

RAQUEL RODRIGUES SANTOS

**OZÔNIO COMO AGENTE FUNGICIDA E SEU EFEITO NA QUALIDADE DO
ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S237o
2014 Santos, Raquel Rodrigues, 1987-
Ozônio como agente fungicida e seu efeito na qualidade do
arroz (*Oryza sativa* L.) / Raquel Rodrigues Santos. – Viçosa,
MG, 2014.
xi, 43f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Lêda Rita Dantonino Faroni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.35-43.

1. Fungos. 2. Arroz - Armazenamento. 3. Arroz - Efeito de
fungicida. 4. Ozônio. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Engenharia Agrícola. Programa de
Pós-graduação em Engenharia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 632.952

RAQUEL RODRIGUES SANTOS

**OZÔNIO COMO AGENTE FUNGICIDA E SEU EFEITO NA QUALIDADE DO
ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

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

APROVADA: 28 de novembro de 2014.

Paulo Roberto Cecon
(Coorientador)

Fernanda Fernandes Heleno
(Coorientadora)

Ana Paula Sato Ferreira

Lêda Rita D'Antonino Faroni
(Orientadora)

*“Aprenda como se fosse viver para sempre,
e viva como se fosse morrer amanhã.”*

Mahatma Gandhi

*À minha vó Nair,
à minha mãe Giselda,
à minha Maninha e,
à minha filha Lara,
as mulheres da minha vida.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder saúde, sabedoria, disposição e alegria. Por ter me concedido mais uma conquista na vida.

À minha vó Nair, minha mãe Giselda e minha Maninha Roberta, por todo amor, carinho, confiança e apoio incondicionais.

À minha filha Lara, que foi a força para que eu não desistisse e minha maior incentivadora – Conseguimos, Princesa!

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Engenharia Agrícola (DEA), pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

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

À Professora Lêda Rita D'Antonino Faroni pela orientação, confiança, ensinamentos e oportunidades concedidas.

Aos Professores Paulo Roberto Cecon e Olinto Liparini Pereira pelas valiosas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Vinicius, pela colaboração, pela disposição e torcida.

Aos demais estagiários: Jaqueline, “Jovens Talentos”, Marcus Vinicius, Amanda, Bruno, Rodrigo e Kerly, pela colaboração.

Aos amigos, das salas A e B: Paty, Juliane, Daniel, Handina e Zenil. Isso só foi possível por causa de vocês. Vocês foram mais que amigos, foram irmãos. Muito obrigada pela ajuda e consolo nos momentos de desespero.

Aos demais colegas de laboratório: Gutierrez, Luis, Mariane e Fernanda, pelo apoio e incentivo.

Aos meus colegas do Laboratório de Patologia de Semente e Pós-Colheita, principalmente à Ana Paula, pela paciência e apoio.

Ao meu grande amigo Romenique, grande incentivador e exemplo, e às amigas Cris, Silma, Svet e Nara, pelo apoio, incentivo, amizade e parceria. A vocês o meu eterno carinho e gratidão.

Aos funcionários do Setor de Armazenamento do Departamento de Engenharia Agrícola da UFV pelo apoio, incentivo e disponibilidade em ajudar: Lucas, Tunico, Zé Geraldo, Édson e Zé Eustáquio.

A todos que de um modo geral, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho e para minha formação acadêmica, Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Raquel Rodrigues Santos, filha de Carlos Alberto Galvão dos Santos e Giselda Rodrigues da Silva, nasceu em Volta Redonda, Rio de Janeiro, em 02 de abril de 1987.

Em março de 2007 iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa e graduou-se Engenheira Agrônoma em janeiro de 2012. Em dezembro de 2012 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, na Área de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas, na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação da Professora Lêda Rita D'Antonino Faroni, submetendo-se à defesa de dissertação em novembro de 2014.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Arroz	5
2.2. Fungos em grãos de arroz	6
2.3. Ozônio no controle de fungos em grãos de arroz	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Obtenção e quantificação do gás ozônio.....	11
3.2. Isolamento e obtenção da suspensão de conídios dos fungos dos gêneros Aspergillus spp e Penicillium spp	11
3.3. Inoculação dos grãos de arroz com a suspensão de conídios dos fungos dos gêneros Aspergillus spp e Penicillium spp	12
3.4. Processo de ozonização dos grãos de arroz	13
3.5. Determinação do tempo de saturação do gás ozônio nos grãos de arroz.....	14
3.6. Avaliação do efeito fungicida do ozônio em grãos de arroz.....	15
3.7. Avaliação do possível efeito do tratamento do ozônio na qualidade dos grãos de arroz	16
3.7.1. Determinação do teor de água	16
3.7.2. Determinação da condutividade elétrica.....	16
3.7.3. Determinação do percentual de germinação.....	17
3.8. Delineamento experimental e análises estatísticas	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. Características dos grãos de arroz antes da exposição ao gás ozônio.....	18
4.2. Tempo de saturação do gás ozônio	18
4.3. Eficácia do efeito fungicida do ozônio	20
4.3.1. Quantificação de fungos filamentosos e leveduras.....	20
4.3.2. Índice de ocorrência dos gêneros Penicillium e Aspergillus	23
4.4. Efeito do ozônio na qualidade dos grãos de arroz	27

4.4.1. Teor de água	27
4.4.2. Condutividade Elétrica	29
4.4.3. Germinação.....	31
5. CONCLUSÕES.....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

RESUMO

SANTOS, Raquel Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2014. **Ozônio como agente fungicida e seu efeito na qualidade do arroz (*Oryza sativa* L.).** Orientadora: Lêda Rita D'Antonio Faroni. Coorientadores: Paulo Roberto Cecon, Olinto Liparini Pereira e Fernanda Fernandes Heleno.

