b não detectado; ^c Comunidade de Itacoatiara/Autazes; ^d Comunidades de Boca do Acre/Amaturá; ^e Antes das BPM; ^f Depois das BPM; ^g AFL B₁; ^h Amostras da safra de 2007; ⁱ do total de 15 kg divididos em três grupos de acordo com o tamanho (grande, médio e pequeno); ^j Resultado de AFL B₁ para amostras do grupo de tamanho pequeno; ^l País da beneficiadora que forneceu as amostras de castanha-do-Brasil para o estudo e não informada a origem; ^m um lote de 42.286 kg; ⁿ 22 amostras rejeitadas no estudo; ^o Castanhas classificadas de Boa Qualidade; ^p Castanhas classificadas de Baixa Qualidade.

2.5 Armazenagem como método de conservação da qualidade

Na safra de 2008-2009 o Brasil está colhendo cerca de 137,5 milhões de toneladas de grãos (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2009) e grande parte é perdida por falta ou por más condições de armazenagem. Em países em desenvolvimento, essas perdas chegam a atingir até 30% em alguns casos, sendo 10% causados diretamente pelo ataque de pragas durante o armazenamento (CONAB, 2009). Após a colheita, a respiração e outros processos metabólicos de grãos continuam ativos, ocasionando na maioria das vezes, perdas significativas de qualidade. Estes processos podem ser diminuídos e/ou retardados através da redução da umidade, que é a forma mais usada comercialmente para prolongamento do tempo de conservação. Mas mesmo com uso de baixa umidade, os grãos perdem qualidade devido à perda de peso e consumo de energia pelo processo respiratório, pelo aumento de rachaduras e ocorrência de pragas e fungos (BRACKMANN, 2002).

Panetta, (1998) relata que o aspecto mais importante a considerar no armazenamento é a manutenção da qualidade do produto. A conservação é uma exigência natural dos alimentos que requerem cuidados para obtenção de um bom produto final. Os processos de produção devem ser seguros, especialmente para com os produtos perecíveis, sendo que as temperaturas elevadas convertem-se em ponto crítico de controle fundamental para garantia e qualidade dos alimentos.

De acordo com Bramorski et al. (2005), a maior parte do Brasil apresenta clima tropical e umidade relativa alta, sendo assim, o cuidado com os alimentos deve ser redobrado para não ocorrer o armazenamento inadequado, comprometendo a vida útil e aumentando os riscos de decomposição dos produtos. É de suma importância analisar e manter as condições satisfatórias de controle de temperatura, limpeza, rotatividade e ventilação, garantindo uma possível redução do crescimento microbiano e diminuindo velocidade de reações químicas e enzimáticas que possam deteriorar os produtos.

O objetivo principal do armazenamento, que inicia antes da colheita, quando a semente atinge o ponto de maturidade fisiológica até a época da semeadura, é manter a qualidade das sementes reduzindo ao mínimo a deterioração, já que a qualidade das sementes se faz no campo e não poderá ser melhorada, nem em condições ideais de armazenamento (BAUDET, 2003). O armazenamento das sementes para fins agrícolas geralmente é utilizado para a manutenção de

estoques no período da entressafra ou para a provisão de quantidades suficientes para atender a demanda de comercialização. Muitas vezes é necessário o armazenamento por longos períodos para garantir estoques em anos que sucedem frustrações de safras, quando as sementes produzidas estão aquém do padrão exigido, ou para a conservação de germoplasma (BERJAK, 1987b; WETZEL, 1987). No entanto, as mesmas condições de armazenamento que permitem a manutenção da viabilidade das sementes, podem também favorecer a sobrevivência de muitos patógenos importantes para a cultura.

2.5.1 Tipos de armazenagem

No que se refere aos tipos de edificação, as convencionais destinam-se à armazenagem de produtos acondicionados em um determinado tipo de embalagem, como sacarias, enquanto do tipo a granel dispensam o uso de embalagens e podem possuir em suas estruturas silos metálicos, silos em concreto e/ou armazéns graneleiros.

a) Armazém convencional

Constitui-se numa unidade armazenadora de fundo plano e compartimento único, adequado à estocagem de produtos, normalmente em sacos, fardos, caixas, *pallets* e *bags*. *Pallets* é a plataforma portátil sobre a qual podem ser empilhados materiais ou produtos em cargas unitárias, de modo a facilitar o empilhamento vertical e a movimentação horizontal, através de dispositivos mecânicos de elevação e translação (BRANDÃO, 1986) (Figura 6). *Bags*, lançado há pouco tempo no Brasil corresponde ao silo tipo bolsa, instalado no chão sem qualquer preparo especial do solo e sem cobertura. Representa uma alternativa prática e viável para os pequenos produtores rurais armazenarem o seu produto. Consiste num tubo flexível de PVC ou similar e lâminas triplas de polietileno de baixa densidade, podendo preservar a qualidade dos grãos (úmidos ou secos) por até um ano (WEBER, 2005) (Figuras 7).



Figura 6 - Armazém convencional

Fonte: CASEMG (2008)



Figura 7 - Armazenagem tipo silo-bolsa

Fonte: CASEMG (2008)

Geralmente o produtor acondiciona os grãos em sacos de aproximadamente 50 kg, os quais devem ser armazenados em galpões arejados e secos com piso impermeáveis e sobre estrados (*pallets*). Também pode forrar o piso com sacos plásticos ou lona plástica, evitando o contato direto dos grãos com o piso. É recomendável que os sacos sejam empilhados sobre um estrado de madeira e que haja alguns centímetros entre ele e o piso, a fim de que seja facilitada a circulação de ar e impedida absorção da umidade do solo. As pilhas não devem ser encostadas às paredes e não devem ser muito altas, pois impedem o arejamento e aumentam o problema de empedramento das camadas e possível rompimento dos sacos inferiores, além do risco de desmoronarem (NOGUEIRA, 2007).

b) Granel

A implantação do manuseio e armazenagem de grãos a granel se constitui em uma tendência universal nos países desenvolvidos. A manipulação a granel é generalizada e integrada desde a colheita. À medida que o agricultor melhora o nível de tecnificação, utilizando técnicas combinadas nas colheitas, verifica-se a tendência de manipular a sua produção a granel, como acontece em algumas regiões do sul e sudeste do país (ARCE, 2004). De forma geral, os depósitos destinados ao armazenamento de grãos a granel são classificados em silos elevados e silos horizontais segundo a forma da estrutura de armazenamento. Os silos elevados são os depósitos cuja altura é maior que o diâmetro. Os silos horizontais ou armazéns graneleiros têm altura menor que a base (ARCE, 2004).

- **Armazém Granelizado:** É o resultado da adaptação dos armazéns convencionais para operar com o produto a granel. Apresenta fundo plano, reforço nos fechamentos laterais e equipamentos de transporte horizontal e vertical de grãos. As vantagens sobre os convencionais são a maior cadência operacional, redução de mão-de-obra, aproveitamento da capacidade ociosa de armazéns convencionais com aumento da capacidade armazenadora e eliminação da sacaria. Já em relação às desvantagens, destaca-se uma menor versatilidade de movimentação dos grãos, a baixa capacidade dinâmica, uma grande quantidade de mão-de-obra para movimentar os grãos, grande possibilidade de infiltração de água e o funcionamento inadequado do sistema de aeração, quando existente (NOGUEIRA, 2007) (Figura 8).



Figura 8 - Armazém granelizado

Fonte: CASEMG (2008)

- **Graneleiro:** Constitui-se em unidade armazenadora cuja estocagem é a granel e desenvolve-se em sentido horizontal, através de um ou mais compartimentos, dependendo da existência de septos divisórios. Dada a simplicidade construtiva do graneleiro, via de regra, apresenta o custo da tonelada instalada bem inferior ao dos silos. Seu perfil mostra que o ar quente, que é mais leve, é que tem acesso no interior do depósito. O armazenamento a longo prazo é problemático, tendo em vista a dificuldade para o expurgo. Os riscos de deterioração são maiores em vista da grande massa do produto estocado. Nem sempre o sistema de termometria consegue ser instalado eficientemente. Podemos destacar como vantagem deste sistema o baixo custo por tonelada instalada, a rapidez de execução, a grande capacidade em pequeno espaço,

entre outras. No entanto, as desvantagens deste tipo de armazém é a pequena versatilidade na movimentação de grãos, um pequeno número de células, uma grande possibilidade de infiltração d'água e a possibilidade de ocorrer dificuldade de aeração (ARCE, 2004) (Figura 9).



Figura 9 - Armazém graneleiro

Fonte: CASEMG (2008)

c) Silos: São unidades armazenadoras de grãos caracterizadas por células ou compartimentos estanques e herméticos, ou semi-herméticos. Oferecem condições técnicas de conservação do produto estocado por período de tempo normalmente prolongado. Permitem controlar as características físico-químicas e biológicas da massa de grãos que, embora perdendo sua identidade de origem, conservam a diferenciação classificatória da espécie e padrão agrícola, em virtude da compartimentação disponível. São dotados, funcionalmente, de equipamentos automatizados e semi-automatizados que permitem a simultaneidade de operações, inclusive a transilagem em circuito aberto ou fechado, além de baixa utilização de mão-de-obra. Algumas das vantagens que apresentam são menor tempo de manipulação do produto, dispensa sacarias, elevado índice de mecanização e automação (economia de mão-de-obra), grande velocidade de operações, como descarga, carga e expurgo, fundações mais simples e baratas, custo por tonelada inferior ao silo de concreto, células de capacidade média permitindo maior flexibilidade operacional, entre outras. Já algumas desvantagens são investimento alto, maior sensibilidade à umidade dos grãos, dificuldade de individualização dos lotes, baixa flexibilidade de armazenamento, limitado praticamente a grãos e “*pellets*”, dificuldade de operações com produtos farináceos, possibilidade de infiltração de água e de vazamento de gases durante o expurgo, transmissão de calor ambiente para dentro da célula, podendo ocorrer condensações, maior custo de instalação que os graneleiros (NOGUEIRA, 2007). Podem ser divididos em dois tipos: silo elevado de concreto e o silo metálico (Figura 10).

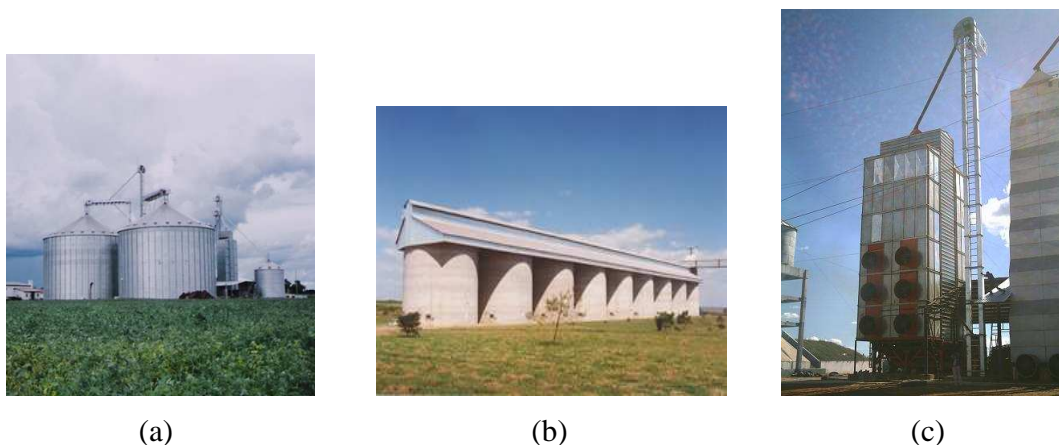


Figura 10 - Alguns exemplos de silos (a) metálicos, (b) de concreto (c) secador

Fonte: CASEMG (2008)

Os silos herméticos podem manter os grãos livres de insetos e impedir o desenvolvimento de fungos e podem armazenar grãos úmidos para a alimentação animal, desde que seja consumido logo após ser retirado do silo. Em relação ao princípio básico do armazenamento hermético, este é o mesmo dos grãos secos ou úmidos e em no seguinte: reduzir a taxa de oxigênio a um nível que causa a morte ou deixa inativos os insetos e fungos. Por causa do processo respiratório dos grãos e destes organismos, há uma redução de oxigênio do ar confinado (ARCE, 2004).

O armazenamento hermético é uma das formas de armazenamento em atmosfera modificada mais antiga. Os primeiros pesquisadores a estudarem foram BAILEY e GURJAR (1918), que observaram que a respiração do grão aumenta com o teor de umidade. Em seguida, MILNER et al. (1947) mostraram que o rápido aumento na produção de dióxido de carbono em grãos com mais de 15% de teor de água foi acompanhado pelo aumento do número de fungos nos grãos.

Após um breve período, um recipiente hermético cheio de grãos úmidos apresentará uma mudança acentuada nas proporções de oxigênio e gás carbônico existente no ar intergranular da massa armazenada. Em razão disso, principalmente do processo respiratório dos grãos e dos fungos associados à massa, verifica-se um rápido consumo de oxigênio e um aumento acentuado da taxa de gás carbônico. A respiração dos grãos secos é baixa. Entretanto quando infestados por insetos, rapidamente consomem o oxigênio disponível e ficam asfixiados. A taxa de redução de oxigênio e do aumento de gás carbônico é determinada pelo grau de infestação de insetos e da

temperatura (Arce, 2004). O mercado hoje oferece um produto chamado *silobag* que é constituído de uma máquina para transporte de grãos e uma bolsa plástica que fecha muito bem, criando um ambiente hermético (EMBRAPA, 2006). O princípio básico deste tipo de conservação de grãos é o de eliminar o oxigênio existente no ar do recipiente hermético, de maneira a suprimir o ataque de fungos e insetos. Os recipientes podem ser dos tipos mais variados, indo desde tambores metálicos, a depósitos de alvenaria e cavidades subterrâneas revestidas. As vantagens do armazenamento hermético são: facilidade de uso, eliminação de insetos sem necessidade de recorrer ao uso de pesticida e baixo custo (WHITE; LESSCH, 1996) (Figura 11).



Figura 11 - Exemplo de armazenamento de silo hermético – tipo *silos bag*

Fonte: EMBRAPA (2006)

2.5.2 Controle das condições de armazenagem

O objetivo real do armazenamento é manter as características que os grãos possuem imediatamente após o pré-processamento, tais como a viabilidade de sementes, a qualidade de moagem e as propriedades nutritivas. Entretanto, independentemente da espécie, do depositante ou das características do local, perdas poderão ocorrer durante a permanência do produto no armazém (BROOKER et al., 1992).

Os problemas de armazenamento de produtos agrícolas constituem objeto de estudo permanente, visando prolongar ao máximo a qualidade dos produtos armazenados, sejam eles semente ou grão para consumo. Segundo diversos pesquisadores, o prejuízo anual que a economia das nações em desenvolvimento sofre em consequência das perdas pós-colheita é muito grande, sendo a causa mais freqüente de perdas no armazenamento o ataque de insetos,

fungos e roedores. Ocorrem ainda perdas das qualidades intrínsecas, como a aparência e o sabor, no caso do feijão para consumo, e, quando se trata das sementes, a sua capacidade de germinar e produzir uma planta vigorosa e sadia.

A deterioração do grão depende do seu teor de umidade, temperatura, oxigênio disponível e microorganismos envolvidos (HALL,1980). A umidade dos grãos é, juntamente com a temperatura, um fator primordial na conservação dos grãos e sementes. Quando a umidade está baixa, a atividade vital (respiração) é diminuída e o metabolismo reduzido ao mínimo. A combinação de baixas temperaturas e baixo teor de umidade dos grãos é ideal para a semente, que necessita se manter viável durante o armazenamento (BRAGANTINI, 2005). Segundo Brooker et al. (1992), grãos com umidade entre 16 e 18,5% podem ser armazenados com segurança por período de 3 a 18 meses se ocorrer a redução da temperatura do grão para valores entre 3 e 10°C. O desenvolvimento de fungos e insetos e as perdas de germinação das sementes são inibidos nesta faixa de temperatura. Existe uma tendência de expansão do uso de resfriamento para grãos armazenados, mas que não irá substituir a secagem. Juntamente com a secagem, o resfriamento irá permitir maior tempo de espera antes da secagem em condições seguras de armazenagem neste período. Em adição, a prática de resfriamento dos grãos possibilita a preservação da qualidade, eliminando a necessidade da rápida secagem dos grãos, com umidade entre 16 e 18%, limitando o desenvolvimento microbiológico e de insetos, e permitindo um maior tempo de armazenamento sem o uso de tratamentos com produtos químicos. Os conteúdos de umidade nos quais ocorre um aumento expressivo na taxa respiratória estão próximos daqueles nos quais o aquecimento e a deterioração se iniciam no armazenamento. Os valores críticos de teor de umidade são de 14% para cereais e 11% para sementes oleaginosas (ATHIÉ et al., 1998). A umidade relativa do ar elevada determina maior grau de umidade das sementes, favorecendo o desenvolvimento de microorganismos, e estes com sua atividade biológica elevam a temperatura da massa de sementes e promovem a aceleração da atividade respiratória das sementes, formando assim uma reação em cadeia que eleva a temperatura e favorece a deterioração das sementes (MARCOS FILHO, 1986).

A temperatura é talvez o fator físico mais importante na conservação dos grãos armazenados, pois a maioria das reações químicas é acelerada com o aumento da temperatura. Quando a temperatura de armazenamento é mais baixa, pode-se armazenar com segurança, mesmo quando a umidade dos grãos está acima da ideal, pois a baixa temperatura inibe o

desenvolvimento de microorganismos e insetos (BRAGANTINI, 2005). Temperaturas elevadas provocam alterações bioquímicas nos grãos e, durante a secagem natural ou artificial, podem prejudicar a qualidade do produto. Temperaturas elevadas também afetam a viabilidade das sementes e em umidades relativas mais elevadas, sementes mortas são mais susceptíveis a invasão por fungos. Em grandes volumes de grãos armazenados a granel, o efeito da temperatura é limitado, devido à baixa condutibilidade térmica dos grãos. No entanto, quando o volume da massa é pequeno ou estão em sacarias, o efeito da temperatura ambiente é maior, e ocorre dentro de um período de tempo mais curto (ATHIÉ et al., 1998). Segundo Weber (1995), os grãos deveriam ser armazenados com temperatura entre 16 e 18°C. De acordo com Acasio (2009), soja com umidade entre 14 e 14,3%, mantida de 5 a 8°C, pode ser armazenada por mais de dois anos sem danos causados por fungos, enquanto que mantida a 30°C, pode ser invadida por fungos em poucas semanas e severamente danificada em seis meses. O mesmo autor afirma que a soja pode ser armazenada com 10,5% de umidade em qualquer temperatura, sem ser danificada por ataque de fungos. Entretanto, com esta umidade, pode desenvolver infestação de insetos, a menos que a temperatura seja mantida abaixo de 20°C. O ideal é que as sementes permaneçam armazenadas em um ambiente em que a temperatura não exceda a 25°C e a umidade relativa do ar não ultrapasse 70% (EMBRAPA, 2004).

Os fungos presentes nas sementes armazenadas são tradicionalmente divididos em dois grupos: de campo e de armazenamento. Os primeiros invadem as sementes ainda no campo, requerendo para o seu crescimento, umidade relativa em torno de 90-95%. O tempo de sobrevivência desses fungos nas sementes está diretamente relacionado com as condições de ambiente do armazém (LAL; KAPOOR, 1979; BERJAK, 1987a; MERONUCK, 1987). Os fungos de armazenamento, por sua vez, estão presentes nas sementes recém-colhidas, geralmente em porcentagens muito baixas. São capazes de sobreviver em ambiente com baixa umidade, proliferando em sucessão aos fungos de campo e causando a deterioração das sementes (BERJAK, 1987a; WETZEL, 1987; CARVALHO; NAKAGAWA, 1988). Quanto aos fungos de armazenamento, os mais freqüentes geralmente são *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* (TUIE et al., 1985; LUZ, 1995; PINTO, 1998). Estes crescem mais rapidamente à 30-32°C. Entretanto, algumas raças de *Aspergillus glaucus* crescem lentamente próximas de 0°C, e certas espécies de *Penicillium* podem crescer à temperatura de alguns graus abaixo de zero. Em geral, estes fungos têm para o seu máximo desenvolvimento uma temperatura ótima em torno de 20-25°C. A

maioria dos fungos de campo são sensíveis a altas temperaturas e usualmente desaparecem em tais condições. Entretanto, *Alternaria tenuis* pode se desenvolver a temperatura acima de 40°C. Pelo controle de umidade e temperatura do grão ou da semente pode-se reduzir a incidência e a população de fungos no armazenamento (NEERGAARD, 1987).

Segundo Yokoya et al. (1971) as amêndoas de castanha-do-Brasil podem ser armazenadas com segurança em ambientes com umidade relativa inferior a 70%, por um período de 8 meses, sem alterações indesejáveis. Castanhas inteiras, em casca, parcialmente desidratadas, contendo 6,8% de umidade, armazenadas em ambiente com 80% de umidade relativa, podem ser conservadas por até 6 meses. Segundo os mesmos autores (1970) as castanhas descascadas armazenadas em ambiente com umidade relativa superior a 80%, em temperatura de 26°C a 28°C, apresentaram crescimento fúngico em sua superfície e aumento de acidez do óleo proporcional ao crescimento dos micélios.

O armazenamento de grãos pode ser definido como um ecossistema em que, mudanças qualitativas e quantitativas podem ocorrer ocasionadas por interações entre os fatores físicos, químicos e biológicos. Os fatores mais importantes que afetam os grãos durante o armazenamento são: temperatura, umidade, concentração de dióxido de carbono e oxigênio no ar intersticial, características do grão, presença de microrganismos, insetos, ácaros, condições do clima e a estrutura do grão (SINHA, 1973). Dentre esses, os insetos assumem particular importância, principalmente em condições tropicais, pelo fato da massa de grãos constituir habitat ideal para o seu desenvolvimento. Os insetos promovem perda de peso, desvalorização e poluição da massa de grãos, aquecimento no local da infestação, aumento da atividade respiratória dos grãos, e, conseqüentemente, maior perda de matéria seca. A perda de peso, devido à respiração dos grãos, durante o período de armazenamento é pequena, quando comparada à causada por organismos vivos, mas, considerada de grande importância, principalmente, para as unidades armazenadoras (PEDERSEN, 1992; MONTROSS et al., 1999). Uma vez conhecidas as principais características da massa de grãos, torna-se importante entender os diversos fatores que influenciam na conservação de grãos armazenados, incluindo os fatores físicos, como a temperatura e a umidade, e os biológicos, como os microorganismos e insetos, que afetam a conservação dos grãos (BRAGANTINI, 2005).

Períodos longos de armazenamento pode ser uma condição favorável ao desenvolvimento de fungos. O período de armazenamento de grãos pode variar de poucos dias à meses, e de

acordo com o período, existem tabelas que indicam qual a temperatura e a umidade do grão adequada à manutenção das qualidades organolépticas do produto (PUZZI, 1973). O resultado de um bom e seguro armazenamento vai estar na dependência da qualidade do produto armazenado, e para a obtenção de um material com qualidade, os cuidados devem iniciar na lavoura. Danos mecânicos, ataques de insetos nas sementes ainda no campo e o atraso da colheita vão afetar a qualidade, propiciando condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos e podem induzir a uma maior velocidade de deterioração do produto armazenado. Uma rápida secagem preliminar do material é de extrema importância, assim como técnicas adequadas de trilhagem e transporte. Todo equipamento de colheita e beneficiamento deve ser limpo, para que não se torne um foco de contaminação do material. Tegumentos danificados ou sementes quebradas facilitam e favorecem a invasão dos fungos. A avaliação dos defeitos na sementes ou nos grãos e condições que favorecem o desenvolvimento dos fungos do armazenamento deve ser realizada através de testes conduzidos no material antes, durante e ao final do período de armazenamento. Os resultados destas avaliações permitirão orientar as medidas de controle a serem adotadas (NEERGAARD, 1987).

2.5.3 Armazenamento da Castanha-do-Brasil

De acordo com as NORMAS ESPECÍFICAS DE CASTANHA-DO-BRASIL – SAFRA 2009 - COMUNICADO CONAB/MOC N.º 030, DE 16/12/2008, nos Estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, os produtos castanha-do-brasil com casca e castanha-do-brasil beneficiada, para os agricultores familiares, produtores rurais e suas cooperativas, beneficiadores e indústrias de castanha-do-Brasil, as castanhas são classificadas de acordo com a Portaria MA n.º 846, de 08/11/1976, não podendo as castanha-do-brasil com casca, com mais de 10% de defeitos e/ou 2% de impurezas.

A CONAB, em norma específica sobre o armazenamento/acondicionamento de castanhas-do-Brasil orienta que:

a) castanhas-do-Brasil com casca: a granel, do produto limpo, seco, ventilado e protegido contra poeira. Quando do seu recebimento no depósito, o produto deverá ser medido, procedendo-se à "bateção" do panelo no hectolitro, para melhor acomodá-lo no recipiente e obter medida mais precisa;

b) castanha-do-brasil beneficiada (amêndoa): em latas, tipo exportação, ou em sacos plásticos, ambos com capacidade para quinze quilos, submetidos a uma injeção de nitrogênio (N) ou gás carbônico (CO₂), hermeticamente fechados e embalados em caixas de papelão, com capacidade para duas unidades (trinta quilos líquidos/caixa). As caixas de papelão que embalam as latas ou os sacos plásticos deverão ter a marca comercial, classe, safra e os pesos líquido e bruto, e ser agrupadas por classe, com a face legendada voltada para a parte externa das pilhas. Observar ainda:

- não se admite, sobre o lastro, superposição superior a quatro caixas;
- não serão admitidas, na mesma embalagem, latas ou sacos plásticos contendo produtos de diferentes classes e safras;
- não caberá adiantamento correspondente à embalagem;
- o beneficiário deverá preencher declaração de que cumpriu a exigência com relação à injeção de nitrogênio (N) ou gás carbônico (CO₂) nas embalagens;
- o limite máximo admitido na participação da quantidade total do produto, é de 7% (sete por cento) de amêndoas feridas (*chipped*) e 11% (onze por cento) de amêndoas quebradas (*broken*), não sendo permitidos lotes isolados de amêndoas das classes "*chipped*" e "*broken*".

O armazenamento na unidade de produção, quando o produto não é comercializado imediatamente deve ser realizadas, em armazéns de madeira e áreas compatíveis com a produção evitando assim grande pilhas (Figura 12), as castanhas devem estar livres de safras anteriores e não armazenar produtos químicos e implementos.



Figura 12 - Armazenamento da castanha-do-Brasil na área de produção.
Fonte: EMBRAPA, 2009

Já no armazenamento na unidade de beneficiamento, as castanhas devem estar em sacos de propileno, aniagem ou caixas sobre estrados; ter distância entre pilhas e paredes; ter boa ventilação, tela; a granel em silos, aeração forçada; ter exaustores quando possível, ter monitoramento diário da temperatura e umidade e os lotes devem estar separados e identificados (Figura 13).



Figura 13 - Armazenamento da castanha-do-Brasil na unidade de beneficiamento.
Fonte: EMBRAPA, 2009

2.6 Uso de atmosfera na armazenagem e em embalagem

O uso da atmosfera artificial teve início com os egípcios, que já armazenavam em recipientes hermeticamente fechados. Com os frutos, os primeiros experimentos foram realizados na França, em 1821, por Jacquet Beard, mas, o grande avanço tecnológico da atmosfera controlada deve-se a Kidd e West, que iniciaram seus estudos em 1918, na Inglaterra (BRACKAMNN; CHITARRA, 1998).

O armazenamento em atmosfera controlada consiste no prolongamento da vida pós-colheita de produtos, por meio da modificação e controle dos níveis dos gases no meio de armazenamento. Já a atmosfera modificada consiste no prolongamento da vida pós-colheita de produtos, pela modificação da atmosfera, geralmente por meio de filme plástico que envolve o produto, porém, sem controle das concentrações dos gases formados ou existentes (WHITE; LEESCH, 1996).

Após a colheita, a respiração e outros processos metabólicos de grãos continuam ativos, ocasionando, na maioria das vezes, perdas significativas de qualidade. Estes processos podem ser diminuídos e/ou retardados através da redução da umidade, que é a forma mais usada comercialmente para prolongamento do tempo de conservação, mas mesmo com uso de baixa umidade, os grãos perdem qualidade devido à perda de peso e consumo de energia pelo processo

respiratório, pelo aumento de rachaduras e ocorrência de pragas e fungos (BRACKMAN; NEUWALD; RIBEIRO; de FREITAS, 2002) Segundo Jayas et al. (1991), a atmosfera controlada (AC), que se baseia na alteração da composição dos gases da atmosfera, ou seja, redução na concentração de oxigênio e elevação nas concentrações de nitrogênio e dióxido de carbono, evita o crescimento de mofo e a presença de insetos, preservando a qualidade dos grãos e mantendo a germinação. A atmosfera controlada também é considerada uma alternativa em substituição ao uso de produtos químicos para o controle de insetos em produtos armazenados (NICOLAS; SILLANS, 1989; JAYAS et al., 1991).

A atmosfera controlada (CAP) é um sistema dinâmico, onde a composição da atmosfera que envolve o produto é monitorada e mantida constante sob condições específicas de temperatura e umidade relativa durante a estocagem e distribuição do produto. Comumente, aplica-se para armazenamento a granel de frutas e vegetais com produção sazonal, para promover uma oferta de produto durante um período de tempo maior. A aplicação é realizada em container de transporte ou câmara de conservação, onde a composição do gás e a umidade são mantidas constantes, controladas e monitoradas durante todo o período de estocagem. Estes parâmetros devem ser adequados ao tipo e estágio de maturação do produto de estocagem. Estes parâmetros devem ser adequados ao tipo e estágio de maturação do produto que está sendo armazenado (WHITE MARTINS, 2005).

O princípio da atmosfera controlada é baseado na redução dos níveis de oxigênio (O_2) e aumento dos níveis de dióxido de carbono (CO_2), desta maneira, retardando a taxa de respiração do produto e conseqüentemente, o seu processo de envelhecimento e perda de qualidade (WHITE MARTINS, 2005). Benefícios: aumento da vida útil do produto; retarda a deterioração da aparência, coloração, textura, aroma e qualidade nutricional; reduz perdas no manuseio pós-colheita; reduz perdas na distribuição e estocagem; possibilita atingir mercados mais distantes, devido ao aumento da vida útil.

Desinfestação de grãos armazenados usando a atmosfera controlada envolve os gases dióxido de carbono (CO_2), oxigênio (O_2) e nitrogênio (N_2). A atmosfera modificada pode ser alcançada de várias maneiras: adicionando CO_2 gás ou sólido, adicionando O_2 ou permitindo processos metabólicos dentro do armazenamento com a remoção de O_2 usualmente associado o aumento de CO_2 . Tal qual atmosferas são referidas com alto CO_2 , baixo O_2 e armazenagem hermético (BANKS; FIELDS, 1995). Atmosfera controlada para o armazenamento é uma

alternativa comparando com a utilização de químicos, inseticidas, fumigantes, sendo que esses deixam resíduos carcinogênicos no produto (BAILEY, 1918; BANKS, 1980; SHEJBAL ; de BOISLAMBERT, 1985).

Na literatura, os termos atmosfera modificada (AM) e em atmosfera controlada (AC) são utilizados alternadamente. Ambos diferem baseado no grau de controle exercido sobre a composição da atmosfera. O armazenamento em AM, composição do gás é modificado inicialmente e ela muda dinamicamente, dependendo da respiração produto alimentar e taxa de permeabilidade do filme ou o armazenamento estrutura em torno do produto alimentar. O armazenamento em AC, a atmosfera de gás é continuamente controlada durante todo o período de armazenagem (JAYAS, 2002).

O processo de atmosfera modificada (AM) começa a ganhar efetiva aplicação na conservação de alimentos em 1940. Em 1970, com os trabalhos de Kader em hortifrutícolas deram significativo impulso na utilização desse processo. Em 1980, Brecht discute conceitos associados com o uso de atmosfera modificada e refrigeração, e, com isto, o respectivo efeito sinérgico resultante da interação destes dois processos sobre produtos alimentícios.

Na atmosfera modificada, as concentrações de oxigênio vão sendo reduzidas pela própria respiração do grão. Tanto para a AC, quanto para a AM, é importante que haja uma vedação quase hermética do ambiente, para que a eficiência dessas técnicas seja alcançada, pois a entrada excessiva de O₂ pela parede dos silos ou armazéns mantém a concentração desse gás muito alta. A escolha da mistura gasosa é influenciada pela microbiota capaz de crescer no produto, pela sensibilidade do produto ao O₂ e CO₂, e estabilização do pigmento requerido. (PARRY, 1993; CHURCH; PARSON, 1995). Benefícios: aumento da vida útil do produto (100%); reduz ou elimina do uso de conservantes; mantém o aroma, sabor e frescor do produto; retarda o desenvolvimento microbiano; propicia o desenvolvimento de novos mercados e a criação de centrais de abastecimentos.

A atmosfera modificada, além de ser vista como um processo integrado alimento/gás/embalagem, ganha aplicação a partir do momento em que passa a ser vista como um processo multidisciplinar, que utiliza princípios das ciências químicas, física e microbiológica dos alimentos. Esse processo tem sido aplicado com considerado sucesso na Europa, desde a metade do século, e nos Estados Unidos vem ganhando espaço desde 1980 (Souza et al., 2001). A idéia de modificar a atmosfera ao redor de um produto alimentício, com o

fim de aumentar a vida útil, se transformou em tecnologia aplicada comercialmente na preservação de carnes, produtos lácteos, aves, pescado, produtos de confeitaria, frutas e hortaliças. A substituição do ar atmosférico por uma mistura otimizada de CO₂, N₂ e O₂ pode propiciar um aumento de vida útil, evitando a degradação de alimentos, pois estas inibem o crescimento microbiano, evitam o ranço proveniente de enzimas bacterianas e oxidação e inibem a respiração de tecidos (KING e NAGEL, 1975; SARANTÓPOULOS; OLIVEIRA, 1990; SARANTÓPOULOS; SOLER, 1994).

O nitrogênio é um gás quimicamente inerte, com baixa solubilidade tanto em meio aquoso como lipídico. O N₂ é usado para substituir o O₂, e assim retardar a rancidez oxidativa e inibir o crescimento de microrganismos aeróbios. Devido à sua baixa solubilidade e menor permeabilidade através da embalagem em relação ao O₂ e CO₂, é usado como um gás de enchimento para prevenir o colapso da embalagem, que pode ser um problema em atmosferas contendo altas concentrações de CO₂ (DAY, 1992; CHURCH, 1993).

O CO₂ é solúvel tanto em meio aquoso como lipídico e é principalmente responsável pelo efeito bacteriostático e fungistático. A ação do CO₂ sobre a microbiota tem sido atribuída à redução de pH, devido à dissolução do CO₂ no meio, às alterações da permeabilidade celular bacteriana e à inibição enzimática, resultando no prolongamento da fase de adaptação e o aumento do tempo de geração dos microrganismos, o que resulta em uma velocidade de crescimento diminuída, além de uma mudança de microflora, levando à predominância de microrganismos de menor potencial de deterioração (KING; NAGEL, 1975; CHURCH, 1993; SARANTÓPOULOS; SOLER, 1994; BRODY, 1993).

Para a maioria dos alimentos, as embalagens devem conter o mínimo possível de oxigênio, com o objetivo de retardar o crescimento microbiano aeróbio e reduzir o grau de oxidação (GODOY, 1995). Para se obter um eficiente processo de atmosfera modificada, é necessário o monitoramento de alguns parâmetros, tais como: análise da composição gasosa no interior da embalagem, análises físico-químicas e microbiológicas e avaliação sensorial durante a vida útil do produto (SOUZA et al., 2001).

Atmosfera modificada no armazenamento é um dos métodos de preservação dos alimentos que mantém a qualidade natural de produtos alimentares, além de alargar a vida de armazenamento. A vida de armazenamento dos produtos alimentares é consideravelmente

prorrogado por modificar o clima em torno dos alimentos, o que reduz a taxa de respiração de produtos alimentícios e atividade de insetos ou microrganismos em alimento (JAYAS, 2002).

2.6.1 Dióxido de carbono, Nitrogênio e Oxigênio

Em atmosferas controladas, em geral a concentração de oxigênio é reduzida e/ou, a concentração de dióxido de carbono é aumentada (níveis acima de 20%). A redução substancial de oxigênio possui potencial para matar animais (insetos, ácaros e roedores), reduzir outras atividades biológicas (fungos e respiração dos grãos) e reduzir a degradação oxidativa; entretanto, atmosferas controladas com altas concentrações de CO₂ no ar e que possuem conteúdo significativo de oxigênio agem apenas como gases tóxicos (WHITE; LEESCH, 1996). Embora aptos para, a longo prazo, reduzirem a infestação por insetos, é pouco provável que esses gases possuam qualquer outro efeito direto na preservação da qualidade (BANKS, 1984, BOND; MILLER, 1988).

O dióxido de carbono, quando em altas concentrações, é reconhecidamente tóxico aos insetos (ANNIS; MORTON, 1997; BOND; BUCKLAND, 1979). White et al. (1996) demonstraram que o CO₂ é tóxico para pragas de grãos armazenados por longos períodos em níveis produzidos pela própria respiração dos insetos. Em geral, os trabalhos, têm mostrado que o CO₂ é um possível agente de controle de insetos, mas há impedimentos para o seu uso. Esses impedimentos incluem o custo, a lentidão de ação e a necessidade de alto nível de hermeticidade (ANNIS; MORTON, 1997).

De acordo com Puzzi (1986), o princípio básico do armazenamento hermético fundamenta-se na redução da taxa de O₂ em nível que cause a morte ou inativação dos fungos e dos insetos antes que proliferem a ponto de prejudicar o produto. Em decorrência do processo respiratório dos grãos e daqueles organismos ocorre redução de oxigênio do ar confinado.

Quando se eleva a concentração de CO₂, em detrimento dos níveis de O₂ abaixo de 1%, pode ser observada a inibição no crescimento de fungos. O controle desse crescimento depende da manutenção de altos teores de CO₂ e baixos de O₂ durante o armazenamento. Também foi demonstrado que a colonização de milho torna-se mais afetada pela diminuição da atividade de água (de 1,0 para 0,7) do que pela diminuição na concentração de O₂ de 21 para 1% (LACEY; MAGAN, 1991).

A microbiota característica em grãos estocados em silos herméticos com alta concentração de CO₂ e baixa de O₂ é composta por leveduras. As espécies *Hansenula anomala*, *Candida krusei*, *Hipopichia burtonii*, *Candida glabrata* (Torulopsis) são predominantes. Ocasionalmente, *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*) e *Rhodotorula* spp podem ser avaliadas como agentes de biocontrole de fungos micotoxigênicos (PETERSSON; SCHNÜRER, 1998).

Gases, especialmente, CO₂ e N₂ podem ser adicionados em silos convenientemente vedados para alterar a atmosfera intergranular. Entretanto, muitas recomendações convenientes para o controle de insetos podem ser insuficientes para o controle de fungos (LACEY; MAGAN, 1991). Além disso, segundo Petersson e Schnürer (1998) é difícil manter silo hermético com baixa concentração de O₂ e alta de CO₂. O sistema é sensível às trocas de ar entre o silo e a atmosfera externa, seja por vedação imperfeita, flutuações na temperatura diária ou pela remoção de grãos do interior do silo. Assim, a adição de agente para o biocontrole do crescimento de fungos pode manter a qualidade dos grãos ao longo do armazenamento.

Em atmosfera com mais de 61,7% de CO₂ (ou 99,7% de N₂ e menos de 0,3% de O₂) foi verificado atraso na deterioração de grãos de milho contaminados por *A. flavus* e *Fusarium moniliforme*, mas sem interromper seu crescimento (WILSON, HUANG; JAY, 1975). Foi observada formação de mofo sobre grãos de milho após inoculação de *A. flavus* e armazenamento durante quatro semanas em atmosfera com 61,7% de CO₂ + 8,7% de O₂ + 29,6% de N₂. A produção de micotoxinas foi limitada ao máximo de 20 µg por quilo de milho, contudo a remoção da atmosfera modificada causou rápida deterioração.

Embora os fungos sejam aeróbios, normalmente o requerimento de O₂ é superestimado, pois são capazes de crescer em concentrações de O₂ muito baixas. Em massa de grãos a 15°C, o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas são inibidos com 40% de CO₂. Por outro lado, na temperatura de 30°C foi observada pequena produção de micotoxinas com 60% de CO₂ e menos de 1% de O₂ (LACEY; MAGAN, 1991).

Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais importantes em grãos estocados hermeticamente (BJÖRNEBERG; SCHNÜRER, 1993). A estocagem em atmosfera controlada com baixo oxigênio e alto dióxido de carbono impede o crescimento de fungos e os grãos podem ser armazenados com teor de água entre 20 e 40%, correspondente a atividade de água de 0,9 a 1,0 (LACEY; MAGAN, 1991). Entretanto, altas tensões de oxigênio são

suficientes para permitir crescimento em sistemas herméticos e considerável infestação de fungos pode ocorrer, principalmente, em temperaturas favoráveis.

2.6.2 Vácuo

De acordo com Parry (1993), a embalagem à vácuo foi a primeira forma de atmosfera modificada desenvolvida comercialmente. Com boas condições de realização do vácuo, o nível de O₂ se reduz a menos de 1%. O acondicionamento em embalagem com atmosfera modificada a vácuo é um processo tecnológico de preservação de alimentos, que em essência consiste da exposição dos alimentos à ausência de ar, controlando o desenvolvimento de microrganismos, a ação enzimática e a oxidação, principais mecanismos de deterioração de alimentos. As características de embalagem à vácuo são: diminuição do volume de ar do espaço-livre, diminuindo o O₂ disponível; aumento da vida útil; alto custo do equipamento; embalagem com material com barreira ao O₂ e ao vapor d'água; embalagem com boa resistência mecânica; fechamento hermético.

Esse sistema é largamente utilizado e caracteriza-se pela utilização de filmes flexíveis de boa barreira, tanto ao vapor de água como aos gases, com remoção quase que completa do ar do espaço livre através de uma bomba e fechamento hermético. Para boa eficiência do sistema, devem ser verificados parâmetros como nível de vácuo aplicado no interior da embalagem que definirá o teor de O₂ residual em contato com o produto, hermeticidade de fechamento para manter o vácuo durante a distribuição e estocagem do produto (SARANTÓPOULOS, 1991; SARANTÓPOULOS, OLIVEIRA; CANAVESI, 2001). Além das características de permeabilidade, a embalagem deve apresentar alta resistência à perfuração, excelentes características de soldabilidade a fim de evitar vazamento e conseqüente perda de vácuo, boa maquinabilidade, boas características de impressão e/ou transparência e custo compatível com a aplicação, podendo ser do tipo encolhível ou não. Os filmes poderão ser encolhíveis ou não, termoformáveis ou não e, preferencialmente, termoseláveis. Sua composição, espessura e propriedades serão em função da aplicação e vida útil desejada (SARANTÓPOULOS, OLIVEIRA e CANAVESI, 2001).