A atividade fúngica, principalmente durante o armazenamento, pode levar a rápida deterioração na qualidade nutricional dos grãos, e reduzir seu aproveitamento industrial. No Brasil, não há fungicidas registrados pelo MAPA para o tratamento pós-colheita de grãos de arroz. Deste modo, é de fundamental importância o controle dos fungos nas unidades armazenadoras, com a finalidade de resolver os problemas associados à qualidade final deste produto. Dentre as tecnologias apontadas como promissoras no controle desses microrganismos, destaca-se a ozonização. O ozônio é um poderoso agente oxidante que promove efeitos de oxidação e destruição da membrana citoplasmática e parede celular. Objetivou-se com este trabalho determinar a concentração e o tempo de saturação do gás ozônio na massa de grãos de arroz, definir o tempo de ozonização eficaz para a desinfecção microbiológica dos grãos, bem como avaliar o efeito do processo de ozonização nas características qualitativas do produto. Foram utilizados grãos de arroz, com teor de água de 14,3% b.u., que foram previamente inoculados com uma suspensão de conídios dos gêneros *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp. O processo de ozonização foi feito utilizando-se 500 g de grãos, que foram acondicionados em recipientes cilíndricos de PVC (15 x 25 cm), com conexões para injeção e exaustão do gás. O mesmo foi aplicado na concentração de 10,13 mg L⁻¹, em fluxo contínuo de 1,0 L min⁻¹. Foram estabelecidos cinco períodos de exposição (12, 24, 36, 48 e 60 h) para avaliar o efeito do gás na desinfecção microbiológica e na qualidade dos grãos de arroz. Para o controle, os grãos de arroz foram submetidos ao tratamento com ar atmosférico, nas mesmas condições que o tratamento com ozônio. Com a finalidade de reduzir o ressecamento dos grãos, fez-se necessário a passagem do gás por uma solução saturada de Cloreto de Sódio (NaCl, 75% de UR). A quantificação de fungos filamentosos e leveduras em meio de cultura e o índice de ocorrência dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* nos grãos foram avaliadas por dois métodos. O primeiro método foi o da contagem em placas para fungos filamentosos e leveduras, em que 25 g de grão foram homogeneizados em 225 mL de solução salina peptonada a 0,1% e após diluições em série (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴), foram plaqueados em meio de cultura BDA acidificado. O segundo, o plaqueamento direto sobre papel de filtro

(Blotter test) foi realizado utilizando-se 400 grãos dispostos individualmente sobre uma camada de papel filtro umedecido no interior de gerbox. Ao final de cada período de exposição, os grãos de arroz foram avaliados quanto ao teor de água, à condutividade elétrica e à porcentagem de germinação. Observou-se que a concentração e o tempo de saturação do gás ozônio nos grãos de arroz foi de 5,0075 mg L⁻¹ e 13,97 min, respectivamente. Ocorreu redução em 3,8127 ciclos log na contagem de fungos filamentosos e leveduras nos grãos ozonizados. Quanto ao índice de ocorrência de *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp, o ozônio foi eficiente, pois não houve crescimento de fungos nos grãos, no período de exposição de 60 h. Com relação às características qualitativas, verificou-se que o ozônio reduziu o teor de água e a porcentagem de germinação e elevou a condutividade elétrica. Houve o efeito fungicida do gás ozônio em grãos de arroz.

ABSTRACT

SANTOS, Raquel Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2014. **Ozone as fungicide agent and its effect on rice quality (*Oryza sativa* L.)**. Adviser: Lêda Rita D'Antonino Faroni. Co-advisers: Paulo Roberto Cecon, Olinto Liparini Pereira and Fernanda Fernandes Heleno.

Fungal activity, especially during storage, can lead to rapid deterioration in the nutritional quality of grains, and reduce its industrial use. In Brazil, there are no fungicides registered in MAPA for post-harvest treatment of rice grains. Thus, this has a fundamental importance in the control of fungi storage units, in order to solve the problems associated with the quality of the final product. Among the technologies identified as promising for the control of microorganisms, there is ozonation. Ozone is a powerful oxidizing agent that promotes effects of oxidation and destruction of cytoplasmic membrane and cell wall. The objective of this work to determine the concentration and the ozone gas saturation time in the mass of grains of rice, set the time effectively ozonation for microbiological disinfection of grains as well as assess the effect of ozonation process in the qualitative characteristics of product. Rice grains were used, with a water content of 14.3% wb, which were previously inoculated with a spore suspension of *Penicillium* spp and *Aspergillus* spp. The ozonation process was done by using 500 g of grains, which were packed in cylindrical PVC containers (15 x 25 cm) with connections for gas injection and exhaust. The same was applied to the concentration of 10.13 mg L⁻¹ bitstream of 1.0 L min⁻¹. Five periods of exposure have been established (12, 24, 36, 48 and 60 h) to assess the effect of gas on the microbiological disinfection and in the quality of rice grains. For the control, rice grains were subjected to treatment with atmospheric air, the same conditions as treatment with ozone. In order to reduce the drying of the grain, it was necessary to pass the gas through a saturated solution of Sodium Chloride (NaCl, 75% RH). Quantification of filamentous fungi and yeasts in the culture medium and the rate of occurrence of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* the grains were evaluated by two methods. The first method was the plate count for filamentous fungi and yeasts, in which 25 g of grain were homogenized in 225 mL of saline peptone and 0.1% after serial dilutions (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ and 10⁻⁴) were plated in medium acidified PDA culture. The second, direct plating on filter paper (Blotter test) was conducted using 400 grit individually arranged on the moistened filter paper layer inside seedling. At the end of each exposure period, rice grains were evaluated for water content, electrical conductivity and germination percentage. It was

observed that ozone concentration and gas saturation time in the rice grains was 5.0075 mg L⁻¹ and 13.97 min, respectively. There was reduction of 3.8127 log cycles in the count of filamentous fungi and yeasts in ozonized grains. As for the rate of occurrence of *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp, ozone was very efficient because there was no growth of fungi in grains, in the exposure period of 60 h. Regarding qualitative characteristics, it was found that ozone reduced the water content and the percentage of germination and increased electrical conductivity. There was the fungicidal effect of ozone gas in rice grains.

1. INTRODUÇÃO

O arroz é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico, sendo considerado um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% das proteínas per capita necessárias ao homem. Por ser uma cultura extremamente versátil, apresenta maior potencial para o combate à fome no mundo (BRONDANI et al., 2006).

A produção mundial de arroz (*Oryza sativa* L.), em 2013 foi de, aproximadamente, 748 milhões de toneladas. Nesta safra, os principais produtores de arroz foram China e Índia, com 27 e 21% da produção mundial, respectivamente. O Brasil ainda ocupa uma modesta posição entre os países produtores de arroz, porém destaca-se como único país não asiático no ranking (FAO, 2014).

No Brasil, a produção de arroz, da safra de 2013/14, foi de 12.161,7 mil toneladas, 2,9% superior em relação à safra 2012/13. Esse aumento de produção ocorreu principalmente devido à expansão de área em face do elevado patamar de preços do produto. Para a próxima safra (2014/15), a projeção média da produção deverá ser 3,4% superior em relação à safra 2013/14, atingindo 12.571,2 mil toneladas (CONAB, 2014).

Segundo a FAO, a previsão para a utilização global de arroz em 2013/14 será de 492,1 milhões de toneladas, 3,0% a mais que no ano anterior. Esse aumento é sustentado devido a um acréscimo de 8,0 milhões de toneladas na ingestão alimentar global. Outros usos, incluindo sementes, pós-colheita, perdas e usos industriais não alimentares, podem atingir cerca de 67,8 milhões de toneladas. Como resultado, o consumo de arroz per capita pode ultrapassar 57,4 kg (FAO, 2014).

Embora muito progresso tenha sido feito na prevenção de perdas na pós-colheita de arroz, as mesmas atingem entre 15 e 16% da produção mundial. Estas perdas ocorrem durante operações como secagem, armazenamento e moagem. As principais razões são a dificuldade de acesso e a falta de conhecimento técnico (FAO, 2004).

Por se tratar do produto final, os prejuízos são irrecuperáveis. A redução nos valores nutritivo e comercial dos grãos se deve, principalmente, pelo ataque de agentes biológicos como os insetos, fungos e ácaros (FARONI e SILVA, 2008; ALENCAR et al., 2012).

A atividade fúngica, principalmente durante o armazenamento, pode levar a rápida deterioração na qualidade nutricional dos grãos e a contaminação com micotoxinas (ANDRADE et al., 2003; MAGAN e ALDRED, 2007). A microbiota fúngica, que mais

atinge os grãos de arroz armazenados, são de dois gêneros: *Penicillium* e *Aspergillus* (PITT, 2000).

Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são contaminantes geralmente encontrados em vegetais e alimentos durante a secagem e o armazenamento (PITT e HOCKING, 1997). Poucos são os fungos que têm ampla importância econômica como *Aspergillus*, sendo um patógeno de plantas, animais e insetos causando apodrecimento em numerosos produtos armazenados. Como patógenos humanos, a espécie *A. flavus* atinge pessoas imunossuprimidas (KLICH, 2007).

No tocante aos problemas decorrentes do ataque de fungos, embora os riscos oferecidos pelo consumo de arroz contaminado por estes microrganismos sejam conhecidos, este fato é negligenciado pelos diferentes elos da cadeia de produção do arroz e pelos órgãos responsáveis pela fiscalização e registro de produtos para o uso no tratamento de produtos agrícolas. No Brasil, não há fungicidas registrados pelo MAPA para o tratamento pós-colheita de grãos de arroz (BRASIL, 2014b). Deste modo, quando é necessário fazer o controle de fungos na pós-colheita os processadores e armazenistas acabam por utilizar princípios ativos não autorizados para este fim, ou mesmo ignoram a presença dos patógenos quando estes não oferecem riscos de grandes perdas econômicas. Em levantamento realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2011, foi detectado que 16% das amostras de arroz analisadas continham 10 princípios ativos não autorizados pela legislação brasileira. Em 2012, esse número reduziu para 1%, apresentando dois princípios ativos não autorizados (BRASIL, 2014a).

Além da ANVISA, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) também inspeciona e fiscaliza as cadeias produtivas de alimento. Este monitoramento é realizado por meio da verificação da presença e dos níveis de resíduos de substâncias químicas potencialmente nocivas à saúde do consumidor, tais como resíduos de produtos de uso veterinário, de agrotóxicos ou afins, e de contaminantes químicos. Para a determinação de micotoxinas, a coleta das amostras deve ser realizada durante o processo de empacotamento ou durante a carga ou descarga. As amostras de monitoramento do PNCRC/Vegetal deverão ser enviadas aos laboratórios participantes do Plano, para fins de efetuar a fiscalização dos produtos que possuem padrão oficial de classificação (BRASIL, 2013).