O termoencolhimento é feito após a selagem, normalmente em imersão em água aquecida. O tempo e temperatura variam conforme a especificação da embalagem ou em túnel de

ar quente (232°C/9s), fazendo com que o material de embalagem tome a forma de seu conteúdo, conferindo-lhe melhor apresentação visual. O material de embalagem a vácuo deverá possuir baixa permeabilidade ao vapor de água a fim de reduzir a perda de peso por evaporação e exsudação durante a estocagem (SACHAROW e GRIFFIN, 1970); evitar contato com odores estranhos e principalmente, boa barreira ao O₂ (Tabela 7) para a conservação do vácuo no interior da embalagem.

Tabela 7 - Classificação relativa dos filmes de acordo com a barreira ao oxigênio

Permeabilidade ao O₂ (cm³/m² atm 90% U.R. 23°C)	Barreira
>300	Baixa
300-50	Média
50-10	Alta
<10	Ultra alta

Fonte: RIZVI, 1984.

2.7 Ozônio

2.7.1 História

De acordo com Rideal (1920) os primeiros relatos sobre o O₃ datam de 1785 quando van Marum, um físico holandês, observou que a descarga elétrica em ar resulta em um odor irritante bastante característico. Em 1801 o mesmo foi observado durante a eletrólise da água (RIDEAL, 1920).

O O₃ foi descoberto em 1840 pelo químico alemão Schonbein (1799-1868) durante experimentos de eletrólise da água a partir de soluções ácidas (SCHONBEIN, 1840). Nestes estudos constatou-se que, paralelamente a reação de desprendimento de oxigênio, ocorria à formação de um segundo produto gasoso desconhecido com odor pungente o qual Schonbein denominou de O₃, palavra que deriva do grego “ozein” que significa cheiro. Este acontecimento ocorreu cerca de vinte anos antes que o ozônio fosse identificado como um alótropo triatômico do oxigênio. Thomas Andrews (1856) mostrou que o ozônio era constituído por átomos de

oxigênio e em Soret (1863) mostrou que três volumes de oxigênio (O_2) produziam dois volumes de ozônio (O_3) (LANGLAIS et al.,1991). La Rive e Marignac (1845) obtiveram O_3 submetendo a passagem de um arco elétrico em ambiente de oxigênio puro. Posteriormente, investigações conduzidas por Hunt (1848) sobre as propriedades oxidantes do ozônio permitiram a este autor postular que a molécula de O_3 é constituída por três átomos de oxigênio.

2.7.2 Alternativa

O aumento da preocupação com problemas ambientais tem estimulado várias pesquisas no sentido de desenvolver produtos químicos não agressivos e também visando melhorar a tecnologia existente (*Green Chemical Processes*, ou Processos Químicos Limpos) de modo a minimizar ou evitar o impacto da atividade industrial no ambiente.

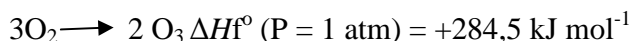
Um oxidante aceitável do ponto de vista ambiental deve possuir as seguintes características: (i) reagir especificamente com os compostos à serem tratados; (ii) não propiciar a formação de subprodutos com toxicidade igual ou superior ao composto original e (iii) ser de fácil obtenção. Diferentes agentes oxidantes são freqüentemente usados tanto como desinfetantes para a água potável e de piscinas, como para a decomposição de compostos orgânicos e inorgânicos presentes em efluentes. Os agentes oxidantes de uso mais comum para estes propósitos são: O_3 , peróxido de hidrogênio, cloro, dióxido de cloro, hipoclorito de sódio e permanganato de potássio (TATAPUDI; FENTON, 1994)

Nos dias atuais, em virtude da eficácia e vantagens associadas ao uso do O_3 em diversos processos químicos de importância tecnológica, há um interesse crescente relacionado a tecnologia eletroquímica para a produção de O_3 .

2.7.3 Características

Quimicamente o O_3 , arranjo molecular triatômico e instável do oxigênio, pode ser gerado pela excitação do oxigênio molecular a oxigênio atômico, em um ambiente energizado que permite a recombinação de átomos. É um gás incolor de odor pungente. Em fase aquosa se decompõe rapidamente a espécies radicalares e oxigênio, o que é uma grande vantagem porque

não gera subprodutos. Do ponto de vista termodinâmico, a formação do ozônio a partir da molécula de oxigênio é um processo endotérmico não espontâneo, descrito pela seguinte reação:



Devido à maior estabilidade do oxigênio, a molécula de O_3 sofre um processo de dissociação espontânea com o tempo resultando novamente na formação do oxigênio (LANGLAIS et al., 1991). A decomposição do O_3 não resulta em espécies nocivas já que o mesmo é espontaneamente convertido em O_2 ; a sua instabilidade ($t_{1/2} = 20$ a 90 minutos, dependendo do ambiente) requer que ele seja produzido no seu local de aplicação reduzindo assim gastos e perigos relacionados como seu transporte e estocagem (ARMOR, 1999; TRASATTI, 1995; TATAPUDI, 1994). Em condições ambientais o O_3 é um gás instável possuidor de um elevado poder de oxidação e possuidor de um odor irritante característico detectável no ar pela maioria das pessoas em concentrações da ordem de 0,01 ppm (KIRK; OTHNER, 1981) (P.e. próximo a máquinas copiadoras). Em condições normais de temperatura e pressão o O_3 é moderadamente solúvel em água (13 vezes mais solúvel que o O_2). Sua velocidade de decomposição, resultando em O_2 , é fortemente dependente da pureza do solvente, diminuindo na presença de impurezas (HILL; RICE, 1982).

A Figura 14 mostra as quatro formas canônicas do híbrido de ressonância representativo da molécula de ozônio propostas por Bailey (1978):

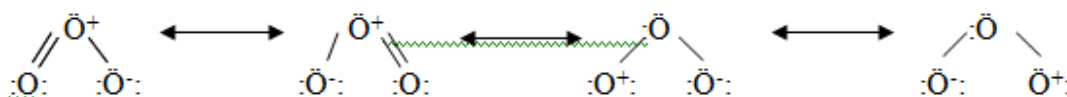


Figura 14 - Formas canônicas do híbrido de ressonância representativo da molécula de ozônio

À temperatura ambiente é um gás de coloração azulada, porém nas concentrações utilizadas com propósitos de desinfecção, torna-se incolor (RICE, 1986).

A molécula de O_3 possui uma geometria triangular, onde o átomo de oxigênio central utiliza orbitais sp^2 para formar ligações σ como os demais oxigênios. Os orbitais p_z dos três oxigênios são utilizados para formar uma ligação π deslocalizada, sendo que as duas ligações desta molécula são equivalentes, com comprimentos iguais e ordem de ligação igual a 1,5. Devido a este arranjo, o O_3 é dipolar e pode reagir como um agente eletrofílico ou nucleofílico. De um modo geral, nas reações de degradação de compostos orgânicos poluentes, o ozônio tende

a reagir preferencialmente com compostos insaturados (alquenos, alquinos, anéis aromáticos, etc). De fato, o O_3 é o reagente clássico usado em reações orgânicas para quebrar ligações duplas carbono-carbono, via o mecanismo de Criegee (ou simplesmente ozonólise) (GOTTSCHALK; LIBRA; SAUPE, 2000; LEE, 2000; MCMURRY, 2005) (Figura 15).

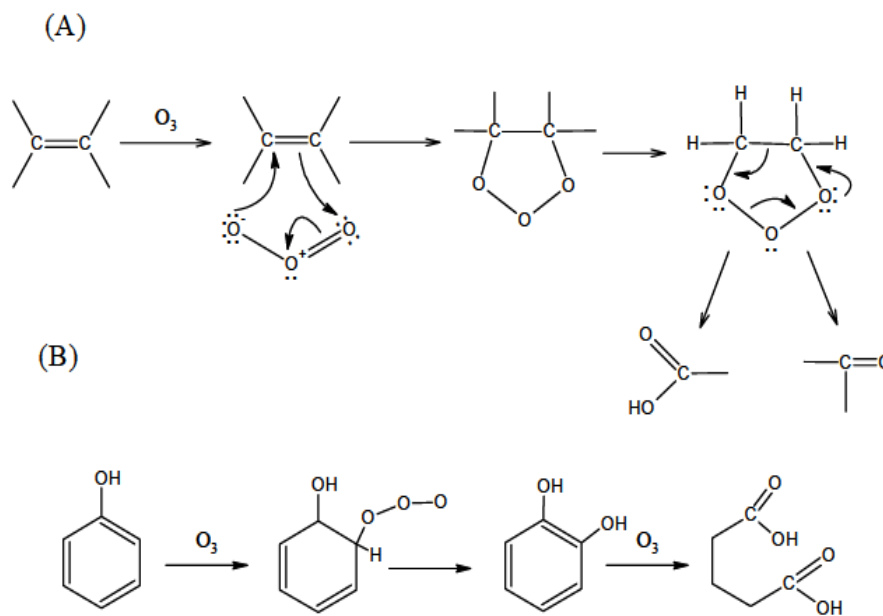


Figura 15 - Reação direta do ozônio com a matéria orgânica: mecanismo de Criegee (A) Exemplo do ataque eletrofílico do ozônio a um composto aromático (B) (MCMURRY, 2005).

Assim, a oxidação direta de compostos orgânicos por ozônio é uma reação seletiva e que muitas vezes apresenta cinéticas relativamente lentas, com valores típicos entre 10^{-1} e 10^3 $L\ mol^{-1}\ s^{-1}$ dependendo das espécies envolvidas. Compostos aromáticos com grupos substituinte desativantes, como o cloro, sofrem ozonólise mais lentamente que compostos aromáticos com grupos substituintes ativantes, como o grupo hidroxila. Em geral, as formas ionizadas ou dissociadas dos compostos orgânicos reagem muito mais rapidamente com o ozônio que as formas neutras (não dissociadas) (MCMURRY, 2005). Além disso, as reações de ozonólise direta não costumam promover a oxidação completa dos compostos orgânicos até CO_2 e H_2O , sendo aldeídos, cetonas, alcoóis e ácidos carboxílicos os principais produtos deste tipo de reação (GOTTSCHALK, 2000).

A maior propriedade física do ozônio puro está citado na Tabela 8.

Tabela 8 - Propriedade física do ozônio

Ponto de evaporação	-11,9 ± 0,3°C
Ponto de fusão	-192,5 ± 0,4°C
Temperatura crítica	-12,1°C
Pressão crítica	54,6 atm

Fonte: MANLEY; NIEGOWSKI (1967).

2.7.4 Poder oxidante e desinfetante

É um poderoso agente oxidante e um poderoso desinfetante (MCKENZIE et al., 1997; GUZEL-SEYDIM et al., 2004; KEELS et al. 2001; MENDEZ et al., 2003) capaz de participar de um grande número de reações com compostos orgânicos e inorgânicos (KUNZ; PERALTA-ZAMORA, 2002; ALMEIDA et al., 2004). Pode reagir com a maioria dos compostos contendo ligações duplas, como C=C, C=N, N=N, etc., mas não com grupos funcionais contendo ligações simples, como C-C, C-O, O-H, etc (ALMEIDA et al., 2004; GOGATE; PANDIT, 2004). Comercialmente, o ozônio tem sido aplicado como um reagente químico em síntese, em processos de purificação de água potável, como desinfetante em tratamento de esgoto e para o branqueamento de fibras naturais. Seu poder oxidante é superado apenas pelo flúor e pelo radical hidroxila e é superior ao de compostos reconhecidamente oxidantes, como o peróxido de hidrogênio e o cloro (Tabela 9).

Com um potencial de oxiredução de 2,07V (BLOCK, 1991), capaz de participar de muitas reações químicas envolvendo diferentes tipos de compostos (YAO; HAAG, 1991). Por isso, o O₃ tem sido usado em diferentes aplicações: (i) desinfecção de água potável; (ii) controle de odor; (iii) tratamento de esgoto e efluentes de diversos processos industriais; (iv) agente branqueador (alvejante); (v) conservante de alimentos; (vi) síntese orgânica; (vii) tratamentos terapêuticos (ozonioterapia); (viii) produção de prata de alta pureza, etc. O maior poder de desinfecção do ozônio em relação a outros desinfetantes é explicado pela combinação entre sua habilidade de se difundir através de membranas biológicas e seu alto potencial de oxidação - 2,07 volts – menor apenas que o do flúor - 3,06 volts - e que dos radicais hidroxila – 2,8 V (HUNT & MARINÃS, 1997; KOLTUNSKI & PLUMRIDGE, 2000).

Tabela 9 - Agente oxidante e seus potenciais de oxidação

Agente oxidante	Potencial de oxidação (mV)
Fluor	3,06
Ozônio	2,07
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Ácido Hipocloroso	1,49
Gás Cloro	1,36

Fonte: Manley; Niegowski (1967).

Dentre as várias motivações para o emprego do O_3 é por ser um forte agente oxidante e não é uma fonte intrínseca de poluição. Outros que são normalmente empregados, como permanganato e gás cloro, costumam levar à formação de sub-produtos (íons de metais pesados e compostos organoclorados), que podem ser inclusive mais tóxicos que os compostos poluentes originais (MANAHAN, 2005). O caráter fortemente oxidante da molécula de ozônio lhe confere habilidade para reagir prontamente com grande variedade de grupos funcionais orgânicos e organometálicos, originando subprodutos de menor peso molecular, muitas vezes mais biodegradáveis que seus precursores. Sua presença pode remover substâncias responsáveis pela cor, gosto e odor, além de microrganismos resistentes a outras técnicas de desinfecção e traços de metais de transição (MAUSTELLER, 1989). Seu poder desinfetante é conhecido desde o início do século XX, mas foram nos últimos vinte anos que adquiriu notoriedade no tratamento de águas residuárias. A ozonização de compostos dissolvidos em água é considerada um processo oxidativo avançado (POA), pois são gerados radicais hidroxila (OH) na decomposição do O_3 , que é catalisada pelo íon hidroxila ou iniciada pela presença de outras substâncias, como cátions de metais de transição.

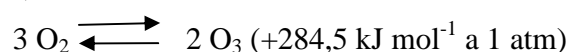
O gás O_3 apresenta certas características sanitizantes atraentes para a indústria alimentícia, por ser mais seguro e potente do que os desinfetantes convencionais, agir sobre um grande número de microrganismos, incluindo patógenos resistentes.

2.7.5 Geração de ozônio

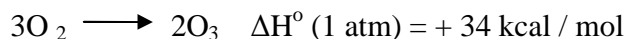
Existem muitos métodos para a produção de ozônio, tal como descarga elétrica em oxigênio, eletrólises na água, ou termal, fotoquímica ou radioquímica. Para a indústria o ozônio é

usado principalmente do oxigênio puro ou o oxigênio da atmosfera no processo de descarga corona (MCKENZIE et al., 1997; PALA, 2001). Na descarga da corona, o ar ou o oxigênio puro é convertido em O₃ usando alta voltagem. O aspecto atrativo do O₃ está na sua rápida decomposição (meia-vida de 20-50min) para o oxigênio molecular sem deixar resíduo (KELLS et al., 2001) É um desinfetante, ozônio é 1,5 vezes mais forte que o cloro e é mais efetivo e atinge um amplo espectro de microrganismos (XU, 1999).

O maior avanço na tecnologia de produção de ozônio foi obtido por Von Siemens em 1857, quando ele desenvolveu um tubo gerador de ozônio baseado no processo corona (passagem de um arco elétrico em ambiente gasoso). Tal processo é baseado na aplicação de uma voltagem alternada entre dois eletrodos separados por um fluxo de oxigênio seco ou ar. Neste processo a descarga elétrica entre os eletrodos resulta na decomposição da molécula de O₂ em radicais O[•], os quais combinam com uma molécula vizinha de O₂ resultando na formação do O₃. No tubo gerador de O₃ desenvolvido por von Siemens cerca de 3 a 8 % do oxigênio era convertido em ozônio. Este tipo de gerador serviu posteriormente como protótipo para o desenvolvimento dos ozonizadores do tipo corona. O maior custo operacional para o processo de oxidação por ozônio é o custo da eletricidade para sua geração. O requerimento energético para a síntese de ozônio usando ar como fonte de oxigênio varia de 22 a 33 kWh kgO₃⁻¹ (MUNTER, 2001). Se o ozônio for produzido a partir de oxigênio puro esse valor varia de 12 a 18 kWh kgO₃⁻¹, mas o custo do oxigênio deve ser considerado. A formação do O₃ é uma reação endotérmica (IGLESIAS, 2002):



O O₃ é gerado pela combinação de um átomo de oxigênio com uma molécula de oxigênio, por meio de uma reação endotérmica. Todos os processos capazes de dissociar o oxigênio molecular em radicais de oxigênio são potencialmente capazes de produzir O₃. Alguns processos para geração de O₃ conhecidos são a reação fotoquímica, pela exposição do oxigênio à luz UV em 254 nm de comprimento de onda, geração pela eletrólise de ácido sulfúrico, geração rádioquímica e geração por descarga corona (IGLESIAS, 2002; USEPA, 1986). Devido à instabilidade da molécula de ozônio, o gás deve ser gerado no ponto de aplicação, o que representa uma grande economia de espaço e elimina riscos associados a armazenamento e transporte.



O processo de geração por descarga corona, Figura 16, é o mais amplamente utilizado e consiste na aplicação de uma corrente alternada de alta voltagem - entre 6 a 20 kV - em um *gap* dielétrico por onde passa o ar seco e limpo ou oxigênio puro (USEPA, 1999). Os geradores podem ser dos tipos prato, tubo vertical e tubo horizontal. O dielétrico pode ser construído tanto em vidro como em cerâmica, esta última mais eficiente em termos energéticos.

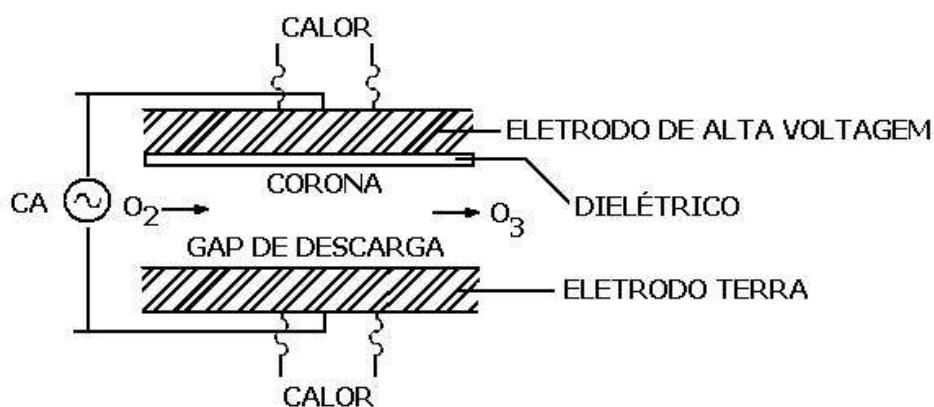


Figura 16 - Esquema do sistema tipo descarga corona de geração de ozônio

Fonte: Adaptado de USEPA (1999) e de EVANS (1972).

As plantas de geração de O_3 podem ainda ser identificadas conforme o gás utilizado para alimentação: ar ou oxigênio de alta pureza. O uso de ar para geração de O_3 exige que o ar seja filtrado e seco antes de passar pelo processo de descarga corona. Isto porque a presença de umidade no gás pode produzir um condensado muito corrosivo dentro do reator. Além disso, o rendimento do equipamento pode ser reduzido pela formação de óxidos de nitrogênio, como o ácido nítrico.

Os sistemas que utilizam oxigênio de alta pureza podem obter oxigênio tanto em processos criogênicos como por peneiras moleculares. Segundo Robson e Rice (1991), das 15 plantas de desinfecção com ozônio que operavam a partir do oxigênio de alta pureza nos Estados Unidos, 11 aplicavam o processo criogênico e 4 o processo de peneiras moleculares. Isso porque, devido ao seu custo comparativamente mais alto até o final da década de 1980, o processo por peneiras moleculares era limitado a plantas com capacidade para tratamento de até 38.000

m³/dia. Vazões maiores dependiam do uso de oxigênio criogênico. Atualmente esta limitação já não existe mais.

Ambos os processos podem ser utilizados independentemente do volume a ser tratado. As principais diferenças entre os sistemas que utilizam ar e aqueles que utilizam oxigênio de alta pureza são os custos energéticos e as concentrações de ozônio que cada sistema pode produzir. De acordo com Costa (2003), para produzir 1 g de ozônio a partir do oxigênio, consomem-se aproximadamente 708 calorias ou 0,82 watt-hora.

A partir do ar, o consumo de energia aumenta para entre 15 e 20 watt-hora, mais ou menos os mesmos valores reportados por Tchobanoglous (2003). Processos que utilizam oxigênio têm capacidade de geração de O₃ de 1,7 a 2,5 vezes àquela obtida quando o ar é utilizado (IGLESIAS, 2002). Segundo Paraskeva e Graham (2002), equipamentos de última geração que operam a partir do ar, em geral, produzem ozônio em concentrações mássicas de até 6 %, contra 20 % daqueles alimentados diretamente com oxigênio. Entre 85 e 95 % da energia elétrica consumida na geração de O₃ é convertida em calor, o que torna necessária a adoção de um dispositivo para resfriamento do sistema. A remoção de calor tem por objetivo aumentar a vida útil do equipamento. Além disso, o resfriamento do gás ozonizado promove aumento do desempenho do equipamento, dado que a meia vida do ozônio aumenta conforme a temperatura diminui. O resfriamento pode ser feito usando água, óleo, ou freon em água ou ar (DOE, 1998).

2.7.6 Aplicações

O₃ foi reconhecido como seguro (US FOOD, 1997). Food and Drug Administration (FDA), e em 26 de junho de 2001, publicou uma determinação oficial sobre a utilização do ozônio admissível como um agente antimicrobiano para o tratamento, armazenamento e processamento de alimentos em gás e uma fase aquosa em contato direto com os alimentos, incluindo as matérias-primas e de frutas e hortaliças minimamente processadas (GUZEL-SEYDIM, GREENE; SEYDIM, 2004).

Por regra, a movimentação deve ser coerente com Boas Práticas de Fabricação (BPF). Especificamente, o O₃ foi aprovado para utilização em BPF, que significa "a exposição dos alimentos ao ozônio (concentração e do tempo de exposição) para realizar a sua finalidade". Isto traduz-se ao mínimo de exposição dos frutos e produtos hortícolas para que a dose de O₃ necessário fornecer o alvo antimicrobiana benefícios específicos sobre hortícolas comestíveis. O₃

pode ser aplicado na forma de gás, como alimentos ou como uma forma dissolvida em água. Os principais efeitos do O₃ na aplicação da fase pós-colheita são apresentadas a seguir:

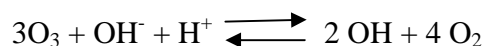
- a) inativação de bactérias (ARCHEN e YOUSEF, 2001; KIM e YOUSEF, 2000; SHARMA et al., 2002; XU, 1999);
 - b) inativação e prevenção de produção de fungos (PALOU et al., 2002; PEREZ et al., 1991);
 - c) destruição de pesticidas e resíduos químicos (ONG et al., 1996; HWANG et al., 2001);
 - d) inativação de aflatoxinas (INAN et al., 2007; YESILCIMEN e OZDEMIR, 2006);
 - e) controle de insetos na armazenagem (KELLS et al., 2001; MENDEZ et al., 2002)
- (Tabela 10).

Atualmente existem mais de 4000 plantas de ozonização operando no mundo. Suas duas principais aplicações são como desinfetante e como oxidante. Como desinfetante o O₃ tem sido reconhecido como inativador de bactérias do grupo coliforme e outras bactérias presentes em esgotos sanitários. Também é eficaz contra protozoários como *Giardia* spp. E *Cryptosporidium* spp. no tratamento de água (ZHOU; SMITH, 2001).

Efluentes que possuam cor, como os da indústria de celulose e papel, podem ser descolorados por O₃. Os efluentes industriais são geralmente uma mistura complexa, composta de diversas substâncias individuais, presentes em uma ampla faixa de concentrações (de mg/L a g/L), que precisam ser removidas. Os principais papéis do O₃ no tratamento de águas residuárias são:

- a oxidação parcial da parte refratária ao tratamento biológico, na maioria das vezes aplicada com o objetivo de aumentar a biodegradação,
- subsequente e a remoção de cor.

À medida que o pH aumenta, a velocidade de decomposição do O₃ na água também aumenta. A oxidação de compostos orgânicos pode ocorrer devido a uma combinação de reações com O₃ molecular e reações com os radicais hidroxila formados (MUNTER, 2001):



A velocidade de reação do radical OH é muito mais rápida que o O₃ molecular (GLAZE et al., 1987). Porém o aumento do pH não necessariamente aumenta a taxa de destruição do substrato pelo radical OH devido ao aumento de efeitos de inibição pela presença de íons carbonato e bicarbonato (GOGATE e PANDIT, 2004). Em pH acima de 10,3 o íon carbonato

predomina sobre o íon bicarbonato e a velocidade de reação do O_3 com o íon carbonato é cerca de 20 vezes maior que com o íon bicarbonato (GLAZE et al., 1987).

Muitos estudos têm sido relatados sobre o efeito do O_3 que tem reduzido o nível de AFLs em produtos agrícolas contaminados. MAEBA et al., (1988) tem confirmado a destruição e descontaminação de AFB_1 e AFG_1 com O_3 . AFB_1 e AFG_1 são sensíveis ao O_3 e degrada com 1,1mg/L em 5 minutos em modelo experimental. O_3 é usado para preservar a qualidade de frutas e vegetais na pós colheita. FRAZIER e WESTHOFF (1988) concluíram que durante o período de armazenagem quando morango, framboesa, currant e maçã coletadas no ambiente colocando 2 a 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de O_3 .

O efeito bactericida do O_3 tem sido estudado e documentado por uma variedade de organismos, incluindo as bactérias Gram positiva e Gram negativa bem como os esporos e células vegetativas (FEMER; INGOIS, 1956; FOOGEDING, 1985; ISHIZAKI et al., 1986; RESTAINO, FRAMPTON et al., 1995). Restaino et al. (1995) reportaram que o O_3 destruiu leveduras *Cândida albicans* e *Zygosaccharomyces bacilli* e esporos *Aspergillus niger*.

Guzel-Seydim et al., (2004). Keels et al. (2001) e Mendez et al., (2003) demonstraram a eficácia do O_3 no controle de pragas e insetos, para o armazenamento de milho. A utilização de O_3 torna-se atraente pelo fato de descartar a necessidade de manipulação, armazenamento e eliminação dos recipientes de produtos químicos e, principalmente, por não deixar resíduos tóxicos, uma vez que o único produto da sua degradação é o oxigênio (O_2).

A maior vantagem do O_3 torna um dos principais candidatos a atrair a atenção da indústria de alimentos. O_3 é um dos mais potentes sanizantes para esterilização de bactérias lácticas e ácidas em alimentos. O excesso do ozônio é auto-decomposto rapidamente produzindo oxigênio e assim não resta resíduo no alimento (NAITO; TAKAHARA, 2006). O_3 foi aprovado para uso como desinfetante ou sanizante em alimentos e alimentos processados nos Estados Unidos (USDA, 1997). Além de ser reconhecido como seguro para o tratamento de garrafas de água (“General Recognized As Safe”-GRAS) pela “Food and Drug Administration” americana, ser utilizado efetivamente no tratamento da água para o consumo na Europa há mais de cem anos e na indústria de alimentos por décadas, o ozônio não deixa resíduos tóxicos nos alimentos, capazes de alterarem o odor e o sabor dos mesmos (TORRES, 1996)

Tabela 10 - Aplicações do ozônio em diversas matrizes reportados na literatura

matriz	O ₃		armazenagem (dias)	redução	autores
	exposição (min)	concentração (ppm)			
<i>Prevenção de fungos</i>					
Figos	180; 300	5; 10	-	72% contagem total de fungos	Oztekin, Zorlugenc, Zurlugenc, 2006
Peras	-	0.03	35	100% <i>Monilinia fruticola</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Mucor piriformis</i> , <i>penicillium expansum</i>	Palou et al., 2002
Figos	7.5; 15 ;30	13.8	-	75% contagem total e fungos	Zorlugenç et al., 2008
Morangos	15	0,35	4	100% <i>B. cinerea</i>	Pérez et al., 1999
Milho	3	50	-	63% the contamination level <i>Aspergillus parasiticus</i>	Kells et al., 2001
Cevada	5	0.16	-	96% total fungi load	Allen et al., 2003
Café	60	3.5	-	90% contagem total de fungos	Nascimento et al., 2008
<i>Inativação de aflatoxinas</i>					
Pimenta	7,5; 15; 30; 60	16; 33; 66	-	80% e 93% AFB ₁	Inan; Pala; Doymaz, 2007
Pistache	140; 420	5; 7; 9	-	24% AFLS; 23% AFB ₁	Yesilcimen; Ozdemir, 2006
Amendoim	30	82	-	78% AFLs	Dwarakanath et al., 1968
Amendoim	120	82	-	83% AFLs	Dollear et al., 1968
Algodão	60	214	-	91% AFLs	Dwarakanath et al., 1968
Figos	30; 60; 180	13.8	-	48.77; 72.39 ;95.21% AFB ₁	Zorlugenç et al., 2008
<i>Inativação do crescimento bacteriano</i>					
Queijo	15		60	70% coliformes	Lanita; Silva, 2008
Figos	360	1,0; 5,0; 7,0; 9,0	-	100% <i>E.coli</i> , <i>B. cereus</i>	Akbas; Ozdemir, 2008
Figos	7.5; 15 ;30	13.8	-	88% <i>E. coli</i>	Zorlugenç et al., 2008
Pimenta	360	1,0	-	100% <i>E.coli</i> <i>B.cereus</i>	Akbas; Ozdemir, 2008
Café	60	3.5	-	100% coliformes	Nascimento, 2008
<i>Controle de pragas de armazenagem</i>					
Milho	3	50	-	92–100% <i>Tribolium castaneum</i> , <i>Sitophilus zeamais</i> , <i>Plodia interpunctella</i>	Kells et al., 2001
Milho	3	50	-	100% <i>Sitophilus zeamais</i>	Strait, 1998
Milho	23.76 ;64.19	50	-	95% <i>S. zeamais</i> e <i>T. castaneum</i>	Rozado, 2008

Fonte: autoria própria

2.7.7 Mecanismos de reação

Ozonização é um método de oxidação, foi recentemente desenvolvido para descontaminação de AFLs em alimentos (SAMARAJEEWA et al., 1990). Muitos métodos físicos e químicos tais como o aquecimento do microondas, tratamentos com O_3 ou amônia tem sido recomendado para descontaminação de alimentos por AFLs (FARAG et al., 1996; XU, 1999; PRUDENTE; KING, 2002). A ozonização envolve dois mecanismos de reação, o ataque direto do ozônio e o ataque através dos radicais OH formados na decomposição do O_3 . A ozonização em pH ácido envolve apenas a reação seletiva do O_3 com compostos orgânicos insaturados. A capacidade oxidante do O_3 é muito menor que a do radical OH, cuja formação é favorecida em $pH > 10$ (GOGATE; PANDIT, 2004). Portanto, o pH básico é mais eficiente que o pH ácido, devido à reação dos compostos orgânicos tanto com ozônio molecular quanto com radicais oxidantes, incluindo o radical hidroxila (GLAZE et al., 1987).

Reage através C8 e C9 dupla do anel de furano da AFL através ataque electrofílico, provocando a formação de ozonides primários seguido de rearranjo de monozonides derivados, como aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos (PROCTOR et al., 2004).

A diferença nas taxas de degradação entre AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 e AFG_2 sugere uma propensão do O_3 com a dupla ligação C8 - C9, que está presente em AFB_1 e AFG_1 , mas não AFB_2 e AFG_2 . Como resultado da natureza do dipolo do O_3 , de acordo com o postulado de Creegie diz que o mecanismo para esta reação pode envolver um 1,3-ciclo adição de O_3 na dupla C8-C9 de AFB_1 e AFG_1 (Figuta 17). Após a formação do ozónide primário, este produto pode reorganizar para derivado molozónide, produzindo uma grande variedade de compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas) ou ácidos orgânicos (BABLON et al., 1991).

Desde que nas AFB_2 e AFG_2 a faltam a dupla ligação, a reação inicial com O_3 pode ocorrer em outra (menos reativas) parte na molécula.

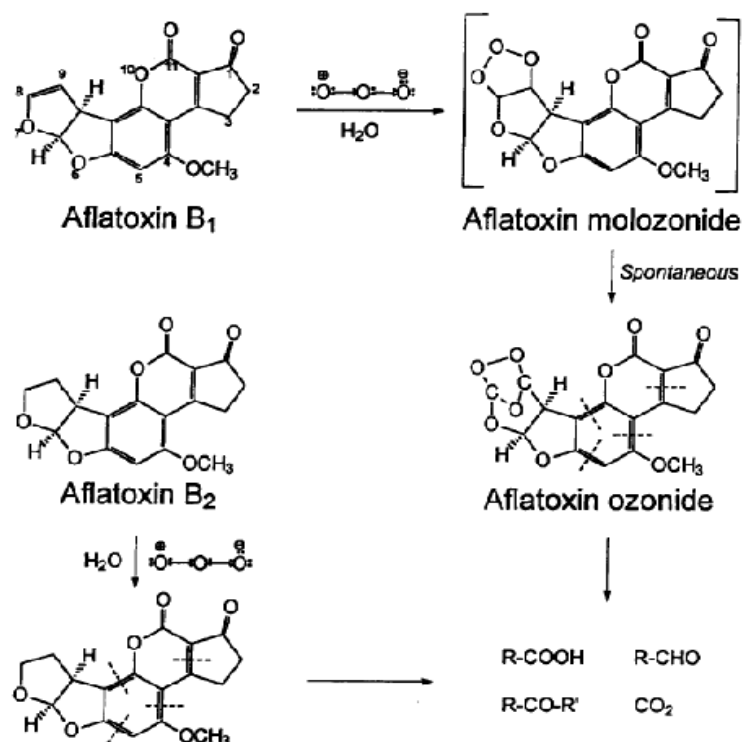
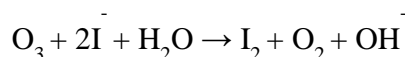


Figura 17 - Mecanismo de degradação da AFB₁ com a adição de ozônio

2.7.8 Método de quantificação do ozônio

Conforme Di Matteo (1992), medições de concentrações de O₃, tanto no *feed-gas* como no *off-gas*, em processo contínuo, via método de absorção em UV e iodométrico, permitem melhor controle operacional do sistema. O método iodométrico utilizado para a análise das amostras é quantitativo, sujeito a poucas interferências capaz de boa precisão. A técnica utilizada é descrita pela APHA, 1980. O método iodométrico é o mais utilizado para a quantificação do ozônio na fase gasosa, e baseia-se na oxidação do íon iodeto pelo O₃, que causa liberação de iodo. O gás contendo O₃ e oxigênio passa pela solução de iodeto de potássio, onde reage quantitativamente para produzir um mol de oxigênio para cada mol de O₃.



O iodo liberado é então titulado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio e a concentração de O₃ é calculada. Esse método, muito empregado, utiliza uma solução de iodeto de

potássio (KI) que, ao reagir com o O_3 , libera íons OH^- . O pH elevado e a presença de íons hidroxila constituem fatores propícios para o início da decomposição do O_3 , podendo interferir na determinação da concentração.

2.7.9 Legislação

O O_3 é seguro e vem sendo usado há muitos anos nos Estados Unidos e Europa onde a legislação é extremamente rígida. FDA (Food and Drugs Administration) confere ao O_3 a classificação "GRAS" (Generally Recognized as Safe) que é o mais alto padrão para segurança para os usuários de um produto. A alta toxicidade do O_3 ao ser humano torna extremamente perigosa sua aspiração direta. No Brasil, a portaria da ANVISA Nr. 25/76 publicada no Diário Oficial da União em 09/11/1977, regulamenta o uso do O_3 .

2.8 Análise sensorial

A análise sensorial é uma ciência interdisciplinar na qual se convidam avaliadores, que se utilizam da complexa interação dos órgãos dos sentidos (visão, gosto, tato e audição) para medir as características sensoriais e a aceitabilidade dos produtos alimentícios e muitos outros materiais (WATTS et al., 1992).

O consumo de qualquer alimento está relacionado às suas características sensoriais, as quais definem sua aceitabilidade pelos consumidores (ORMENESE et al., 2001). Os métodos sensoriais são baseados nas respostas aos estímulos, que produzem sensações cujas dimensões são: intensidade, extensão, duração, qualidade e prazer ou desprazer. Enquanto os estímulos podem ser medidos por métodos físicos e químicos, as sensações são medidas por processos psicológicos (LANZILLOTTI, 1999). A análise sensorial é uma importante ferramenta utilizada para o desenvolvimento de novos produtos, reformulação dos produtos já estabelecidos no mercado, estudo de vida de prateleira, determinação das diferenças e similaridades apresentadas entre produtos concorrentes, identificação das preferências dos consumidores por um determinado produto, otimização e melhoria da qualidade (MEILGAARD, CIVILLE e CARR, 1999).

Normalmente os atributos observados em um produto são na ordem de aparência, odor/aroma, consistência ou textura e sabor. Deve-se considerar que no processo global de percepção os atributos sobrepõem-se uma vez que todas as impressões surgem quase que simultaneamente (MEILGAARD, CIVILLE e CARR, 1999).

A análise sensorial utiliza princípios traçados pela ciência dos alimentos, fisiologia, psicologia e estatística, para que tenhamos respostas objetivas às propriedades dos alimentos, percebidas através dos sentidos (PIGGOT, SIMPSON e WILLIAMS, 1998). Os testes sensoriais, os quais utilizam os órgãos dos sentidos humanos como “instrumentos”, devem ser incluídos como garantia de qualidade por ser uma medida multidimensional integrada, que possui importantes vantagens, como por exemplo, determinar a aceitação de um produto por parte dos consumidores (CARDELLO e CARDELLO, 1998). Segundo WATTS, YLIMAKI e JEFFERY (1992) não existe nenhum outro instrumento que possa reproduzir ou substituir a resposta humana e, portanto, a avaliação sensorial resulta num fator essencial em qualquer estudo com alimentos.

Para realização de análise sensorial, empregam-se diferentes métodos de avaliação, visando determinar o perfil sensorial, a aceitação e preferências acerca de um produto específico. Os métodos sensoriais podem ser divididos em três grupos: métodos discriminativos (comparação pareada, teste triangular, duo-trio, teste de ordenação, comparação múltipla); métodos descritivos de resposta objetiva (perfil de sabor, perfil de textura, análise descritiva quantitativa - ADQ) (ABNT, 1994; PIGGOT, SIMPSON e WILLIAMS, 1998) e os métodos afetivos, compreendendo um menor número de testes: preferência e aceitabilidade (ABNT, 1994). Na tabela 11 encontram-se, divididos por categorias, alguns dos métodos mais tradicionalmente empregados em análise sensorial (STONE e SIDEL, 1993).

Tabela 11 - Categorias de testes e exemplos de métodos usados na análise sensorial.

Categoria	Tipo de teste
Discriminativos	Diferença: comparação pareada, duo trio, triangular
Descritivos	Análise descritiva: Perfil livre, Análise Descritiva Quantitativa
Afetivos	Aceitação-preferência: escala hedônica

Fonte: STONE; SIDEL, 1993

Os métodos afetivos utilizam provadores não treinados e são importantes porque expressam a opinião do consumidor, mas necessitam de um grande número de provadores. HOUGH et al., (2006) relataram uma técnica para estimativa do número mínimo de provadores em testes de consumidores considerando o erro padrão e a escala utilizada. Segundo STONE; SIDEL (1993) para triagem inicial das amostras ou avaliação preliminar da aceitação, a análise é normalmente realizada em condições laboratoriais com 30 a 50 provadores.

Os métodos discriminativos são de fácil interpretação, requerem pouco tempo, são relativamente baratos e estabelecem a diferença qualitativa e/ou quantitativa entre as amostras (STONE; SIDEL, 1993).

Métodos descritivos têm como objetivo caracterizar as propriedades sensoriais do produto alimentício, empregando um grupo de pessoas treinadas, e que descrevem qualitativa e quantitativamente as amostras (MURRAY, DELAHUNTY; BAXTER, 2001). A análise descritiva quantitativa (ADQ) avalia a intensidade dos atributos sensoriais presentes no produto através de uma escala que, via de regra, é um escala não estruturada de 9 cm ancorada em seus extremos com palavras que indicam intensidade. A ADQ foi desenvolvida por STONE et al. (1974), da Tragon Corporation, EUA. Através desse método é possível descrever e quantificar os atributos associados ao produto (conforme aparência, aroma, sabor e textura). A ADQ é desenvolvida com base nas seguintes etapas: i) pré seleção dos provadores; ii) desenvolvimento da terminologia descritiva; iii) treinamento e seleção dos provadores; iv) testes sensoriais finais; e v) análise estatística dos resultados.

Os princípios essenciais da ADQ são: o uso de provadores selecionados e treinados guiados por um líder; o uso de fichas descritivas e glossário desenvolvidos pela equipe; o uso de escalas não estruturadas ancoradas nos extremos, com termos que indicam a intensidade do atributo que está sendo avaliado; treinamento e definição de padrões para os extremos de escala, repetição nas avaliações e o uso de análise estatística (STONE ; SIDEL, 1993). A ADQ apresenta como vantagens: a confiança no julgamento de uma equipe composta por 10-12 provadores treinados, ao invés de alguns poucos especialistas; desenvolvimento de uma linguagem descritiva objetiva, mais próxima à linguagem do consumidor; desenvolvimento consensual da terminologia descritiva a ser utilizado o que implica em maior concordância de julgadores entre os provadores; e emprego de repetições por todos os provadores em testes à cega e os resultados estatisticamente analisados (STONE; SIDEL, 1993; BEHRENS; SILVA,

2000). Esta técnica de análise fornece descrições qualitativas e quantitativas de produtos, baseadas nas percepções de indivíduos qualificados. Constitui-se numa descrição sensorial completa, levando em conta todas as sensações percebidas quando o alimento é avaliado: visual, auditiva, gustativa, olfativa e cinestética (STONE e SIDEL, 1992).

Em testes sensoriais descritivos existem cinco causas principais de divergências nas respostas dos provadores: efeito de interpretação (emprego de diferentes termos ou combinações de termos para a descrição do produto); efeito de nível (variação na avaliação da intensidade do atributo); efeito de faixa (tendência do provador a utilizar diferentes partes da escala); percepção de diferentes estímulos e variação entre sessões (OP & P Product Research, 1998). Esses efeitos podem ser minimizados pelo treinamento e detectados em seleção final dos provadores.