Diante disso, torna-se evidente a necessidade da adoção de estratégias para o tratamento pós-colheita dos grãos de arroz com a finalidade de resolver os problemas associados à qualidade final deste produto. Dentro deste contexto, uma estratégia moderna

e eficiente que vem sendo sugerida é o uso do gás ozônio (O_3). O ozônio é um gás resultante do rearranjo de átomos de oxigênio e pode ser gerado por descargas elétricas ou pela incidência de radiação eletromagnética de alta energia (luz ultravioleta) no ar (KHADRE et al., 2001). É uma molécula instável que decai rapidamente a oxigênio biatômico, liberando um átomo de oxigênio altamente reativo. Por essa característica, o gás ozônio possui o segundo maior potencial de oxidação dentre os elementos químicos, sendo superado apenas pelo Flúor (F_2) (HILL e RICE, 1982).

O ozônio vem sendo amplamente utilizado na indústria alimentícia e na medicina, sendo considerado um agente antimicrobiano de amplo espectro. O gás O_3 foi classificado pela U.S. Food and Drug Administration em 2001, nos Estados Unidos como sanitizante seguro para aplicação em alimentos, já que o seu produto de degradação é o oxigênio e não deixa resíduos nos alimentos (GABLER et al., 2010).

Historicamente, o ozônio foi descoberto por Schonbein em 1840, seguido por uma patente nos Estados Unidos emitida por Fewson em 1888, que tratava da remoção de odores provenientes de esgotos. A primeira desinfecção de água com ozônio data de 1906, na França, e o primeiro sistema de tratamento de água com uso do ozônio, em escala comercial, foi instalado em 1940, nos Estados Unidos. Dentre as características do ozônio, pode ser destacado que esse gás apresenta alta solubilidade em água em baixa temperatura e pH, tem como produto final de sua decomposição o oxigênio e é um efetivo agente oxidante contra uma gama de microrganismos (GRAHAM, 1997; NOVAK e YUAN, 2007).

Em 1982, o FDA (Food and Drugs Administration) declarou a ozonização de água engarrafada como segura, integrando a lista de produtos “Generally Recognized as Safe” (GRAS). Em 1997, o ozônio foi reconhecido GRAS como sanitizante de alimentos, e em 2001, declarado seguro como agente antimicrobiano para o tratamento, armazenamento e processamento de alimentos, seja sob a forma de gás ou dissolvido em água, em contato direto com os alimentos, incluindo produtos minimamente processados de frutas e hortaliças (21 CFR Part 173.368) pela FDA (SUSLOW, 2003).

No que tange ao uso do ozônio no controle de fungos em alimentos, sabe-se que este gás é um forte agente antimicrobiano, podendo atuar na inativação ou inibição do desenvolvimento de muitas espécies de fungos nas diversas commodities. Sabe-se que em produtos agrícolas o gás ozônio inibe ou retarda o desenvolvimento de fungos dos gêneros *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium* e *Mucor* (RAILA et al., 2006; WU et al., 2006), além

de outros microrganismos, como as bactérias (KIM et al., 1999; KHADRE et al., 2001; AGUAYO et al., 2006; ÖZTEKIN et al., 2006; WHANGCHAI et al., 2006).

Ressalta-se ainda que o ozônio não altera a composição nutricional dos cereais e que não são formados metabólitos prejudiciais à saúde humana e animal (KIM et al., 2003; MENDEZ et al., 2003; YOUNG et al., 2006).

Diante do contexto apresentado, objetivou-se com este trabalho determinar a concentração e o tempo de saturação do gás ozônio na massa de grãos de arroz, definir o tempo de ozonização eficaz para a desinfecção microbiológica dos grãos, bem como avaliar o efeito do processo de ozonização nas características qualitativas do produto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Arroz

O arroz é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas no mundo. É o segundo cereal mais cultivado no mundo, ocupando área aproximada de 165 milhões de hectares (SOSBAI, 2010; FAO, 2014).

Os três maiores produtores de arroz são: China (205,3 Mt), Índia (159,8 Mt), Indonésia (71,3 Mt). O Brasil (12,2 Mt) é o maior produtor fora da Ásia (FAO, 2014).

No Brasil, a maior produção de arroz irrigado concentra-se na região Sul, porém vem crescendo também na região Norte. Na região Sul, 98% da produção se concentra nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CONAB, 2014).

Além de ser um alimento presente praticamente todos os dias na alimentação do brasileiro, o mesmo contribui como ingrediente em vários produtos alimentícios – como cereais matinais, farinhas, bebidas, amido de arroz e alimentos infantis e está aliado à alimentação em hospitais, creches, escolas entre outras (GUIMARÃES et al., 2010b).

Conforme Storck (2004), ao se comparar as características nutricionais entre os subgrupos integral, polido e parboilizado observa-se que o primeiro apresenta maior teor de matéria mineral, gordura bruta, fibra total e insolúvel, o parboilizado maior conteúdo de amido resistente e o polido, maior conteúdo de amido digestível (Tabela 1).

Tabela 1. Composição centesimal média (% na matéria seca) de arroz integral, branco polido e parboilizado polido.