A análise dos dados de ADQ permite, ainda, observar o desempenho da equipe (STONE; SIDEL, 1993). As principais causas de divergência entre provadores (efeito interpretação, de nível, de faixa, percepção de diferentes estímulos e variação entre sessões) podem ser minimizadas pelo treinamento e detectadas em seleção de provadores, permitindo retreinamento da equipe se necessário.

A análise de variância (ANOVA) é o método estatístico mais apropriado para avaliar as respostas da ADQ (NATALÍCIO, 2003; GOMES, 2003; PIAZZON-GOMES et al., 2003).

2.9. Oxidação Lipídica

Os lipídios desempenham um importante papel no que respeita à qualidade de certos produtos alimentares, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis (*e.g. flavor, cor, textura*). São misturas de glicerídeos (mono, di, triglicerídeos) e oxidáveis em diferentes graus (SILVA; MARSAIOLI, 1999). Estes por sua vez, são formados pela associação química entre o glicerol e molécula(s) de ácidos graxos (HOLCAPEK et al., 2003) que por sua vez são classificados em saturados e insaturados (mono e polinsaturados), dependendo do número de duplas ligações em sua estrutura química. Por outro lado, conferem valor nutritivo aos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica, de ácidos graxos essenciais (*e.g. ácidos linoleico, linolênico e araquidónico*) e de vitaminas lipossolúveis (*e.g. A, D, E e K*) (St. ANGELO, 1996).

Os ácidos graxos insaturados são considerados como uma das maiores causas de danos nas propriedades sensoriais de alguns alimentos devido às reações oxidativas que levam à formação de hidroperóxidos. A rancidez oxidativa, um dos fatores críticos que afetam a qualidade do produto processado, ocorre em lipídios que contêm ácidos graxos insaturados. Esses podem sofrer oxidação, degradação e polimerização via radicais livres, causando a formação de aldeídos, cetonas, ácidos, alcoóis e hidrocarbonetos, responsáveis pelas características organolépticas e físico-químicas associadas com a rancificação (HASENHUETTL e WAN, 1992). Ocorre com maior facilidade em alimentos com certa quantidade de água, condição que permite a hidrólise enzimática e contaminação bacteriana. As enzimas envolvidas são as lipases (fosfolipases e glicolipídioidrolases), próprias do alimento ou de origem bacteriana. O processo hidrolítico pode provocar uma profunda modificação da fração lipídica, propiciando alterações sensoriais às vezes muito evidentes. No caso dos ácidos graxos serem voláteis, como ocorre com o ácido butírico, o produto da rancidez manteiga, eles também contribuem no sabor característico de queijos (PIÑOL; BORONAT, 1989).

A oxidação é um fenômeno espontâneo e inevitável, com uma implicação direta no valor comercial quer dos corpos graxos, quer de todos os produtos que a partir deles são formulados (e.g. alimentos, cosméticos, medicamentos) (FERREIRA, 1999). Entre os fatores que afetam ou catalisam a oxidação dos lipídios, os mais importantes são: presença de insaturação nos ácidos graxos, luz, temperatura, presença de antioxidantes e de pró-oxidantes (como metais e clorofila), enzimas, metaloproteínas, microrganismos e condições de armazenamento (NAWAR, 1985).

As alterações nos óleos e gorduras (animais e vegetais) e dos produtos que os contêm devem-se, principalmente, a processos químicos e/ou enzimáticos, podendo ser detectadas ou percebidas sensorialmente, ainda em estágios iniciais. Os processos bioquímicos dependem da umidade, da atividade enzimática e da presença de microrganismos, enquanto que os processos químicos, chamados de autooxidação e de fotooxidação, ocorrem com intervenção de oxigênio (FRANK et al., 1982).

A oxidação lipídica está na origem do desenvolvimento do ranço, da produção de compostos responsáveis por *off flavors* e *off odors*, da reversão e da ocorrência de um elevado número de reações de polimerização e de cisão. Este tipo de reações não só diminui o tempo de vida e o valor nutritivo dos produtos alimentares, como podem gerar compostos nocivos (MOTTRAN, 1998). Responsável pelas mudanças de cor, aroma, sabor, valor nutritivo e textura

dos alimentos, bem como a formação de produtos lipídicos indesejáveis (CHAN et al., 1995). A maior parte dos produtos de oxidação lipídica, como malonaldeídos e óxidos de colesterol, têm despertado a atenção da comunidade, devido a sua possível relação com formação de câncer (PEARSON et al., 1977; ADDIS, 1986). Quanto maior a quantidade de ácidos graxos insaturados e o grau de insaturação destes ácidos, maior a susceptibilidade ao ranço e, conseqüentemente, menor será o tempo de estocagem (FORREST et al., 1979; BOBBIO e BOBBIO, 1989).

Torres (1988) relata que à partir da origem dos hidroperóxidos há a formação de produtos secundários como os aldeídos, cetonas, alcoóis, ácidos e, em condições drásticas, lactonas, sendo de grande importância para o desenvolvimento do odor característico do ranço. O aldeído mais citado como produto da oxidação lipídica é o malonaldeído, que é um dialdeído com três carbonos, que é produzido durante a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados (ARAÚJO, 1995).

O malonaldeído é um dialdeído de três carbonos e grupos carbonil nas posições C-1 e C-3. Pode ser encontrado em diversos alimentos, entretanto, nos gordurosos, a sua concentração é dependente do grau de insaturação do ácido graxo, da presença de metais, do pH e da temperatura e duração de cocção a que os mesmos estiveram submetidos (DAWSON & GARTNER, 1983). É considerado o maior produto secundário da oxidação lipídica, e, como um aldeído bifuncional, é muito reativo, podendo interagir através de ligações cruzadas com o DNA e proteínas, promovendo aberrações cromossômicas e redução da capacidade de síntese protéica (PEARSON et al., 1983; ADDIS, 1986).

Existem poucas dúvidas de que o malonaldeído, produto secundário da oxidação lipídica, seja tóxico às células vivas (ADDIS et al., 1983 e PEARSON et al., 1983). O malonaldeído pode ser formado "in vivo" ou pré-formado em alimentos. Existem estudos sugerindo que o malonaldeído seja cancerígeno (SHAMBERRGER et al., 1974) e mutagênico (MUKAI e GOLDSTEIN, 1976). Os produtos da oxidação lipídica, como o malonaldeído e óxidos de colesterol têm chamado a atenção da comunidade científica devido à sua provável relação com a formação de câncer (PEARSON et al., 1983; ADDIS, 1986).

Testes como índice de peróxidos, ácidos graxos livres, anisidina, Kreis, TBA (ácido 2-tiobarbitúrico), valor Totox (valor total de oxidação) e compostos voláteis são utilizados no controle de qualidade de óleos, gorduras e produtos que os contenham, por fornecerem

informações valiosas e essenciais a respeito do estado oxidativo, na predição da rancidez do alimento analisado. (SQUIRES; VALDES; WU; LEESON, 1991; BARRERA-ARELLANO, 1993; ADDIS, 1986; GÓMEZ PIÑOL; DE LA TORRE-BORONAT, 1989; CECCHI, 1999).

Torres (1997) desenvolveu um método que avalia a extensão da estabilidade lipídica chamado o teste de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) ou TBARS (substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico). Nesse método, o malonaldeído, um produto de oxidação lipídica, após ser obtido por destilação, reage sob aquecimento com o ácido tiobarbitúrico, produzindo coloração rósea que pode ser medida espectrofotometricamente e comparada com a absorção da curva padrão. Araújo (1995) cita que este é um excelente método para detectar oxidação lipídica. O teste é expresso em miligramas de malonaldeído por quilo de amostra.

Essa técnica é bastante utilizada em laboratórios no mundo inteiro. Ela vem sendo frequentemente aperfeiçoada, devido aos avanços tecnológicos em se obter dados mais confiáveis (TORRES, 1997) e fundamenta-se na formação de um composto de coloração vermelha resultante da condensação de 2 moles de ácidos 2-tiobarbitúrico com 1 mol de aldeído malônico ou de seus tautômeros (originados na oxidação dos lipídios) (TARLADGIS et al., 1960).

O teste de TBA quantifica o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo – o MDA é um dialdeído de três carbonos, com grupos carbonilas nos carbonos C-1 e C-3 (ST ÂNGELO, 1996). É um teste altamente empírico e foi sugerido primeiramente por Patton, Keeney; Kurtz, em 1951, para leites e produtos lácteos (CECCHI, 1999; MEHLENBACHER, 1960). A reação envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o malonaldeído, produzindo um composto de cor vermelha, medido espectrofotometricamente a 532 nm de comprimento de onda (de acordo com a metodologia, esse comprimento de onda pode variar, situando-se ao redor de 500 a 550 nm). A formação do composto TBA-MDA, na proporção de 2:1, é possivelmente iniciada pelo ataque nucleofílico, envolvendo o carbono 5 do TBA e o carbono 1 do MDA, seguido de desidratação e reação similar subsequente do composto intermediário com uma segunda molécula de TBA, na proporção de 1:16. A quantificação de malonaldeído é feita a partir de curvas de calibração construídas com concentrações conhecidas de malonaldeído. Os padrões mais frequentemente utilizados são 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) e 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) que, nas condições ácidas do teste, sofrem hidrólise,

resultando na liberação do malonaldeído. Os resultados são expressos em unidades de absorvância por unidade de massa de amostra ou em “valor de TBA” ou “número de TBA”, definidos como a massa, em mg, de malonaldeído por kg de amostra (ST ANGELO, 1996) (Figura 18).

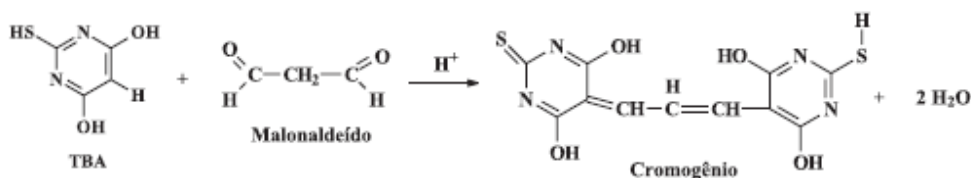


Figura 18 - Reação do teste ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido, medido espectrofotometricamente a 532 nm.

Ao optar pelo teste de TBA, deve-se conhecer a composição em ácidos graxos do alimento em análise, uma vez que o teste mede a extensão da oxidação de lipídios com três ou mais duplas ligações. Para sistemas mais complexos, em que estão presentes misturas de constituintes, a medida de TBA tem apenas significado qualitativo e comparativo (DAHLE; HILL; HOLMAN, 1962), embora seja de grande utilidade na comparação de um único material em diferentes estágios de oxidação (NAWAR, 1996). É usado satisfatoriamente na avaliação dos estágios iniciais de rancidez de banhas, gorduras e óleos de soja, girassol e *colza*. Em contrapartida, é um pobre indicador da oxidação térmica de vários óleos de fritura (KIM; MAENG, 1984). Apesar de ser reconhecido como metodologia oficial (AOAC, 2004), atualmente não se recorre à avaliação de TBA em óleos vegetais.

2.10 Referências Bibliográficas

ACASIO, A.U. Handling and storage of soybeans and soybean meal. <<http://www.asasea.com.>>, Acessado dia: 20/05/2009.

ADDIS, P. B. Occurrence of lipid oxidation products in foods. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 24, n. 10/11, p. 1021-1030, 1986.

ALMEIDA, C. P. **Castanha-do-pará, sua exportação e importância na economia amazônica**. SAI n. 19. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1963. 86 p.

ALMEIDA, E.; ASSALIN, M.R.; ROSA, M.A. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 818-824, 2004.

ANNIS, P.C.; MORTON, R. The acute mortality effects of carbon dioxide on various life stages of *Sitophilus oryzae*. **Journal Stored Product Research**, v.33, p.115-124, 1997.

AOCS; **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**, AOCS: Champaign, 2004.

APHA, American Public Health Association, **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19. ed. New York:, American Water Works Association, Water Environment Federation, 1995.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos**. 2ª edição. Viçosa: Editora UFV, 1999. 416p.

ARCE, M.A.B.R. **Pós colheita e armazenagem de grãos**. Departamento Agroindústria, Alimentos e Nutrição – São Paulo: ESALQ/USP, 2004.

ARMOR, J.N. Striving for catalytically green processes in the 21st century. **Appl. Catal. A** 1999, 189, 153.

ARRUS, K. et al. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **J. of Stor. Prod. Research**, v.41, p.513-527, 2005a.

ARRUS, K.; BLANK, G.; CLEAR, R.; HOLLEY, R.A.; Abramsom, D. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. **Journal of Food Protection**, v.68, n.5, p.1060-1065, 2005b.

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Teste de ordenação em análise sensorial**: NBR 13170, Rio de Janeiro, 1994. 76 p.

ATHIÉ, I. **Conservação de grãos**. Campinas, Fundação Cargill, 1998. 236p.

ATUI, M. B.; LAZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998.

BABLON G., BELLAMY W. D., BOURBIGOT M. M., DANIEL F.B., DOREM., ERB F., GORDON G., LANGLAIS B., LAPLANCHE A., LEGUBE B., MARTIN G., MAsschelein W.J., PACEY G., RECKHOW D. A.; VENTRESQUE C. (1991) Fundamental aspects. In Ozone in Water Treatment. "**Application and Engineering**". Edited by B. Langlais, D.A. Reckhow and D. R. Brink. pp. 11-132. LewisPublishers, Chelsea, MI.

BAILEY, C. H. & GURJAR, A. M. Respiration in stored wheat. **Journal Agricultural Engineering Research**, New York, v. 12, p. 685-713, 1918.

BAILEY, P.S.; **Ozonation in Organic Chemistry**, Academic Press: New York, 1978, vol. 1, p.8.

BANKS, H.J. (1984). Current methods and potential systems for production of controlled atmospheres in grain storages. In: 'Controlled Atmosphere and Fumigation in Grain Storages: **Proceedings of an international symposium**', Amsterdam, Elsevier pp 523-541.

BARRERA-ARELLANO, D. . **Estabilidade de óleos e Gorduras. Óleos e Grãos**, São Paulo, SP, v. 13, n. jul-agost, p. 10-13, 1993

BAUDET, L. Armazenamento de sementes. In: PESKE, S.T.; ROSENTHAL, M. D.; ROTA, G.R.M. Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos. **Pelotas:UFPel** Editora e gráfica universitária, 2003. 414p.

BAYMAN P.; BAKER, J.L. Ochratoxins: a global perspective, **Mycopathologia** 162 (2006), pp. 215–223.

BEHRENS, J.H.; SILVA, M.A. Perfil sensorial de vinhos brancos vanetais brasileiros através de análise descritiva quantitativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n.1, p.60-67, 2000.

BERJAK, P. Stored seeds: the problems caused by microorganisms. In: ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY, Passo Fundo, 1987. **Proceedings. Passo Fundo: EMBRAPA; ABRATES**, 1987a. p.93-112.

BERJAK, P. Seed stored problems: our research program. In: ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY, Passo Fundo, 1987. **Proceedings. Passo Fundo: EMBRAPA; ABRATES**, 1987b. p.113-130.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução a química de alimentos**. 2ª Ed. São Paulo: Livraria Varela, 1989. 222p.

BODÓ E, STEFÁNKA Z, IPOLYI I, SÖRÖS C, Dernovics M, Fodor P. Preparation, homogeneity and stability studies of a candidate LRM for Se speciation. **Anal Bioanal Chem** 2003; 377:32– 8.

BOND, E.J.; BUCKLAND, C.T. Development of resistance of carbon dioxide in the Granary Weevil. **Journal Economic Entomology**, v.72, p.770-771, 1979.

BOND, E.J.; MILLER, D.M.; A new technique for measuring the combustibility of gases at reduced pressures and its application to the fumigant phosphine. **Journal of Stored Products Research**, v.24, p.225-228, 1988.

BORGES, P. **Do valor alimentar da castanha-do-pará**. SAI n. 39. Rio de Janeiro: s.n., 1967. 38 p.

BRACKMANN, A.; NEUWALD, D.A.; RIBEIRO, N.D.; DE FREITAS, S.T. Conservation of three bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.) of the group carioca in cold storage and controlled atmosphere. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, 2002.

BRAGANTINI, C. **Alguns Aspectos do Armazenamento de Sementes e Grãos de Feijão**. Embrapa Arroz e Feijão. ISSN 1678-9644, 28p, Dezembro, 2005.

BRAMORSKI, A; VASCONCELLOS S. K. Avaliação dos equipamentos de refrigeração e congelamento dos maiores supermercados do município de Blumenau, SC. **Revista Higiene Alimentar**, Santa Catarina, v.19 n.133, 2005.

BRANDÃO, F. **Manual do Armazenista**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 1986. 269p.

BRASIL. Decreto nº51.209, de 18/08/1961. Aprova as novas especificações para classificação e fiscalização da exportação da "Castanha-do-Brasil". Brasília/DF: **Diário Oficial de Brasília**, p. 853-855. 1961.

BRASIL. Ministério do Interior. **Estudos e Pesquisas sobre a Castanha-do-Pará**. Belém/PA: SUDAM, p.97. 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Estabelece, os padrões mínimos, das diversas matérias primas empregadas na alimentação animal. Portaria n.07, de 09 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União** de 14 de novembro de 1988, seção 1, p.21968.

BRASIL. Portaria MAARA No.183 de 21 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília (DF), 25 mar 1996. Seção I. p. 4929.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeto de Monitoramento da Castanha-do-Brasil**. Relatório de Atividades – 2002. Brasília/DF: 2002. P. 110.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 172 de 04 de julho de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 7 de julho de 2003. Disponível em: <http://forteanalises.com.br/paginas/boletins.htm> Acesso em: 26 de maio de 2008.

BRODY, A.L. The market. In: Parry, R.T. Principles and applications of modified atmosphere packaging of food. London: **Blackie Academic & Professional**, 1993. cap.2, p.19-40.

BROOKER, D.B., BAKKER-ARKEMA, F.W., HALL, C.W. Drying and storage of grains and oilseeds. New York: **Van Nostrand Reinhold**, 1992. 450p.

BULLERMAN, L.B.; SCHROEDER, L.L.; PARK, K.Y. Formation and control of mycotoxins in food. **J. Food Prot.**, v.47, n.8, p.637-646, 1984.

CACEX. **Informação semanal**, v. 19, n. 901, 1984.

CALDAS, E. et al. Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risk to human health. **Rev. de Saúde Pública**. V. 36, n.3. São Paulo: USP, p.319-323. 2002.

CAMARGO, L.A.A. **Estudo químico bromatológico das castanhas da *Bertholletia excelsa* H.B.K.**, 1968. 43p. Tese de Doutorado – Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 1968.

CAMPO/PAS, **Manual de Segurança e Qualidade para a cultura da castanha-do-Brasil**. Série Qualidade e Segurança dos alimentos. Brasília, DF: Campo PAS, 2004.

CANDLISH, A. A survey of ethnic foods microbial quality and aflatoxin content. **Food Addit. And Contaminants**, v.18, n.2, p.129-136, 2001.

CARDELLO, H. M. A. B.; CARDELLO, L. Teor de vitamina C, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (*Mangifera indica* L.) var. haden, durante o amadurecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, p. 211-217, 1998.

CARTAXO, C. et al. Occurrence of aflatoxin and filamentous fungi contamination in Brazil-nuts left inside the forest. **Sem. Cient. Int. de Salud Animal**. Havana/CU, B56, abstracts, 2004.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424p.

CASEMG – **Companhia de armazéns e silos do Estado de Minas Gerais**. Disponível em: http://www.casemg.com.br/servicos/armaz_conv.htm, 2008.

CASTRILLÓN, A.L.; PURCHIO, A. Fungos e produtores de aflatoxinas em castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa* Humb & Bonpl 1808). **Acta Amazonica**, 18(3-4):173-183,1988.

CAVALCANTE, P. B. Frutas comestíveis da Amazônia I. Belém, Museu Paraense Emilio Goeldi: ESALQ/USP. 84 p. 1972.

CAVALIERE, et al., Aflatoxin M₁ determination in cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatography A**, 1135, p.135-141, 2006.

CECCHI, H. M.; **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**, Ed. da Unicamp: Campinas, 1999.

CDC-Centers for Disease Control and Prevention (2004). **Outbreak of aflatoxin poisoning-eastern and central provinces**, Kenya, January–July 2004. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report (Vol. 3, pp. 790–793).

CHANG, J.; GUTENMANN, W.; REID, C.; LISK, D. Selenium content of brazil nuts from two geographic locations in Brazil. **Chemosphere** 1995;30:801–2.

CHAVES, N. (2007). **Cultivo da Castanha-do-Brasil**. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília – CDT/UnB, 22p.

CHU, F. S. Mycotoxins: food contaminations, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 259, n. 3-4, p. 291-306, 1991.

CHUNHIENG, T. et al. Study of selenium in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Canada, v. 52, n. 13, p. 4318-4322, 2004.

CHURCH, I.J.; PARSONS, A.L. Modified atmosphere packaging technology: a review. **Journal Science Food Agriculture**, v.67, p.143-152, 1995.

CHURCH, P.N. Meat products. In: Parry, R.T. Principles and applications of modified atmosphere packaging of food. London: **Blackie Academic & Professional**, 1993. cap.10, p.229-268.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Boletim técnico, **Subsídios para as operações de castanha do Brasil no programa de aquisição de alimentos**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/pa/subsidios_para_operacoes_de_castanha_do_para.pdf, acesso dia: 20/05/2009.

COSTA, H.S. **Estudo do comportamento do processo de ozonização como póstratamento de efluentes de sistemas de tratamento anaeróbio de águas residuárias domiciliares**. 2003. 295f. Tese de doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos.

COZZOLINO, S. M. **Novas recomendações de nutrientes interpretação e utilização**. In: Usos e aplicações das “Dietary Reference Intake”. DRIS. São Paulo: ILSI/SBAN, 2001.

DA GLÓRIA, E.M. **Segregação da contaminação com aflatoxina durante a classificação das amêndoas de castanha-do-Brasil**. In: V Congresso Latino-americano de Micologia. P.155, 2006.

DA SILVA, R.A.; CHALFOUN, S.M.; DA SILVA, M.A.M.; PEREIRA, M.C. Inquérito sobre o consumo de alimentos possíveis de contaminação por micotoxinas na ingesta alimentar de escolares da cidade de Lavras, MG. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 439-447, mar./abr., 2007.

DAHLE, L. K.; HILL, E. G.; HOLMAN, R. T.; **Arch. Biochem. Biophys.** 1962, 98, 253.

DE LA RIVE, A.; MARIIGNAC, D.; RENDUS Hebd. **Seances Acad. Sci.** 1845, 20, 1291.

DE MELLO, F.R.; SCUSSEL, V.M. characteristic of in-shell Brazil nuts and their relationship to aflatoxin contamination: criteria for sorting. **J. Agric. Food Chem.** October. p.9305-9310. 2007.

DI MATTEO, M.L. **Influência da Pré-ozonização na Coagulação-Floculação de Água de Abastecimento utilizando o Cloreto Férrico como coagulante**. 1992. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Engenharia Civil. Unicamp. São Paulo.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **O Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 187-191, 2002.

DOE. Washington State Department of Ecology. **Criteria for Sewage Works Design**. In: Water Quality Program, Estados Unidos, 1998.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J Natl Cancer Inst** 1981;66:1191-308.

DUMONT, E.; De PAUW, L.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? **Food Chem** 2006;95:684 –92.

ENRÍQUEZ, G.; SILVA, M.A.; CABRAL, E. **Biodiversidade da Amazônia. Usos e potencialidades dos mais importantes produtos naturais do Pará**. Belém: NUMA/UFPA, p.32-49, 2003.

EUROPEAN COMMISSION (EC), 2006. Commission Regulation No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union** L 364: 5-24.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Comission Regulation n. 1525/98 of July 1998, Amending Regulation (EC) 194/97 of 31 January 1997 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, 201, 43-46, 1998.

EVANS, F. L. Ozone in water and wastewater treatment. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio. **Ann Arbor Science Publisher** Inc. 1972. p. 179.

FAO. 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. **FAO Food and Nutrition** Paper 81.

FAO. **Dados agrícolas**. Genebra, 2005. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subset=agriculture&language=ES1983>. Acessado em 20/08/2008.

FAO/WHO Expert Committee on Food Aditives [JECFA]. Safety evaluation of certain food additives and contaminants – Aflatoxins. Geneva: **World Health Organization**; 1998.

FAO/WHO/UNU. Expert consultation energy protein requirements: FAO/WHO nutrition meetings, Geneva: Food and Agriculture Organization / **World Health Organization**, Report series 724, 1985.

FDA – Food and drug administration: bacteriological analytical manual. 8.ed. Gaithersburg: **AOAC International**, 1998. 1.01-28.09p

FINLEY, J. Selenium accumulation in plant foods. **Nutr Rev** 2005; 63:196–202.

FONSECA, H. **Os fungos e a deterioração de alimentos**. Disponível: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>>. Acesso em 15 de maio 2009

FORREST, J.C.; ABERLE, E.D.; HWDRICK, H.B. **Fundamentos da ciencia de la carne**, Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha, 1979, 357p.

FORTNUM, B.A. Effect of environment on aflatoxin development in prehavest maize: I: Workshop on Aflatoxin in Maize, El Batan, 1986. **Proceedings**. El Batan: CIMMYT, 1986. P.145-51.

FOX, T.; VAN DEN HEUVEL, E.; ATHERTON, C. Bioavailability of selenium from fish, yeast and selenate: a comparative study in humans using stable isotopes. **Eur J Clin Nutr** 2004;58:343–9.

FRANK, H.K.; BETANCOURT, L.A. Castanha-do-pará; I – origem, produção e características físicas e químicas. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.15, n.4, out/dez, p.351-365, 1981.

FRANK, J.; GEIL, J.V.; FREASO, R. Automatic determination of oxidation stability of oil and fatty products. **Food Technology**, v.36, n.6, p.71-76, 1982.

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. **Progress in Lipid Research**, v. 19, p. 1-22, 1980.

FRANKEL, E.N.; HUANG, S.W. Improving the oxidative stability of polyunsaturated vegetable oils by blending with high oleic sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.71, n.3, p.255-259, 1994.

FREIRE, F.C.O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R.M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, n.149, p.13-19, 2000.

FREIRE, F.; OFFORD, L. Bacterial and yeast counts in Brazilian commodities and apices. **Braz. J.Microbiol.** v.33, n.2, São Paulo/SP, Apr/Ju, 2002.

GLAZE, W.H.; KANG, J.W.; CHAPIN, D.H. The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. **Ozone Science & Engineering**, Abingdon, v. 9, p. 335-352, 1987.

GODOY, R. Atmosfera modificada: consevação naturaldos alimentos. **Revista Nacional da carne**, v.1995, n.223, p.54-61, 1995.

GOGATE, P.R.; PANDIT, A.B. A review of technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. **Advances in Environmental Research**, Amsterdã, v. 8, p. 501-551, 2004.

GOMES, J.P. **Queijo tipo minas frescal com derivados de soja**. 2003. 125p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

GÓMEZ PIÑOL, J. M.; DE LA TORRE-BORONAT, M. C.; **Alimentaria** 1989, 204, 11.

GONZAGA, I. **Avaliação nutricional relativa ao selênio em crianças com dieta enriquecida de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*, H. B. K.)**. São Paulo: USP, 2002.

GOTTSCHALK, C.; LIBRA, A.J.; SAUPE, A.; Ozonation of water and waste water, Wiley-Vch: **Weinheim**, 2000.

GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation: a review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 55, p. 539-546, jun. 1978.

GRAY, J.L.; PEARSON, A.M. **Cured Meat Flavor**. Advances in Food Research, New York, v.19, p.1-86, 1984.

GRUNERT, K.G.; BECH-LARSEN, T.; BREDAHL, L. Three issues in consumer quality perception and acceptance of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 575-584, 2000.

GUZEL-SEYDIMA, Z.B.; GREENEB, A.K.; SEYDIMA, A.C. Use of ozone in the food industry. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** 37 (2004) 453-460.

HAAS, P. **Exposição da população a aflatoxina B₁ e ocorrência de carcinoma hepatocelular nos estados de São Paulo e Santa Catarina**. 2000. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

HALL, C.W. **Drying and storage of agricultural crops**. Westport, The AVI publishing Company, INC, 1980. 381p.

HASENHUETTL, G.L.; WAN, P.J. Temperature effects on the determination of oxidative stability with the metrohm rancimat. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.69, n.6, p.525-527, Jun. 1992.

HAUMANN, B.F. Health implications of lipid oxidation. **Inform**, v.4, n.7, p.800-810, 1993.

HEATHCOTE, J.G. **Aflatoxins and related toxins**. In: Betina, V. (Ed) Micotoxins – Production, isolation, separation and purification. Amsterdam: Erlsevier, 1984. p. 89-130.

HILL, A.G.; RICE, R.G. **Handbook of Ozone Technology and Applications**, Ann Arbor Science: Michigan, 1982, vol. 1, p. 1.

HOLBEN, D.; SMITH, A. M. The diverse role of selenium within selenoprotein: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, Philadelphia, v. 99, n. 7, p. 839-843, 1999.

HOLCAPEK, M et al. characterization of triacylglycerol and triacylglycerol composition of plants oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **J. of Chromatography A**, v.1010, p.195-215, 2003.

HOUGH, G.; WAKELING, I.; MUCCI, A.; CHAMBERS, E.; GALLARDO, I.M.; ALVES, L.A. Number of consumers necessary for sensory acceptability tests. **Food Quality and Preference**, n. 17, p. 522-526, 2006.

HOYLAND, D. V.; TAYLOR, A. J.; **Food Chem.** 1991, 40, 271.

HUNT, N. K.; MARIÑAS, B.J. Kinetics of Escherichia coli inactivation with ozone. **Water Research**. 31 (6): 1355-62. 1997.

HUNT, T.J.; **J.Am.Sci.** 1848, 6, 171.

HUSSEIN, S. H.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Ireland, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

IGLESIAS, S.C. **Degradation and biodegradability enhancement of nitrobenzene and 2,4-dichlorophenol by means of advanced oxidation processes based on ozone.** 2002. 322f. Tese de Doutorado. (Doutorado em Engenharia Química) Universidade de Barcelona, Barcelona.

IOANNOU-KAKOURI. Surveillance and control of aflatoxins B1, B2, G1, G2 and M1 foodstuffs in Republic of Cyprus: 1992-1996. **Food and Chem. Contaminants**, v.82, n.04, p.883-892, 1999.

JAIMEZ, J. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v.882, p.1-10, 2000.

JAYAS, D.S., KHANGURA, B., WHITE, N.D.G. Controlled atmosphere storage of grains. **Postharvest News and Information**, London, v.2, n.6, p.422-427, 1991.

JAYAS, D. S.; JEYAMKONDAN, S. Modified Atmosphere Storage of Grains Meats Fruits and Vegetables. **Biosystems Engineering** (2002) 82 (3), 235–251

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluation of certain food additives and contaminants – Aflatoxins. Geneva: **World Health Organization**; 1998.

JOLLY, P. et al., Determinants of aflatoxin levels in Ghanaians: Socio demographic factors, knowledge of aflatoxin and food handling and consumption practices. **Int. J. Hyg. Environ. Health** 209, p.345-358. 2006.

KABAK, D.; DOBSON, A.D.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. **Crit. Rev. In food science and nutrition**. V.46, 596-619, 2006.

KANNAMKUMARATH, S.; WROBEL, K.; WROBEL, K.; VONDERHEIDE, A.; CARUSO, J. HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. **Anal Bioanal Chem** 2002;373:454-60.

KELLS, S.A.; MASON, L.J.; MAIER D.E.; WOLOSHUK, C.P.; Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize, **J. Stored Prod. Res.** 37 (2001), pp. 371-382.

KERSHAW, S.J. Aflatoxin in imported edible nuts: some data 1982-84. **J. of Food Technology**, 20, p.647-649, 1985.

KIM, D. H.; MAENG, Y. S.; **Nonglim Nonjip** 1984, 24, 101.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone, **J. Food Sci.** 65 (3) (2000), pp. 521-528.

KING, A.D.; NAGEL, C.W. Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of food Science**, v.40, n. 21, p. 362-366, 1975.

KIRK, R.E.; OTHMER, D.F.; **Encyclopaedia of Chemical Technology**, John Wiley and Sons: New York, 1981, vol. 16, p. 683.

KLISCH, M.A. environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycoscience**, 48, p.71-80, 2007.

KOLTUNSKI, E.; PLUMRIDGE, J. Ozone as a disinfecting agent in the reuse of wastewater. **Publicação de Ozonia Ltd.** Duebendorf, Switzerland. 2000.

KRYUKOV, G.V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S.V. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science** 2003;300:1439-43.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências no tratamento efluentes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

LACEY, J.; MAGAN, N. Fungi in cereal grain: their occurrence and water and temperature relations. In: CHELKOWSKI, J. Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Amsterdam: **Elsevier Science**, 1991. p. 77-118.

LAL, S.P.; KAPOOR, J.N. Succession of fungi in wheat and maize during storage. **Indian Phytopathology**, v.32, p.101-104, 1979.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R.; Ozone in Water Treatment. Application and Engineering. **Lewis Publishers**, Chelsea: Michigan, 1991.

LEE, J.D.; **Química Inorgânica não tão concisa**, 2ª Ed., Editora Edgard Blücher: São Paulo, 2001.

LILLEHOJ, E.D. The aflatoxin in maize problem: The historical perspective. In: Workshop on aflatoxin in maize, El Batan, 1986. **Proceedings**. El Batan: CIMMYT, 1986. P.13-32.

LINDLEY, M.G. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. **Trends in Food Science e Technology**, v.9, p.336-340, 1998.

LIRA, M.H. High incidence of aflatoxigenic fungi in Brazil nut. **Fitopatologia**, 11:21 resumo. 1976.

LOCATELLI, M. **Cultivo da Castanha-do-Brasil em Rondônia**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Castanha/CultivodaCastanhadoBrasilRO/index.htm>. Acesso em: 20 de maio de 2008.

LORINI, I. **Armazenagem de Grãos**. 1ª Ed. Campinas/SP: IBG, 2002. 1000p.

LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F. **Catálogo das madeiras da Amazônia**. Belém: SUDAM. v. 1, p. 238-239. 1968.

LUZ, W.C. **Diagnose e controle das doenças da espiga de milho no Brasil**. Passo Fundo: EMBRAPA, CNPT, 1995. 28p.(Circular Técnica, 5).

MANAHAN, S.E.; **Environmental Chemistry**, 8a ed., CRC Press: Boca Raton, 2005.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Cartilha do produtor. **Prevenção de aflatoxinas em castanha-do-Brasil**. Brasília, 2002.

MARCOS FILHO, J. **Produção de sementes de soja**. Campinas: Fundação Cargill, 1986. 86p.

MARKLINDER, I. et al. Consumer's ability to discriminate aflatoxin-contaminated Brazil nuts. **Food Addit. and Contaminants**, 22, p.56-64, 2005.

MCLEAN, M.; DUTTON, M. F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. **Pharmacology and therapeutics**, London, v. 65, n. 2, p. 163-192, 1995.

MCMURRY, J.; **Química Orgânica**, 6a ed., Editora Pioneira Thomson Learning: São Paulo, 2005.

MEHLENBACHER, V. C.; **The Analysis of Fats and Oils**, The Garrad Press: Illinois, 1960.

MEILGAARD, M.C.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. Boca Raton: CRC Press. 387p, 1999.

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, **J. Stored Prod.** 39 (1) (2002), pp. 33–34.

MENNINGER, E.A.. **Edible nuts of the world. Brazil nut family.** 174p. 1977.

MERCOSUR. Technical Regulament about maximum limits for aflatoxins. **Internal Correspondence** – Mercosul/GMC/, n. 56/94, 1994.

MERONUCK, R.A. The significance of fungi in cereal grains. **Plant Disease**, v.71, p.287-291, 1987.

MILNER, M.; CHRISTENSEN, C. M.; GUEDES, W. G. Grain storage studies. VI. Wheat respiration in relation to moisture content, mold growth, chemical deterioration, and heating. **Cereal Chemical**, v. 24, p. 182-199, 1947.

MONTROSS, J.E., MONTROSS, M.D., BAKKER-ARKEMA, F.W. Grain Storage. In: BAKKER-ARKEMA, F.W. (Ed.). **CIGR handbook of agricultural engineering**. St. Joseph: ASAE, 1999. v. 4, p. 46-59.

MOSKOWITZ, H. R. **Applied sensory analysis of foods.** Boca Raton: CRC Press, v.1, 259p., p. 403 – 409, 1984.

MÜLLER, C. H.; FIGUEIREDO, F. J. C.; KATO, A. K.; CARVALHO, J. E. U. de. **A cultura da castanha-do- Brasil.** Brasília: EMBRAPA. Coleção Plantar, v. 23, 65 p. 1995.

MUNINBAZI, C.; BULLERMAN, L. Molds and mycotoxins in foods from Burundi. **J. Food Protect.**, v. 59, n. 8, p. 869-875, 1996.

MUNTER, R. **Advanced Oxidation Processes – current status and prospects.** Proceedings of the Estonian Academy of Science: Chemistry, Tallinn, v. 50, n. 2, p. 59-80, 2001. Disponível em: <<http://www.kirj.ee/esi-l-k/k50-2-1.pdf>>. Acesso em 25 de agosto de 2006.

MURRAY, J.M.; DELAHUNTY, C.M.; BASTER, I.A. Descriptive sensory analysis: past, present and future. **Food Research International**, v. 34, n. 6, p. 461-471, 2001.

NAIR, V.; TURNER, G.; **Lipids** 1984, 19, 804.

NATALÍCIO, M.A. **Caracterização química, física e sensorial de mandioca cultivares Catarina amarela e Iapar-19 pioneira com duas épocas.** 120p, 2003. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina: Londrina.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O. R.(Ed.). **Food chemistry.** 3 ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p 225-320.

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. London and Basingstoke, Macmillen Press, Ltda. In: Patologia de sementes. Fundação Cargill, Campinas São Paulo, p.260-261, 1987.

NEWING, H.; HARROP, S. European health regulations and Brazil nuts: Implications for biodiversity conservation and sustainable rural livelihoods in the Amazon. **Journal of International Wildlife Law and Policy**, v.3, n.2, p.109-124, 2000.

NOGUEIRA, M.A.F. DE S. **O Armazenamento de grãos nas regiões da grande Dourados e Sul-Fronteira do Mato Grosso do Sul com o Paraguai: um estudo de caso**. Dissertação de mestrado em Agronegócios. Universidade Federal de Mato Grosso do sul, Universidade de Brasília e Universidade Federal de Goiás. Campo Grande-MS/Brasília-DF/Goiânia-GO. 132p, 2007.

NYBG – The New York Botanical Garden. **The Brazil nut Industry** – Past, present and the future. Disponível em: <http://www.nybg.org/bsci/braznut/>. Acesso em 10/06/2008. 2008.

OLIVEIRA, MS; PRADO, G.; JUNQUEIRA, RG. Comparação das técnicas de cromatografia em camada delgada e ELISA na quantificação de aflatoxinas em amostras de milho. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 20, n. 3, p. 369-374, 2000.

OP & P Product Reseach, Senstools Versão 2.3. Utrecht: **OP & P Product Research**, 1995-1998. Conjunto de programas 1 CD room.

ORMENESE, R.C.S.C.; FARIA, E.V.; GOMES, C.R.; YOTSUYANAGI, K. Massas alimentícias não- convencionais à base de arroz – perfil sensorial e aceitação pelo consumidor. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.4, p.67-74, 2001.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Castanha-do-Brasil: da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis: Editorgraf, 2006. 176 p.

PACHECO, A.M. Florianópolis. **Selênio e aflatoxinas em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) e qualidade de produtos derivados**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Florianópolis/SC: a – Universidade Federal de Santa Catarina, 144p. 2007.

PACHECO, A.M. **Ocorrência de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) na análise de perigos e pontos críticos de controle em três etapas da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) na safra de 2002**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Manaus/AM: Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Amazonas, 87p. 2003.

PACHECO, A.M.; SCUSSEL, V.M. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Easten and Western Amazon basin. **J. Agric. Food**. 55(26): 11087-11092, 2007.

PÁDUA, I. P. M.; SILVEIRA I. A.; MARTINS, C. E. C. B. Aflatoxinas e risco de contaminação do leite humano. **Pro Homine**, v. 1, n. 1, 2002.

PALOU, L.; CRISOTO, C.H.; SMILANICK, J.L.; ADASKAVEG J.E.; ZOFFOLI, J.P. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physical responses of peaches and table grapes in cold storage, **Postharvest Biol. Technol.** 24 (2002), pp. 39–48

PANETTA, J.C. Calor e Alimentos. Os cuidados devem ser redobrados. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 12 nº 53,1998.

PARASKEVA, P.; GRAHAM, N. Ozonation of municipal wastewater effluents. **Water Environment Research**. 74 (6): 569-81. 2002.

PARRY, R. T. Introduction. In: Parry, R. T. Principles and applications of modified atmosphere packaging of food, London: **Blackie Academic & Professional**, 1993, cap.1, p.1-18.

PATERSON, R.; RUSSELL, M. Fungi and fungal toxins as weapons. **Myvological Research**, v.110, n.9, p.1003-1010, September, 2006.

PEARSON, A.M. LOVE, J.D.; SHORLAND, F. B. Warmed-over flavor in meat, poultry and fish. **Advances in Food Research**, v.23, p.1-74, 1977.

PEDERSEN, J.R. **Insects: Identification, damage and detection**. In: SAUER, D. B. (Ed.). Storage of cereal grains and their products. St. Paul, MN:AACC. 1992.

PELLETIER, M.J.; REIZNER, J.R. Comparison of fluorescence sorting and color sorting for the removal of aflatoxin from large groups of peanuts. **Peanut Science**, v.19, n.1, p.15-20.

PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e Produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.20, n.1, 2002.

PEREZ, A.G.; SANZ, C.; RIOS, J.J.; OLIAS R.; OLIAS, J.M. Effect of ozone treatment on postharvest strawberry quality, **J. Agric. Food Chem.** 47 (1999), pp. 1652–1656

PETERSSON, S.; SCHNÜRER, J. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.3, p.1027-1032, 1995.

PIÑOL, J. M. G.; BORONAT, M. C. de la T. Influencia de la tecnología en el valor nutritivo de los alimentos: lípidos. **Alimentaria**, v. 204, p. 15-21, 1989.

PINTO, N.F.J.A. **Patologia de sementes de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, 1998. 44p. (Circular Técnica, 29).

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

PITT, J.I.; MISCAMBLE, B.F., 1995. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. **Journal of Food Protection** 58: 86-90.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Chapman & Hall, 1997. 593 p.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenagem de grãos**. Campinas: Icea, 1986. 603 p.

PUZZI, D. **Combate das pragas**. In: Conservação dos grãos armazenados. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1973, 98p.

RAHARJO, S.; SOFOS, J. N.; **Meat Sci.** 1993, 35, 145.

RAYMAN, M.P. The importance of selenium to human health. **Lancet** 2000; 356:233– 41.