Constituinte	Arroz integral	Arroz branco	Arroz parboilizado
		polido	polido
Amido Total	74,12	87,58	85,08
Proteínas	10,46	8,94	9,44
Lipídeos	2,52	0,36	0,69
Cinzas	1,15	0,30	0,67
Fibra Total	11,76	2,87	4,15
Fibra Solúvel	8,93	1,05	1,63
Fibra Insolúvel	8,82	1,82	2,52

Fonte: Adaptado de STORCK (2004)

A maior fração de lipídios está nas camadas periféricas. O conteúdo lipídico do grão integral pode representar até 3% e do arroz polido menos de 1% (STORK, 2004). A presença de ácidos graxos insaturados oléico e linoléico no farelo auxilia na prevenção de doenças cardiovasculares (ZHOU et al, 2003).

O conteúdo protéico do arroz (grão cru), em média de 7,5% (base úmida) pode oscilar entre 5 e 13% pelas diferenças varietais (KENNEDY e BURLINGAME, 2003).

De acordo com Groff (2003), a obtenção da qualidade envolve todo o processo de produção do arroz, começando pelo desenvolvimento de novas variedades de sementes, passando pelas práticas culturais, pelas técnicas de colheita, secagem e armazenagem e terminando no beneficiamento e embalagem.

2.2. Fungos em grãos de arroz

Os microrganismos desempenham um papel importante no que diz respeito à qualidade das sementes, pois reduzem o vigor e enfraquecem a planta no estágio inicial de crescimento (BUTT et al., 2011). As infecções mais comuns de arroz, tanto no campo e também durante o armazenamento, são causadas por fungos (ALMAGUER et al., 2012). Estes podem diminuir a germinação, causar descoloração, reduzir o peso dos grãos e produzir toxinas que podem ser prejudiciais ao homem e aos animais domésticos (BUTT et al., 2011).

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza e são contaminantes comuns de alimentos, grãos e rações, que, por apresentarem nutrientes como carboidratos, proteínas e lipídeos, constituem um substrato adequado para o desenvolvimento de microrganismos (GUIMARÃES et al., 2010a).

O ambiente de produtos armazenados é o ideal para o estabelecimento e o desenvolvimento de muitas espécies de microrganismos. Uma das suas características é o alto poder de proliferação e, embora presentes no campo em baixa porcentagem, multiplicam-se rapidamente, desde que tenham condições ambientais favoráveis (GARCIA et al., 2002, MOLINIÉ et al., 2005). São capazes de tornar um lote de sementes ou grãos totalmente sem valor, sob condições ineficientes de armazenamento (TANIWAKI e SILVA, 2001; GARCIA et al., 2002). Neste contexto, os fungos são os principais responsáveis por perdas na qualidade do arroz (COELHO et al., 1999; BIANCHINI, 2003; DRUVEFORS e SCHNÜNRER, 2004).

Para Garcia et al. (2002), há vários efeitos visíveis da atividade fúngica em sementes e grãos armazenados, ressaltando que o efeito geral é o aumento gradativo no teor de água e na temperatura do produto, resultado do metabolismo dos fungos. Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os principais encontrados no arroz armazenado (SAKAI et al., 2005).

O gênero *Aspergillus* contribui para a deterioração de uma infinidade de produtos armazenados, dentre eles, o arroz. A infestação do arroz com *Aspergillus* spp., principalmente por *A. flavus* e *A. parasiticus*, pode reduzir qualidade e contaminar as sementes com micotoxinas sob más condições de armazenamento (KUMAR et al., 2008).

A contaminação do arroz pelo gênero *Penicillium* foi mais elevada no Japão (SAKAI et al., 2005), Argentina e Paraguai (TONON et al., 1997). Este gênero é comumente encontrado em produtos alimentícios, no campo e durante o armazenamento. No Japão, as espécies mais comumente encontradas no arroz em casa são *P. citrinum* (66% das amostras) e *P. islandicum* (50% das amostras) (SAKAI et al., 2005). *P. islandicum* foi responsável pela descoloração do arroz e *P. citrinum* foi responsável por causar o seu amarelecimento (UDAGAWA e TATSUNO, 2004).

Amostras de arroz coletadas em diferentes regiões do Brasil, nos anos de 1987 e 1988, apresentavam os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus* e *Rhodotorula*. A contaminação fúngica foi menor em arroz polido, aumentando progressivamente em amostras de farelo de arroz e casca de arroz. As espécies *A. flavus* e *A. candidus* foram as mais frequentemente isoladas e verificou-se produção de micotoxinas do grupo de aflatoxinas B (AMAYA e SABINO, 2002).

Penicillium e *Aspergillus* são fungos que liberam maior quantidade de conídios no ar. Uma elevada contagem de esporos têm sido relatada tanto em ambientes internos como ao ar livre. Contagens elevadas no ar favorecem o desenvolvimento dos mesmos em condições ótimas de temperatura e umidade (REDDY et al., 2008; BORREGO et al., 2010).

A contaminação do arroz por fungos tem sido relatada em vários países (MAKUN et al., 2007; FREDLUND et al., 2009). Fredlund et al. (2009) relataram que 21% das amostras de arroz recolhido de mercados suecos estavam contaminadas com *A. flavus*. Deste modo, é importante evitar a contaminação do arroz por fungos, pois o seu crescimento é afetado pela disponibilidade de nutrientes e condições ambientais, tais como temperatura, atividade de água, e pH (RAMIREZ et al., 2006; MYLONA et al., 2012).

A contaminação fúngica tem um impacto significativo sobre a qualidade do arroz, desta forma maior atenção é necessária para melhorar a qualidade e a segurança do arroz consumido (LESLIE e LOGRIECO, 2014).

2.3. Ozônio no controle de fungos em grãos de arroz

A eficácia do ozônio como agente antimicrobiano tem sido estudada por diversos autores, pois este gás apresenta um largo espectro antimicrobiano e é eficiente no controle de fungos, bactérias e protozoários (AKBAS e OZDEMIR, 2006; WU et al., 2006). Dentre as espécies já estudadas e que apresentaram sensibilidade ao ozônio, destacam-se as bactérias *Salmonella typhimurium* (CHAIDEZ et al., 2007), *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* (AKBAS e OZDEMIR, 2008), *Listeria monocytogenes* (SHEELAMARY e MUTHUKUMAR, 2011) e os fungos *Alternaria* sp., *Aureobasidium* sp., *Cladosporium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp., *Stachybotris chartarium*, *Trichoderma viride*, *Ulocladium* sp. (HUDSON e SHARMA, 2009), *Botrytis cinerea* (BARBONI et al., 2010), *C. gloesporioides* e *C. magna* (COSTA, 2012), *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. (BRITO JÚNIOR, 2013), dentre outros.

Estudos utilizando o ozônio gasoso como fungicida para preservar a cevada e o trigo armazenados mostraram que, esse pode ser utilizado na inativação de fungos sem danificar a capacidade de germinação de ambos (ALLEN et al., 2003; WU et al., 2006).

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

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

Considerando, portanto que o mecanismo de ação do ozônio promove efeitos de oxidação e destruição da membrana citoplasmática e parede celular, entende-se que, a diferença entre a maior e a menor tolerância ao ozônio ocorre, provavelmente em função da estrutura da parede e da membrana celular (NAITO e TAKAHARA, 2006).

Cada microrganismo possui uma sensibilidade ao ozônio que lhe é inerente. Dessa forma, bactérias apresentam maior vulnerabilidade que leveduras e fungos filamentosos, em que, bactérias gram-negativas são menos sensíveis que as gram-positivas e os esporos fúngicos são mais tolerantes que células vegetativas (PASCUAL et al., 2007).

Segundo os mesmos autores, em função da natureza do mecanismo de ação do ozônio na destruição das células dos microrganismos, o desenvolvimento de resistência por parte destes ao agente oxidante não ocorre. Seu amplo espectro de ação lhe permite atuar sobre bactérias, fungos, partículas virais, protozoários e esporos fúngicos e bacterianos (CULLEN et al., 2009; KHADRE et al., 2001). Apresenta também, elevado potencial no controle de pragas de armazenamento, bem como na degradação de micotoxinas, especialmente em grãos armazenados (TIWARI e MUTHUKUMARAPPAN, 2012).

A capacidade de o gás ozônio eliminar aflatoxinas em grãos de milho foi confirmada por McKenzie et al. (1998), que alimentaram perus com dieta contendo milho contaminado com a micotoxina, tratado ou não com o gás ozônio. Os autores observaram alta capacidade de degradação da micotoxina pelo ozônio, e que a dieta com o milho ozonizado não afetou o desenvolvimento das aves. A eficácia do gás ozônio na degradação de aflatoxinas também foi avaliada por PRUDENTE e KING (2002), que obtiveram redução de 92% no teor de aflatoxinas em grãos de milho. Estudos recentes indicam que o ozônio foi eficiente como agente fungicida e de degradação de micotoxinas em grãos de amendoim (ALENCAR et al., 2012).

A eficácia do efeito fungicida do gás ozônio sobre a contaminação de grãos de milho com *Aspergillus parasiticus* foi constatada por Kells et al. (2001), quando obteve redução de 63% na viabilidade das unidades de propagação daquele fungo.

Em cevada, Allen et al. (2003), comprovaram a inativação de 96% dos esporos fúngicos, utilizando também ozônio gasoso, nas concentrações de 0,2434 mg L⁻¹ (160 ppm) e 0,214 mg L⁻¹ (100 ppm), por 16 h. Além disso, os mesmos autores tiveram a oportunidade de observar que o efeito fungicida do gás ozônio se elevava com o aumento da temperatura e da atividade de água nos grãos de cevada.

Em trabalhos experimentais desenvolvidos por Wu et al. (2006), envolvendo grãos de trigo ozonizados, foi constatado que a concentração de 0,7062 mg L⁻¹ (330 ppm) de ozônio gasoso, por 45 min, foi suficiente para inativar 96,9% dos esporos fúngicos presentes naqueles grãos.

Houve redução de aproximadamente 3 ciclos log na contagem de unidades formadoras de colônia de fungos totais presentes nos grãos de amendoim ozonizados, após submeter os mesmos a concentração de 21 mg L⁻¹ do gás por 96 h (ALENCAR et al., 2012)

Constatou-se uma redução de 78,5 e 98,0% no índice de ocorrência de *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp em grãos de milho, quando estes foram expostos ao gás ozônio à concentração de 2,14 mg L⁻¹, por um período de 50 h, além disso, reduziu também em 2,0 ciclos log a contagem de fungos filamentosos e leveduras (BRITO JÚNIOR, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Setor de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola e no Laboratório de Patologia de Sementes e de Pós-Colheita do Departamento de Fitopatologia, ambos na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG.

Para realização dos ensaios experimentais, foram utilizados grãos de arroz (*Oryza sativa* L.) obtidos na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), cujo teor de água foi quantificado em 14% (b.u.), para favorecer o crescimento e a reprodução dos patógenos.