RIBEIRO, M. A. A.; SOLER, R. M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; LIMA, V. A. Shelled Brazil nuts canned under different atmospheres. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 105-107, jul./dez,1995.

RIZVI, S. S. H. Flexible packaging material properties that influence shelf life. In: Am. **Meat Science Association**. Proceedings of the Meat Industry Conference. New Orleans, Louisiana, p. 125-141, September, 1984.

ROBSON, C. M.; RICE R. G. Wastewater ozonation in the USA – history and current status - 1989. **Ozone Science and Engineering**. 13 (1): 23-40. 1991.

RODRIGUES, J.E.; ARAÚJO, M.E.; AZEVEDO, F.F.M.; MACHADO, N.T. Phase equilibrium measurements of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil supercritical carbon dioxide. **The journal of Supercritical Fluids**, v.34, p.223-229, 2005.

ROJAS-DURAN, T.R. et al. Study of a room temperature phosphorescence phenomenon to allow the detection of aflatoxigenic strains in culture media. **Int. J. of Food Microbiology**, 115, p.149-158, 2007.

ROSA, M. F. A. P. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de aflatoxina B₁, aflatoxicol M₁ e aflatoxicol por Cromatografia por camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de patê de fígado industrializado**. 1995. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.

ROSSO, L.; ROBINSSON, T.P., 2001. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. **International Journal of Food Microbiology**. 63: 265-273.

RYAN, E. et al. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of Brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. **Int. J. of food Sci. and Nutrition**, 57, p.219-228, 2006.

SABINO, M. **Micotoxinas em Alimentos**. In: OGA, S.(ed) Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu Editora, 461-472, 1996.

SANT'ANNA, N.M.G. **Desenvolvimento e estudo de estabilidade e embalagem de alimentos formulados contendo castanha- do-pará**. Viçosa, 1985. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, L. M. A embalagem plástica e a conservação de produtos cárneos. **Alimentos & Tecnologia**, v.6, n.30, p.86-92, 1990.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. Embalagem a vácuo e com atmosfera modificada para carnes frescas. In: CETEA, Ital (Org.) **Embalagens para produtos cárneos**. Campinas, SP: CETEA, 1991, p. 1-20.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; SOLER, R.M. **Embalagens com atmosfera modificada/controlada**. **Catálogo Brasileiro de Produtos e Serviços**. Campinas: ITAL, jul. 1994, p.32-42.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M. de; CANAVESI, E. Carnes, aves, pescados e derivados. In: **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**, Campinas, SP: CETEA, 2001, p. 151-174.

SCHONBEIN, C. F.; Comptes Rendus Hebd. **Séances Acad. Sci.** v. 10, p. 706, 1840.

SCUSSEL, V. M. Micotoxinas em alimentos. Florianópolis: Editora Insular, 1998.

SCUSSEL, V.M. **Estudo da incidência de aflatoxinas em amendoim (*Arachis hypogae* L.), milho (*Zea mays* L.) e produtos derivados**. Campinas: UNICAMP, 1984, 138p.

SCUSSEL, V.M. **Fungos e micotoxinas associados a grãos armazenados**. In: **Lorini, I. Armazenamem de grãos**, Campinas, IBG. Seção 9, 2002.

SHARMA, R.R.; DEMIRCI, A.; BEUCHAT, L.R.; FETT, W.F. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with ozonated water and heat treatment, **J. Food Protect.** **65** (3) (2002), pp. 447–451.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA, F.A.; MARSAIOLI, A.JR. Atividade de água em amêndoas de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) secas por microondas e convencionalmente. **Rev. Cienc. Exatas e Naturais**, vol.5, n.1, 2003.

SIMÕES, A.V. **Impactos de tecnologias alternativas e do manejo da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) no controle da contaminação por aflatoxinas em sua cadeia**

produtiva. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade Federal do Amazonas. 2004, Manaus.

SILVA, F.A.; MARSAIOLI, A. Jr. Atividade de água em amêndoas de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) secas por microondas e convencionalmente. **Ver. Cienc. Exatas e Naturais**, vol. 5, n. 1, 2003.

SINHA, R.N. **The stored-grain ecosystem**. In: *Stored-grain Ecosystems*. JAYAS, D.; WHITE, N.D.G., MUIR, W.E. (eds.) New York: Marcel Dekker, 1995. p.1-33.

SOUZA, M.L.; MENEZES, H.C.; Processamento de amêndoa e torta de castanha-do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, janeiro/março, 2004.

SOUZA, L.M.; VARGAS, E.A.; DE ANDRADE, I.A. **Contaminação em castanha-do-Brasil por aflatoxinas**. In: XII Encontro Nacional de Micotoxinas, V Congresso Latino-Americano de Micotoxicologia e IV Simpósio em Armazenagem quelitativa de Grãos do Mercosul, 2006, Florianópolis. Livro de resumos, p.130a.

SOUZA, M. L. de. **Processamento de cereais matinais extrusados de castanha-do-brasil com mandioca**. Campinas. 2003. 191 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

SOUZA, M.L. de; MENEZES, H.C.de; Extrusão de misturas de castanha do Brasil com mandioca. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 28(2): 451-462, abr.-jun. 2008.

SOUZA, M.L.; HOLANDA, L.F.F. DE; MAIA, G.A.; GASPAR JUNIOR, J.C. Estudo do processamento e estabilidade de leite de amêndoa da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.). **Ciência Agrônômica**, v.8, n.1, p.137-146, 1987.

SQUIRES, E. J.; VALDES, E. V.; WU, J.; LEESON, S.; **Poultry Sci.** 1991, 70, 180.

St. ANGELO, A.J. Lipid oxidation in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, n.3, p.175-224, 1996.

STEINER, W.E. et al. Aflatoxin and fluorescence in Brazil nuts and Pistachio nuts. **J. of Agric. and Food Chem.** 40, p.2453-2457, 1992.

STONE, H.; SIDEL, J.L.; OLIVER, S.M.; WOOLSEY, A.; SINGLETON, R.C. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technology**, v.28, n.11, p.24-34, 1974.

STONE, H.; SIDEL, J.L. **Sensory evaluation practices**. New York: Academic Press, 2. Ed., 338p. 1993.

TABATA, S. Aflatoxin Contamination in Foods and Foodstuffs in Tokyo: 1986-1990. **J. AOAC International**. v. 76, n.1, p.32-355, 1993.

TARLADGIS, B.G.; WATTS, B.M.; YOUNATHAN, M.T.; DURAM, L.R. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **Journal of American oil chemistry society**, v.37, p.44-48, 1960.

TATAPUDI, P.; FENTON, J. M. **Environmental Oriented Electrochemistry**. Sequeira, C. A. C., ed.; Elsevier: Amsterdam, p. 103, 1994.

TAWFIK, M.S.; HUYGHEBAERT, A. Interaction of packaging materials and vegetable oils: oil stability. **Food Chemistry**, v. 64, p.451-459, 1997.

TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F.L.; STENSEL, H.D. **Wastewater engineering, treatment and reuse**. 4th ed./revised. Nova Iorque: Metcalf & Eddy Inc. McGraw-Hill. 2003. p. 1819.

TEIXEIRA, A.S. **Adequação e apresentação de parâmetros de validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de aflatoxinas em Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) através de cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. 57p, 2008.

THOMSON, C.D.; ONG, L.K.; ROBINSON, M.F. Effects of supplementation with high-selenium wheat bread on selenium glutathione peroxidase and related enzymes in blood components of New Zealand residents. **Am J Clin Nutr** 1985;41:1015-22.

THOMSON, C.D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. **Eur J Clin Nutr**. 2004; 58:391- 402.

THUVANDER, A. et al Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. **Food Addit. and Contaminants**. V.18, n.8, p.696-706.2001.

TORRES, E.A.F.S. Oxidação lipídica em carnes. **Bol. SBCTA**, v.22, n.1, p.53-71, 1988.

TRABULSI, L. R. et. al. **Biologia dos fungos**. In: GOMPERTZ, O. F. et al. Microbiologia médica. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 365-374.

TRASATTI, S.; **Int Hydrogen Energy** 1995, 20, 835.

TUITE, J.; KOH-KNOX, C; STROSHINE, R.; CANTONE, F.A.; BAUMAN, L.F. Effect of physical damage to corn kernels on the development of *Penicillium* species and *Aspergillus glaucus* in storage. **Phytopathology**, v.75, p.1137-1140, 1985.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Design manual: municipal wastewater disinfection**. Cincinnati, OH. EPA-625/1-86/021. 1986.

US Food and Drug Administration, 1997 US Food and Drug Administration (1997). **Substances generally recognized as safe, proposed rule**. Federal Register 62 (74), 18937–18964 (April 19, 1997).

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Ozone Disinfection. Wastewater Technology Fact Sheet**. Office of Water, Washington, DC. EPA/832/F-99/ 063. 1999.

VAN DER TORRE, H.; VAN DOKKUM, W.; SCHAAFSMA, G.; WEDEL, M.; OCKHUIZEN, T. Effect of various levels of selenium in wheat and meat on blood Se status indices and on Se balance in Dutch men. **Br J Nutr** 1991;65:69–80.

VIANNA, P. R. **Estudo da castanha-do-Brasil**. Brasília: Ministério da Agricultura, Comissão de Financiamento da Produção, 1972.

VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia—Manual das Plantas Medicinais**. São Paulo7 Agronômica Ceres; 1992.

VONDERHEIDE, A.; WROBEL, K.; KANNAMKUMARATH, S. Characterization of selenium species in Brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. **J Agric Food Chem** 2002; 50:5722– 8.

WATTS, B. M.; YLIMAKI, G. L.; JEFFERY, L. E. Métodos Sensoriales Básicos: para la evolución de alimentos. Ottawa: **International Development Research Centre**, 1992.

WEBER, E.A. **Armazenagem Agrícola**. Guaíba: Ed. Agropecuária, 2005. 692 p.

WEBER, E. **Armazenamento agrícola**. Porto Alegre: Kepler-Weber Industrial, 1995.400p.

WETZEL, M.M.V.S. **Fungos de armazenamento**. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.) Patologia de sementes. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.260-275.

WHITE , N. D. G., LEESCH, J. G. **Chemical control**. In: SUBRAMANYAM, B., HAGSTRUM, D. W. Integrated Management of Insects in Stored Products, New York: Marcel Decker, 1996, p.287-330.

WILSON, D.M.; HUANG, L.H.; JAY, E. Survival of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* in high – moisture corn stored under modified atmospheres. **Applied Microbiology**, v.30, p.592-595, 1975.

XU, L. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables, **Food Technol.** 33 (10) (1999), pp. 58–61 63.

YAO, C. C. D.; HAAG, W. R.; Rate constants for direct reactions of ozone with several drinking water contaminants. **Wat. Res.**, v. 25, p. 761, 1991.

YOKOYA, F; ANTUNES, A.J. & JORDÃO, B.A. Deterioração de castanha do Pará: II-Armazenamento das castanhas. **Revista Brasileira de Tecnologia**, São Paulo, v.2, n.3, p.117-120, 1971.

ZHOU, H.; SMITH, D.W. Process parameter development for ozonation of kraft pulp mill effluents. **Water Science and Technology**, Londres, v. 35, n. 2-3, p. 251-259, 1997.

ZOLLNER, P; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry. **J. of Chromatography A**, 1136, p. 123-169, 2006.

ZORÓ, RIKBAK TSA E ARARA (2008). **Boas práticas de coleta, armazenamento e comercialização da castanha-do-Brasil**: Capacitação e intercâmbio de experiências entre os povos da Amazônia mato-grossense com manejo de produtos florestais não-madeireiros. Associação do Povo Indígena Zoró – APIZ, Editora Defanti, Cuiabá/MT, 40p.

3. ARTIGO

**EFFECT OF OZONE GAS ON BRAZIL NUT (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)
MYCOFLORA AND AFLATOXIN REDUCTION DURING STORAGE**

**Trabalho submetido para publicação na revista: Journal of Agricultural and Food
Chemistry**

**EFFECT OF OZONE GAS ON BRAZIL NUT (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)
MYCOFLORA AND AFLATOXIN REDUCTION DURING STORAGE**

3.1 Abstract

This work reports an evaluation of the ozone (O₃) gas influence during in-shell Brazil nut storage on fungi load, aflatoxins (AFLs) degradation, lipid oxidation and the sensory attributes of quality. Groups of in-shell Brazil nuts obtained from retail market were submitted to O₃ gas atmosphere at different concentrations (10, 14, 31.5 mg/L) and stored for 180 days. Samples were collected just after the gas exposure and every 30 days during the storage period, for mycological tests and analysed for, AFLs by HPLC-FD, lipid oxidation by 2-thiobarbituric acid - TBA test and sensory evaluation by descriptive quality analysis utilizing 18 trained panelists. The O₃ treatment affected the mycoflora growth, lowering their total count and the moisture content (mc) from 9.43 to 7.32 %. The O₃ treatment applied within 5 hours at concentration of 31 mg/L was able to successfully destroy nuts fungi contamination (initial log cfu/g: 4,83) and the *Aspergillus* species of *A. flavus* and *A. parasiticus* since the day of application. On the other hand, those *A. flavus* and *A. parasiticus* species were able to grow at 14 mg/L O₃ concentration up to and the 30th day of storage. AFLs presented total degradation in all samples despite the O₃ treatments for all concentrations applied. Regarding the toxigenic potential, the species of *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*) and *Penicillium citrinum* were able to produce AFLs and citrinin, respectively, however only in the Control Group. As far as lipid oxidation (TBA test) and sensory evaluation are concerned, no significant changes were obtained that could affect their acceptability after the O₃ treatments and time of storage utilized in the present experiment. In contrary, the Control Group had high MDA and low scores in the sensory evaluation throughout the storage nuts. Fungi reduction just after storage by applying O₃ will certainly reduce the possibility of further fungi proliferation and AFLs formation during long storage period and so nut acceptability.

Keywords: in-shell Brazil nut, ozone, mycoflora, aflatoxin, storage, lipid oxidation, sensory evaluation.

3.2 Introduction

Brazil nuts are the seeds of *Bertholletia excelsa* H.B.K. trees that grow wild in the Amazon rainforest. They can reach up to 60 meters in height, take 12 years to bear fruits and live up to 500 years (1). Harvesting of Brazil nuts, a major non-timber forest product, not only helps to preserve the Amazon rainforest but also creates an economy on which thousands of local people depend up on (2, 3, 4). Brazil nut is widely recognized as the cornerstone species of the Amazonian extractive economy, and is the only internationally traded nut collected almost entirely from natural populations in mature forest (5, 6). AFLs contamination can be a potential problem for Brazil nuts (7). The occurrence of AFLs, produced by aflatoxigenic strains of *Aspergillus* species such as *flavus* in Brazil nuts has been reported in some studies (3, 8, 9, 10,11) and so *A. nomius* (12, 13).

Moulds can growth either on the shell and inside the nuts when shells are cracked or through the opercule. AFLs have been detected on the surface of shelled nuts and/or inside of cracked, or brown spotted in-shell nuts (10, 14). Recently it was found that the main AFLs site is in between shell and the nut peel (15). Several environmental factors are known to influence fungi growth and AFL production, being temperature and relative humidity (RH) the most critical. Studies performed on hazelnuts and pistachios suggested that optimum temperature and RH for AFLs production are 25 to 30 °C and 97 to 99%, respectively (16). In a study carried out by Arrus et al., (2) in Brazil nuts, the authors reported that the optimal conditions for *A. flavus* growth were moisture content (mc) of 8.6 % and water activity (a_w) of 0.91, at RH of 97% and 30 °C. They reported also the limiting mc and a_w of 4.5 and 0.68, and, 5.0 and 0.75 for shelled and in-shell nuts fungi growth at those same temperature and time, respectively. The Codex Alimentarium Commission (CAC) consider mc below the maximum limit accepted for international trade of $13 \pm 2\%$ and the $a_w < 0.70$ safe for toxigenic fungi growth (17).

Brazil nuts have been exported mainly to Canada, United States and the European countries, since 1950. More recently, there have been demands to Eastern countries such as Australia, China, Hong Kong, Japan and Vietnam. However, since 1998 a reduction of Brazil nuts export has been detected, affected especially by the European Union (EU) that regulated nuts total AFLs limit down to 4 µg/kg and for AFB₁ only 2 µg/kg (18). Recently, the EU import zero Brazil nut from Brazil (19). Moreover, since temperature and RH are important factors for

AFLs production, it is of interest to evaluate the effect of these parameters on AFLs production during storage of Brazil nuts (4, 6). Apart from AFLs, lipid oxidation may also reduce its quality.

Physical and chemical methods such as microwave heating or treatments with ozone (O₃) or ammonia have been recommended for fungal destruction AFLs detoxification of contaminated food (20, 21, 22, 23). Ozonation, an oxidation method by O₃, has recently been studied for detoxification of AFLs in foods (24). O₃, or triatomic oxygen, is a powerful disinfectant and oxidizing agent (25). As a disinfectant, O₃ is 1.5 times stronger than chlorine and is effective over a much wider spectrum of microorganisms (21, 26). It reacts across the 8, 9 double bond of the furan ring of AFLs through electrophilic attack, causing the formation of primary ozonides followed by rearrangement into monozonide derivatives such as aldehydes, ketones and organic acids (27). That reaction results in decrease of AFL concentration over time (25). As far as fungi growth and O₃ atmosphere modified application are concerned studies have been developed, in dried figs (37), barley (28), pistachio (29) among other foods. The attractive aspect of O₃ is that it decomposes rapidly (half-life of 20–50 min) to molecular oxygen without leaving a residue (30).

One of the important usages of O₃ in agriculture is the post harvest treatment of crops. It can be applied to food as a gas or as a dissolved form in water. The main purposes of O₃ application at the postharvest stage are as follows: inactivation of bacterial growth (21, 31), prevention of fungal decay (32, 33) destruction of pesticides and chemical residues (34, 35) and control of storage pests (30, 36). Oztekin et al. (37) reported reduction of microorganism counts on dried figs at a minimum of three hours treatment at 5 mg/L of O₃, decreasing the total yeast/mould counts of 72%. In postharvest of strawberry, Pérez, et al. (33) observed fungal decay after 4 days of storage under ozonation. Lanita and da Silva (38) utilized O₃ for controlling fungi in Parmesan cheese maturation. After 60 days of ozonation it reduced the total fungi count from 10 to 3.7 cfu/plate (15 min exposition). In cereal product (barley), treated with O₃ for 5 minutes of ozonation (0.16mg/L of O₃) observed inactivation of 96% of fungi spores (28). Yesilcimen and Murat (29) studied pistachio exposure to O₃ (5.0, 7.0 and 9.0 mg/L of O₃) for 140 and 420 minutes and found that AFB₁ and total AFLs were reduced by 23 and 24 % at 9 mg/L for 420 min, respectively. O₃ (29 mg/L) also was effective to reduce or eliminate AFL from cottonseed and peanut meal (23, 39). Five mg/L of O₃ inhibited the surface growth, sporulation and mycotoxin production of cultures of *Aspergillus flavus* Link and *Fusarium*

moniliforme Sheldon (40). Several research studies have been undertaken to evaluate the effects of O₃ gas in reducing AFLs levels in contaminated agricultural products. Maeba et al. (41) have confirmed the destruction and detoxification of AFB₁ and AFG₁ with O₃. AFB₁ and AFG₁ were sensitive to O₃ and was degraded with 1.1 mg/L of O₃ in 5 min in model experiments. In the study with red pepper, the reductions of content of AFB₁ in flaked and chopped red peppers were 80 and 93% after exposures to 33 and 66 mg/L O₃ for 60 min, respectively (42). Olmez, et al. (43), used O₃ to preserve the quality of fresh-cut green leaf lettuce after harvest and determined an optimum ozonization condition of 2 mg/L. Frazier and Westhoff (44) reported that the storage period can be doubled when strawberry, raspberry, currant and apples are held in an environment including 2–3 mg/L of O₃

Considering that in-shell Brazil nuts for export (a) have been rejected by the EU due to AFL contamination, (b) fungi deterioration is found mostly on the nut shell cracked parts and in the microclimate between the shell and the peel (c) fungi can growth during shipping under favorable UR and T°C conditions, (d) O₃ has been utilized in different food commodities and sensory efficiency on fungi destruction and AFLs degradation. A work was carried out to study the influence of O₃ controlled atmosphere during in-shell Brazil nut storage and its best concentration on fungi load reduction, possible AFLs degradation/reduction as well as the consumer acceptance of the O₃ treated and stored nuts by checking lipid oxidation and sensory evaluation.

3.3 Materials and Methods

Material

Sample. dry (processed) in-shell Brazil nuts (14 Kg) with, initial AFLs (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) of 11.58 µg/kg obtained in the retail market. Total fungi count: 4.83 log cfu/g and 9.43% and mc.

Storage. (a) seven vertical silos, build with vinyl polychloride (PVC) tubes with the following dimensions 80 x 15 x 0.2 cm for height, diameter and width; containing an upper lid and two apertures (top and lower part of the silos) for sample collection and O₃ application, respectively; (b) ozone generator (Megazon). (c) thermometer and hygrometer (CE) (Figure 1).

Iodinometrical Analysis. potassium iodine, sulphuric acid and sodium thiosulfate (Vetec). Starch indicator (Synth).

Mycology Tests. (a) culture media: malt extract agar – MEA (Himedia); *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar – AFPA (Fluka) and peptone agar (Himedia); (b) tween 80 (CRQ); (c) equipment and apparatus: automatic pipette 100 and 1000 μ l tips (Digipet); autoclave (Phoenix); oven (Fanen); microscope (PZO); incubator set at 20-25°C (Dist); analytical scale (Mettler); semi-analytical (CAB); microscope stereoscope (Carlzeiss Jena); colonies counter (Phoenix).

mc. microbiological oven (Fanen); analytical scale (Mettler); semi-analytical (CAB) an industrial Brazil nut cracker provided by CIEX (Manaus, AM).

AFL Analysis. (a) AFL standards: B₁, B₂, G₁ and G₂ (Sigma); (b) chemicals: methanol, acetonitrile, benzene, toluene (Carlo Erba). Ultrapure water (MilliQ system, Millipore); (c) liquid chromatograph: injector Rheodine (loop 20 μ l), with isocratic pump 305 (Gilson) and fluorescence detector model fluorimeter 121 (Gilson). Column C18 length 15cm, diameter 4.6mm, particle size 5 μ m (Phenomenex).

Lipid Peroxidation. 2-thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic (TCA), Butylated hydroxytoluene (BHT), ethanol, analytical scale (Mettler), homogenizer (IKA T 25 – Ultra Turrax), water bath (Quimis – Dubnoff Q226D), spectrophotometer (Hitachi).

Sensory Evaluation. in-shell and shelled Brazil nuts (ca. 8g each) from each storage time and O₃ treatments Groups (C, I, II and III), plastic cups (50 x 45 mm, id and height, respectively), spring water. A group of 18 panelists.

Methods

Sample Preparation for O₃ Application. in-shell Brazil nuts previously analysed for fungi load, mc and AFLs contamination were aseptically weighted into portions of 2 kg to be added into each silo for the O₃ treatment.

Preparation of the Storage Silos. they were filled with the nuts (2 kg) and had the upper part with the lid tightly closed. Silos were divided into 4 Groups for O₃ application: Group C (Control = no O₃ application), Group I (O₃ conc. = 10mg/L), Group II (O₃ conc. = 14 mg/L) and Group III (O₃ conc. = 31.5 mg/L) (Figure 1 and 2). Each treatment was carried out in duplicate (n =2) except for Group C. Note: the silos (total = 7) were previously cleaned with sulphite hypochloride, rinsed with distilled water to remove the excess of humidity and dried.

Ozone Application. after closing the upper part of the silos, O₃ gas was applied through the lower lateral aperture by means of a compressed air pump to get the following concentration in each silo: 10, 14 e 31.5 mg/L, with 1, 3 and 5 hours of exposure time, (n=2) for silo 1, 2 and 3, respectively. Those concentration were checked by iodinemetrical analysis. A portion of Brazil nut was taken for mycoflora and mc analysis just after treatment.

Iodinemetrical Method. O₃ concentration rechecked in each silo was measured by titration. The gas was bubbled into a potassium iodide solution (50 mL), acidified with 2.5 ml of sulfuric acid 1N (pH below 2.0). The solution was then titrated with sodium thiosulfate 0.005 N using a starch solution as the indicator (45).

Storage. silos with the O₃ atmosphere and Control (just air) in-shell Brazil nut were placed in a room with the following dimensions of 3.25 x 6.4 x 3m (height, length, width, respectively) that had the temperature and RH monitored for 6 month during May to October (180 days). Data on rain precipitation out door during that period was provide by the Santa Catarina State Company of Agriculture Research and Extension (EPAGRI/SC) located in Florianopolis, SC, Brazil.

Sample Collection for Analysis. Individual 200 g portions of Brazil nuts were aseptically collected from each silo for the mycological analysis as well as for, mc, AFLs, lipid oxidation and sensory evaluation, at Day one and every 30 days. That was carried out from the top silo aperture. Nuts, after being shelled, were then ground and weighed for each analysis. Silos were rechecked O₃ concentration for the each time of sample collection. Samples collected for analysis were made in duplicate. See figure 2 for the flowchart of the whole O₃ experiment.

Mycology Tests. for total fungi count the method used was of Pit and Hocking (46) by applying serial dilutions (10^{-1} to 10^{-4}) on to the surface of MEA media. For fungi toxigenicity (AFLs) the method was of Machida and Saito (47). The identification of fungi in genus and species was carried out according to the keys of Samsom et al., (48). The strains aflatoxigenicity was checked utilizing the AFPA by Pitt et al. (49).

mc. by gravimetry (50).

RH and Temperature. they were monitored daily utilizing hygrometer and thermometer, respectively. In parallel data on relative humidity and temperature was obtained from EPAGRI/SC from May to October in the year 2008.

AFLs Analysis. by high performance liquid chromatography with fluorescence-detection HPLC/FD at 330 (ex.) and 460 (em.) nm, LOD 0.25; 0.08; 0.25 and 0.08 µg/kg e LOQ 0.50;

0.17; 0.50 and 0.17 $\mu\text{g}/\text{kg}$, for AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ respectively (51). mobile fase water:MeOH:ACN (60:15:15), ex. 330, em 460.

Lipid Peroxidation. TBA method (52). It was used 2 g of the edible Brazil nuts part, homogenized together with aqueous solution of TCA. After filtration, extract was mixed with TBA solution (20 mmol/L) in stoppered test tubes, that were then immersed in water bath. After cooling, MDA was measured at 532 nm. The results were expressed as mg of MDA equivalents per kg of nut sample using a molar extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ for MDA. The method LOD was 0.37 ppm.

Sensory Evaluation. descriptive quantitative analysis (DQA) by Stone and Sidel (53), it was conducted using a team of 18 trained (specifically for Brazil nut taste) panelists during four sessions (n=4). Nuts were peeled and served at room temperature in plastic cups that received a three-digits random code number and randomized order of presentation. At each session the panelists were encouraged to use associative and cognitive terms to describe impressions perceived, for each reference nut sample. Was used a hedonic scale of 5 points (1 for dislike very much, 2 for dislike, 3 for neither like nor dislike, 4 for like and 5 for like very much). The sensory attributes of Brazil nuts which was analysed shell appearance, nut appearance, strange odor, roasted flavor, rancidity and firmness. Note: The panelists were trained on the use of hedonic scale and what they need to consider during the evaluation.

Statistical Analysis: the results were expressed as the mean values and standard errors. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) and included the Turkey's test to evaluate significant differences among the means ($p < 0,05$).

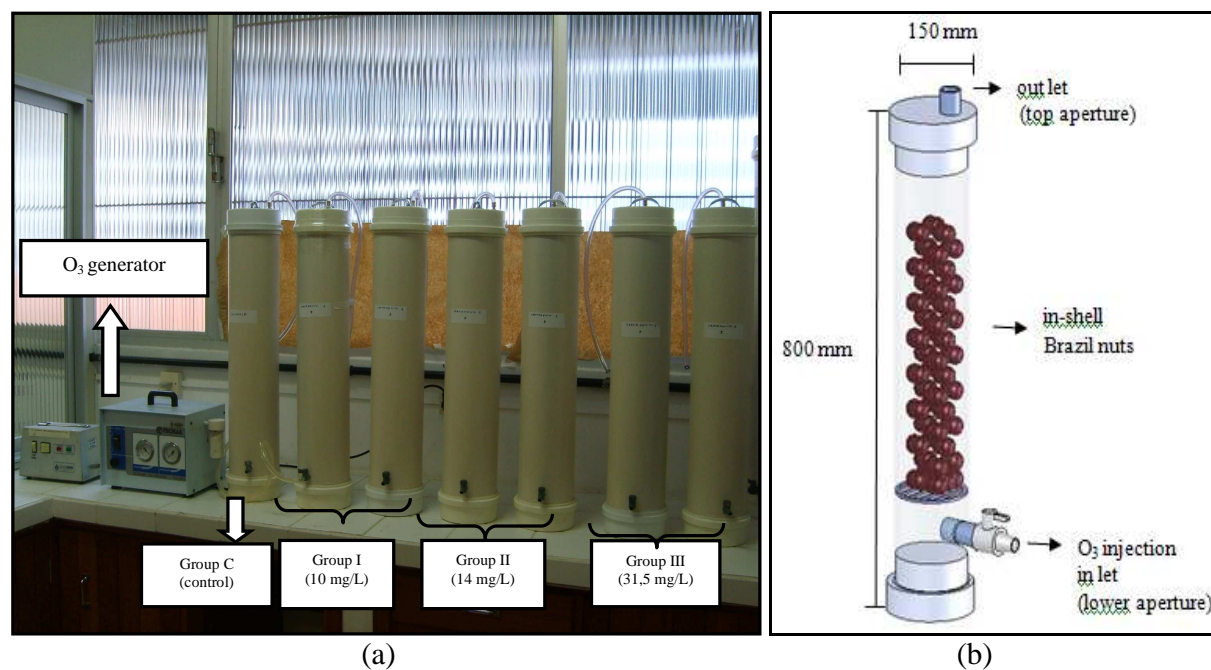


Figure 1 - Brazil nut ozone treatment and storage study system: (a) PVC silos (n=7) and O₃ generator; (b) silo details and dimensions.

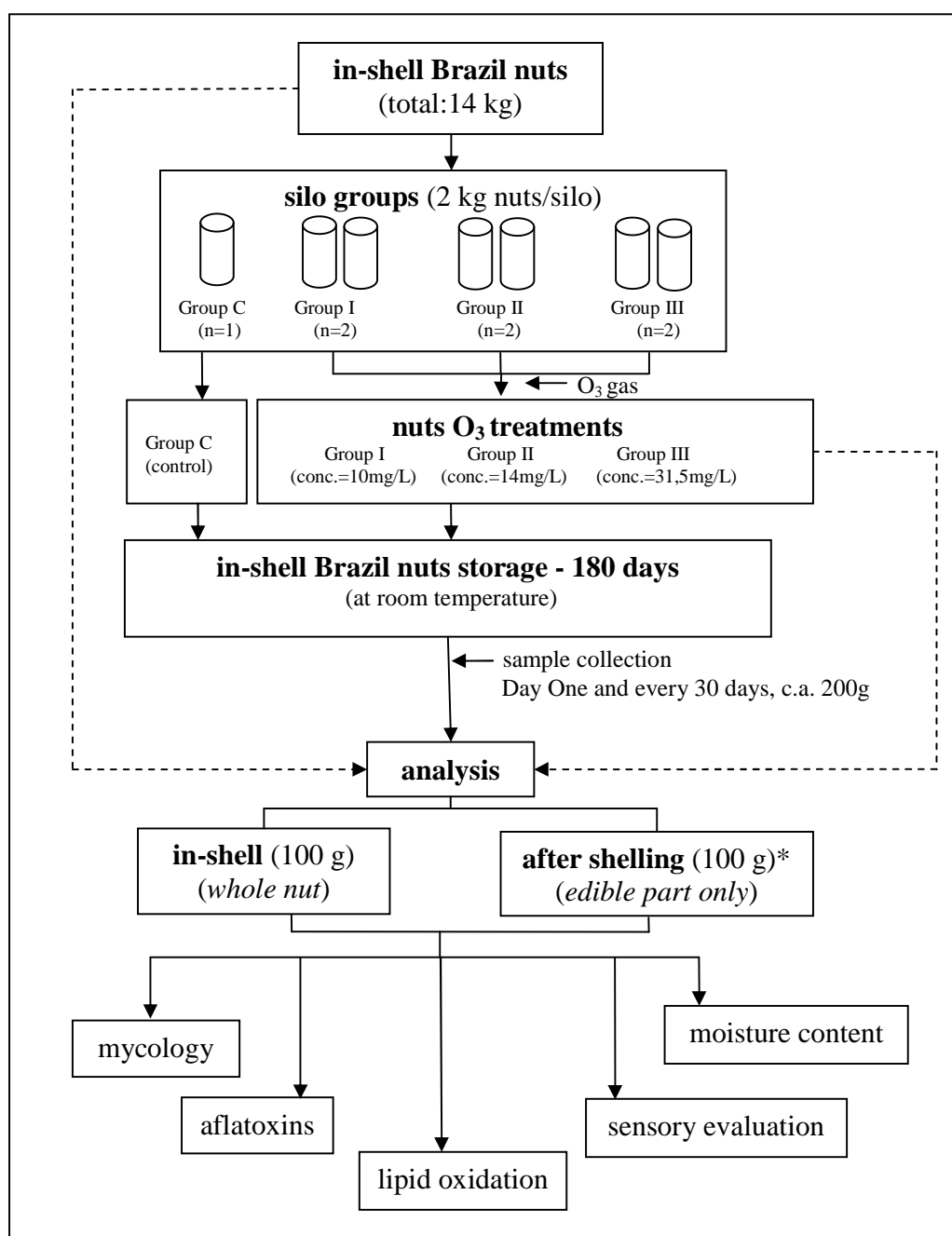


Figure 2 - Flowchart of the in-shell Brazil nuts storage under O_3 atmosphere study (*after shelling the weight reduced to c.a. 80 g of edible part).

3.4 Results and Discussion

From the data obtained on the stored Brazil nuts O₃ treated mycoflora, AFLs, lipids, sensory attributes and environmental conditions, it was possible to observe a direct correlation regarding the gas treatment effect on the fungi load and AFLs degradation. On the other hand, that gas atmosphere effect was not able to deeply influence the lipid oxidation and the sensory attributes of nut quality under the experiment conditions despite of the O₃ concentration used.

Effect of the O₃ Concentrations and Storage Time on the In-shell Brazil Nut Mycoflora and Moisture Content During Storage

The total fungi load, aflatoxigenic species of *Aspergillus*, AFLs and mc variation during the storage of in-shell Brazil nuts under O₃ atmosphere at different concentrations are shown in Table 1. There was a clear reduction on the total fungi count, AFLs and mc when compared to the Control Group, however that was dependent upon the O₃ concentration used and time of storage.

Total Fungi Load. As expected, the in-shell Brazil nuts ozonation showed to be effective on the fungi/spores destruction during the period of storage. A reduction of total fungi count was registered since the first day after O₃ application in all treated nut Groups. However, the complete destruction of fungi (no growth: ng) was reached at different stages of storage depending on the gas concentration applied. Total fungi destruction started at the first day when the highest O₃ concentration was applied (31.5 mg/L) and after 30 days of storage, when O₃ was at 14.0 and 10 mg/L. Thus no fungi growth was registered in all O₃ treated nut Groups after a month of storage up to the end of the six month. From the original (untreated nuts) total fungi load of 4.83 log cfu (Control), it went at Day One of the O₃ treated nuts down to 3.5 and 3.3 log cfu/g for Groups I (O₃: 10.0 mg/L) and II (O₃: 14.0 mg/L), respectively, and no fungi growth was detected in the nuts treated with the highest O₃ concentration (Group III – O₃: 31.5 mg/L). Different of, the nuts of Control Group that kept the fungi load somewhat stable with a slight increase during the whole period of storage i.e., from Day Zero/One: 4.83 to Day 180: 4.91 log cfu/g. Similar happened to those nuts when analyzed after being shelled however is a lower level (Day One: 2.54 to Day180: 2.69 log cfu/g – Control Group) which was expected as the edible part was protected by the shell.

Some work have reported the effect of ozonation in food and nuts and they have similar findings for fungi load reduction as obtained in the present experiments, however applying lower O₃ concentrations. We utilized higher O₃ concentrations due to the fact that our aim was more than just fungi disinfection. We wanted AFLs degradation too (to be discussed in the next Session) and for that purpose the O₃ concentration should be higher. Zhao and Cranston (54) studied the effect of O₃ on black pepper, at a lower gas concentration (6.7mg/L) than in our study. The authors reported fungi load reduction from 7 to 4 log cfu/g. In another study carried out in dried figs (37), O₃ reduced the total fungi load from initial 1.46 to 1.00, 0.57 and 0.40 log cfu/g using O₃ at 1, 5 to 10 mg/L, respectively. A work carried out in Brazil nut, however treating the nuts with aqueous O₃ solutions (0, 1, 10 and 20mg/L) authors showed that they were effective to fungi control reaching an inactivation rate of 100% for *A. parasiticus* and 96% for *A. flavus* (55).

Moisture Content, RH, T°C and Rain Precipitation: During the nuts storage of the 3 silos Groups with O₃, nuts reduced their mc from initial 9.4% i.e., prior to O₃ treatments, to ca. 7% corresponding to 22% of total mc loss at the end the of storage period. The mc reduction per Group during the nuts storage was: from 9.4% (untreated- Group Control) – Day Zero to 7.4 (21.8%), 7.4 (22.1%) and 7.32 (22.3%) for O₃ treated nuts of Groups I, II and III; respectively at the end of storage (Table 1). That may have occurred due to the O₃ atmosphere concentration adjustment each 30 days at sample collection or due to the environment low RH (min 75.8; max 85.3%). The loss of moisture can lead to an unfavorable environment for fungi growth. According to Pacheco and Scussel, (2007b), mc can still be considered safe up to 8%, fungi growth wise. That reduction in mc also occurred in peanut treated with O₃, down to 12% (Dollear et al., 1968). The rain precipitation, as well as other environmental conditions such as temperature and RH data (Figure 3) that are considered factors to influence fungal growth and AFL formation were monitored in and out doors during the storage period. *Rain precipitation:* the experiment started in May, and up to June rain precipitation was of 80 mm (average), it went down to 10 mm in July and then increased again, reaching 300 mm in October. *RH:* throughout the storage period was some what low between 75.8 to 85.5%. *Temperature:* the temperature average was from 16.6 to 20.6°C which was not optimal for fungi proliferation (seasons throughout the experiment in Southern Brazil: autumn, winter and spring - dry seasons). That is

one of the reasons for the Control Group fungi contamination to remain similar during the whole experiment.

Aflatoxigenic Species of Aspergillus. Regarding the isolation of aflatoxigenic species of *Aspergillus* (*A. flavus* and *A. Parasiticus*) in the Brazil nuts just after the O₃ treatments (Group I, II, III), only the the highest O₃ concentration treated nuts (Group III - 31,5mg/L) did not allow them to growth since Day one after the gas application. The same occurred to the Groups of lower O₃ concentrations, however after 30 days of storage. On the other hand, the Control Group had those species being detected on the nuts throughout the whole storage period. Similar happened when Mason et al. (40) applied O₃ (5 mg/L) in cultures of *A. flavus* Link and *Fusarium moniliforme* Sheldon. It inhibited the growth, sporulation and mycotoxin production. Kells et al. (30) studied the efficacy of O₃ as a fumigant to desinfest stored maize (50 mg/L), apart from insects, it reduced by 63% the contamination level of *A. parasiticus* on the kernels. Important to emphasize that the species *A. nomius* was not detected in the present experiments either due to the fact that after nut dehydration fungi were destroyed by the heating temperature or because the AFPA media does not give a clear response ie., not enhancing the characteristic of that *Aspergillus* species.

Other Fungi: Apart from the *A. flavus*, and *A. parasiticus* that were isolated on AFPA media, other fungi genera and species were also isolated utilizing MEA media. The more often isolated ones from the untreated nuts (Control Group) during the storage were *Acremonium sp*; *A. ochraceus*; *Cladosporium sp.*; *P. corylophium* and *Rhizopus sp.* followed by *A niger*; *A. parasiticus*; *A. versicolor* and *P. crustosum* (Table 2). Regarding the toxigenic potential of those fungi isolated, *Aspergillus* (*A. flavus*; *A. parasiticus*) and *Penicillium citrinum* were able to produce AFLs and citrinin (CTR), respectively, only in the Control Group. These fungi were found from the beginning until the end of storage Table 1. They did not have an accentuated growth though, due to the mild (RH 80.5%; 18.5°C) environmental conditions of the storage and inside the silo being tightly closed apart from the lower nut mc. Important to emphasize that after O₃ treatment nuts from Groups I and II at Day One still presented the following fungi strains showing to be more resistant to that gas: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *P. penicilioides*, *Byssochlamys*, *Cladosporium P. corylophium*, *P crusdtosum*, *P. naugioviense*, *P variabile* and *Rhizopus sp.*, *P viridicatum*. Despite of the fact that Brazil nuts have a hard outer shell on (protects the edible part), since their collection when they drop from the trees (50-60m high),

transport, storage and nut handling during commercialization; cracks can happen becoming an entrance for moisture and fungi spores. Thus, allowing fungal proliferation and toxin formation, which need to be taken into account and try to use methods for control, such as the use of O₃. Previous studies have shown that as long as mc is kept below 10–11%, Brazil nuts can be stored safely (10).

Table 1 - Total fungi count, *Aspergillus* aflatoxigenic species, moisture content and evaluation AFLs levels in-shell and after shelling Brazil nut stored under ozone treatment.

storage		Brazil nut											
days	O ₃ treatment	fungi					mc/loss (%)		AFLs (µg/kg) ^a - (in-shell/after shelling)				
		total count (log cfu/g)		<i>Aspergillus</i> aflatoxigenic species			in-shell	after shelling	ΣAFLs	AFB ₁	AFG ₁	AFB ₂	AFG ₂
	group	conc. (mg/L)	in-shell	after shelling	in-shell	after shelling							
1	C	0 ^a	4.83	2.54	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	ng	9.43 (NA)	5.14 (NA)	11.58/6.61	3.48/1.16	3.57/1.89	2.21/2.02	2.32/1.74
	I	10	3.5	ng	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	ng	7.72 (6.61)	3.97 (6.25)	3.01/ND	3.01	ND	ND	ND
	II	14	3.3	ng	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	ng	7.71 (7.58)	3.96 (6.89)	ND	ND	ND	ND	ND
	III	31.5	ng	ng	ng	ng	7.68 (8.56)	3.95 (7.52)	ND	ND	ND	ND	ND
30	C	0	4.84	2.57	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	ng	9.57 (NA)	5.28 (NA)	12.06/8.01	3.69/1.37	3.78/2.73	2.23/2.05	2.36/1.86
	I	10	ng	ng	ng	ng	7.67 (10.22)	3.95 (8.04)	ND	ND	ND	ND	ND
	II	14	ng	ng	ng	ng	7.66 (10.60)	3.94 (8.67)	ND	ND	ND	ND	ND
	III	31.5	ng	ng	ng	ng	7.64 (11.74)	3.93 (9.29)	ND	ND	ND	ND	ND
60	C	0	4.86	2.60	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	ng	9.63 (NA)	5.32 (NA)	12.24/7.95	3.83/1.16	3.82/2.83	2.22/2.08	2.37/1.88
	I	10	ng	ng	ng	ng	7.63 (11.65)	3.93 (9.03)	ND	ND	ND	ND	ND
	II	14	ng	ng	ng	ng	7.61 (12.59)	3.90 (9.65)	ND	ND	ND	ND	ND
	III	31.5	ng	ng	ng	ng	7.58 (13.34)	3.88 (10.28)	ND	ND	ND	ND	ND
90	C	0	4.88	2.62	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	ng	9.84 (NA)	5.46 (NA)	12.34/8.03	3.86/1.14	3.86/2.86	2.25/2.10	2.37/1.93
	I	10	ng	ng	ng	ng	7.56 (14.65)	3.87 (11.38)	ND	ND	ND	ND	ND
	II	14	ng	ng	ng	ng	7.54 (15.75)	3.87 (12.29)	ND	ND	ND	ND	ND
	III	31.5	ng	ng	ng	ng	7.51 (16.11)	3.60 (12.50)	ND	ND	ND	ND	ND
120	C	0	4.89	2.65	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	ng	9.89 (NA)	5.51 (NA)	12.49/8.08	3.94/1.14	3.88/2.88	2.27/2.11	2.40/1.95
	I	10	ng	ng	ng	ng	7.47 (16.15)	3.85 (12.23)	ND	ND	ND	ND	ND
	II	14	ng	ng	ng	ng	7.43 (17.78)	3.84 (13.14)	ND	ND	ND	ND	ND
	III	31.5	ng	ng	ng	ng	7.41 (17.96)	3.82 (13.34)	ND	ND	ND	ND	ND
180	C	0	4.91	2.69	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	ng	9.93 (NA)	5.63 (NA)	12.55/8.17	3.95/1.13	3.90/2.91	2.28/2.17	2.42/1.96
	I	10	ng	ng	ng	ng	7.37 (18.82)	3.80 (12.99)	ND	ND	ND	ND	ND
	II	14	ng	ng	ng	ng	7.35 (19.89)	3.78 (13.79)	ND	ND	ND	ND	ND
	III	31.5	ng	ng	ng	ng	7.32 (19.89)	3.76 (14.19)	ND	ND	ND	ND	ND

^a nuts were evaluated for fungi whole (in-shell + edible part) and after shelling (only edible part); nuts Groups: ^b C = control (no O₃ treatment); I (O₃ conc. = 10mg/L), II (O₃ conc. = 14 mg/L) and III (O₃ conc. = 31.5 mg/L); NT = not treatment ; NA = no applicable; ng = no growth; mc = moisture content; total fungi load initial = 6.9x10⁴; initial mc= 9.43%/ ND = not detected; ^c = concentration AFLs µg/Kg in duplicate; LOD 0.25; 0.08; 0.25 and 0.08 µg/kg e LOQ 0.50; 0.17; 0.50 and 0.17 µg/kg, to AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ respectively; ^d AFB₁+AFG₁+AFB₂+AFG₂.

Table 2 - Fungi development on in-shell Brazil nuts treated at different ozone concentrations and time of exposure during storage

fungi	storage time of in-shell Brazil nut O ₃ treated																											
	groups	day 1				day 30				day 60				day 90				day 120				day 180						
		Ctl	I	II	III	Ctl	I	II	III	Ctl	I	II	III	Ctl	I	II	III	Ctl	I	II	III	Ctl	I	II	III			
<i>Acremonium sp</i>	g	g	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>Aspergillus. candidus</i> Link	g	g	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>A. flavus</i>	g	g	g	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>A. niger</i>	g	g	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>A. ochraceus</i> Wilhem	g	g	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>A. parasiticus</i>	g	g	g	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>A. penicillioides</i> Speg	g	g	g	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>A. tamari</i>	g	g	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>A. versicolor</i>	g	g	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>A. ustus</i> Thom & Church	g	g	g	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>A. wentii</i>	g	g	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>Byssochlamys fulva</i>	g	g	g	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>B. nivea</i> Westling	g	g	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>Cladosporium sp.</i>	g	g	g	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>Mucor sp</i>	g	g	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	g	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>Penicillium. citrinum</i>	g	g	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>P. corylophilum</i>	g	g	g	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>P. crustosum</i> Thom	g	g	g	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>P. nalgioviense</i> Laxa	g	g	g	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>P. variabile</i> Sopp	g	g	g	ng	g	ng	ng	ng	g	g	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>Rhizopus sp</i>	g	g	g	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>P. viriticutum</i>	g	g	g	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng
<i>Syncephalastrum recemosum</i> Cohn	g	g	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng	g	ng	ng	ng

nuts Groups: Ctl = control (no O₃ application); Group I (O₃ conc. = 10mg/L), Group II (O₃ conc. = 14 mg/L) and Group III (O₃ conc. = 31.5 mg/L);
g = growth; ng = no growth

Effect of the O₃ Concentrations and Storage Time on the In-shell Brazil Nut Natural AFL Contamination

In contrary of the nuts Control Group, a reduction on the AFL levels was detected throughout the whole storage period of the in-shell Brazil nuts O₃ treated (Table 1). Just after the O₃ treatments, either at gas concentrations of 10, 14 or 31.5 mg/L, the Brazil nuts did not present contamination by AFLs – up to the method LOQ (0.50; 0.17; 0.50 and 0.17 µg/kg, for AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂, respectively). Although the three concentrations applied were able to degrade the toxins, some AFLs were still detected i.e., 3.01 µg/kg (74% reduction) at the lower O₃ concentration (10 mg/L) the toxins was able to be totally degraded after 30 days. As far as the storage period and the AFL degradation are concerned, all the groups did not present any AFLs contamination after one month of storage throughout the whole period. As expected, in the Control Group the nuts AFL level remained or slightly increased from the beginning to the end of storage (11.58 to 12.55 µg/kg, respectively). That could be explain by the controlled experiment environment and storage conditions applied. The fact that other AFLs were detected, i.e., AFB₂ and AFG₂ in the Control Group, it is probably because the nuts were obtained in the retail market of Southern Brazil and not in the Amazon region, thus exposed to different fungi spores through manipulation and or different environments, tropical to temperate climate, respectively. Although studies on O₃ effect have been published on fungi in dried fruits (figs, red and black peppers), cereal (rice, corn) and nuts (pistachios, peanuts), only a few are on AFLs degradation (23, 29, 39,42). A reduction on the AFB₁ content was observed by Inan et al. (42) on red pepper ozonated at three concentrations (16, 33, 66 mg/L) and exposure times (7.5, 15, 30, 60 min). They found toxin reduction reduction of 80 and 93% after exposure to 33 and 66 mg/L O₃ for 60 min, respectively. For pistachios exposed to gaseous atmosphere at 5.0, 7.0 and 9.0 mg/L concentrations, AFB₁ and total AFLs reduced (95%) at the highest concentration (9.0mg/L) (29). Cottonseed and peanut meal when exposure to O₃, AFB₁ and AFG₁ were destroyed. Authors reported that O₃ at 25 mg/L reduced AFLs in both meal. Cottonseed meal had 91% of the total AFLs reduced (214 to 20 ppb) and peanut meal, 78% of AFL destroyed in 1 h, (82 to 18 ppb). In both studies, AFB₁ was totally inactivated (22). Prudente and King (39) determined the efficacy and safety of ozonation degrading AFL in corn. O₃ reduced AFL levels by 92% and no reversion to the parent compound was observed. In the present study with in-shell Brazil nuts, the AFL reduction at Day One for 10 mg/L O₃ concentration was 74% and

100% reduction occurred only after 30 days throughout the rest of period of storage. For the other O₃ concentrations used, a total AFLs degradation occurred.

Environmental Conditions During Stored of In-shell Brazil Nut O₃ Treated

The environmental conditions of temperature and relative humidity (RH) during the period (May to October) of the in-shell Brazil nut storage in Southern Brazil were rather mild with average temperature of 20°C (min 16.6 and max 20.6°C) and RH of 80% (min 75.8 and max 85.3%). Those conditions in the present experiment, together with other factors related (silos tightly closed, low mc) reduced the possibility of fungi growth and AFLs formation, as well as rancidity development, when compared to optimal conditions of 30°C, RH 80-85% (6) and mc > 8% (4). In this study it was observed that the Control Group did not show high fungi growth during the six months of storage. That can be explained by the environmental conditions present throughout the whole period, which were not adequate enough for fungi growth. Thus remaining a constant total number of fungi, during storage, from 4.83 to 4.91 log cfu/g at the end of storage. The environmental conditions are very important, since the collection of Brazil nuts in the forest until reaching the stores for sale to consumers. In a work carried out by Pacheco and Scussel (11) the authors reported that in the Brazil nut collected in the Amazon forest from April to May, had much higher rain precipitation index rather averages of 496.2 and 440.3 mm, in 2006 and 2007, respectively. The RH outdoors of the factory, the authors reported to vary from 80 to 96% for April and 80 to 93% for May in 2006, with average of 85.6% for both months. In contrary, the storage conditions, in this study (May to October, 2008), for rain precipitation average was 126 mm (min 10mm and max 300mm). The RH indoors of storage room varied from 75.8 to 85.3% (average 80%) for the period. The room temperature ranged from 18.8 to 20.6°C (average 18.5°C). As expected the indoor and outdoor environmental conditions were rather similar to the outdoors in the period of study for RH and temperature.

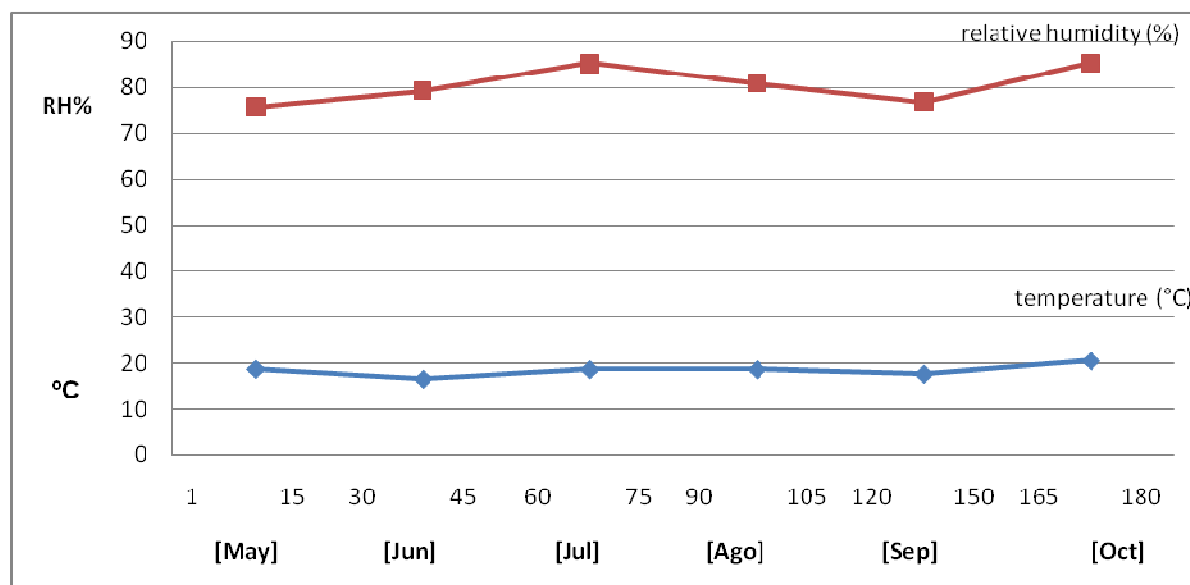


Figure 3 - Relative humidity and temperature (averages/month) during the storage of in-shell Brazil nut O_3 treated experiments (May to October -2008) in the site of study.

Effect of the O_3 Concentration and Time of Storage on the In-Shell Brazil Nuts Lipid Stability and Quality of the Sensory Attributes

Rancidity is one of the most depreciative alterations that can occur in food containing lipids regarding consumer acceptance. Methodology for that oxidation detection / quantification varies and none can define that group of reactions solely. Therefore is necessary to use a combination of methods and the sensory evaluation is one of the best method to determine lipid alteration. For that reason, we applied the TBA together with the sensory evaluation for a better approach to check nut acceptability regarding lipid degradation under the storage experiment conditions.

Lipid Stability: Table 3 shows the results of TBA tests on the nuts extracts from all Groups and times of storage. The levels of MDA, formed by the TBA reactants in the in-shell Brazil nut O_3 treated did not increase significantly (Day one: 7.25; day 180 7.27 mg/kg) when compared to the Control Group. The levels detected in the last month of storage were 7.27, 7.21, 7.21 and 7.80 mg/Kg for Groups I, II, III and Control, respectively. These results can be attributed to low

oxidation occurring on the storage silos. That probably due to lower temperature (average 19.6; min 17.9°C and max 21.9°C), lack of light and the O₃ gas influence on lipids. These results are corroborated by experiments reported in vegetable and nuts. The same effect occurred in aloe powders when submitted to O₃ treatment (18 mg/L for 8 h), where the TBA test did not detect significant changes in the lipid oxidation (56). Also Inan et al. (42) when working with red pepper and Yesilcimen and Murat, (29) with pistachio. The authors reported that no significant changes observed after those foods were O₃ treated, but the Control (not O₃) with lipid oxidation being detected during storage period. Our experiments data achieved with TBA test for in-shell Brazil nuts are better understood if together with sensory evaluation which was carried out next.

Table 3 - Evaluation of lipid oxidation by the acid 2-thiobarbituric method of in-shell Brazil nuts stored under different concentrations of ozone

storage (day)	MDA ^a level ^b on the in-shell Brazil nut O ₃ treated (mg/kg)				
	groups	control	I ^c (O ₃ : 10 mg/L)	II ^c (O ₃ : 14 mg/L)	III ^c (O ₃ : 31.5 mg/L)
1		7.16	7.25	7.17	7.15
30		7.25	7.24	7.18	7.17
60		7.38	7.24	7.18	7.18
90		7.59	7.25	7.19	7.19
120		7.64	7.26	7.20	7.20
180		7.80	7.27	7.21	7.21

^a average (n=3); ^b O₃ treatment; ^c MDA increase from Day one to Day 180.

Nuts Quality Sensory Attributes: No significant changes (p<0.05) were found between shell and nut appearances, strange odor, roasted flavor, rancidity and firmness scores of the ozonated Brazil nuts samples stored (Table 4). It was observed on the sensory evaluation that all notes of O₃ treated nut Groups, despite of the O₃ concentrations, did not differ greatly. They were between 3 (indifferent) and 4 (like), different of the Control Group that received score 2 for most of the attributes except for nut firmness (score 3). The treatment with O₃ and the period of storage of the in-shell Brazil nuts, did not affect their sensory quality for all Groups. Also the shell received score 4 except for roasted flavor (score 3). The data obtained are corroborated by studies on pistachio nuts. When Yesilcimen and Murat (29) studied pistachio they observed no

significant changes between sweetness, rancidity, flavor, appearance and overall palatability of ozonated and non-ozonated nuts. Apart from that, O₃ was also found to be better effective for degrading AFLs in whole pistachio than ground ones. Inan et al., 2006 observed that the colour values in red pepper did not present any significant changes after O₃ treatment and the appearance was still quite acceptable. According to the present work carried out with O₃ in the Brazil nuts and the sensory evaluation scores plus TBA test, one can conclude that the gas treatment did not interfere greatly on the nuts lipid oxidation and their sensory attributes thus still palatable apart from being safe.

Table 4 - Effect of different ozone concentrations and time of storage on the sensory attributes of in-shell Brazil nuts ^a

quality attributes	scores for Brazil nut O ₃ treated per days of storage																											
	day 1				day 30				day 60				day 90				day 120				day 180							
	groups:	Ctl	I	II	III	Ctl	I	II	III	Ctl	I	II	III	Ctl	I	II	III	Ctl	I	II	III	Ctl	I	II	III			
<i>edible part</i>																												
nut appearance	2	3	4	4	2	4	4	4	2	3	4	4	2	4	4	4	2	4	4	4	2	4	4	4	2	4	4	4
strange odor	3	3	4	4	3	4	4	4	3	3	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4
roasted flavor	3	4	3	4	3	3	3	4	3	3	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4
rancidity	2	3	4	4	2	3	4	4	2	4	4	4	2	4	4	4	2	4	4	4	2	4	4	4	2	4	4	4
firmness	2	3	4	4	2	4	3	4	2	4	4	4	2	4	4	4	2	4	4	4	2	4	4	4	2	4	4	4
<i>shell</i>																												
shell appearance	2	4	4	4	2	3	3	4	2	4	4	4	2	4	4	4	2	4	4	4	2	4	4	4	2	4	4	4

nuts Groups: Ctl = control (no O₃ application); Group I (O₃ conc. = 10mg/L), Group II (O₃ conc. = 14 mg/L) and Group III (O₃ conc. = 31.5 mg/L);

^a values were the mean scores of 18 individual trained panelists. Results are based on a 5-points hedonic scale. Highest rating is: 5 like very much, 4 like, 3 neither like nor dislike, 2 dislike and 1 dislike very much.

3.5 Conclusion

O₃ reduced fungal growth and so AFLs in the ozonated in-shell Brazil nuts, consequently, that treatment can be an effective method for reducing nut deterioration and toxin contamination in the market. Regarding the O₃ concentration for the safest storage, by utilizing 31.5mg/L, nuts can be free of fungi and AFLs since the first day of application under the present experiment conditions. This study showed that O₃ treatment prior storage can prolong the self life of in-shell Brazil nuts and it could be applied on nuts for export prior shipping held in bags (60 kg bags) with or without vacuum. Currently in-shell Brazil nuts are shipped either in bulks (loose) or in raffia bags (keep nuts micro-environment ventilated) and piled up inside containers. By applying O₃ prior packing, nuts could be kept away from mold and last safer longer. Also, fungi reduction just after harvesting in the forest by applying O₃ will certainly reduce the possibility of further mycelia proliferation and AFL formation. It could be applied in other stages of the Brazil nuts productive chain (prior transporting/processing/packaging/ shipping either in bulk or bags) as well as during truck transportation and commercialization (raffia bags) in the country. In addition nuts O₃ treated could be packaged in hermetic (silos bags) or under vacuum with shell resistant materials. From a food quality and safety point of view prevention is a better strategy than detoxification which is much more complicated and so the implications to human and animal health. Despite of the findings, there is a need of more studies, especially on application (a) in pilot plants and (b) with larger amounts of nut (c) under the Amazon forest environment (first and second storages) prior factory processing, in order to establish the optimal applicable O₃ gas concentration and time of exposure for maximum effectiveness utilizing the present findings.

Important to emphasize that gaseous O₃ decomposes to form O₂ and it does not affect the environment, nor leave residues in the nuts. This work is part of a Research Project on “Technology Development for Prevention and Control of AFLs in Stored Brazil Nuts” that has been developed in the Food and Technology Department of the Federal University of Santa Catarina/SC, Brazil.

Acknowledgment

Authors thank de Mello, F.R. for providing the Brazil nut samples and Simão, V. for carrind out the LC AFLs analysis.

3.6 Literature Cited

- (1) Wadt, L.H.O.; Kainer, K.A.; Gomes-Silva, D.A.P. Population structure and nut yield of a *Bertholletia excelsa* stand in southwestern Amazonia. *Forest Ecology and Management*, **2005**, 211, 371-384.
- (2) Arrus, K.; Blank, G.; Abramson, D.; Clear, R.; Holley, R.A. AFL production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *J. Stored Products Research*, **2005**, 41, 513–527.
- (3) Pacheco, A. M.; Scussel, V.M. Is there a connection between selenium and aflatoxins in Brazil nuts? *International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*. Istanbul, Turkey. 21 – 25, May, **2007a**.
- (4) Pacheco, A.M.; Scussel, V.M. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Amazon basin. *J. Agric.Food Chem.*, **2007b**, 55, 11087-11092.
- (5) Clay, J.W.. Brazil nuts: the use a keystone species for conservation and development. In: Freese, C.II. (Ed), *Harvesting Wild Species: Implications for Biodiversity Conservation*. The Johns Hopkins Univ. Press. Boltimore, MD. USA, **1997**, pp. 246-282.
- (6) Pacheco, A.M.; Scussel, V.M.. *Castanha do Brasil – da Floresta ao Consumidor*. Ed. Editograff, Brazil, **2006**, 174 pp.
- (7) CAC- Codex Alimentarius Commission, *Codex Committed on Food Additives and Contaminants*, Code of practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in tree nuts, CAC/RCP 59 -**2005**.
- (8) Lopes Castrillón, A.; Purchio, A.; Fungos contaminantes e produtores de aflatoxians em castanha-do-Brasil do Pará (*Bertholletia excelsa*) *Acta Amazonica*, **1988**, 18, 173-183.
- (9) Steiner, W.E.; Brunschweiler, K.; Leimbacher, E.; Scheneider, R. Aflatoxins and fluorescence in Brazil nuts and pistachio nuts. *J. Agric.Food Chem.*, **1992**, 40, 2453–2457.
- (10) Freire, F. das C. O.; Kozakiewicz, Z.; Paterson, R.R.M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, **2000**, 149, 13–19.
- (11) Pacheco, A.M.; Scussel, V.M. Aflatoxins evaluation on in-shell and shelled dry Brazil nuts for export analysed by LC-MS/MS – 2006 and 2007 harvests. *Wold Mycotoxin Journal*. In press. **2009**.
- (12) Kurtzman, C.P., Horn, B.W. and Hesseltine, C.W., **1987**. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53: 147-158.
- (13) Olsen, M.; Johsson, P.; Moller, T.; Paladino, R.; Lindblat, M. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? *World Mycotoxin Journal*. **2008**, 1, 2, 123-126.
- (14) De-Mello, F.R.; Scussel, V.M. Characteristics of in-shell Brazil nuts and their relationship to aflatoxin contamination: criteria for sorting. *J. Agric.Food Chem.*, **2007**, 55, 9305-9310.

- (15) CONFORCAST, 2008. Plano de amostragem para castanha-do-Brasil. Acess: 02/06/2008, //www.nutfruit.org.
- (16) Simsek, O.; Arici, M.; Demir, C. Mycoflora of hazelnut (*Corylus avellana* L.) and aflatoxin content in hazelnut kernels artificially infected with *Aspergillus parasiticus*. *Nahrung*, **2002**, 46, 194–196.
- (17) Codex Alimentarius. 2006. Code of practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in tree nuts. CAC/RCP 59-2005, Rev. 1-2006.
- (18) EU – European Union **2006** - Commission Regulation 1881/2006 of 19 Dec 2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. *Official Journal of European Communities* L.364/5-364/24.
- (19) Brazil. 2008. Ministry of development, industry and commerce [on line]. Disposable in: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/logon.asp?urlOrigem=http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/default.asp>>. Accessed in: 10/03/08.
- (20) Farag, R.S.; Rashed, M.M.; Abo-Hgger, A.A.A. Aflatoxin destruction by microwave heating. *Int. J. Food Sci. and Nutr.*, **1996**, 47, 197–208.
- (21) Xu, L. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. *Food Technology*, **1999**, 53, 10, 58–61.
- (22) Prudente Jr, A.D.; King, J.M. Efficacy and safety evaluation of ozonation to degrade aflatoxin in corn. *J. Food Sci.*, **2002**, 67, 2866–2872.
- (23) Dollear, F.G.; Mann, G.E.; Codifer Jr.; L.P.; Gardner Jr. H.K.; Koltun, S.P.; Vix, H.L.E.. Elimination of aflatoxin from peanut meal. *J.Am.Oil Chem.Soc.*, **1968**, 45, 862–865.
- (24) Samarajeewa, U.; Sen, A.C.; Cohen, M.D.; Wei, C.I. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *J. Food Protection*, **1990**, 53, 489–501.
- (25) McKenzie, K.S.; Sarr, A.B.; Maymura, K.; Bailey, R.H.; Miller, D.R.; Rogers, T.D.; Norred, W.P.; Voss, K.A.; Plattner, R.D.; Kubena, L.F.; Phillips, T.D. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology*, **1997b**, 35, 807–820.
- (26) Kim, J.G.; Yousef, A.E.; Dave, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *J. Food Protection*, **1999**, 62, 1071–1087.
- (27) Proctor, A.D.; Ahmedna, M.; Kumar, J.V.; Goktepe, I. Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. *Food Additives and Contaminants*, **2004**, 21, 786–793.
- (28) Allen, B.; Wu, J.; Doan, H. Inactivation of fungi associated with barley grain by ozone. *J. environ. Sci. Health B*. **2003**, 38 (5), 617-630.
- (29) Yesilcimen, A.M.; Murat, Ozdemir. Effect of different treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios. *J. Science Food Agric.*, **2006**, 86, 13, 2099-2104.

- (30) Kells, A.A.; Mason, L.J.; Maier, D.E.; Wolushuk, C.P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. *J. Stored Products Research*, **2001**, 37, 371–382.
- (31) Sharma, R. R.; Demirci, A.; Beuchat, L. R.; Fett, W. F. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with ozonated water and heat Treatment. *Journal of Food Protection*, **2002**, 65, 3, 447–451.
- (32) Palou, L.; Crisosto, C.H.; Smilanick, J.L.; Adaskaveg, J.E.; Zoffoli, J.P. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physical responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biol. Tech.*, **2002**, 24, 39–48.
- (33) Perez, A. G.; Sanz, C.; Rios, J. J.; Olias, R.; Olias, J. M. Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 1652–1656.
- (34) Hwang, E.; Cash, J. N.; Zabik, M. J. Postharvest treatments for the reduction of Mancozeb in fresh apples. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 3127–3132.
- (35) Ong, K. C.; Cash, J. N.; Zabik, M. J.; Siddiq, M.; Jones, A. L. Chlorine and ozone washes for pesticide removal from apples and processed apple sauce. *Food Chemistry*, **1996**, 55, 2, 153–160.
- (36) 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. *J. Stored Products*, **2002**, 39, 1, 33–34.
- (37) Oztekin, S.; Zorlugenç, B.; Zorlugenç, F.K. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. *J. Food Engineering*, **2006**, 75, 396–399.
- (38) Lanita, C. S.; da Silva, S.B. Use of ozone in industrial cold rooms to control yeasts and moulds during parmesan cheese ripening. *Braz. J. Food Technol.*, **2008**, 11, 3, 182-189.
- (39) Dwarakanath, C.T.; Rayner, E.T.; Mann, G.E.; Dollear, F.G.. Reduction of aflatoxin levels in cottonseed and peanut meals by ozonization. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1968**, 45, 93–95.
- (40) Mason, L.J.; Woloshuk, C.P.; Maier, D.E. Efficacy of ozone to control insects, molds and mycotoxins. In: Donahaye, E.J., Navarro, S. and Varnava, A., Editors, *Proceedings of the International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*, Nicosia, Cyprus Printer Ltd., Nicosia, **1997**, 665–670.
- (41) Maeba, H.; Takamoto, Y.; Kamimura, M.; Miura, T. Destruction and detoxification of aflatoxins with ozone. *Journal of Food Science*, **1988**, 53, 667–668.
- (42) Inan F.; Pala, M.; Doymaz, I. Use of ozone in detoxification of aflatoxin B1 in red pepper. *J. Stored Products Research*. **2007**, 43, 425-429.
- (43) Olmez, H.; Akbas, M.Y. Optimization of ozone treatment of fresh-cut green leaf lettuce. *J. Food Engineering*, **2009**, 90, 489-494.
- (44) Frazier, W. C.; Westhoff, D.C. *Food Microbiology*. McGraw-Hill Book Company, 4th ed, New York, **1988**, 17-31.

- (45) APHA - American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and was and wastewater. 15 ed. Washington: American Public Health Association, **1980**.
- (46) Pitt, J.I.; Hocking, A.D. *Fungi and food spoilage*. 2ed. London: Blackie Academic & Professional, **1997**, 593p.
- (47) Machida, S; Saito, M. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience*, **1999**, 40, 205-208.
- (48) Samsom, R.A.; Hoesktra, E.S.; Frisvad, J.C. *Introduction to Food and Airborne Fungi*. 7th edition, CBS. The Netherlands, **2004**, 389p.
- (49) Pitt, J.I.; Hocking, A.D.; Glenn, D.R. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A.parasiticus*. *J.Appl. Bacteriol.* **1983**, 54, 109-114.
- (50) AOAC - Official Methods of analysis of AOAC International *Nuts and Nuts Products*. art. 925.40, , **2005**, 18th ed. Vol II, chapter 40.
- (51) Sobolev, V.S. Simple, rapid, and inexpensive cleanup method for quantitation of aflatoxins in important agricultural products by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 2136-2141.
- (52) Yaacoub, R.; Saliba, R.; Nsouli, B.; Khalaf, G.; Birlouez-Aragon, I. Formation of Lipid Oxidation and Isomerization Products during Processing of Nuts and Sesame Seeds. *J. Food Agric.Chem.*, **2008**, 56, 7082-7090.
- (53) Stone, H.S.; Sidel, J.L. *Sensory evaluation practices*. Florida: Academic Press, INC, **1993**. 295p.
- (54) Zhao, J.; Cranston, P.M. Microbial descontamination of black pepper by ozone and the effects of the treatment on volatile oil constitutes of the spices. *J.Sci. Food Agric.* **1995**, 68, 11-18.
- (55) Freitas-Silva, O.; Venâncio, A. Supressão de *Aspergillus* produtores de aflatoxinas e ácido ciclopiazonico por ozônio. *Revista Ciência da Vida*. **2008**, 28, 198-200.
- (56) Byun, M.; Yook, H.; Kwon, O. Comparative effects of gamma irradiation and ozone treatment on hygienic quality of aloe powders Source. *Intern.J. Food Sci. & Tech.*, **1997**, v.32, n.3.

4. ARTIGO

EVALUATION OF OZONE TREATMENT AND VACCUM PACKAGING FOR IN-SHELL BRAZIL NUT FUNGI INACTIVATION AND AFLATOXIN DEGRADATION DURING STORAGE

Trabalho submetido para publicação na revista: Journal of Agricultural and Food Chemistry

EVALUATION OF OZONE TREATMENT AND VACCUM PACKAGING FOR IN-SHELL BRAZIL NUT FUNGI INACTIVATION AND AFLATOXIN DEGRADATION DURING STORAGE

4.1 Abstract

A study utilizing ozone (O₃) and vacuum packaging to find out their effect on in-shell Brazil nuts fungi and aflatoxin (AFL) degradation was carried out together with lipid stability and sensory evaluation after 60 days of storage 26°C. In-shell Brazil nuts were O₃ treated at 31.5 mg/L (5h.), vacuum packaged in low oxygen permeability polyethylene bags, heat sealed and stored (Group I). Groups of in-shell nut packs were kept for Control: no O₃ treatment / with vacuum (Group II) and no O₃ / no vacuum (Group III). The nuts initial fungi load was 4.83 log cfu/g, moisture content of 9.37% and AFLs of 11.58 µg/kg. Any fungi load change (on MEA media), *Aspergillus flavus* and *parasiticus* (on AFPA media) growth/inhibition, AFL presence (analyzed either in-shell and after shelling by LC/FD), lipid oxidation (TBA test) and nut acceptance/rejection by sensory evaluation (attributes: nut shell and edible part appearance, strange odor, residual taste, rancidity and firmness) were registered. Right after the O₃ treatment no fungi and yeast count (cfu), neither the toxigenic species of *Aspergillus* (*A. parasiticus* and/or *A. flavus*) growth were detected in the nuts and the same persisted throughout the whole storage period. As expected, different behavior was observed in the Control Groups. Group II nuts kept similar fungi count as the beginning of the experiment; however, slightly lower, probably due to lack of oxygen by the vacuum environment. With the exposure of O₃, AFLs were not detected up to the LOQ of the method (0.50; 0.17; 0.50; 0.17 µg/kg) since Day One up to the end of the storage, different of the untreated nut packs (Control Groups). The sensory evaluation showed that nuts O₃ treated and vacuum packaged were still palatable and were accepted by the panelist groups scores ranging from 4 (like) to 5 (like very much), with no significant changes (p<0.05) between nut sensory attributes. O₃ gas did not affect the lipids of the treated in-shell Brazil nuts and vacuum packaged. The malonaldehyde values were constant throughout the whole storage period. The data obtained here on O₃ + vacuum + packaging showed that it can be an alternative procedure, easy to apply, for transporting in-shell Brazil nuts in long distances such as: in the forest (raw) – by boat in the long and curved Amazon river, or during export– trips by ship can last 3 to more weeks.

Keywords: Brazil nut, ozone, packaging, vacuum, mycoflora, aflatoxin, lipid oxidation.

4.2 Introduction

The Brazil nut trees (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) grow in the Amazonian basin in South America with thousands of tons of its seeds (the Brazil nuts), that are held in pods, exported each year. The consumption of that nut in the internal market is very small, ca. 1% of its production. Most are exported *in natura*, to European countries, North America and more recently to China. Brazil nuts have 67.0, 17.0 and 7.0% of fat, protein and carbohydrates as average (g/100g), respectively. The albumin fraction, the *excelsine*, is a complete protein, leading Brazil nuts to be called by the Amazonian natives: the *meat nut* (de Souza,; de Menezes, 2004; Pacheco, Scussel, 2006). They are also rich in selenium, an important antioxidant (Cardarelli, Oliveira, 2000; Mehlenbacher, Janick, 2003; Pacheco, Scussel, 2007).

The occurrence of aflatoxins (AFLs) produced by strains of *Aspergillus* in Brazil nuts has been reported (Pacheco, Scussel, 2007; 2009; Xavier, Scussel, 2008; Olsen et al., 2008). Fungi can grow both, on the shell and in the nut i.e., the edible part, due to the penetration of spores through the operculum and the cracks of the shell (de Mello, Scussel, 2007; Freire et al., 2000). Therefore it is necessary to conduct studies to reduce the proliferation of fungi and production of the toxin, mainly by modifying the factors that favor its production during the harvest, storage (raw) as well as after processing when nuts are load in ships for export or on trucks for road transportation in the country.

Packaging with modified atmosphere and vacuum have become increasingly popular as preservation techniques, which has brought great advances in storage, distribution and marketing of raw materials and processed products in order to meet the consumer demands. Modified atmosphere and vacuum systems have provided improvements in the shelf life and organoleptic quality in a range of food products and may be extended, depending on factors such as: if raw or processed type, temperature, gas mixtures and packaging materials, to several other food commodities (Farber, 1991; Church, 1998). The shelf life improvement under modified atmosphere can vary up to 280%, when compared to the aerobic storage (Reddy et al., 1992). As far as vacuum is concerned, the content of available O₂, is reduced by the vacuum, only, in sealed impermeable packaging, or by an additional injection of a gas free of O₂, such as carbon dioxide and/or nitrogen (New, 1988, Parry, 1993). Trials conducted with pumpkin seeds (Bee, Barros, 1999), beans (Aguirre, Peske, 1991), wheat (Aguirre,

Peske, 1991) and peanuts (Odowd, Dobie, 1983) have indicated the viability of vacuum storage for prolonging the shelf-life.

Fungi growth can make unacceptable the foods organoleptic characteristics due to changes in color, odor and texture, apart from mycotoxin formation. Therefore the inhibition of growth of these fungi results in a potential improvement of its shelf life when using modified atmosphere and vacuum and it is considered one of the main benefits of that technology (Church, Parsons, 1995; Farber, 1991).

Ozone (O_3) is a recommended gas for use in the storage of grains. It is also indicated for food disinfection especially because it does not leave any residue due to its structure rapid decomposition (Zeynep, 2004). The main effects of the application of O_3 in the post-harvest are: prevention and reduction/inactivation of fungal growth (Peres et al., 1999; Palou et al., 2002; Alen et al., 2003), and bacteria and virus (Tyrrell et al., 1995, Kim et al., 1999; Xu et al., 1999; Sharma et al., 2002), destruction of pesticides and chemical residues (Hwang et al., 2001), control of the storage pests (Kells et al., 2001; Mendez et al., 2002) and degradation of AFLs (Samarajeewa et al., 1990; Proctor et al., 2004; Yesilcimen et al., 2006; Giordano, Scussel, 2009). Although the sensitivity of microorganisms to O_3 can be influenced by factors such as species, moisture content (mc), microorganisms location in food, the forms of fruit, the interactions between different parameters, etc. To reduce the activity fungi/yeast, the O_3 can be applied either for long periods in low concentration, or conversely short period, with higher concentrations (Oztekin et al., 2006) also as a gas or aqueous solution. The destruction of fungi and yeasts immediately after harvest certainly reduces the possibility of AFL formation in the next stages of processing. From a food quality and safety in terms of prevention is a better strategy than detoxification which is much more complicated.

Considering that in-shell Brazil nut for export (a) can get moldy in the nut shell cracked parts and in between the shell and the peel (Conforcast, 2008), (b) fungi can grow during nut shipping (load in bulks -loose) under favorable UR and $T^\circ C$ conditions and (d) O_3 together with vacuum packaging that have been used in several foods for fungi inactivation and AFL degradation can be an alternative to control / prevent fungi spoilage and toxin formation as well as to improve nuts quality; a work was carried out to study the influence of in-shell Brazil nut treated with O_3 gas under vacuum packaging on fungi load reduction, AFLs degradation during storage as well as the consumer acceptance.

4.3 Materials and Methods

Material

Sample. Dry (processed) in-shell Brazil nuts (4 kg). A naturally contaminated batch was chosen for the study with initial total AFLs (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) of 11.58 µg/kg obtained from the retail market in Southern Brazil. Total fungi count: 4.83 log cfu/g and 9.43% and mc. Export Medium size Type: 40-50 mm length (de Mello, Scussel, 2007).

Samples Preparation. Brazil nuts were aseptically divided into portions of 200 g to be treated with the O₃ and vacuum packed.

O₃ Treatment. Container with an upper lid and two apertures for the O₃ application as reported by Giordano and Scussel (2009); O₃ generator (Megazon).

Vacuum Packaging. Vacuum machine with heat sealer (Sunnyvale). Packaging material: polyethylene film, 0.025 mm thickness with low permeability to O₂, thermal retracted, thickness 80µ, weight 78 g/m². Bags dimensions: 10 x 20 cm (height x width, respectively).

Iodinometrical Test. Potassium iodine, sulphuric acid and sodium thiosulfate analytical Grade (Vetec). Starch indicator (Synth).

Storage. BOD oven (Dist).

Analysis. (a) *Mycology tests:* (a1) culture media: malt extract agar - MEA (Himedia); *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar - AFPA (Fluka) and peptone agar (Himedia); (a2) tween 80 (CRQ); (a3) equipment and apparatus: automatic pipette 100 and 1000µl tips (Digipet); autoclave (Phoenix); oven (Fanen); microscope (PZO); incubator set at 20-25°C (Dist); analytical scale (Mettler); semi-analytical scale (CAB); microscope stereoscopic (Carlzeiss Jena); colony counter (Phoenix). (b) *Mc:* microbiological oven (Fanen); analytical scale (Mettler); semi-analytical scale (CAB) an industrial Brazil nut cracker provided by CIEX (Manaus, AM). (c) *Aflatoxin analysis:* (c1) aflatoxin standards: AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ (Sigma); (c2) chemicals: methanol, acetonitrile, benzene, toluene (Carlo Erba). Ultrapure water (MilliQ system, Millipore); (c3) liquid chromatograph: isocratic pump, model 305 (Gilson) and fluorescence detector model 121 (Gilson). Column C₁₈ (15 mm, 4.6 mm, 5 µm for length, diameter and particle size, respectively (Phenomenex). (d) *Lipid peroxidation:* 2-thiobarbituric acid -TBA, trichloroacetic acid -TCA, butylated hydroxytoluene -BHT and ethanol (Vetec). Analytical scale (Mettler), homogenizer (IKA T 25 – Ultra Turrax), water bath (Quimis) and spectrophotometer (Hitachi). (e) *Sensory evaluation:* in-shell Brazil nuts – shells and edible parts (ca. 8g each) from each month and Group (Controls and with treatment), polyethylene cups, spring water and a group of 18 panelists.

Methods

Sample Preparation for O₃ Application. In-shell Brazil nuts previously analysed for fungi load, mc, AFLs contamination, lipid oxidation and sensory evaluation were aseptically weighted into portions of 4 kg to be added into silo for the O₃ treatment.

O₃ Application. The O₃ gas was applied to the in-shell Brazil nuts utilizing the O₃ generator, until the concentration reached 31.5 mg/L (5 h) (Giordano, Scussel, 2009).

Packaging preparation. The ozonated portions of (200 g) were aseptically placed into the 16 polyethylene bags previously prepared, applied vacuum and quickly sealed by heating (n = 2). The nut packs were divided into 3 Groups: Group I (O₃ conc. = 31.5 mg/L), Group II (Control = no O₃ application / with vacuum) and Group III (Control = no O₃ / no vacuum). Each group was carried out in duplicate (n =2) (Figure 1).

Iodimetric Test. The high O₃ concentration were checked by measuring it by titration. The gas was bubbled into a potassium iodide solution (50 mL), acidified with 2.5 ml of sulfuric acid 1N (pH below 2.0). The solution was then titrated with sodium thiosulfate 0.005 N using a starch solution as the indicator (APHA, 1980).

Storage. Nut packs were stored at 26°C in BOD oven for a period of two months (December 2008 to February 2009). Samples were collected also before and after injection of O₃ every 30 days for mycology analysis, mc, AFLs, lipid oxidation and sensory evaluation two intervals of 30 days.

Sample Collection for Analysis. Two packs (n=2) of 200 g portions of in-shell Brazil nuts from each group were collected from the BOD storage to be analysed for: fungi, mc, AFLs, lipid oxidation and sensory evaluation. That was at Day One, after 30 and 60 days.

Mycology. For total fungi count, the method used was of Pit and Hocking (1997) by applying serial dilutions (10⁻¹ to 10⁻⁴) on to the surface of MEA media. For fungi identification the method was of Machida, Saito (1999). The identification of fungi in genus and species was carried out according to the keys of Samsom et al., (2004). The strains aflatoxicity was checked utilizing the AFPA by Pitt et al. (1983).

Mc. by gravimetry (AOAC, 2005).

Aflatoxins. By liquid chromatography with fluorescence-detection FD at 330 (ex.) and 460 (em.) nm, LOD 0.25; 0.08; 0.25 and 0.08 µg/kg e LOQ 0.50; 0.17; 0.50 and 0.17 µg/kg, for AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂, respectively (Sobolev, 2007); mobile fase was water:MeOH:ACN (60:15:15).