3.1. Obtenção e quantificação do gás ozônio

O ozônio foi obtido por meio de um gerador de ozônio O&L3 ORM (Ozone & Life, São José dos Campos, Brasil), utilizando como insumo gás oxigênio isento de umidade. O oxigênio foi retirado do ar atmosférico com o auxílio de um concentrador de oxigênio OxxiSul, Mark 5 Plus (Ozonebras, Curitiba, Brasil). Na geração do ozônio, o oxigênio passa por um reator refrigerado, onde ocorre a Descarga por Barreira Dielétrica (DBD). Este tipo de descarga é produzido ao aplicar uma alta tensão entre dois eletrodos paralelos, tendo entre eles um dielétrico (vidro) e um espaço livre por onde flui o oxigênio. Neste espaço livre é produzida uma descarga em forma de filamentos, em que são gerados elétrons com energia suficiente para produzir a quebra das moléculas de oxigênio, formando o ozônio.

A concentração de ozônio foi obtida pelo ajuste de um variador de tensão do gerador e do fluxo de oxigênio, que foi constantemente monitorado com auxílio de um medidor de vazão de ar (rotâmetro). Para a quantificação da concentração de ozônio utilizou-se o método iodométrico, por meio da titulação indireta (APHA, 2005) conforme recomendado pela International Ozone Association (IOA).

3.2. Isolamento e obtenção da suspensão de conídios dos fungos dos gêneros *Aspergillus spp* e *Penicillium spp*

Para a avaliação do efeito do ozônio no controle de *Aspergillus spp* e *Penicillium spp*, foram obtidos isolados pertencentes a esses gêneros, de grãos de arroz naturalmente infectados. Após o isolamento e identificação destes fungos, as placas de petri contendo os

isolados foram incubadas em câmara climática do tipo B.O.D. a 25 °C, sem controle de umidade relativa e de fotoperíodo e em ausência de luz artificial, até o surgimento da estrutura reprodutiva dos fungos. Foi feita a repicagem e transferência dos isolados para placas de petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar), que posteriormente foram incubadas nas mesmas condições adotadas na obtenção das estruturas reprodutivas dos fungos, a fim de obter densa massa micelial e conidial. Após esse processo, foi obtida uma suspensão de conídios, mediante deposição de água destilada e esterilizada sobre superfície da placa de Petri contendo micélio e conídios (Figura 1A), seguidos de fricção das colônias, com auxílio da alça de Drigalski. Após remoção da massa micelial e conidial foi feita filtragem em camada dupla de gaze (Figura 1B). Em seguida o filtrado foi submetido à contagem em microscópio óptico, com auxílio de câmara de Neubauer, para obtenção de uma suspensão de conídios com concentração de 1×10^8 conídios mL⁻¹(Figura 1C).

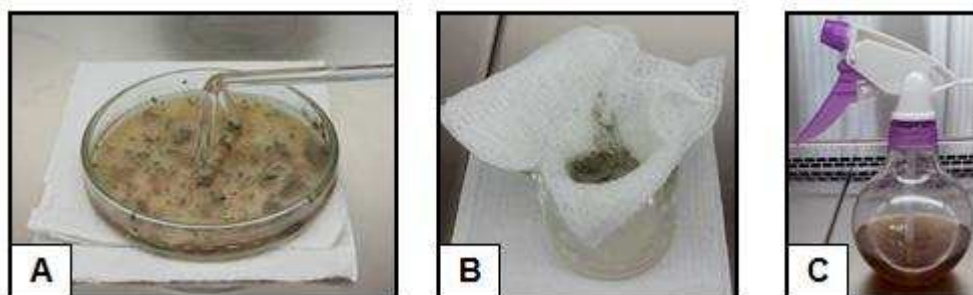


Figura 1. Placa de Petri contendo micélio e conídios (A), filtragem do micélio em camada dupla de gaze (B) e suspensão de conídios (C).

3.3. Inoculação dos grãos de arroz com a suspensão de conídios dos fungos dos gêneros *Aspergillus spp* e *Penicillium spp*

A suspensão de conídios dos dois gêneros de fungos, após contagem em câmara de Neubauer, foi agitada com dispersante Tween 20 e aspergida sobre os grãos (Figura 2A) com posterior mistura (Figura 2B), e estes foram acondicionados em bandejas contendo papel germitest umedecido.

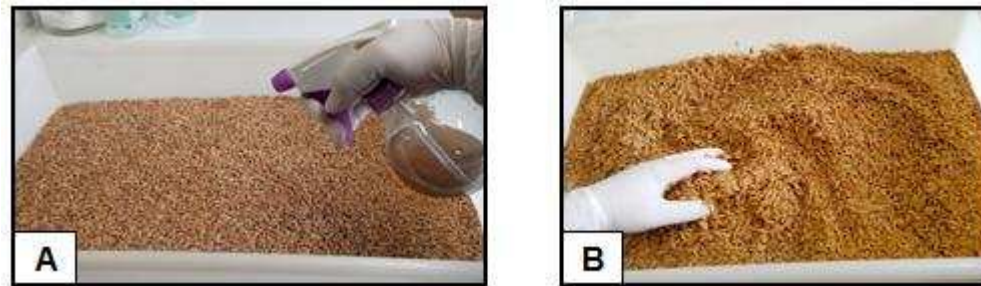


Figura 2. Aspersão da solução de conídios sobre os grãos de arroz (A) e mistura (B).

Em seguida, os grãos foram acondicionados em câmara climática do tipo B.O.D. a temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa de $95 \pm 5\%$ UR, condições consideradas ótimas para o crescimento e reprodução dos fungos. Os grãos foram mantidos no interior da câmara climática por 48 h, tempo suficiente para o desenvolvimento e reprodução dos fungos.