Lipid Peroxidation. TBA method by Yaacoub et al. (2008). For extraction, 2 g of the sample was homogenized together with 5% (w/v) aqueous solution of TCA containing 100 µL

of freshly prepared BHT in ethanol (1 mg/mL) by using a homogenizer set at 20 000 rpm for 15 s. After filtration, extract was mixed with TBA solution (20 mol/L) in stoppered test tubes immersed in a 70 °C water bath for 30 min and then rapidly ice cooled. The absorbance of the reaction solutions was read at 532 nm against a blank containing of TCA and TBA reagent. The results were expressed as mg of MDA equivalents per kg of nut sample using a molar extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ for MDA. LOQ was 0.37 mg/Kg.

Sensory Evaluation. Descriptive quantitative analysis (DQA) was by Stone, Sidel (1993). It was conducted using 18 trained panelists during four sessions (n=4). Nuts were peeled and served at room temperature in plastic cups that received a random three-digits code number. At each session the panelists were encouraged to use associative and cognitive terms to describe impressions perceived, for each reference nut sample. It was used a hedonic scale of 5 points (1 for dislike very much, 2 for dislike, 3 for neither like nor dislike, 4 for like and 5 for like very much) for shell and the edible nut part. The sensory attributes of Brazil nuts analysed were: shell appearance, nut appearance, strange odor, roasted flavor, rancidity and firmness.

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA).

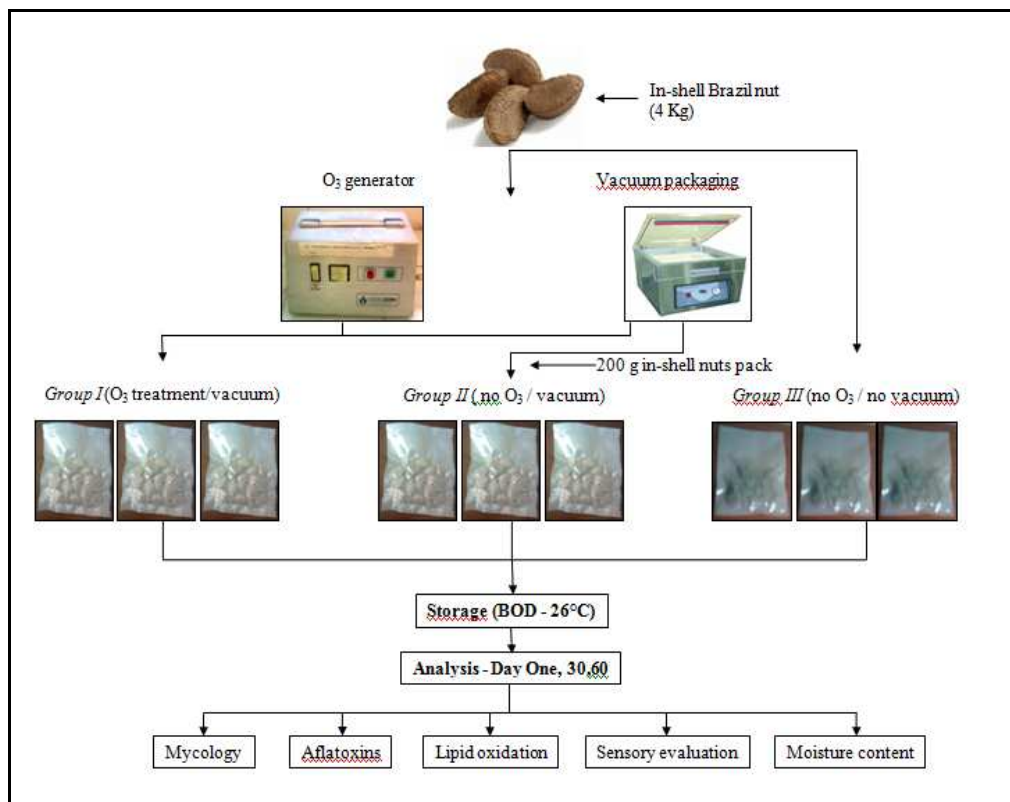


Figure 1 - Flowchart of the in-shell Brazil nuts storage under O₃ treatment with vacuum and packaging.

4.4 Results and Discussion

The data of total fungal counts, the toxigenic species of genus *Aspergillus*, the moisture content and AFLs of in-shell Brazil nut treated with O₃, and packaged under vacuum and stored for 60 days are presented in Table 1. Figures 1 and 2 represent the results of the evaluation of the oxidation of lipids and sensory analysis of the nuts, respectively.

Effect of the O₃ Treatment, Vacuum Packaging and Storage Time on the in-shell Brazil nut mycoflora and moisture content

Total Fungi Count. As expected, fungi and yeasts as well as, the mc of in-shell Brazil nuts were sensitive to O₃ when compared to the Control Groups (II = no O₃ / with vacuum; III = no O₃ / no vacuum). The vacuum packaged Brazil nuts, immediately after (Day one) the O₃ treatment with 31.5 mg/L and until the end of the experiment (60th day), showed no fungal growth. In contrary, the Control Groups, from previous 4.83 log cfu/g, reached 4.86 and 6.86 log cfu/g, for II and III respectively. The Group III, as expected, the total count of fungi and yeasts increased and Group II kept it fungi load showing that the O₃ is a powerful oxidizing agent that is very effective in destroying fungi.

Regarding the extent of fungal growth and O₃ modified atmosphere, studies have been developed in figs (Oztekin et al., 2006), black pepper (Zhao, Cranston, 1995), barley (Allen et al., 2003), pistachio (Yesilcimen and Murat, 2006), among other foods. As a disinfectant, O₃ is 1.5 times stronger than chlorine and is very effective over a wider spectrum of microorganisms including fungi (Xu, 1999). O₃ is a strong oxidant that has been effectively used to control fungal growth and reduce contamination by mycotoxins (Kim et al., 1999).

Moisture Content. The mc of in-shell Brazil nut analyzed before (Day zero) the treatment with O₃ and vacuum packing was 9.37%. The packs of nuts treated with O₃ and stored under vacuum packaging had a small reduction in mc (from initial 9.37 to 8.53%). The same happened for different commodities reported by several authors. When pistachio paste was packed under vacuum the mc reduced (from 8.65 to 7.56 %) in 7 month of storage (Gamh, Hayoglu, 2007). Also Torun (1999) found similar mc behavior when walnuts were stored under different temperatures and packing materials. Another study with pecans, 60% RH reduction in mc after 6 months of storage (Dull, 2006).

Packaging under vacuum offers protection against O₂ and does not favor the development of fungi. Exposure to moisture results in loss of crunchiness and shelf life, different than what occurs with vacuum packing, where there is no contact of the food/nut with the exterior

environment (Saleemullah, et al., 2006). In a similar way, prolonged exposure to O₂ results in rancidness, whereas packing under vacuum protects the food from exposure to O₂.

Aflatoxigenics Species of Aspergillus. The considerations above were made with respect to the total fungi and yeasts count. When evaluating especially the aflatoxigenic fungi (*A. flavus* and *A. parasiticus*), under the O₃ and vacuum conditions, the development of aflatoxigenic species was observed only on those that were not O₃ treated (Controls II and III) they present development of the *Aspergillus* aflatoxigenic species. Mason et al., (1997) reported growth inhibition of *A. flavus* Link and *Fusarium moniliforme* Sheldon cultures, as well as sporulation and mycotoxin production when O₃ was applied (5 mg/L). The low concentrations of O₃ protect food from fungal contamination and subsequent their growth, though higher doses are necessary to kill fungi in contaminated areas (Rice et al., 1982) which was what was used and corroborated by the present study findings.

Table 1 - Total fungi count, *Aspergillus* aflatoxigenic species, moisture content and evaluation AFLs levels in-shell Brazil nut under vacuum packaging after O₃ treatment for 60 days at 26°C

storage (days)	in-shell Brazil nut vacuum packed											
	O ₃ treatment		total count (log cfu/g)		aflatoxigenic species of <i>Aspergillus</i>	moisture content (%)	AFLs (µg/Kg) ^a					
	groups	conc. (mg/L)	fungi	yeast			ΣAFLs ^b	AFB ₁	AFG ₁	AFB ₂	AFG ₂	
<i>(Group I) ozone</i>		with O ₃ / with vacuum										
0 ^c	control	no O ₃	4.83	2.50	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	9.37	11.58	3.57	3.48	2.32	2.21	
1 ^d	treatment	with O ₃ 31.5	ng ^e	ng	ng	9.04	ND	ND	ND	ND	ND	
30			ng	ng	ng	8.80	ND	ND	ND	ND	ND	
60			ng	ng	ng	8.47	ND	ND	ND	ND	ND	
<i>(Group II) control</i>		no O ₃ / with vacuum										
0 ^c	“	“	4.83	2.50	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	9.37	11.58	3.57	3.48	2.32	2.21	
30	“	“	4.80	2.47	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	8.91	11.59	3.56	3.49	2.33	2.21	
60	“	“	4.86	2.49	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	8.54	11.60	3.56	3.49	2.33	2.22	
<i>(Group III) control</i>		no O ₃ / no vacuum										
0 ^c	“	“	4.83	2.50	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	9.37	11.58	3.57	3.48	2.32	2.21	
30	“	“	5.84	2.57	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	9.57	12.06	3.69	3.78	2.23	2.36	
60	“	“	6.86	2.60	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	9.63	12.24	3.83	3.82	2.22	2.37	

^a LOD: 0.25; 0.08; 0.25 and 0.08 µg/kg and LOQ: 0.50; 0.17; 0.50 and 0.17 µg/kg for AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂, respectively; ^b AFB₁+AFG₁+AFB₂+AFG₂; ^c before O₃ treatment; ^d just after O₃ treatment; ^e no growth; ND = not detected

Effect of O₃ Treatment, Vacuum Packaging and Storage on the in-shell Brazil nut Natural AFL Contamination

As reported by Giordano and Scussel (2009) utilizing the same O₃ concentration 31.5 mg/L on in-shell stored nuts, however stored loose in silos, at room temperature (20°C), which was lower than the present experiment and RH of 82 %, fungi and AFLs were totally inactivated. Here it was included vacuum which is another controlling (addition) fungi growth method, AFLs were again, not detected neither at Day one, nor after 30 and 60 days of storage. The same did not occur in the Control Group where AFLs were still detected (Table 1). These results are in agreement with the literature available on AFL degradation by O₃. This oxidation method (ozonation) has been developed for the detoxification of AFLs in foods (Samarajeewa et al., 1990). The O₃ reacts with 8, 9 double bond of the furan ring of AFL through electrophilic attack, causing the formation of primary ozonides followed by rearrangement in monozonide derivatives such as aldehydes, ketones and organic acids (Proctor et al., 2004). The attractive aspect of O₃ is that it decomposes rapidly (half-life of 20-50 minutes) to molecular oxygen without leaving a residue (Kells et al., 2001).

Lipid Stability and Sensory Analysis of the in-shell Brazil nut *versus* Treatment with O₃, Vacuum and Storage Time

Lipid Oxidation: With respect to the possible stability of the lipids in the in-shell Brazil nuts O₃ treated and vacuum packaged, it was observed that the values of MDA lowered and kept constant throughout the whole period of storage (Figure 2) with 8 mg/Kg. The same occurred when Gamh and Hayoglu (2007) studied vacuum packaged pistachio. The authors observed no significant difference on the TBA values during the storage period in pistachio. These results can be attributed to the reduction in the speed rate of oxidation, both by the withdrawal of air (vacuum) and by O₃ treatment (removing waste from O₂). The Control samples had an increase of MDA. Similar results occurred in peppers and pistachio after the application of O₃ and vacuum packaging the effect on lipid oxidation was not apparent, which could not alter the sensory characteristics (Yesilcimen, Murat, 2006).

Sensory Evaluation: The sensory analysis of the in-shell Brazil nuts treated with O₃ and vacuum packed did not present significant changes (p <0.05). The scores for the sensory attributes tested (shell appearance, appearance nut, strange odor, residual taste, rancidity and

firmness) are shown in Figure 3. It was observed that, all scores for the O₃ treated nuts during storage period did not differ much. They were between 4 (like) and 5 (like very much). It was verified that O₃ leaves no residue, neither residual odor or taste. Similar occurred when Inan et al. (2006) worked with red pepper ozonation. They did not register significant sensory changes after the O₃ application as the peppers were still quite palatable. When Yesilcimen and Murat (2006) studied the quality of pistachio, no significant changes were observed between sweetness, rancidity, taste, overall appearance and taste, compared to Control samples (no O₃) indicating the efficacy of that gas application. Other authors also have reported the efficiency of the O₃ and its low interference in the sensory attributes of quality in several products such as vegetables, fish, birds carcasses and their by-products (Takaharra, Naito, 2006; King, Walker, 2000; Naito, 2006; Ibanoglu, 2001). In a work carried by Dull (2006) with pecans, the author reported a slightly better sensory quality on the vacuum packaging nuts after 6 months of storage at 24 °C.

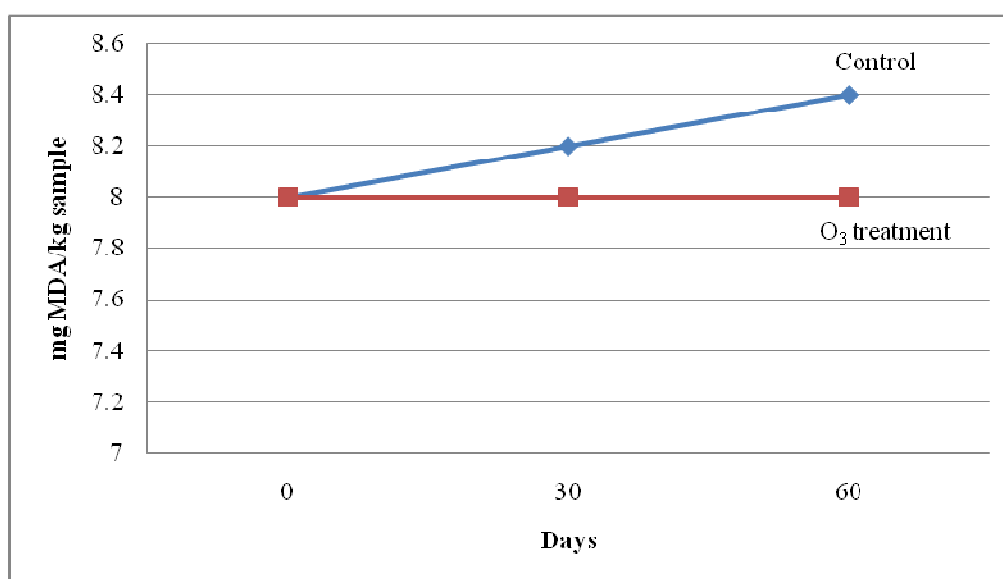


Figure 2 - Effect of ozone treatment and vacuum packaging on lipid oxidation of in-shell Brazil stored for 60 days

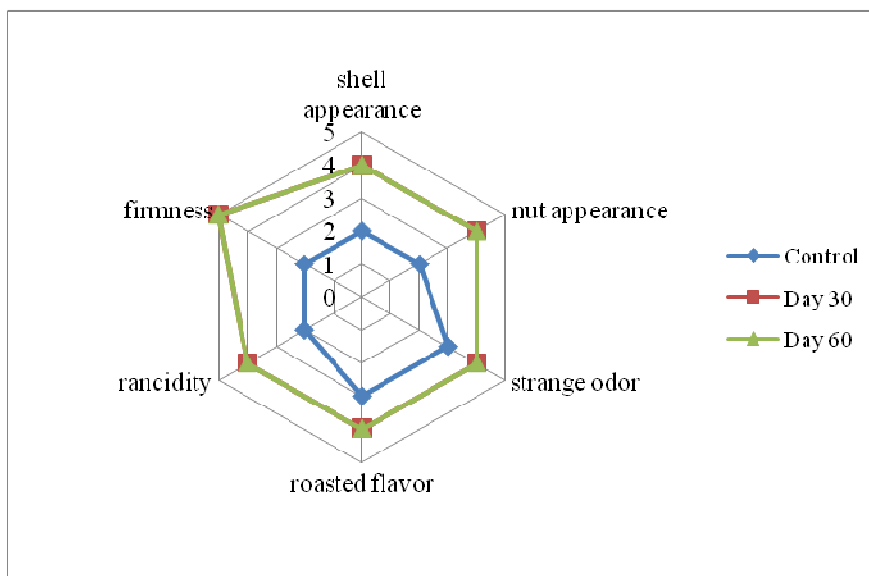


Figure 3 - Effect of ozone treatment and vacuum packaging on the sensory attributes of in-shell Brazil nuts stored for 60 days (hedonic scale of 5 points (1-dislike very much, 2- dislike, 3- indifferent, 4- like, 5- like very much))

4.5 Conclusion

The in-shell Brazil nut O_3 treated at 31.5 mg/L for 5 hours with vacuum packaging study, revealed a successful reduction/inactivation of total fungi / yeast load and AFLs degradation. That procedure, apart from preventing and controlling fungi proliferation and AFLs contamination, can maintain nut sensory quality. It could be a safer alternative for shipping batches of in-shell Brazil nut abroad in 40 kg bags to be piled up in containers. Trips to foreigner countries can take long, reaching 3 to 4 weeks. Treating then with O_3 gas and pack under vacuum can keep whole nuts under stable conditions during the journey - a key point. It also could be an effective method to be used in the retail market and even in the forest 1st and 2nd storage stages (raw in-shell nut) prior processing them (Pacheco and Scussel 2006). A study on packaging resistance material will be a future work to be carried out with a three transversal layered material, more resistant to the sharp corners of the three faced nut shell.

This is the first study reported out on O_3 gas treatment and vacuum packaging for storage of in-shell Brazil nut. Important to emphasize that the O_3 gas was chosen to be use, instead of aqueous

O₃ solution, due to the fact that gas can be more deeply distributed and defused in the interstitial nuts spaces, reaching more efficiently the moldy the areas and AFLs, than aqueous solutions which can add moist, thus interfering with the crunchy and firm characteristics of the dry nut product.

The data obtained here on O₃ + vacuum + packaging showed that it can be an alternative procedure, easy to apply, for transporting in-shell Brazil nuts in long distances such as: in the forest (raw) – by boat in the long and curved Amazon river, or during export– trips by ship.

4.6 Literature Cited

Aguirre, R.; Peske, S.T. Required bean seed moisture content for hermetic storage. *Seed Science and Technology*, Zürich, **1991**, 19, 117-122.

Allen, B.; Wu, J.; Doan, H. Inactivation of fungi associated with barley grain by ozone. *J. Environ. Sci. Health B*. **2003**, 38, 5, 617-630.

AOAC. Edition Official Methods of analysis of AOAC International art. 925.40, chapter 40. Nuts and Nuts Products, **2005**.

APHA - American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and was and wastewater. 15 ed. Washington: American Public Health Association, **1980**.

Bee, R.A.; Barros, A.C.S.A. Sementes de abóbora armazenadas em condições de vácuo. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, **1999**, 21, 120-126.

Cardarelli, H.R.; Oliveira, A.J. Conservation of Brazil nut extract, *Scientia Agricola*, **2000**, 57 617–622.

Cavaletto, C.G. **1983**. Macadamia nuts. In: *Handbook of Tropical Foods*. H.T. Chan, Jr. (ed), pp. 361-397.

Church and Parsons, 1995. I.J. Church and A.L. Parsons, Modified atmosphere packaging technology: a review. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **1995**, 67, 143–152.

Church, 1998. N. Church, MAP fish and crustaceans-sensory enhancement. *Food Science and Technology Today* **1998**, 12, 2, 73–83.

de-Mello, F.R.; Scussel, V.M. Characteristics of in-shell Brazil nuts and their relationship to aflatoxin contamination: criteria for sorting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, 55, 9305-9310.

de Souza, M.L.; de Menezes, H.C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **2004**, 24(1): 120-128.

Dull, G.G.; Kays, S.T. Quality and Mechanical Stability of pecan kernels with different packaging protocols. **2006**, *J. Food Science*, 53, 2, 565-567.

FAO, **1995**. Edible nuts. Non-wood forest products. No. 5. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Farber, 1991. J.M. Farber, Microbiological aspects of modified-atmosphere packing technology—a review. *Journal of Food Science*, **1991**, 9, 58–70.

Freire, F.C.O.; Kozakiewicz, Z.; Paterson, R.R.M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian Black pepper, White pepper and Brazil nuts, *Mycopathologia*, **2000**, 149, 13-19.

Gamlı, Ö.F.; Hayoğlu, İ. The effect of the different packaging and storage conditions on the quality of pistachio nut paste. *Journal of Food Engineering*, 2007, 78, 443-448.

Hwang, E.; Cash, J. N.; Zabik, M. J. Postharvest treatments for the reduction of Mancozeb in fresh apples. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **2001**, 49, 3127–3132.

Kells, A.A.; Mason, L.J.; Maier, D.E.; Woloshuk, C.P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. *J. Stored Products Research*, **2001**, 37, 371–382.

Kim, J.G.; Yousef, A.E.; Dave, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *J. Food Protection*, **1999**, 62, 1071–1087.

Mason, L.J.; Woloshuk, C.P.; Maier, D.E. Efficacy of ozone to control insects, molds and mycotoxins. In: Donahaye, E.J., Navarro, S. and Varnava, A., Editors, *Proceedings of the International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*, Nicosia, Cyprus Printer Ltd., Nicosia, **1997**, 665–670.

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*, **2002**, 39,1, 33–34.

Mehlenbacher, S.A.; Janick, J. Progress and prospects in nut breeding, *Acta Hort.* **2003**, 622 57–79.

New, J.H. Studies on vacuum packing of seed. *Seed Science and Technology*, Zürich, **1988**, v. 16, p. 715-723.

Odowd, E.T.; Dobie, P. Reducing viability losses in open seed stores in tropical climates. *Seed Science and Technology*, Zürich, **1983**, v. 11, p. 57-75.

Olsen, M.; Johsson, P.; Moller, T.; Paladino, R.; Lindblat, M.. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? **2008**, *World Mycotoxin Journal*, 1, 2, 123-126.

Oztekin, S.; Zorlugenc, B.; Zorlugenc, F.K. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. *Journal of Food Engineering*, **2006**, 75, 396–399.

Palou, L.; Crisosto, C. H.; Smilanick, J. L.; Adaskaveg, J. E.; Zoffoli, J. P. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physical responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biology and Technology*. **2002**, 24, 39–48.

Pacheco, A. M.; Scussel, V.M. Is there a connection between selenium and aflatoxins in Brazil nuts? International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Istanbul, Turkey. 21 – 25, May, **2007**

Parry, R.T. Introduction. In: R.T. Parry, Editor, *Principles and application of modified atmosphere packaging of food*, Blackie Academic and Professional, Glasgow, **1993**, pp. 1–17.

Perez, A. G.; Sanz, C.; Rios, J. J.; Olias, R.; Olias, J. M. Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 1652–1656.

Pitt, J.I.; Hocking, A.D. *Fungi and food spoilage*. 2ed. London: Blackie Academic & Professional, **1997**. 593p.

Pitt, J.I.; Hocking, A.D.; Glenn, D.R. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A.parasiticus*. *J.Appl. Bacteriol.* **1983**, 54, 109-114.

Proctor, A.D.; Ahmedna, M.; Kumar, J.V.; Goktepe, I. Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. *Food Additives and Contaminants*, **2004**, 21, 786–793.

Rice, R.G.; Farquhar, J.W.; Ballyky, L.J. Review of the applications of ozone for increasing storage times of perishable foods, *Ozone Science and Engineering* **4** (1982), pp. 147–163.

Saleemullah, A.I.; Iqtidar, A.K.; Hamidullah, S. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. *Food Chemistry*, **2006**, 98, 4, 699-703.

Samarajeewa, U.; Sen, A.C.; Cohen, M.D.; Wei, C.I. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *J. Food Protection*, **1990**, 53, 489–501.

Sharma, R. R.; Demirci, A.; Beuchat, L. R; Fett, W. F. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated Alfalfa Seeds with ozonated water and heat Treatment. *Journal of Food Protection*, **2002**, 65, 3, 447–451.

Torun B. The production methods of walnut paste, improving the shelf life and quality, University of Mediterranean, **1999**, *Institute of Natural and Applied Science*, Antalya, p. 15.

Tyrrell, S. A., Rippey, S. R., & Watkins, W. D. Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone. **1995**, *Water Research*, 29,11, 2483–2490.

Xu, L. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. *Food Technology*, **1999**, 53, 10, 58–61.

Yesilcimen, A.M.; Murat, Ozdemir. Effect of different treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios. *J. Science Food Agric.*, **2006**, 86, 13, 2099-2104.

Zhao, J., Cranston, P.M., Microbial decontamination of black pepper by ozone and the effect of the treatment on volatile oil constituents of the spice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1995**, 68, 11–18.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da presença de AFLs em castanha-do-Brasil, a heterogenicidade desta ocorrência demonstra que diversos fatores podem agir isoladamente ou em associação para determinar as condições ideais de produção das AFLs, ou que suas características físico-químicas ou organolépticas sejam alteradas negativamente.

As condições ambientais em toda a cadeia produtiva são extremamente dinâmicas a cada safra, e os controles aplicados em caráter preventivo têm papel fundamental em diminuir a possibilidade de instalação do fungo e produção da toxina, que demonstra ter alta ocorrência mesmo nas etapas anteriores ao beneficiamento.

Para diminuir a ocorrência e a possibilidade de instalação do fungo e a posterior produção de toxina, são propostos métodos mais adequados, como a utilização do gás O_3 durante o armazenamento da castanha-do-Brasil. Por ter como propriedade ser um poderoso oxidante, ele previne, inativa os fungos e degrada toxinas. Sabendo disso, há necessidade de ter novos estudos, sobre a concentração de O_3 por quantidade de castanha-do-Brasil; o estudo de onde seria melhor aplicado o O_3 nas unidades de armazenamento e estudo de uma unidade de armazenamento ideal para ser aplicado o O_3 .

Em função do impacto que podem causar tanto na saúde do consumidor, como também no âmbito comercial, a castanha-do-Brasil necessita de monitoramento contínuo na sua qualidade. Assim, observa-se que os dados obtidos podem ser úteis para subsidiar a busca de outros mecanismos de melhoria da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil, de forma a contribuir na manutenção desta atividade tão importante aos povos da Amazônia.

APÊNDICES

APÊNDICE A

**TRABALHO APRESENTADO NO XIII ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS,
6 A 8 DE AGOSTO DE 2008, RIO DE JANEIRO**

**INFLUÊNCIA DO OZÔNIO NO CONTEÚDO DE UMIDADE DA CASTANHA-DO-
BRASIL (*BERTHOLLETIA EXCELSA* H.B.K.)**

INFLUÊNCIA DO OZÔNIO NO CONTEÚDO DE UMIDADE DA CASTANHA-DO-BRASIL (*BERTHOLLETIA EXCELSA* H.B.K.)

BÁRBARA NANTUA EVANGELISTA GIORDANO ¹; VILDES MARIA SCUSSEL²

1. Bolsista CAPES, Discente de Mestrado em Ciências dos Alimentos – UFSC .

2. Professor Titular, PhD, UFSC.

ABSTRACT: GIORDANO, B.N.E.; SCUSSEL, V.M. INFLUENCE OF OZONE GAS ON BRAZIL NUT (*BERTHOLLETIA EXCELSA* H.B.K.) MOISTURE CONTAIN REDUCTION. Brazil nut is a product of great economic importance Brazilian and foreign. The low technological level characteristic of some parts of its production chain, and the conditions of inadequate management and handling of raw materials, promote the absorption / lifting of the content of moisture, the proliferation of fungi and possible contamination by aflatoxin, with the consequent risk the health of consumers and economic losses. The contamination by aflatoxin can occur both in the forest or in storage. Contamination by the fungal is directly related to climatic conditions in the forest during the harvest, time that the nuts are in contact with the wet soil, conditions of storage in primary forest and precarious conditions of transport by rivers that takes a long time to reach local processing. One very effective method is the use of ozone to reduce the occurrence of microorganisms and therefore the possible production of aflatoxins produced by fungi toxigenics. This work was used different time of exposure to ozone at different concentrations. We observed a reduction in the moisture content with the increase in the time of exposure to ozone, thus promoting the development of micro decrease.

Keywords: Brazil nut, moisture content, ozone, aflatoxins.

INTRODUÇÃO

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é um produto de elevada importância para a economia dos Estados da Amazônia brasileira sendo, em alguns destes, o principal produto extrativista de exportação, estando voltado para a base de sustentação das famílias de baixa renda das regiões do Baixo Amazonas, Regiões do Nordeste, Sudoeste e Sudeste paraense e demais Estados brasileiros (PACHECO; SCUSSEL, 2006). No entanto, as condições de umidade e temperatura elevadas na floresta, o baixo nível tecnológico característico de sua cadeia produtiva, bem como a precariedade do sistema de colheita, transporte e armazenamento da castanha favorecem o desenvolvimento de fungos produtores de aflatoxinas, com conseqüente risco à saúde do consumidor e perdas econômicas, comuns em todas as etapas da cadeia produtiva. O conteúdo de umidade é usualmente expresso em termos de umidade absoluta do material e das exigências mínimas presentes pelos fungos com relação à sua capacidade de desenvolvimento. Em geral, os fungos e leveduras são mais tolerantes que as bactérias aos meios com baixa umidade. Por esta razão, fatores como umidade e temperatura deverão ser rigorosamente controlados para inibir a produção da toxina nas etapas da cadeia produtiva. Variações na temperatura e nos teores de umidade relativa nos armazéns poderão possibilitar a re-hidratação das amêndoas e o desenvolvimento dos fungos e produção de aflatoxinas. Teores de umidade acima de 16% e temperaturas entre 27-30°C favorecem a produção das

aflatoxinas. Os fungos podem ser divididos em fungos de campo (ex. *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*) que exigem um conteúdo de umidade mais elevado e de armazenagem (ex. *Aspergillus* e *Penicillium*) com capacidade de crescimento em níveis inferiores (SCUSSEL, 1998). A estabilidade da castanha é assegurada quando é seca abaixo de 6,5% ou seja 1-2% abaixo da umidade crítica. Além disso deve ser seca uniformemente, evitar muita quebra das amêndoas durante o descasque, secagem e armazenagem e manter o ambiente bem ventilado. Uma alternativa utilizada nesse trabalho foi a utilização do ozônio, pois ele é um agente oxidante e potente desinfetante (GUZEL-SEYDIM et al., 2004, BARBOSA, et al., 2005). Ozonização é um método oxidativo desenvolvido recentemente para a descontaminação de aflatoxinas em alimentos (SAMARAJEEWA et al., 1990). O ozônio é degradado rapidamente, sem resíduo (NAITO; TAKAHARA, 2006). Assim, esse trabalho teve como objetivo observar o efeito do ozônio no conteúdo de umidade da castanha-do-Brasil armazenada.

MATERIAL E MÉTODOS

Material: a) Amostras: Castanha-do-Brasil com casca (14 Kg), colheita de 2005/2006 no Estado do Amazonas, Brasil. b) Equipamentos: silos de policloreto de vinila (PVC) com 0,80 x 0,15 m de altura e largura, respectivamente. Estufa de laboratório, Fanen; balança analítica, Mettler e semi-analítica, CAB; ozonizador, Megazon. Descascador comercial de castanhas-do-Brasil gentilmente doado por CIEX. **Métodos:** (a) Preparo das castanhas: as castanhas foram divididas em duas porções e uma delas foi descascada utilizando descascador comercial, foram realizadas em triplicatas. O conteúdo de umidade inicial foi medido e as castanhas foram em seguida submetidas aos tratamentos com ozônio. b) Grupos de castanhas (com e sem casca): as castanhas foram separadas em 4 grupos como segue: Grupo Controle (C – castanhas armazenadas sem tratamento) e castanhas tratadas com ozônio (Grupo T1, Grupo T2, Grupo T3 e Grupo T4) em diferentes tempos de exposição (2, 3 e 5 horas). Concentrações de ozônio: 10, 14 e 31,5 mg/l. c) Injeção de ozônio: o ozônio foi injetado na base do cilindro (silo), sob uma sustentação de pvc situada à 0,20 m da base (para a sustentação das castanhas) do silo, formando um espaço livre para melhor distribuição do gás. d) Determinação do conteúdo de umidade: método art. 925.40, AOAC (2005). e) temperatura ambiente e umidade relativa do ar: oscilou durante o experimento de 20° a 23° e a umidade de 50 a 70%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas variações entre os conteúdos de umidade do Grupo Controle e dos três grupos tratados com diferentes concentrações e tempos de exposição ao ozônio. As amostras de castanha-do-Brasil tratadas (Grupos T1, T2 e T3) apresentaram conteúdos de umidade inferiores às do Grupo Controle (Tabela 1), tanto as com casca quanto às sem casca, com uma média de redução de 18,13 a 21,63% e 22,76 a 28,59% do conteúdo umidade inicial, respectivamente. Considerando as castanhas sem casca, onde a perda de umidade foi mais intensa, foi observado que embora os Grupos: T1 (exposição de 2 hs a 10 mg/l de O₃) e o T2 (exposição foi por 3 hs a 14mg/l de O₃) apresentaram conteúdos de umidade mais baixos (3.97, 3.94 %, respectivamente), a diferença foi mais acentuada no Grupo T3 (5 hs / 31,5 mg/l) atingindo 3.67 %.

Tabela 1. Conteúdo de umidade de castanhas-do-Brasil apos armazenagem sob tratamento de ozônio

Grupo	Tratamento com O ₃		Conteúdo de umidade da castanha-do-Brasil			
	Tempo (min.)	Conc. (mg/l)	Com casca (%)		Sem casca (%)	
			Castanha	Redução	Castanha	Redução
C ^a	Zero	Zero	9,43	NA ^b	5,14	NA ^b
T1	120	10	7,72	21,63	3,97	22,76
T2	240	14	7,44	21,10	3,94	23,35
T3	300	31,5	7,39	18,13	3,67	28,60

^a controle ^b não aplicável

Com a diminuição do conteúdo de umidade, através do tratamento com o ozônio, foi observado também diminuição do desenvolvimento dos fungos e por consequência a possível produção de aflatoxinas. Esse trabalho faz parte do Projeto de Pesquisa em Desenvolvimento de Métodos para Redução de Aflatoxinas na Armazenagem da Castanhas-do-Brasil que está sendo realizado no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC. Há necessidade de mais estudos para estabelecer a concentração ideal de ozônio bem como do tempo exposição para a máxima redução de umidade, do crescimento de fungos e de aflatoxinas. O ozônio atua nos microrganismos através da progressiva oxidação dos componentes vitais das células levando a sua destruição (GUZEL-SEYDIM et al., 2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, G.N.O.; FARONI, R.D.A., SARTORI, M.A.; et al. **Avaliação do óleo obtido a partir de grãos de milho tratados com ozônio**. Engenharia na Agricultura, viçosa, MG, v. 13, n. 3, 173-177, 2005.
- GUZEL-SEYDIM, Z.B., GREENE, A.K., SEYDIM, A.C. **Use of ozone in food industry**. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, v. 37, p. 453-460, 2004.
- NAITO, S., TAKAHARA, H. **Ozone Contribution in Food Industry in Japan**. Ozone: Science and Engeneering, v. 28, p. 425-429, 2006
- PACHECO, A.M., SCUSSEL, V.M. **Castanha-do-Brasil: da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis - SC, Editograf, 2006, 176p.
- RESTAINO, L., FRAMPTON, E.W., HEMPHILL, J.B., PALNIKAR, P. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 9, p. 3471-3475, 1995.
- SAMARAJEEWA, U., SEM, A.C., COHEN, M.D., WEI, C.I., **Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods**. Journal of Food Protection, v. 53, p. 489-501, 1990.
- SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis, Insular, 1998, 144p.

APÊNDICE B

**TRABALHO APRESENTADO NO CONTROLLED ATMOSPHERE AND
FUMIGATION, 21 A 26 DE SETEMBRO DE 2008, CHENGDU, CHINA**

**EFFECT OF OZONE GAS ON BRAZIL NUT (*BERTHOLLETIA EXCELSA* H.B.K.)
MYCOFLORA AND AFLATOXIN REDUCTION**

0307

Effect of Ozone Gas on Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) Mycoflora and Aflatoxin Reduction

Giordano, B. N. E., Simão, V. and Scussel, V. M.*

Abstract: Raw Brazil nuts grow and are harvested in the wild of the Amazon forest. At post-harvest they are submitted to two storage stages prior to their drying process. The first storage is in the forest (on pallets) and the second in cities near the Amazon River or its tributaries to be subsequently sent to the factories by boat. They are kept in wooden silos inside suspended stalls to keep them away from the environment. Despite of that, the relative forest humidity and temperature are high and suitable to fungi proliferation. The main biological factor that can affect in-shell nuts' quality during storage is fungi (deteriorating and aflatoxigenic strains) apart from forest termites. This work reports on an evaluation of ozone (O_3) gas influence on Brazil nut fungi load and its effect on aflatoxins (AFLs). Groups of in-shell Brazil nuts (14kg) from the year 2006 harvest, AFL contaminated with 5.62 (g/kg), collected in the Brazilian Amazon were submitted to O_3 treatment at different concentrations and conditions. After the gas exposure period, nuts were submitted to mycology tests, moisture and AFL analysis. Total fungi count was carried out utilizing malt extract agar and the aflatoxigenic fungi identification with *A. flavus* and *Parasiticus* agar. The nuts' moisture was determined by gravimetry and AFB₁ by high performance liquid chromatography with fluorescence-detection. As expected, the mycological tests showed that O_3 treatment affected mycoflora growth, lowering their cfu/g count and so the moisture content (from 8.2% to 5.6%). The O_3 treatment applied within 5 hours at 31 mg/L was able to successfully destroy nuts' fungi contamination (initial cfu/g: 40×10^4). Fungi reduction just after harvesting by applying O_3 will certainly reduce the possibility of further fungi proliferation and so AFL formation. From a food quality and safety point of view, prevention is a better strategy than detoxification which is much more complicated and so are the implications towards human and animal health.

Key words: Brazil nut, ozone, post-harvest, mycoflora, aflatoxin

Introduction

Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl.) is native to the Amazon forests of South America and represents some of the oldest living tree species on earth. Many of these trees date back more than 1 100 years^[12]. Harvesting of Brazil nuts, a major non-timber forest product, not only helps in preserving the Amazon rainforest but also creates an economy on which thousands of local people depend^[3,25,26]. Brazil nut is widely recognized as the cornerstone species of the Amazonian extractive economy, and is the only internationally traded nut collected almost entirely from natural populations in mature forest^[7,24]. The occurrence of aflatoxins (AFLs) produced by *Aspergillus flavus* Link, in Brazil nuts has been confirmed in several studies^[6,36,15,5,25]. In many instances, the presence of the mycotoxins were detected on the surface of shelled nuts exhibiting visible mold growth and/or inside shriveled, cracked, or brown spot-

ted nuts^[15,8].

Several environmental factors are known to influence AFL production, but temperature and relative humidity (r. h.) are considered to be the most critical. Studies performed on hazelnuts and pistachios suggested that optimum temperature and r. h. for AFL production is 25°C to 30°C and 97% to 99%, respectively^[9,10,34,22,35]. Additional factors such as water activity, moisture content, substrate composition^[31], storage time, insect damage^[18,33], and presence of a shell^[4] also influence fungal growth and AFLs production. It is also important to recognize, however, that the interaction of all these factors may provide for varying results in regards to fungal growth and mycotoxin production even on identical substrates. The presence of AFLs is a serious concern for exporters of Brazil nuts especially since 1998, when the European Community decreased the maximum tolerance limit of total and B1 AFLs to 4 and 2 ng/g, respectively^[11]. Moreover,

* Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, P. O. Box 476, Florianópolis SC, CEP-88034-001, Brazil, vildescussel_2000@yahoo.co.uk

since temperature and r. h. are important factors for AFLs production, it is of interest to evaluate the effect of these parameters on AFLs production during storage of Brazil nuts^[24,26]. The main problems of Brazil nuts that reduces its quality and safety are fungi, AFB₁ and lipid oxidation. Since export companies must provide documentary evidence of laboratory analyses for AFB₁ and microorganisms, primary control for each nut lot is performed by sampling at the reception stage^[23].

Many physical and chemical methods such as microwave heating, treatments with ozone (O₃) (ozonation) or ammonia have been recommended for detoxification of AFLs contaminated food^[13,37,29]. Ozonation, an oxidation method, has recently been developed for the detoxification of AFLs in foods^[32]. O₃ or triatomic oxygen, is a powerful disinfectant and oxidizing agent^[20]. It reacts across the 8,9 double bond of the furan ring of AFLs through electrophilic attack, causing the formation of primary ozonides followed by rearrangement into monozone derivatives such as aldehydes, ketones and organic acids^[28]. The attractive aspect of O₃ is that it decomposes rapidly (half-life of 20-50 min) to molecular oxygen without leaving a residue^[17]. As a disinfectant, O₃ is 1.5 times stronger than chlorine and is effective over a much wider spectrum of micro-organisms^[37]. Several research studies have been undertaken to evaluate the effects of O₃ gas in reducing AFLs levels in contaminated agricultural products. Maeba et al. (1988)^[19] have confirmed the destruction and detoxification of AFB₁ and AFG₁ with O₃. AFB₁ and AFG₁ were sensitive to O₃ and degraded with 1.1 mg/L of O₃ in 5 min in model experiments. O₃ is used to preserve the quality of fruit and vegetables after harvest. Frazier and Westhoff (1988)^[14] reported that the storage period can be doubled when strawberry, raspberry, currant and apples are held in an environment including 2-3 mg/kg of O₃.

The objective of this research was to determine the influence of O₃ gas treatment on the mycoflora, moisture content and AFLs reduction in Brazil nuts.

Materials and Methods

Material

(a) **Sample:** in-shell Brazil nuts (14 kg), 2005/2006 harvest, supplied by a Brazil nuts

factory, located in Manaus city, Amazonas State (AM), Brazil. The AFL contamination was 5.62 g/kg.

(b) **Storage:** (b.1) seven vertical silos, made with vinyl polychloride (PVC) with 80 cm × 15 cm × 0.2 cm for height, diameter and width, respectively containing a lid and two apertures i. e., top and lateral - inferior of the silos, for sample collection and O₃ application, respectively. (b.2) ozoniser, Megazon (b.3).

(c) **Mycology tests:** (c.1) glassware: Erlenmeyer (2 000 mL), test tubes, Petri plates, microbiological pipettes (1, 10 mL), automatic pipette 100, 1 000 L tips, microscope slides, Drigalski agar; (c.2) culture media: malt extract agar (MEA), *A. flavus* and *A. parasiticus* agar (AFPA), peptone media, tween 80. (c.3) equipment: autoclave, oven, microscope, incubator set at 20-25°C, scale, scissors, microscope stereoscope, colonies counter and tubes racks.

(d) **Moisture content:** dissectors, microbiological oven, Fanen; analytical scale, Mettler; semi-analytical, CAB and industrial Brazil nuts cracker provided by CIEX, Manaus, AM.

(e) **Aflatoxin analysis:** LC with isocratic pump and fluorescence detector, Gilson.

Methods

(a) **Sample preparation for O₃ application:** in-shell Brazil nuts were weight and portions of 2 kg were aseptically added into the silos for O₃ treatment. Samples were collected from each silo for the following analysis: mycological, moisture content and AFLs.

(b) **Preparation of the silos:** the silos (total = 7), after cleaned up with sulphite hypochloride, were filled with the 2 kg of nuts and had tightly closed the upper part with the lid. They were divided into 4 Groups for O₃ application at different concentrations: Group I (Control = no O₃ application), Group II (O₃ = 10 mg/L), Group III (O₃ = 14 mg/L) and Group IV (O₃ = 31.5 mg/L), n = 2.

(c) **Ozone application:** after closing the upper part of the silos, O₃ gas was applied through a lower lateral aperture by means of a vacuum pump to get the following concentration in each silo: 10, 14 e 31.5 mg/L (n = 2) during 1, 3 and 5 hours and closed. The O₃ concentrations were measured utilizing the iodimetric method of APHA (1980)^[7].

(d) **Storage:** after O₃ application, silos were placed in a room with temperature and UR monitored for up to 6 months. Brazil nuts were monitored for mycological tests, moisture con-

tent as well as R. H. and temperature.

(e) **Sample collection for analysis**: samples were aseptically collected for mycology, moisture content and Afls from the top silo aperture, de-shelled and ground.

(f) **Analysis**: (f. 1) **Mycology**: 225 mL of peptone media (0.1% com Tween 80) were added to 25 g portions of ground Brazil nuts, shake and 0.1 mL applied on the surface of MEA media. After their incubation at 25°C for 7 days the fungi total colonies count was carried out. The fungi identification were carried out utilizing AFPA media and their strains toxigenicity checked utilizing the Machida & Saito (1999) method. (f. 2) **Moisture content**: by gravimetry. 5 g of each Group of Brazil nuts were taken to a drying oven with temperature of 105°C up to constant weight (AOAC, 2005).

(f. 3) **Relative humidity and temperature**: temperature and r. h. were monitored utilizing thermometer and hygrometer, respectively. (f. 4) **Aflatoxins**: by high performance liquid chromatography with fluorescence-detection HPLC/FD - (AOAC, 2005).

Results and Discussion

As expected, the mycological tests showed that O₃ treatment affected mycoflora growth, lowering their cfu/g count and so the moisture content (from 8.2% to 5.6%). The O₃ treatment applied in 5 hours at 31 mg/mL was able to successfully destroy fungi contamination in the nuts (initial cfu/g: 40 × 10⁴). As far as aflatoxicity is concerned, according to Saito & Machida (1999) [30], in order to identify the trains toxigenicity when utilizing the AFPA media, its (the media) reverse should present an orange colour. In our experiment the media turned orange-aflatoxicogenic fungi genera *Aspergillus* detected-only in the Control Group nuts. From the nuts further O₃ gas treated i. e., Groups T2 to T4 no aflatoxicity was detected in any of the isolated strains thus, showing that the gas treatment was efficiently able to destroy them. O₃ gas produces a progressive oxidation of the cell vital components leading to apoptosis [16]. Table 1 shows the different strains of *Aspergillus* and *Penicilium* as well other genera isolated from the nuts. No AFLs were also detected in the nuts samples after O₃ gas treatment. To reduce yeast/mould activity, O₃ could be applied either for longer periods at low concentration, or conversely, for short period with higher concentrations. Literature studies show

that low concentrations and long exposure times were usually preferred for O₃ applications. In the study of Palou et al. (2002) [27] with the peaches cultivars Elegant Lady, they were treated for a four week period by O₃ at 0.3 mg/L concentration in cold storage conditions at 5°C temperature and 90% r. h. Fungi reduction just after harvesting by applying O₃ will certainly reduce the possibility of further mycelia proliferation and so AFL formation.

As far as moisture content is concerned, variations were observed between Groups: the Control and the three treated Groups with different concentrations and exposition time to O₃. The treated Brazil nuts (Groups T1, T2 e T3) presented lower moisture content than the Control Group (Table 2), either in - shell or shelled ones, with an average of moisture reduction of 18.13 to 21.63% and 22.76 to 28.59% of the initial moisture content, respectively. Considering the shelled Brazil nuts, where the moisture loss is more intense due to the lack of shell protection, it was observed that although Groups: T1 (exposition of 2 hs at 10 mg/L of O₃) and the T2 (exposure of 3 hs at 14mg/L of O₃) presented much lower moisture content (3.97%, 3.94%, respectively), the difference was more intense in Group T3 of 5 hs of exposure to the gas and 31.5 mg/L of O₃, a higher concentration applied, reaching 3.67%. Fig. 1 shows clearly that a reduction on the moisture content by the O₃ treatment was observed from the third treatment (Group T3) onwards.

This work is part of a Research Project on "Methodology Development for Reduction and Control of AFLs in Stored Brazil Nuts" that has been developed in the Food and Technology Department of the Federal University of Santa Catarina, Brazil.

Conclusion

It can be concluded that a minimum of five hours O₃ treatment at 31.5mg/L could be successfully used for reducing the microbial count of Brazil nuts. O₃ reduced fungal growth and so AFLs in Brazil nut, consequently, that treatment could be an effective method for reduction of nut deterioration and so the AFLs contamination risk in the market. By destroying yeast and moulds just after harvesting will certainly reduce the possibility of AFLs formation before the next processing steps. On the other hand sensitivity of fungi to O₃ could be influenced by

other factors including location of fungi in the nut and interactions among the different parameters. O₃ could be used in packaged nuts, as long as proper method such as hermetic or vacuum resistant materials can be applied. From a food quality and safety point of view prevention is a better strategy than detoxification which is much more complicated and so the implications to human and animal health. Despite of the findings, there is a need of more studies, especially in pilot plants and application in larger amounts of nuts under the environment of Amazon forest in order to establish the optimal and practical O₃ gas concentration and the time of exposure for maximum reduction either of deteriorating or aflatoxigenic fungi growth and so moisture content and AFLs contamination.

Referenes

- [1] Ala M. Ozone and ozone treatment in the fruit juice industry. *Gida Teknolojisi*, 2001, 5: 59 - 65
- [2] American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and was and wastewater. 15 ed. Washington; American Public Health Association, 1980
- [3] Arrus K, Blank G, Abramson D, Clear R, Holley R A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of Stored Products Research*, 2005, 41: 513 - 527
- [4] Ayerst G, Budd D. Effect of moisture content on the storage of Brazil nuts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1960, 11: 390 - 396
- [5] Caldas W, Silva S, Oliveira J. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saude humana (Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health). *Revista de Saude Publica*, 2002, 36: 319 - 323
- [6] Castrillon A L, Purchio A. Ocorrencia de aflatoxinas do Para (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl., 1808) (Aflatoxin occurrence in Brazil nuts). *Acta Amazonica*, 1988, 18: 49 - 56
- [7] Clay J W. 1997. Brazil nuts: the use a keystone species for conservation and development. In: Freese, C. II. (Ed), *Harvesting Wild Species: Implications for Biodiversity Conservation*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, MD. USA, pp. 246 - 282
- [8] De - Mello Robert R, Scussel V - M. Characteristics of in - shell Brazil nuts and their relationship to aflatoxin contamination; criteria for sorting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55: 9305 - 9310
- [9] Diener U L, Davis N D. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 1966, 56: 1390 - 1393
- [10] Diener U L, Davis N D. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. *Journal American Oil Chemists' Society*, 1967, 44: 259 - 263
- [11] European Commission. Commission Regulation (EC) No. 1525/98 of July 1998, amending Regulation (EC) 194/97 of 31 January 1997 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, 1998, 201: 43 - 46.
- [12] FAO, 1995. Edible nuts. Non - wood forest products. No. 5. Food and Agriculture Organization of the United Nations; Rome
- [13] Farag R S, Rashed - M M, Abo - Hgger A A A. Aflatoxin destruction by microwave heating. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1996, 47: 197 - 208
- [14] Frazier W C, Westhoff D C, 1988. *Food Microbiology*. McGraw - Hill Book Company, New York
- [15] Freire F das C O, Kozakiewicz Z, Paterson R R M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, 2000, 149: 13 - 19
- [16] Guzel - Seydim Z B, Greene A K, Seydim A C. Use of ozone in food industry. *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie*, 2004, 37: 453 - 460
- [17] Kells A A, Mason L J, Maier D E, Wolushuk C P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. *Journal of Stored Products Research*, 2001, 37: 371 - 382
- [18] Lynch R E, Wilson D M. Enhanced infection of peanut, *Arachis hypogae* L., seeds with *Aspergillus flavus* group fungi due to external scarification of peanut pods by the lesser cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller). *Peanut Science*, 1991, 18: 110 - 116
- [19] Maeba H, Takamoto Y, Kamimura M, Miura T. Destruction and detoxification of aflatoxins with ozone. *Journal of Food Science*, 1988, 53: 667 - 668
- [20] McKenzie K S, Sarr A B, Maymura K, Bailey R H, Miller D R, Rogers T D, Norred W P, Voss K A, [21] Plattner R D, Kubena L F, Phillips T D. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology*, 1997, 35: 807 - 820
- [22] Northolt M D, Verhulsdonk C A H, Soentoro P S S, Paulsch W E. Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Milk and Food Technology*, 1976, 39: 170 - 174
- [23] Oztekin S, Zorlugen B Zorlugen F K. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. *Journal of Food Engineering*, 2006, 75: 396 - 399
- [24] Pacheco A M, Scussel V M. 2006. *Castanha do Brasil da Floresta ao Consumidor*. Ed. Edigrafraff, 174 pp
- [25] Pacheco A M, Scussel V M. Is there a connection between selenium and aflatoxins in Brazil nuts *International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*. Istanbul, Turkey. 21

- 25, May, 2007a
- [26] Pacheco A M, Scussel V M. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Amazon basin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007b, 55:11087 – 11092
- [27] Palou L, Crisosto C H, Smilanick J L, Adaskaveg J E, Zoffoli J P. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physical responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 2002, 24:39 – 48
- [28] Proctor A D, Ahmedna M, Kumar J V, Goktepe I. Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. *Food Additives and Contaminants*, 2004, 21:786 – 793
- [29] Prudente Jr A D, King J M. Efficacy and safety evaluation of ozonation to degrade aflatoxin in corn. *Journal of Food Science*, 2002, 67:2866 – 2872
- [30] Saito M, Machida S. A rapid identification method for aflatoxin – producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience*, 1999, 40:205 – 208
- [31] Sakai T, Sugihara K, Kozuka H. Growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* in plant materials. *Journal of Hygienic Chemistry*, 1984, 30:62 – 68
- [32] Samarajeewa U, Sen A C, Cohen M D, Wei C I. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *Journal of Food Protection*, 1990, 53:489 – 501
- [33] Schatzki T F, Ong M S. Dependence of aflatoxin in almonds on the type and amount of insect damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49:4513 – 4519
- [34] Schindler A F, Palmer J, Eisenberg W. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. *Applied Microbiology* 1967, 15:1006 – 1009
- [35] Simsek O, Arici M, Demir C. Mycoflora of hazelnut (*Corylus avellana* L.) and aflatoxin content in hazelnut kernels artificially infected with *Aspergillus parasiticus*. *Nahrung*, 2002, 46:194 – 196
- [36] Steiner W E, Brunschweiler K, Leimbacher E, Scheneider R. Aflatoxins and fluorescence in Brazil nuts and pistachio nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40:2453 – 2457
- [37] Xu A. Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. *Food Technology*, 1999, 53:58 – 62

Table 1.- Effect of different ozone gas concentrations and time of exposure on fungi development on in-shell and shelled Brazil nuts

Media	Fungi growth								
	Control In-shell	Treatment 1			Treatment 2			Treatment 3	
		Shelled	In-shell	Shelled	In-shell	Shelled	In-shell	In-shell	Shelled
MEA									
10 ⁻¹	<i>A. flavus</i> (1) <i>A. parasiticus</i> (2) Yeasts (nbc)	<i>P. crustosum</i> (nbc) Yeasts (nbc)	<i>A. N ger</i> (1) Yeast (8)	Yeast (6) <i>P. nalgioyense</i> Laxa (1)	Yeast (nbc) Yeast (6)	Yeast (6) <i>Rhizopus stonifer</i> (Ehrenb) Lind. (1) <i>P.</i> <i>nalgioyense</i> Laxa (2)	Yeast (1) Yeast (1)	Yeast (1) Yeast (1)	Yeast (1) Yeast (1)
10 ⁻²	<i>Sycephalastrum</i> <i>recessosum</i> Cohn (1) <i>A. ochraceus</i> (1) Yeast (30)	<i>P. crustosum</i> (20) <i>A. versicolor</i> (25) Yeasts (15)	<i>A. . versicolor</i> Yeasts (4)	Yeast (6)	Yeast (6) <i>P. corylophilum</i> Dierckx (3)	<i>Byssochlamys</i> <i>s nivea</i> Westling (1)	Yeast (1)	<i>Byssochlamys</i> <i>s nivea</i> Westling (1)	Yeast (1) Yeast (1)
10 ⁻³	Yeast (10)	Yeast (4)	Yeast (3)	Yeast (1)	Yeast (3)	<i>P. nalgioyense</i> Laxa (3)	Yeast (1)	NG	NG
10 ⁻⁴	Yeast (4)	Yeast (2)	<i>Byssochlamys nivea</i> Westling (1)	NG*	NG*	NG	NG	NG	NG
AFPA									
10 ⁻¹	<i>A. parasiticus</i> (4) <i>A. flavus</i> (2) <i>Cladosporium</i> <i>Sphaerospermum</i> Penzig (1)	<i>A. parasiticus</i> (1), <i>A. sydowii</i> (Bain. & Sart.) Thom & Church (2)	<i>A. parasiticus</i> (1)	<i>Cladosporium</i> <i>Sphaerospermum</i> Penzig (5)	<i>Cladosporium</i> <i>Sphaerospermum</i> Penzig (1)	NG	<i>Cladosporium</i> <i>Sphaerospermum</i> Penzig (1)	NG	NG
10 ⁻²	NG	<i>Cladosporium</i> <i>Sphaerospermum</i> Penzig (1)	NG	NG	<i>Cladosporium</i> <i>Sphaerospermu</i> m Penzig (1)	NG	NG	NG	NG
10 ⁻³	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG
10 ⁻⁴	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG

* no microorganisms growth was observed

Table 2. Moisture content of Brazil nuts after ozone treatment

Group	O ₃ treatment		Brazil nuts moisture content			
	Time (min.)	Concentration (mg/L)	In-shell(%)		Shelled(%)	
			Nuts	Reduction	Nuts	Reduction
C ^a	Zero	Zero	9.43	NA ^b	5.14	NA ^b
T1	120	10	7.72	21.63	3.97	22.76
T2	240	14	7.44	21.10	3.94	23.35
T3	300	31.5	7.39	18.13	3.67	28.60

^a control ^b not applicable

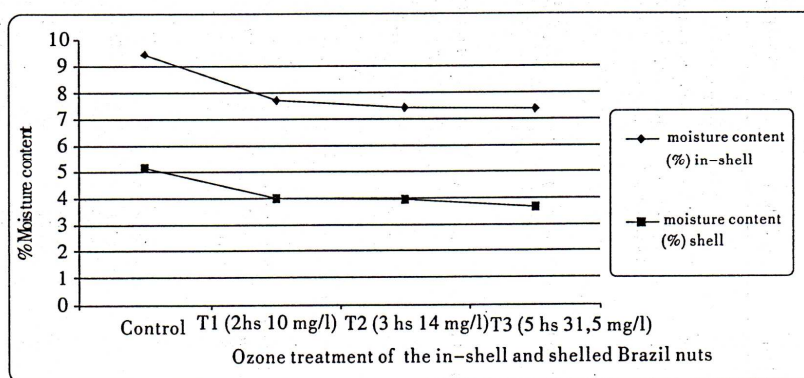


Fig. 1 Moisture content of in-shell and shelled Brazil nuts after treatment with different ozone concentrations

APÊNDICE C

TRABALHOS APRESENTADOS NO XVI ENCONTRO NACIONAL E III CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 19 A 23 DE JULHO DE 2009, BELO HORIZONTE

I SUSCETIBILIDADE DO *ASPERGILLUS FLAVUS* E *PARASITICUS* EM CASTANHAS-DO-BRASIL COM CASCA TRATADAS COM OZÔNIO E EMBALADAS À VÁCUO

II ESTUDO DA ESTABILIDADE LIPÍDICA NA ARMAZENAGEM DA CASTANHA-DO-BRASIL COM CASCA TRATADAS COM OZÔNIO E EFEITOS NAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS

SUSCETIBILIDADE DO *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* EM CASTANHAS-DO-BRASIL COM CASCA TRATADAS COM OZÔNIO E EMBALADAS À VÁCUO

*GIORDANO, B.N.E.¹; MANFIO, D.²; GALVÃO, S.³; PANINI, R.L.⁴; MOECKE, E.⁵; SCUSSEL, V.M.⁶

¹Bolsista CAPES, Discente de Mestrado em Ciências dos Alimentos (CAL/CCA/UFSC);²Mestrando em Ciência dos Alimentos (CAL/CCA/UFSC);³Estagiárias (CAL/CCA/UFSC); ⁵Coordenadora do Laboratório de Microscopia- NUMIC(CAL/CCA/UFSC);⁶Profa Dra, Laboratório de Micotoxicologia e Contaminantes Alimentares –LABMICO, Depto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (CAL/CCA/UFSC). Endereço: Rod Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, Florianópolis-SC, CEP 88034-001; *e-mail do autor para correspondência – bagiordano@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As castanheiras são árvores nativas da floresta amazônica. Tem sido relatada em seus frutos (castanhas-do-Brasil) a ocorrência de aflatoxinas (AFLs) produzidas por espécies de *Aspergillus* (OLSEN et al., 2008; PACHECO & SCUSSEL, 2009). Fungos podem crescer tanto na casca quanto entre a casca e a amêndoa (CONFORCAST, 2008) devido à penetração de seus esporos através do opérculo e de rachaduras da casca, podendo assim produzir as AFLs (De MELLO & SCUSSEL, 2007; XAVIER & SCUSSEL, 2008). O ozônio (O₃) é um gás recomendado na armazenagem de grãos e também para alimentos em geral, pois não deixa qualquer resíduo devido a sua rápida decomposição. Um dos principais efeitos do O₃ na fase pós-colheita é a prevenção e diminuição do crescimento fúngico (PALOU et al., 2002). Alimentos tratados com O₃ devem ser embalados utilizando métodos adequados, tais como armazenamento hermético ou à vácuo (OZTEKIN et al. 2006).

2. OBJETIVO

Avaliar a ação O₃ sobre a microbiota bem como nas espécies *A. flavus* e *parasiticus*, e AFLs em castanha-do-Brasil com casca embaladas à vácuo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: castanha-do-Brasil com casca, Tipo Médio (comprimento: 40 - 50 mm) para Exportação, (carga fúngica, conteúdo de umidade e AFLs previamente avaliados = 6,9 x 10⁴ cfu/g, 9,37 e 11.58%, respectivamente). *Preparo da amostra:* as castanhas foram assepticamente divididas em porções de 200 g, tratadas com O₃ e embaladas à vácuo utilizando embalagem (10 x 20 cm, altura e largura) com baixa permeabilidade à O₂. *Tratamento com O₃:* O gás foi aplicado nas castanhas antes de embalar até atingir a concentração de 31,5 mg/L (tempo: 5 hs) Grupo I. Em seguida foram colocadas assepticamente em embalagens previamente preparadas, submetidas ao vácuo e rapidamente seladas por aquecimento (n=2). Controle: Grupo II sem O₃/com vácuo. *Armazenagem:* Em estufa DBO à 26°C por 2 meses (dez./2008 a fev./2009).

Amostras foram coletadas a cada 30 dias para análises. *Micologia*: (a) *contagem de fungos totais* com extrato de malte (MEA) (PIT & HOCKING, 1997) e (b) *isolamento de cepas aflatoxigênicas* verificadas utilizando o método AFPA para *A. flavus* e *A. parasiticus* (PITT et al., 1983). *Aflatoxinas*: por LC/FD, ex.330; em.460 nm (SOBOLEV, 2007). LOD 0.25; 0.08; 0.25 and 0.08 µg/kg e LOQ 0.50; 0.17; 0.50 and 0.17 µg/kg, para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente (d) *conteúdo de umidade*: por gravimetria (AOAC, 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados da contagem total de fungos, as espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus*, o conteúdo de umidade e AFLs das castanhas com casca tratadas com O₃, embaladas à vácuo e armazenadas estão apresentados na Tabela 1. *Fungos*: Foi observada redução na contagem total de fungos e leveduras nas castanhas com casca tratadas com O₃ quando comparadas com as do grupo Controle com vácuo. Foi observado que os pacotes de castanhas embaladas à vácuo, tanto logo após o tratamento com O₃ (conc. 31,5mg/L) (Grupo I) como durante os primeiros 30 dias de armazenagem e no final do experimento (60 dias), não apresentaram crescimento fúngico, bem como de leveduras. Isso provavelmente ocorreu, devido à uns dos principais efeitos do O₃ na fase pós-colheita: a prevenção e/ou redução de fungos através da sua destruição. Diferentemente, ocorreu com o grupo Controle que previamente apresentava $6,9 \times 10^4$ ufc/g e após embalado à vácuo não apresentaram diferença na carga fúngica nos dias de armazenagem zero, 30 e 60. *Espécies aflatoxigênicas*: Não foi observado desenvolvimento de espécies aflatoxigênicas ie., *A. flavus* e *A. parasiticus*, nas castanhas tratadas com O₃ e embaladas à vácuo, diferente do que ocorreu nas castanhas Controle, onde ocorreu desenvolvimento dessas espécies aflatoxigênicas. *Aflatoxinas*: as castanha expostas ao O₃ e embaladas à vácuo, não apresentaram AFLs detectáveis desde o dia zero até os 60 dias de armazenagem. Já no grupo Controle AFLs ainda foram detectadas, o que também ocorreu em castanhas tratadas com O₃ armazenados à granel em silos por 3 meses (GIORDANO et al., 2008). Essa redução provavelmente ocorreu devido a sua degradação causada pelo O₃. Em paralelo as castanhas embaladas sob vácuo, se mantiveram estáveis porque houve proteção contra a entrada de O₂ e umidade, não favorecendo o desenvolvimento de microrganismos. *Umidade*: As castanhas tratadas com O₃ e armazenadas em embalagem à vácuo apresentaram uma pequena redução no conteúdo de umidade: de 9,37% (sem tratamento/O₂/sem embalagem) inicial, reduziu para 9,04% após O₃ e chegando a 8,53% no final da armazenagem.

Tabela 1. Contagem total de fungos e leveduras, fungos aflatoxigênicos, conteúdo de umidade e AFLs após do tratamento com O₃ em castanha-do-Brasil armazenada por 60 dias

Armazenagem (dias)	Castanha-do-Brasil embaladas à vácuo										
	Tratamento com O ₃		Contagem total (cfu/g)		Espécies aflatoxigênicas de <i>Aspergillus</i>	Conteúdo de umidade (%)	AFLs (µg/Kg)				
	Grupo	Conc. (mg/L)	Fungos (10 ⁴)	Leveduras (10 ²)			ΣAFLs	AFB ₁	AFG ₁	AFB ₂	AFG ₂
(Grupo I) Ozônio											
0 ^a	C	ST	6,9	3,2	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	9,37	11,58	3,57	3,48	2,32	2,21
1 ^b	T	com O ₃ (31,5)	NC	NC	NC	9,04	ND	ND	ND	ND	ND
30	T	“	NC	NC	NC	8,90	ND	ND	ND	ND	ND
60	T	“	NC	NC	NC	8,53	ND	ND	ND	ND	ND
(Grupo II) Controle											
0	Sem O ₃ /com vácuo										
	Controle	“	6,9	3,2	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	9,37	11,58	3,57	3,48	2,32	2,21
30	“	“	6,8	3,0	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	8,91	11,59	3,56	3,49	2,33	2,21
60	“	“	6,9	3,1	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	8,54	11,60	3,56	3,49	2,33	2,22

^a antes do tratamento com O₃ ^b logo após o tratamento com O₃; C = controle; T = tratamento; ST = sem tratamento; NC = não cresceu; LOD 0.25; 0.08; 0.25 and 0.08 µg/kg e LOQ 0.50; 0.17; 0.50 and 0.17 µg/kg, para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂; ND= não detectado.

5. CONCLUSÃO

Pelos dados obtidos, o O₃ foi capaz de reduzir a carga fúngica e as leveduras que contaminavam a castanha e as espécies: *A. flavus* e *A. parasiticus* não obtiveram condições para crescimento. O₃ também favoreceu a degradação das AFLs e o uso de embalagem juntamente com o vácuo intensificou a ação do gás. Portanto, os métodos aplicados conjuntamente nesse estudo (O₃ + vácuo + embalagem) sugerem ser uma alternativa de controle para o embarque de castanha-do-Brasil em longas viagens durante exportação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. Nuts and Nuts Products. *Official Methods of analysis of AOAC International art. 925.40*, 18th ed. Vol II, chapter 40, 2005.
- CONFORCAST, 2008. *Plano de amostragem para castanha-do-Brasil*. Acesso em: 02/06/2008, //www.nutfruit.org.
- DE-MELLO, F.R.; SCUSSEL, V.M. Characteristics of in-shell Brazil nuts and their relationship to aflatoxin contamination: criteria for sorting. *J. Agric. Food Chem.*, v.55, p.9305-9310, 2007.
- GIORDANO, B.N.E.; SIMÃO, V.; SCUSSEL, V.M. Effect of O₃ gas on Brazil nut mycoflora and aflatoxin reduction. In: *Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*, 2008, Chengdu, China. Proc. of 8th Int. Conf. on Controlled Atmosphere & Fumigation in Stored Products. Chengdu, China, p. 214-220, 2008.
- OLSEN, M.; JOHSSON, P.; MOLLER, T.; PALADINO, R.; LINDBLAT, M. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? *J. World Myco.*, v.1, n.2, p.123-126, 2008.
- OZTEKIN, S.; ZORLUGENC, B.; ZORLUGENC, F.K. Effects of O₃ treatment on microflora of dried figs. *J. Food Eng.*, 2006, 75, 396-399.
- PACHECO, A.M.; SCUSSEL, V.M. Aflatoxin evaluation on in-shell and shelled dry Brazil nuts for export analysed by LC-MS/MS – 2006 and 2007 harvests. *World Myco. J.*, 2009, in press.
- PALOU, L.; CRISOSTO, C. H.; SMLANICK, J. L.; ADASKAVEG, J. E.; ZOFFOLI, J. P. Effects of continuous O₃ exposure on decay development and physical responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biol. and Tech.*, v.24, p.39-48, 2002.
- Pitt, J.I.; HOCKING, A.D. *Fungi and food spoilage*. 2ed. London: Blackie Academic & Professional, 593p. 1997.
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D.; Glenn, D.R. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. Appl. Bacteriol.*, v.54, p. 109-114, 1983.
- SOBOLEV, V.S. Simple, rapid, and inexpensive cleanup method for quantitation of aflatoxins in important agricultural products by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, v.55, p.2136-2141, 2007.
- XAVIER, J.J.M.; SCUSSEL, V.M. Development of LC-MS/MS method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Brazil nut. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, v.28, n.6, p.425-433, 2008.

ESTUDO DA ESTABILIDADE LIPÍDICA NA ARMAZENAGEM DA CASTANHA-DO-BRASIL COM CASCA TRATADAS COM OZÔNIO E SEU EFEITO NAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS

*GIORDANO, B.N.E.¹; MANFIO, D.²; GALVÃO, S.³; PANINI, R.L.⁴; GONZAGA, L.⁵; SCUSSEL, V.M.⁶

¹Bolsista CAPES, Discente de Mestrado em Ciências dos Alimentos (CAL/CCA/UFSC);²Mestrando em Ciência dos Alimentos (CAL/CCA/UFSC);³Estagiárias (CAL/CCA/UFSC); ⁵Laboratório de Bromatologia (CAL/CCA/UFSC);⁶Profa Dra, Laboratório de Micotoxicologia e Contaminantes Alimentares –LABMICO, Depto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (CAL/CCA/UFSC). Endereço: Rod Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, Florianópolis-SC, CEP 88034-001; *Autor para correspondência – bagjordano@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H. B. K.), também conhecida como castanha-do-pará, tem alto potencial econômico. A amêndoa contém elevado teor de lipídios, proteínas, além de fibras, vitamina E e minerais tais como fósforo, potássio, magnésio, cálcio e selênio (PACHECO; SCUSSEL, 2006). A degradação ou oxidação lipídica há muito tem sido considerada um grave problema no armazenamento de óleos e gorduras, bem como alimentos contendo lipídios. Essa oxidação produz compostos responsáveis por sabores e aromas indesejáveis no alimento, e leva à produção de compostos tóxicos (hidroperóxidos), comprometendo também a qualidade nutricional e sua aceitabilidade pelo consumidor. Um dos métodos para controlar a oxidação de óleos e gorduras comestíveis é a utilização de embalagem à vácuo para expelir o oxigênio atmosférico aumentando assim, o tempo de armazenamento. A utilização do gás O₃ juntamente com a embalagem à vácuo podem controlar a oxidação dos lipídios e reduzir a carga fúngica com possível redução de aflatoxinas (MIRALIAKBARI; SHAHIDI, 2008).

2. OBJETIVO

Estudar a influência do O₃ na estabilidade lipídica de castanhas-do-Brasil com casca, embaladas à vácuo bem como seu efeito nas características sensoriais durante armazenagem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: castanha-do-Brasil com casca. *Preparo da amostra:* as castanhas foram assepticamente divididas em porções de 200 g para serem tratadas com O₃ e embaladas à vácuo. *Tratamento com O₃:* O gás foi aplicado nas castanhas acondicionadas em um silo de PVC até atingir a concentração de 31,5 mg/L (tempo de 5 hs), colocadas assepticamente dentro das

embalagens (de baixa permeabilidade à O₂) previamente preparadas, submetidas ao vácuo e rapidamente seladas por aquecimento (n=2). *Armazenagem*: Os pacotes foram colocados em estufa DBO 26°C por 2 meses (dez./2008 a fev./2009) e coletadas a cada 30 dias para análises. *Oxidação lipídica*: método de TBA (ácido 2-tiobarbiturico) de YAACOUB et al. (2008). As castanhas foram homogenizadas com solução aquosa de TCA (ácido tricloroacético) juntamente com BHT em metanol. Após a filtração o extrato foi misturado com TBA e incubado em banho maria, após resfriamento rápido a formação da cor vermelha (complexo MDA/TBA), onde o malondialdeído (MDA) é determinado à 532 nm e expresso em equivalentes de MDA mg/kg de castanha. *Análise sensorial*: análise descritiva quantitativa (ADQ) por STONE e SIDEL (1993), realizada utilizando equipe de 18 provadores treinados em quatro sessões. As castanha-do-Brasil foram descascadas e servidas em temperatura ambiente em recipientes codificados (3 dígitos). Os 5 atributos das castanhas foram julgados. *Análise estatística*: análise de variância (ANOVA). Teste de Turkey para avaliar diferenças significativas entre as médias (P <0,05).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estabilidade lipídica: O TBA utilizado como reagente, para indicar rancidez das castanhas que contenham ácidos graxos poliinsaturados, condensa com o MDA (produto da oxidação) produzindo uma cor rosa e com aldeídos e dienos, produzindo cor laranja. No presente estudo foi observado que os valores de MDA foram constantes em todo o período de armazenagem na castanha-do-Brasil tratadas com O₃ embaladas à vácuo (Figura 1). Estes resultados podem ser atribuídos à redução da velocidade de oxidação dos lipídios contidos nas castanhas, tanto pela retirada do ar (vácuo), quanto pelo tratamento como O₃ bem como pela substituição do resíduo de O₂ (microclima) pelo O₃. Foi inclusive observado que essas castanhas embaladas à vácuo não apresentaram diferença em relação ao grupo embaladas à vácuo e sem aplicação de O₃ onde essas amostras apresentaram um pequeno aumento do MDA indicando autooxidação. Assim o ozônio, por sua vez apresentou um efeito positivo com o vácuo tanto no controle na redução da deterioração (fungos e leveduras), mantendo assim as características organolépticas das castanhas, e posteriormente a aceitação pelo consumidor.

Análise sensorial: Não foram observadas alterações significativas (p<0,05) quanto à análise sensorial no tratamento com O₃ em castanhas-do-Brasil embaladas à vácuo. Os atributos sensoriais analisados foram: aparência casca, aparência amêndoa, odor estranho, sabor residual,

odor rancido e firmeza (Figura 1). Foi observado que todos os escores às castanhas durante o tratamento nos meses de armazenamento não diferiram entre si: haviam escores entre 4 (gostei) e 5 (gostei muitíssimo), assim foi verificado que o O₃: (a) não deixa resíduos, (b) não interfere no odor natural da castanha e (c) não deixa sabor residual. Semelhantes resultados ocorreram em pimentas e pistaches após a aplicação do O₃ (YESILCIMEN e MURAT, 2006). Portanto o O₃ e vácuo mantém/aumentam a aceitação e a qualidade das castanhas armazenadas.

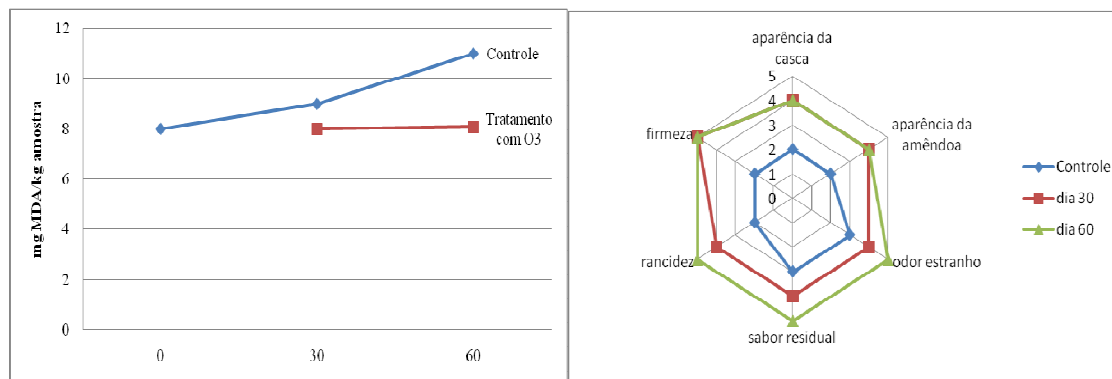


Figura 1. Efeito do tratamento com ozônio para os teores de malondialdeído (MDA) - indicador da oxidação lipídica – e na análise sensorial de castanha-do-Brasil embaladas à vácuo e armazenadas por 60 dias (resultados baseados na escala hedônica de 5 pontos - 1 desgostei muito, 2 desgostei, 3 indiferente, 4 gostei, 5 gostei muito).

5. CONCLUSÃO

O tratamento com O₃ e a utilização do vácuo nas castanhas-do-Brasil apresentaram resultados bastante satisfatórios quanto aos lipídios, que se mantiveram estáveis durante o período de armazenagem, permanecendo com o *flavor* agradável natural das castanhas. Portanto o emprego do O₃ pode ser um possível aliado à aceitabilidade da castanha-do-Brasil e ao tempo de prateleira/armazenamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MIRALIAKBARI, H.; SHAHIDI, F. **Oxidative stability of tree nut oils.** J. Agric. Food Chem. 2008, v.56, p.4751–4759.
- PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Castanha-do-Brasil: da floresta tropical ao consumidor.** Florianópolis: Editorgraf, 2006. 176 p.
- YAACOUB, R.; SALIBA, R.; NSOULI, B.; KHALAF, G.; BIRLOUEZ-ARAGON, I. **Formation of Lipid Oxidation and Isomerization Products during Processing of Nuts and Sesame Seeds.** J. Food Agric.Chem., 2008, v.56, p.7082-7090.
- STONE, H.S.; SIDEL, J.L. **Sensory evaluation practices.** Florida: Academic Press, INC, 1993. 295p.
- YESILCIMEN, A.M.; MURAT, ÖZDEMİR. **Effect of different treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios.** J. Science Food Agric., 2006, v.86, n.13, p.2099-2104.

APÊNDICE D

TRABALHOS APRESENTADOS NO WORLDWIDE MYCOTOXIN REDUCTION IN FOOD AND FEED CHAINS, 9 A 11 DE SETEMBRO DE 2009, TULLN/VIENNA, AUSTRIA

EVALUATION OF OZONE TREATMENT AND VACCUM FOR IN-SHELL BRAZIL NUTS SHIPMENT AND AFLATOXIN REDUCTION

EFFECT OF OZONE TREATMENT DURING THE IN-SHELL BRAZIL NUTS STORAGE ON MYCOFLORA, AFLATOXIN AND LIPID STABILITY

Evaluation of Ozone treatment and Vacuum for In-shell Brazil nuts Shipment and Aflatoxin Reduction

Bárbara Nantua Evangelista Giordano^a, Daniel Manfio^a, Vanessa Simao^a, Vildes Maria Scussel^a

^a Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, P.O. Box 476, Rod Admar Gomzaga 1346, Itacorubi, Florianopolis – SC, CEP 88034-001, Brazil - e-mail: vildescussel_2000@yahoo.co.uk

Fungi and aflatoxins can develop in/on in-shell Brazil nuts and methods for their prevention and reduction need to be developed. Ozone (O₃) is a gas suitable for use in storage of grains for fungi control. It is also indicated for other foods as it leaves no residue due to fast decomposition. Some papers have reported aflatoxin degradation by O₃. Therefore, a study utilizing O₃ and vacuum packaging was carried out, to find out their behavior on in-shell Brazil nuts fungi and aflatoxin degradation. It was also evaluated the effect of that treatment on nuts lipid stability and consumers acceptance after 60 days of application. In-shell Brazil nuts were O₃ treated (at 31.5 mg/L, 5h), vacuum packaged in low oxygen permeability polyethylene bags, heat sealed and stored for a period of 60 days (Group I). Two Groups of nuts were kept as Controls: without O₃ treatment but with vacuum (Group II) and no O₃ and no vacuum at all (Group III). The nuts initial fungi load: was 6.9 x 10⁴ cfu/g, moisture content: 9.37% and aflatoxins: 11.58 µg/kg. Any fungi load change (on MEA media) *Aspergillus flavus* and *parasiticus* (on AFPA media) growth/inhibition, aflatoxin presence (analyzed either in-shell and after shelling by LC/FD), lipid oxidation (TBA test) and nut acceptance/rejection by sensory evaluation (attributes: nut shell and edible part appearance, strange odor, residual taste, rancidity and firmness) were registered. Right after O₃ treatment no fungi (cfu) neither toxigenic species (*parasiticus* and/or *flavus*) of *Aspergillus* were detected on/in the nuts. Also no yeast growth was observed. The same persisted after 30 and 60 days of storage. Different behavior was observed in the Control Groups (with and without vacuum) that kept similar fungi count as the beginning of the experiment (slightly lower) probably due to lack of oxygen (micro-atmosphere) – Group II. That Control Group presented 9.8 x 10⁴ cfu at the end of the storage. On the other hand, as expected for Group III, fungi load increased quite high. With the exposure of O₃, aflatoxins were not detected neither in the 30th or 60th Day of storage up to the LOQ of the method 0.25; 0.08; 0.25 and 0.08 µg/kg. That contamination could be either due to fungi growth or to the heterogeneity of the original nut contamination. The sensory evaluation showed that nuts were still palatable and were accepted by the panelist groups, as no significant changes (p<0.05) were found between nut sensory attributes. As far as the oxidation or rancidity of lipids (TBA test) in the Brazil nuts O₃ treated and vacuum packaged are concerned the values of malonaldehyde were constant throughout the storage period. This method can be a safer alternative for shipping batches of Brazil nut (in-shell) abroad. It can prevent and control fungi and aflatoxins, at the same time, it maintains nut sensory acceptance. Trips to foreigner countries can be long reaching 3 to 4 weeks thus keeping nuts safer/stable during the journey. A study on packaging material will be a future work to be carried out.

Effect of Ozone Treatment During the In-shell Brazil nuts Storage on Mycoflora, Aflatoxin and Lipid Stability

Bárbara Nantua Evangelista Giordano^a, Vildes Maria Scussel^a

^a Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, P.O. Box 476, Rod Admar Gomzaga 1346, Itacorubi, Florianopolis – SC, CEP 88034-001, Brazil - e-mail: vildescussel_2000@yahoo.co.uk

As for other nuts (hazelnuts, pistachio, walnuts and pecans), aflatoxins (AFLs) can also be found in in-shell Brazil nuts and are produced by fungi species of *Aspergillus*. The storage is one of the stages of in-shell Brazil nuts fungi proliferation (Safe Nut, 2008). Thus there is a need of finding alternatives for long term in-shell Brazil nuts storage. There have been reports of the ozone (O₃) use for controlling bacterial and fungi proliferation on several foods as well on AFLs degradation. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of O₃ gas on the mycoflora, species of *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*), AFLs, lipids as well as its effect on the sensorial attribute of *in-shell* Brazil nuts stored for 180 days. Groups of *in-shell* Brazil nuts, were submitted to O₃ atmosphere at different concentrations and stored. Samples were collected just after the gas exposure and every 30 days during the storage period, for mycological tests and analysed for, AFLs, lipid oxidation (2-thiobarbituric acid-TBA-test) and sensory evaluation with 18 trained panelists. The O₃ treatment affected the mycoflora growth, lowering their total count and so the moisture content (from 9.43 to 11.58 %) similar the findings of Giordano et al, 2008. The O₃ treatment applied within 5 hours at 31 mg/L was able to successfully destroy nuts fungi contamination (initial cfu/g: 6.9x10⁴) since Day One and so the *Aspergillus*, species. On the other hand, those species were still able to grow when the O₃ at 14 mg/L concentration was applied in the nuts silo, up to the 30th day of storage. That fungi reduction just at the beginning of storage by applying O₃ (31 mg/L) will certainly reduce the possibility of further fungi proliferation and so AFLs formation. As far as lipid oxidation (TBA test) and sensory evaluation are concerned, from the data obtained it was not observed significant changes after the O₃ treatments and times of storage. AFLs presented degradation with O₃ 14 mg/L after 30 day of storage. In conclusion, O₃ can be a safer alternative for shipping batches of Brazil nut (in-shell) abroad as well as for controlling fungi proliferation/AFLs production during storage in the Amazon environment conditions.

ANEXOS

ANEXO A

PORTARIA N.846, DE 08 DE NOVEMBRO DE 1976.

**ESPECIFICAÇÕES PARA PADRONIZAÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E
COMERCIALIZAÇÃO INTERNA DA CASTANHA-DO-BRASIL (*BERTHOLLETIA
EXCELSA* H.B.K.)**

Especificações para padronização, classificação e comercialização interna da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), aprovadas pela portaria Ministerial nº 846 de 08 de 11 de 1976, em observância ao disposto no artigo 39, Ministério da Agricultura, item VIII, do Decreto-Lei nº 200, de 25 de fevereiro de 1967, e com vistas ao que prescreve o art. 1º do Decreto nº 69.502, de 05 de novembro de 1971.

DA PADRONIZAÇÃO

Art. 1º. A castanha do Brasil, conhecida no mercado internacional como Brazil nuts ou noix du Brésil, semente do castanheiro (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), da família das Lecythidáceas, será classificada em grupos, subgrupos, classes e tipos, segundo sua forma de apresentação, preparo ou manipulação, tamanho e qualidade.

DOS GRUPOS E SUBGRUPOS

Art. 2º. A castanha do Brasil, segundo sua forma de apresentação, será ordenada em 2 (dois) grupos, assim denominados:

I – Castanha em Casca: É o produto que se apresenta no estado que foi colhido, extraído ou ouriço, limpo e seco naturalmente ou por processo de desidratação adequado.

II – Castanha Descascada ou Beneficiada: É o produto limpo, seco e são, que por processos tecnológicos adequados, teve retirada sua casca.

Art. 3º. A castanha em casca, segundo o seu preparo ou processo de manipulação, será classificada em 3 (três) subgrupos:

I – Natural: É o produto “in natura”, sem ter sido submetido a qualquer processo de desidratação artificial, apenas limpo e seco naturalmente.

II – Desidratado: É o produto que foi submetido simplesmente ao processo artificial de desidratação, teve o seu teor de umidade compreendido entre 11% (onze por cento) e 15% (quinze por cento), no máximo.

III – Desidratado Polido: É o produto que, depois de desidratado, foi submetido ao processo de polimento, objetivando melhoria de sua apresentação e conservação.

Art. 4º. A castanha descascada ou beneficiada, segundo seu preparo ou processo de manipulação, será classificada em 2 (dois) subgrupos:

I – Amêndoa com Película: É o produto que se apresenta total ou parcialmente revestido de película.

II – Amêndoa sem Película: (Brancheada): É o produto que, após ter sido submetido a processo químico, se apresenta totalmente desprovido de película.

DAS CLASSES

Art. 5º. A castanha em casca, quando “in natura”, do subgrupo Natural, será classificada segundo o seu tamanho, caracterizado pelo número de unidade/castanha por 453 gramas, em 6 (seis) classes:

I – Extra Grande (extra-large): É o produto que contiver menos de 36 unidades/castanha por 453 gramas.

II – Grande (large): É o produto que contiver de 36 a 40 unidades/castanha por 453 gramas.

III – Semigrande (weak-large): É o produto que contiver de 41 a 45 unidades/castanha por 453 gramas.

IV – Extra Média (extra-medium): É o produto que contiver de 46 a 50 unidades/castanha por 453 gramas.

V – Média (medium): É o produto que contiver de 51 a 58 unidades/castanha por 453 gramas.

VI – Pequena (small): É o produto que contiver acima de 58 unidades/castanha por 453 gramas.

Art. 6º. A castanha em casca dos subgrupos Desidratado e Desidratado Polido será classificada segundo seu tamanho, caracterizado na forma do artigo anterior, em 6 (seis) classes:

I – Extra Grande (extra-large): É o produto que contiver menos de 46 unidades/castanha por 453 gramas.

II – Grande (large): É o produto que contiver de 46 a 50 unidades/castanha por 453 gramas.

III – Semigrande (weak-large): É o produto que contiver de 51 a 55 unidades/castanha por 453 gramas.

IV – Extra Média (extra-medium): É o produto que contiver de 56 a 62 unidades/castanha por 453 gramas.

V – Média (medium): É o produto que contiver de 57 a 68 unidades/castanha por 453 gramas.

VI – Pequena (small): É o produto que contiver acima de 68 unidades/castanha por 453 gramas.

Art. 7º. A castanha descascada ou beneficiada dos Subgrupos Amêndoa com Película e Amêndoa sem Película (Brancheada) será classificada segundo seu tamanho, caracterizado na forma do disposto no artigo 5º e, simultaneamente, de acordo com a natureza a que for o produto enquadrado (inteira, ferida ou quebrada), em 8 (oito) classes:

I – Miudinha (tiny): É o produto que contiver acima de 180 unidades/amêndoa por 453 gramas.

II – Miúda (midget): É o produto que contiver de 160 a 180 unidades/amêndoa por 453 gramas.

III – Pequena (small): É o produto que contiver de 140 a 159 unidades/amêndoa por 453 gramas.

IV – Média (medium): É o produto que contiver de 115 a 139 unidades/amêndoa por 453 gramas.

V – Extra Média (extra-medium): É o produto que contiver de 102 a 114 unidades/amêndoa por 450 gramas.

VI – Grande (large): É o produto que contiver menos de 102 unidades/amêndoa por 453 gramas.

VII – Ferida (chipped): É o produto que se apresente com as amêndoas lascadas e/ou mutiladas por escoriações, oriundas de agente físico.

VIII – Quebrada (broken): É o produto que apresenta com as amêndoas fragmentadas, partidas e/ou quebradas.

DOS TIPOS

Art. 8º. A castanha em casca será classificada, segundo a qualidade, respeitado o subgrupo e a classe a que pertencer, em um único tipo; constituído de castanhas perfeitamente desenvolvidas, de cor natural; de tamanho e uniformidade correspondentes à classe a que forem enquadradas; limpas; secas, em boas condições de sanidade e isentas de matérias estranhas.

Tolerância: Máximo de 10% (dez por cento) de castanhas danificadas e/ou defeituosas, e 2% (dois por cento) de impurezas próprias do produto para a castanha natural; sendo, quando desidratada e desidratada polida, de 7% (sete por cento) e 1% (um por cento), no máximo, respectivamente.

Art. 9º. A castanha descascada ou beneficiada será classificada, segundo a qualidade, respeitado o subgrupo e a classe a que pertencer, em um único tipo: constituído de amêndoas de cor natural; de tamanho e uniformidade correspondentes à classe a que forem enquadradas, em boas condições de sanidade; livre de amêndoas rancificadas, e isentas de matérias estranhas.

Tolerância: Máximo de 1% (um por cento) de impurezas próprias do produto. Parágrafo único – As amêndoas das Classes VII (Ferida) e VIII (Quebrada) serão respectivamente classificadas, segundo a qualidade, respeitado o subgrupo a que pertencer, em um único tipo: constituído de

amêndoas, correspondentes à classe a que forem enquadradas, de cor natural, em boas condições de sanidade, livre de amêndoas rancificadas e isentas de matérias estranhas.

Tolerância: Máximo de 2% (dois por cento) de impurezas próprias de produto, inclusive resíduo e/ou pó.

ABAIXO DO PADRÃO

Art. 10. A castanha de qualquer grupo, respeitadas os respectivos subgrupos e as respectivas classes, que pelos seus atributos não se enquadrar no tipo descrito, será considerada Abaixo do Padrão, desde que se apresente em bom estado de conservação.

§ 1º. A castanha assim classificada poderá, conforme o caso, ser rebeneficiada ou submetida à secagem, para efeito de se enquadrar no tipo descrito, observando os artigos 8º, 9º e 10.

§ 2º. É permitido, quando no ato da inspeção e de rebeneficiamento ou secagem do produto, a recomposição (loteamento) e o desdobramento dos lotes.

§ 3º. Deverão constar, obrigatoriamente, no Certificado de Classificação, os motivos que deram lugar à denominação Abaixo do Padrão.

DECLASSIFICAÇÃO

Art. 11. Será desclassificado a castanha de qualquer grupo que apresente:

- a). Mau estado de conservação;
- b). Aspecto generalizado de mofo e/ou fermentação;
- c). Odor estranho de qualquer natureza, impróprio ao produto, prejudicial a sua utilização normal;
- d). Presença de insetos vivos.

Parágrafo Único - Serão declarados, obrigatoriamente, no Certificado de Classificação, os motivos que deram lugar a Desclassificação.

Art. 12. Toda a castanha em que for verificada a presença de insetos vivos, só poderá ser comercializada depois de expurgada, medida esta prescrita pela autoridade fitossanitária competente, que expedirá o respectivo Certificado, respeitada a legislação vigente.

DA AFLATOXINA

Art. 13. Quando exigido em cláusula contratual, a castanha, de qualquer grupo, só poderá ser comercializada internamente, mediante apresentação do certificado de isenção de aflatoxina.

Parágrafo único - Será considerado isento de aflatoxina o produto que presença dessa toxina até um limite máximo de 50 p.p.b. (cinquenta partes por bilhão).

DA AMOSTRAGEM

Art. 14. A retirada ou extração de amostra será procedido do seguinte modo:

- a). Nos lotes de castanha em casca natural, quando à granel, far-se-á extração de amostra do alto, do meio e das laterais do lote ou tulha, em quantidade que represente a totalidade de castanha a ser classificada, nunca inferior a 10 (dez) quilograma por tonelada do produto.
- b). Nos lotes de castanha em casca natural ou desidratada, quando ensacada, far-se-á extração de amostra ao acaso, em quantidade mínima correspondente a 10% (dez por cento) do total do lote a ser classificado.
- c). Nos lotes de castanha descascada ou beneficiada (amêndoa) encaixotada, far-se-á extração de amostras, obedecendo ao seguinte critério:

Lote de até 5 (cinco) caixas: amostra média de 1 (uma) unidade (caixa);

Lote de 6 (seis) a 100 (cem) caixas: 10% (dez por cento) do lote, com um mínimo de 5 (cinco) unidades (caixa);

Lote acima de 100 (cem) caixas: 5% (cinco por cento) do lote, com um mínimo de 10 (dez) unidades (caixa).

DA ANÁLISE

Art. 15. As amostras extraídas segundo os processos descritos no artigo anterior, serão homogeneizadas, divididas em 3 (três) ou mais exemplares com o pese

mínimo de 500 (quinhentos) gramas cada, as quais serão acondicionadas em saquinhos de papel, plástico ou similar, devidamente identificadas, sendo 2 (duas) destinadas, obrigatoriamente, ao órgão classificador.

Parágrafo Único – Para fins de fiscalização, a extração de amostra e sua embalagem serão idênticas ao estabelecido nos artigos 14 e 15.

DA EMBALAGEM E MARCAÇÃO

Art. 16. A castanha em casca, quando não embarcada a granel, e a castanha descascada ou beneficiada (amêndoa), deverão ser acondicionadas em embalagens apropriadas e em lotes uniformes.

§ 1º - No caso específico de castanha descascada ou beneficiada (amêndoa), seu acondicionamento deverá simultaneamente ser feito mediante injeção de gás inerte na respectiva embalagem, objetivando preservar a conservação do produto.

§ 2º - As embalagens avariadas durante o transporte deverão ser substituídas ou reparadas com material idêntico.

§ 3º - A embalagem de castanha será obrigatoriamente marcada de acordo com a legislação específica em vigor.

§ 4º - A marcação de embalagem será procedida mediante o emprego de tintas que não afetem sua qualidade.

DO AMARZENAMENTO E MAIOS DE TRANSPORTE

Art. 17. O depósito para armazenamento da castanha e os meios para seu transporte devem oferecer plena segurança e condições técnicas imprescindíveis à sua perfeita conservação, respeitadas as exigências da legislação específica vigente.

DA FRAUDE

Art. 18. Considera-se fraude toda alteração dolosa de qualquer natureza praticada não só na classificação e no acondicionamento, como também nos documentos da qualidade da castanha, conforme legislação vigente.

NORMAS GERAIS

Art. 19. As normas e termos adotados nas presentes especificações assim como as características relacionadas com a qualidade da castanha deverão ser observadas e interpretadas do seguinte modo, e de acordo com o apêndice incluso:

Castanha Defeituosa: Castanha em casca, amêndoas e fragmentos de amêndoas que se apresentem carunchados, mofados, rancificados.

Coloração: Cor uniforme e característica do produto.

Corte: Operação que compreende na abertura da castanha em casca, para exame do estado em que se encontra sua amêndoa.

Danificada: Castanha em casca, amêndoas e pedaços de amêndoas que se apresentem com danos causados por agentes biológicos (carunchos, roedores, insetos e outros).

Impurezas: Detritos do próprio produto, tais como haste, pó e casca.

Matérias Estranhas: Detritos de qualquer natureza, estranhos ao produto tais como: areia, fragmentos de madeira, pedra, torrões, sementes estranhas, sujidades, restos de insetos.

Mofada: Castanha em casca, amêndoa e fragmentos de amêndoa, que apresentem, a olho nu, filamentos de fungos.

Odor Estranho: Aroma não peculiar ao produto.

Quebrado: Peça ou fragmento de amêndoa, qualquer que seja o seu tamanho.

Rancificada: Amêndoa que apresenta cor anormal, odor e sabor desagradáveis, devido às características físico-químicas do óleo terem se alterado por processo oxidativo.

Teor de Umidade: Percentual de água contida na castanha ou na amêndoa, determinado através de processos reconhecidos oficialmente.

DISPOSIÇÕES GERAIS

Art. 20. O Certificado de Classificação será válido pelo prazo de 90 (noventa) dias para a castanha em casca natural, e de 150 (cento e cinquenta) dias para a castanha em casca desidratada, e descascada ou beneficiada (amêndoa), contados, respectivamente, da data de sua emissão.

Parágrafo Único – Deverão constar do Certificado de que trata o presente artigo a indicação do grupo, subgrupo, classe, tipo e ano da safra a que pertencer o produto, sendo que no caso de mistura de castanha de safras colhidas em anos diferentes prevalecerá a anotação da mais antiga.

Art. 21. As determinações físico-químicas, serão aquelas obtidas em laboratórios devidamente credenciados.

Art. 22. Os métodos de análises para a determinação dos teores de umidade e aflatoxina serão os de validade reconhecido no mercado, tanto interno como externo.

Art. 23. Os casos omissos serão resolvidos pelo órgão técnico competente do Ministério da Agricultura.

ANEXO B

PORTARIA N.85, DE 06 DE MARÇO DE 2002.

**ANEXO VIII – REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E DE QUALIDADE
PARA A CLASSIFICAÇÃO DAS CASTANHAS-DO-BRASIL**

ANEXO VIII
REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E DE QUALIDADE PARA A
CLASSIFICAÇÃO DA CASTANHA DO BRASIL

1.OBJETIVO:

O presente Regulamento tem por objetivo, definir as características de identidade e de qualidade para fins de classificação da Castanha do Brasil.

2.ÂMBITO DE APLICAÇÃO:

Este Regulamento Técnico será aplicado para atender a obrigatoriedade de classificação prevista nos incisos I, II e III, do Art. 1º, da Lei n.º 9.972, de 25 de maio de 2000.

3.DEFINIÇÃO DO PRODUTO:

Entende-se por Castanha do Brasil, o fruto do castanheiro, *Bertholletia excelsa* H.B.K, da família das Lecythidáceas.

4.CONCEITOS:

Para efeito deste Regulamento, considera-se:

- 4.1.Castanha defeituosa: castanha em casca, amêndoas e fragmentos de amêndoas que se apresentem mofadas e rancificadas.
- 4.1.1.Mofada: castanha em casca, amêndoa e fragmentos de amêndoas, que apresentem colônias de fungos (bolors), visíveis a olho nu.
- 4.1.2.Rancificada: amêndoa que apresenta odor e sabor desagradáveis, devido às características físico-químicas do óleo terem se alterado por processo oxidativo.
- 4.2.Castanha danificada: castanha em casca, amêndoas e pedaços de amêndoas que se apresentem com danos causados por agentes biológicos (carunchos, roedores, insetos e outros).
- 4.3.Quebrado: pedaço ou fragmento de amêndoa, qualquer que seja o seu tamanho.
- 4.4.Impurezas: detritos do próprio produto, tais como haste, pó e casca.
- 4.5.Matérias estranhas: detritos de qualquer natureza, estranho ao produto tais como: areia, fragmentos de madeira, pedra, torrões, sementes estranhas, sujidades e restos de insetos.
- 4.6.Odor estranho: aroma não peculiar ao produto.
- 4.7.Coloração: cor uniforme e característica do produto.
- 4.8.Teor de umidade: percentual de água contida na castanha ou na amêndoa, determinado através de processos reconhecidos oficialmente.
- 4.9.Corte: operação que compreende a abertura da castanha em casca, para exame do estado em que se encontra sua amêndoa.
- 4.10. Lote: quantidade de produtos com as mesmas especificações de identidade, qualidade e apresentação, processados pelo mesmo fabricante ou fracionador, em um espaço de tempo determinado, sob condições essencialmente iguais.
- 4.11.Embalagem: recipiente, pacote ou envoltório, destinado a garantir a conservação, e a facilitar o transporte e o manuseio dos produtos.
- 4.12.Produto embalado: todo produto que está contido em uma embalagem pronta para ser oferecido ao consumidor.
- 4.13.Aflatoxina: substância tóxica (metabólito) de fungo *Aspergillus flavus*, também produzido por outros fungos, capaz de provocar danos à saúde do homem e dos animais.
- 4.14.Libra: medida de peso inglesa equivalente à 453,59 gramas.
- 4.15.Força de tipo: produto que não atende, em um ou mais aspectos, às especificações de qualidade previstas nas Tabelas de Tolerâncias constantes neste Regulamento Técnico.
- 4.16. Contaminantes ou substâncias nocivas à saúde: substâncias ou agentes estranhos de origem biológica, química ou física que se saiba ou se presuma, serem nocivas a saúde.
- 4.17. Isento de substâncias nocivas à saúde: quando o produto apresenta contaminação cujo valor se verifica dentro dos limites máximos previstos na legislação específica vigente.
- 4.18. Umidade: o percentual de água encontrado na amostra do produto, podendo ser determinado por métodos indiretos, calibrados pelo método de estufa (método 44-15 A da American Association of Cereal Chemists, 1995);

5.CLASSIFICAÇÃO

A Castanha do Brasil será classificada em grupos, subgrupos, classes e tipos, segundo sua forma de apresentação, preparo ou manipulação, tamanho e qualidade, respectivamente.

5.1.GRUPOS : a Castanha do Brasil, segundo sua forma de apresentação, será ordenada em 2 (dois) grupos, assim denominados:

5.1.1.Castanha em Casca: produto que se apresenta no estado em que foi colhido, extraído do ouriço, limpo e seco naturalmente ou por processo de desidratação adequado.

5.1.2.Castanha Descascada ou Beneficiada: produto limpo, seco e que por processos tecnológicos adequados, teve retirada sua casca.

5.2. SUBGRUPOS

5.2.1.A Castanha em Casca, segundo seu preparo ou processo de manipulação, será classificada em 3 (três) subgrupos:

5.2.1.1.Natural: produto "in natura", sem ter sido submetido a qualquer processo de desidratação artificial, apenas limpo e seco naturalmente.

5.2.1.2.Desidratado: produto que foi submetido ao processo de desidratação ou secagem artificial.

5.2.1.3.Desidratado polido: produto que, depois de desidratado, foi submetido ao processo de polimento, objetivando melhoria de sua apresentação.

5.2.2. A Castanha Descascada ou Beneficiada, segundo seu preparo ou processo de manipulação, será classificada em 2 (dois) subgrupos:

5.2.2.1.Amêndoa com película: produto que se apresenta total ou parcialmente revestido de película.

5.2.2.2.Amêndoa sem película: produto que, após ter sido submetido a processo químico/mecânico, se apresenta totalmente desprovido de película.

5.3.CLASSES

5.3.1. A castanha em casca, do subgrupo Natural, será classificada segundo seu tamanho, pelo número de unidades de castanha por 453,59 gramas, em 3 (três) classes:

5.3.1.1.Grande (large): produto que contém de 30 a 45 unidades de castanha por 453,59 gramas.

5.3.1.2. Média (medium): produto que contém de 46 a 55 unidades de castanha por 453,59 gramas.

5.3.1.3.Pequena (small): produto que contém acima de 56 unidades de castanha por 453,59 gramas.

5.3.2.A castanha em casca, dos subgrupos Desidratado e Desidratado polido, será classificada segundo seu tamanho, pelo número de unidades de castanha por 453,59 gramas, em 6 (seis) classes.

5.3.2.1.Extra Grande (extra-large) : produto que contém de 30 a 40 unidades de castanha por 453,59 gramas.

5.3.2.2.Grande (large) : produto que contém de 41 a 45 unidades de castanha por 453,59 gramas.

5.3.2.3.Semigrande (weak-large): produto que contiver de 46 a 50 unidades de castanha por 453,59 gramas.

5.3.2.4.Extra média (extra-medium) : produto que contiver de 51 a 55 unidades de castanha por 453,59 gramas.

5.3.2.5. Média (medium) : produto que contiver de 56 a 60 unidades de castanha por 453,59 gramas.

5.3.2.6.Pequena (small) : produto que contiver de 60 a 70 unidades de castanha por 453,59 gramas.

5.3.3. A castanha descascada ou beneficiada, dos Subgrupos Amêndoas com película e Amêndoas sem películas, será classificada segundo seu tamanho, pelo número de unidades de amêndoas por 453,59 gramas ou pelo seu estado de apresentação/integridade (inteira, ferida ou quebrada), em 7 (sete) classes:

5.3.3.1.Miudinha (tiny) : produto inteiro, íntegro, que contém de 180 a 220 unidades de amêndoa por 453,59 gramas.

5.3.3.2. Miúda (midget) : produto inteiro, íntegro, que contém de 160 a 179 unidades de amêndoa por 453,59 gramas.

5.3.3.3.Pequena (small) : produto inteiro, íntegro, que contém de 130 a 159 unidades de amêndoa por 453,59 gramas.

5.3.3.4. Média (medium) : produto inteiro, íntegro, que contém de 110 a 129 unidades de amêndoa por 453,59 gramas.

5.3.3.5.Grande (large) : produto inteiro, íntegro, que contém de 90 a 109 unidades de amêndoa por 453,59 gramas.

5.3.3.7.Ferida (chipped) : produto que se apresenta com as amêndoas lascadas e/ou mutiladas por escoriações, oriundas de agente físico, mantendo mais da metade do tamanho.

5.3.3.8.Quebrada (broken) : produto que se apresenta com as amêndoas fragmentadas, partidas e/ou quebradas, com menos da metade do tamanho.

5.4. TIPOS

5.4.1.A castanha em casca, respeitado o subgrupo e a classe a que pertencer, será classificada, segundo a qualidade, em um único tipo, constituído de castanhas perfeitamente desenvolvidas, de cor natural, limpas, secas e isentas de matérias estranhas, conforme os limites máximos de tolerância estabelecidos na Tabela 1, deste Regulamento.

5.4.2. A castanha descascada ou industrializada, respeitado o subgrupo e a classe a que pertencer, será classificada, segundo a qualidade, em tipo único, constituído de amêndoas de cor natural, livres de amêndoas rancificadas e isentas de matérias estranhas, conforme os limites máximos de tolerância estabelecidos na tabela 1, deste Regulamento.

5.4.3.As amêndoas das classes Ferida e Quebrada, respeitado o subgrupo a que pertencer, serão classificadas, segundo a qualidade, em tipo único, constituído de amêndoas de cor natural, livre de amêndoas rancificadas e isentas de matérias estranhas.

5.5. UMIDADE, MATÉRIAS ESTRANHAS E IMPUREZAS.

5.5.1.O teor máximo de umidade para enquadramento em tipo, tecnicamente recomendado para a conservação e empacotamento da Castanha do Brasil, será de 15% (quinze por cento), qualquer que seja o seu grupo, subgrupo ou classe.

5.5.2.Os limites máximos de impurezas aceitável para o produto, segundo o seu grupo, subgrupo ou classe, estão estabelecidos para o Tipo Único, na Tabela 1, do presente Regulamento.

5.5.3. Ao nível da comercialização o produto deve se apresentar livre ou isento de matérias estranhas.

5.6. INSETOS VIVOS E SEMENTES TÓXICAS.

5.6.1.Será exigido, previamente à classificação, o expurgo e/ou o beneficiamento do produto que apresentar insetos vivos ou sementes tóxicas prejudiciais a sua utilização normal.

5.7. FORA DE TIPO

5.7.1.Será classificada como Fora de Tipo, a Castanha do Brasil que apresentar os percentuais de ocorrência de defeitos das castanha e amêndoa, de impurezas e de umidade, excedendo os limites máximos de tolerância especificados para o Tipo Único, da Tabela 1, qualquer que seja o Grupo, respeitados os respectivos subgrupos e classes.

5.7.2.Não será admitida a internalização e a comercialização da Castanha do Brasil classificada como Fora de Tipo, devendo neste caso ser previamente rebeneficiada para enquadramento em tipo.

5.8. DESCLASSIFICAÇÃO

5.8.1.Será desclassificada a Castanha do Brasil que apresentar uma ou mais das características indicadas abaixo, sendo proibida a sua comercialização para a alimentação humana. São elas:

5.8.1.1. Mau estado de conservação.

5.8.1.2. Aspecto generalizado de mofo e/ou fermentação.

5.8.1.3.Odor estranho de qualquer natureza, impróprio ao produto.

5.8.1.4.Resíduos de produtos fitossanitários, teor de micotoxinas e outros

contaminantes ou substâncias nocivas à saúde acima do limite estabelecido por legislação específica vigente.

5.8.1.5.Presença de insetos vivos no produto destinado diretamente à alimentação humana.

5.8.2.Sempre que julgar necessário, o Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento ou a Pessoa Jurídica responsável pela classificação, poderá requerer a análise laboratorial prévia, do produto suspeito de contaminação, visando certificar-se de sua impropriedade para consumo humano.

5.8.2.1. As análises laboratoriais serão realizadas por laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com o respectivo ônus para o detentor do produto.

5.8.3. A pessoa jurídica responsável pela classificação deverá comunicar imediatamente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a ocorrência de produto desclassificado, para as providências cabíveis, junto ao setor técnico competente.

5.8.4.Caberá ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a decisão quanto ao destino do produto desclassificado, podendo, para isso, articular-se, onde couber, com outros órgãos oficiais.

5.8.4.1.No caso específico da permissão ou autorização de utilização do produto desclassificado para outros fins, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento deverá estabelecer, ainda, todos os procedimentos necessários ao acompanhamento do produto até a sua completa desnaturação ou destruição, cabendo ao proprietário do produto ou ao seu preposto, além de arcar com os custos pertinentes à operação, ser o seu depositário e responsável pela inviolabilidade e indivisibilidade do lote, em todas as fases de manipulação, imputando-lhe as ações civis e penais cabíveis, em caso de irregularidades ou de uso não autorizado do produto nestas condições.

5.9.SUBSTÂNCIAS NOCIVAS À SAÚDE

5.9.1. É obrigatória a análise de aflatoxina da Castanha do Brasil, efetuada em laboratório credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e realizada de acordo com o método de análise e plano de amostragem oficiais.

5.9.2. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento poderá, sempre que julgar necessário, em ação de caráter temporário ou por tempo indeterminado, exigir a análise de outras micotoxinas, de resíduos e outros contaminantes da castanha posta à comercialização, independentemente do resultado de sua classificação.

5.9.3. O ressarcimento dos custos das análises a que se refere os itens 5.9.1. e

5.9.2, correrá por conta do interessado.

5.9.4. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, juntamente com outros órgãos oficiais, as pessoas jurídicas responsáveis pela classificação, Instituições de pesquisa, redes de laboratórios credenciados e em parceria com o setor privado, poderá desenvolver programas específicos de monitoramento de micotoxinas, resíduos e contaminantes da castanha, visando ao controle e à garantia de sua qualidade para a alimentação humana.

6. EMBALAGEM

6.1. As embalagens utilizadas no acondicionamento da Castanha do Brasil poderão ser de materiais naturais, sintéticos ou qualquer outro material apropriado.

6.2. As embalagens da Castanha do Brasil, quando comercializada no varejo, devem obedecer às legislações específicas vigentes.

6.3. Dentro de um mesmo lote será obrigatório que todas as embalagens sejam do mesmo material e tenham idêntica capacidade de acondicionamento.

7. MARCAÇÃO OU ROTULAGEM

7.1. As especificações de qualidade do produto, contidas na marcação ou rotulagem, e na identificação do lote, deverão estar em consonância com o seu respectivo Certificado de Classificação.

7.2. Todo lote ou embalagem deve trazer as especificações qualitativas, marcadas ou rotuladas, na vista principal, em lugar de destaque, de fácil visualização e de difícil remoção.

7.3. Os rótulos dos produtos embalados não deverão apresentar vocábulos, símbolos, emblemas, ilustrações ou outras representações gráficas que possam induzir o consumidor a equívoco, erro, confusão ou engano em relação a sua qualidade.

7.4. No nível de atacado, para o produto ensacado ou à granel, (neste caso desde que não haja mistura do lote ou carga com outros produtos à granel, de diferentes qualidades ou origem), a marcação do lote deve trazer, no mínimo, as seguintes indicações:

7.4.1. Identificação do lote.

7.4.2. Grupo

7.4.3. Subgrupo.

7.4.4. Classe.

7.4.5. Tipo.

7.4.6. Safra de produção, de acordo com a declaração do responsável pelo produto.

7.4.7. Identificação do responsável pelo produto (nome ou razão social e endereço completo).

7.4.8. Peso líquido.

7.4.9. Órgão responsável pela fiscalização da classificação: MAPA

7.5. No nível de varejo, a marcação ou rotulagem das especificações de qualidade será feita, na posição horizontal em relação à borda superior ou inferior da embalagem a qual deverá conter, no mínimo, as seguintes indicações, no idioma oficial do País de consumo:

7.5.1. Denominação de venda do produto.

7.5.2. Identificação do lote.

7.5.3. Identificação da origem (deverá ser indicado o nome ou a razão social, o endereço completo e o CNPJ do fabricante, produtor ou embalador, conforme o caso, assim como a localidade, o Estado e o País de origem, onde couber).

7.5.4. Data de validade

7.5.5. Peso líquido.

7.5.6. Subgrupo.

7.5.7. Classe.

7.5.8. Subclasse. (Quando for subclasse mesclada, sendo facultativa para as demais subclasses).

7.5.9. Órgão responsável pela fiscalização da classificação: MAPA

7.6. Todo rótulo deverá ter impresso, gravado ou marcado de qualquer outro modo, uma indicação em código ou linguagem clara, que permita identificar o lote a que pertence o alimento de forma visível, legível e indelével.

7.6.1. O lote será determinado em cada caso, pelo produtor, fabricante, fracionador ou embalador do produto, onde couber, segundo seus critérios.

7.6.2. Para indicação do lote poderá ser utilizado:

7.6.2.1. Um código chave precedido da letra "L". Este código deverá estar a disposição da autoridade competente e constar da documentação comercial, quando ocorrer comércio nacional e internacional.

7.6.2.2. A data de fabricação, embalagem ou prazo de validade, sempre que seja(m) indicado(s) claramente, pelo menos, o dia e o mês, ou o mês e o ano nesta ordem, conforme o regulamento técnico específico de alimentos embalados.

7.7. As expressões qualitativas referentes ao grupo, ao subgrupo, à classe e ao tipo, devem ser grafadas por extenso, respectivamente, e com a expressão "tipo único", também por extenso. Fora de Tipo

7.8. Os indicativos de grupo, subgrupo, classe e tipo devem ser grafados em caracteres do mesmo tamanho, segundo as dimensões especificadas para o peso líquido, em legislação metrológica vigente.

7.9. No caso específico da comercialização feita à granel ou em conchas, o produto exposto diretamente ao consumidor deverá ser identificado e a identificação colocada em lugar de destaque, de fácil visualização, contendo, no mínimo, as seguintes indicações:

7.9.1. Denominação de venda do produto.

7.9.2. Subgrupo.

7.9.3. Classe.

7.9.4. Tipo.

7.9.5. Identificação da origem (deverá ser indicado o nome ou a razão social, o endereço completo e o CNPJ do fabricante, produtor ou embalador, conforme o caso, assim como a localidade, o Estado e o País de origem onde couber).

7.9.6. Data de validade.

8. AMOSTRAGEM

8.1. Previamente à amostragem, deverão ser observadas as condições gerais do lote do produto e em caso de verificação de qualquer anormalidade, tais como, presença de insetos vivos ou a existência de quaisquer das características desclassificantes (odor estranho, mau estado de conservação, aspecto generalizado de mofo, entre outras), adotar os procedimentos específicos previstos neste Regulamento.

8.2. A retirada ou extração de amostra em lotes da Castanha do Brasil, ensacada ou à granel, será efetuada do seguinte modo:

8.2.1. Castanha ensacada: por abertura ou despejo de, no mínimo, 10% (dez por cento) dos sacos, escolhidos inteiramente ao acaso, e sempre representando a expressão média do lote, numa quantidade mínima de 30g (trinta gramas) de cada saco, observando-se o plano de amostragem abaixo:

Tamanho de lote em sacos	N.º mínimo de sacos a serem amostrados
2 a 25	2
26 a 50	3
51 a 90	5
91 a 150	8
151 a 280	13
281 a 500	20
501 a 1.200	32
1201 a 3.200	50
3.201 a 10.000	80
10.001 a 35.000	125
35.001 a 150.000	200
150.001 a 50.000	315
500.001 ou mais	500

8.2.2. Castanha a granel: far-se-á a extração do alto, do meio e das laterais do lote ou tulha, em quantidade que represente a totalidade da castanha ser classificada, nunca inferior a 10kg (dez quilogramas) por tonelada do produto.

8.2.3. Em navios ou similares: serão adotados os mesmos critérios e procedimentos de amostragem, previstos neste Regulamento, para o produto a granel ou ensacado, conforme o caso, até que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através de seu setor competente, discipline a matéria por instrução normativa complementar específica.

8.2.4. Castanha empacotada ou encaixotada: far-se-á a extração de amostras, obedecendo o seguinte critério:

8.2.4.1. Lote de até 5 (cinco) caixas: amostra média de 01 (uma) unidade (caixa).

8.2.4.2. Lote de 6 (seis) caixas: 10% (dez por cento) do lote, com um mínimo de 5 (cinco) unidades (caixa).

8.2.4.3. Lote acima de 100 (cem) caixas: 5% (cinco por cento) do lote, com um mínimo de 10 (dez) unidades (caixa).

8.2.5. Quando a amostra for coletada e enviada pelo interessado, deverão ser observados os mesmos critérios e procedimentos de amostragem previstos neste Regulamento, visando garantir a identificação da mesma com o lote ou volume da qual se originou, sendo o coletor o responsável legal pela sua representatividade.

8.2.6. As amostras extraídas conforme os itens anteriores, referentes ao produto ensacado, a granel e empacotado, serão homogêneas, reduzidas e acondicionadas em, no mínimo, 3 (três) alíquotas, com peso de, no mínimo, 1kg (um quilograma) cada, devidamente identificadas, lacradas e autenticadas.

8.2.7. Será entregue 01 (uma) alíquota para o interessado, 02 (duas) ficarão com a pessoa jurídica responsável pela classificação e o restante da amostra será obrigatoriamente recolocado no lote ou devolvido ao proprietário.

8.2.8. A amostra para efeito de classificação (amostra de trabalho) será de 1kg (um quilograma),

9. CERTIFICADO DE CLASSIFICAÇÃO

9.1. O Certificado de Classificação será emitido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ou pelas pessoas jurídicas, devidamente credenciadas pelo mesmo, de acordo com a legislação vigente.

9.2. O Certificado de Classificação é o documento hábil para comprovar a realização da classificação, correspondendo a um determinado lote do produto classificado.

9.3. O Certificado somente será considerado válido quando possuir a identificação do classificador (carimbo e assinatura), pessoa física, devidamente habilitada e registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

9.4. A validade do Certificado de Classificação será de 45 (quarenta e cinco) dias, contados a partir de sua emissão.

9.4.1. A validade, a que se refere o item anterior, se aplica à validação do serviço de classificação, ou seja o prazo em que se pode questionar administrativamente o resultado apresentado (laudo e Certificado emitidos) e será averiguada com base na amostra de arquivo (contraprova) ou se necessário, com uma nova amostra do produto, caso o lote em questão se mantenha inalterado nos aspectos qualitativo e quantitativo.

9.5. No Certificado de Classificação deverão constar, além das informações estabelecidas no Regulamento Técnico específico, as seguintes indicações:

9.5.1. Discriminação dos resultados de cada análise efetuada e dos percentuais encontrados para cada determinação de qualidade da castanha, estabelecidos no item 5 e seus subitens deste Regulamento, bem como as informações conclusivas (enquadramento em grupo, subgrupo, classe e tipo), que serão transcritos do seu respectivo laudo de classificação.

9.5.2. Os motivos que determinaram a desclassificação do produto.

9.5.3. O percentual de umidade e de impurezas encontradas no produto.

10. ARMAZENAGEM E MEIOS DE TRANSPORTE

10.1. Os estabelecimentos destinados à armazenagem da castanha do Brasil e os meios de transporte devem oferecer plena segurança e condições técnicas imprescindíveis à sua perfeita conservação, respeitada a Legislação específica em vigor, sendo fundamental a tomada de cuidados especiais quanto à manutenção rigorosa dos teores de umidade recomendados para o produto, visando evitar ou controlar a contaminação por aflatoxina.

11. FRAUDE

11.1. Considerar-se-á fraude toda a alteração dolosa, de qualquer ordem ou natureza, praticada na classificação, no acondicionamento, no transporte e na armazenagem, bem como nos documentos de qualidade do produto.

11.2. Será também considerada fraude, a comercialização da castanha do Brasil em desacordo com o estabelecido neste Regulamento.

12. TABELAS

TABELA 1 - CASTANHA EM CASCA - Limites máximos de tolerância (%) e características admitidas

CASTANHA EM CASCA

CASTANHA EM CASCA							
Tipos	Umidade	Cor	Matérias Estranhas	Natural	Desidratada Desidratada e Polida		
				Castanha Danificada e/ou Defeituosa	Impurezas	Castanha Danificada e/ou Defeituosa	Impurezas
Único	15%	Natural, Uniforme e Característica do Produto	Isenta	10,0	2,0	7,0	1,0
Fora de Tipo				> 10,0	> 2,0	> 7,0	> 1,0

TABELA 2 - CASTANHA DESCASCADA OU BENEFICIADA - Limites máximos de tolerância (%) e características admitidas
CASTANHA DESCASCADA OU BENEFICIADA

CASTANHA DESCASCADA OU BENEFICIADA					
Tipo	Umidade	Cor Natural, Uniforme e Característica do Produto	Matérias Estranhas e Amêndoas Rancificadas	Amêndoas das Classes Miudinha à Grande	Amêndoas das Classes Ferida e Quebrada
				Impurezas	Impurezas
			Isenta	1,0	2,0
				> 1,0	> 2,0

TABELA 3 - Classificação - Quadro sinóptico

CLASSIFICAÇÃO	CASTANHA DO BRASIL				
	GRUPOS	Castanha em Casca	Castanha Descascada ou Beneficiada		
SUBGRUPOS	Natural, Desidratado, Desidratado e polido	Amêndoa com película Amêndoa sem película			
	Nomes das Classes	Desidratado Desidratado e Polido	Natural	Nomes das Classes	Amêndoa com película Amêndoa sem película
CLASSES (Unidades de Castanha ou de Amêndoas em 453 g)	Extra Grande Grande Semi Grande Extra Media Média Pequena	De 30 a 40 De 41 a 45 De 46 a 50 De 51 a 55 De 56 a 60 De 60 a 70	- de 30 a 45 de 46 a 55 Acima de 56	Miudinha Miúda Pequena Média Grande Ferida Quebrada	De 180 a 220 De 160 a 179 De 130 a 159 De 110 a 129 De 90 a 109 -
TIPO	ÚNICO	ÚNICO			

TIPO ÚNICO ÚNICO

13. DISPOSIÇÕES GERAIS

13.1. Este Regulamento Técnico será também aplicável, quanto à classificação aos produtos orgânicos e aos transgênicos, desde que os mesmos tenham cumprido previamente os trâmites necessários a sua identificação ou certificação, atestando-os como tal e ainda, tenham atendido as disposições específicas vigentes.

13.2. Será de competência exclusiva do Órgão Técnico do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento resolver os casos omissos porventura surgidos na utilização do presente Regulamento.

ANEXO C

CHAPTER I - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION

PART 173 – SECONDARY DIRECT FOOD ADDITIVES PERMITTED IN FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION



[FDA Home Page](#) | [CDRH Home Page](#) | [Search](#) | [A-Z Index](#)

[Questions?](#)



[510\(k\)](#) | [Registration & Listing](#) | [Adverse Events](#) | [PMA](#) | [Classification](#) | [CLIA](#)
[CFR Title 21](#) | [Advisory Committees](#) | [Assembler](#) | [Recalls](#) | [Guidance](#) | [Standards](#)

[New Search](#)

[Help](#) | [More About 21CFR](#)

[Code of Federal Regulations]
 [Title 21, Volume 3]
 [Revised as of April 1, 2008]
 [CITE: 21CFR173.368]

TITLE 21--FOOD AND DRUGS
 CHAPTER I--FOOD AND DRUG ADMINISTRATION
 DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
 SUBCHAPTER B--FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION (CONTINUED)

PART 173 -- SECONDARY DIRECT FOOD ADDITIVES PERMITTED IN FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION

Subpart D--Specific Usage Additives

Sec. 173.368 Ozone.

Ozone (CAS Reg. No. 10028-15-6) may be safely used in the treatment, storage, and processing of foods, including meat and poultry (unless such use is precluded by standards of identity in 9 CFR part 319), in accordance with the following prescribed conditions:

- (a) The additive is an unstable, colorless gas with a pungent, characteristic odor, which occurs freely in nature. It is produced commercially by passing electrical discharges or ionizing radiation through air or oxygen.
- (b) The additive is used as an antimicrobial agent as defined in 170.3(o) (2) of this chapter.
- (c) The additive meets the specifications for ozone in the *Food Chemicals Codex*, 4th ed. (1996), p. 277, which is incorporated by reference. The Director of the Office of the Federal Register approves this incorporation by reference in accordance with 5 U.S.C. 552 (a) and 1 CFR part 51. Copies are available from the National Academy Press, 2101 Constitution Ave. NW., Washington, DC 20055, or may be examined at the Office of Premarket Approval (HFS-200), Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, 5100 Paint Branch Pkwy., College Park, MD 20740, and at the National Archives and Records Administration (NARA). For information on the availability of this material at NARA, call 202-741-6030, or go to: http://www.archives.gov/federal_register/code_of_federal_regulations/ibr_locations.html.
- (d) The additive is used in contact with food, including meat and poultry (unless such use is precluded by standards of identity in 9 CFR part 319 or 9 CFR part 381, subpart P), in the gaseous or aqueous phase in accordance with current industry standards of good manufacturing practice.
- (e) When used on raw agricultural commodities, the use is consistent with section 201(q) (1) (B) (i) of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (the act) and not applied for use under section 201(q) (1) (B) (i) (I), (q) (1) (B) (i) (II), or (q) (1) (B) (i) (III) of the act.