3.4. Processo de ozonização dos grãos de arroz

No processo de ozonização, amostras de grãos de arroz contaminados foram acondicionadas em câmaras de fumigação, confeccionadas com PVC, com 15 cm de diâmetro e 25 cm de altura. A 10 cm do fundo do recipiente, foi colocada uma tela metálica para sustentação dos grãos e formação de um “plenum”, para melhor distribuição do gás. Nas tampas inferiores e superiores das câmaras, foram instaladas conexões para injeção e exaustão do gás, respectivamente (Figura 3).

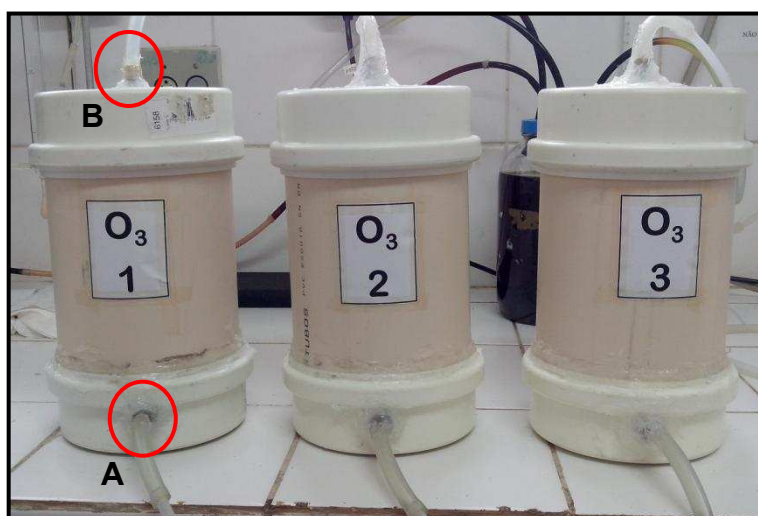


Figura 3. Câmaras de fumigação, com conexões para injeção (A) e exaustão (B) do gás.

A injeção do gás foi efetuada na concentração de $10,13 \text{ mg L}^{-1}$, em fluxo contínuo de 1 L min^{-1} . Os tempos de exposição dos grãos ao ozônio foram definidos em ensaios preliminares (12, 24, 36, 48 e 60 h), com a finalidade de avaliar o efeito do gás na desinfecção microbiológica e na qualidade dos grãos de arroz.

O controle da umidade relativa (UR) do gás ozônio, após a geração, foi obtido pela passagem do gás por uma solução saturada de Cloreto de Sódio (NaCl, 75% de UR), seguindo o método proposto por Ozkan et al. (2011), para que não ocorresse o ressecamento dos grãos de arroz.

O teste foi realizado em três repetições para cada tratamento, sendo cada repetição constituída por uma mostra de 500 g de arroz (Figuras 4A e 4B). O mesmo procedimento foi adotado para o tratamento controle, que consistiu na aplicação ar atmosférico, nas mesmas condições de umidade do gás ozônio (Figuras 4C e 4D).

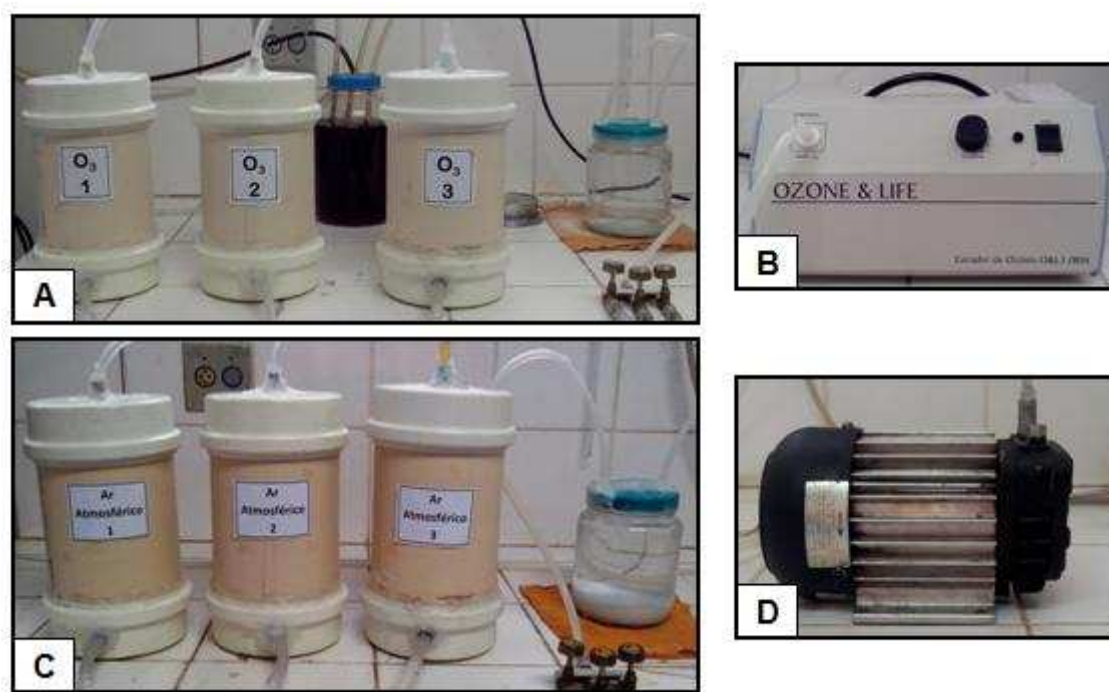


Figura 4. Recipientes cilíndricos utilizados para acondicionamento dos grãos de arroz submetidos ao ozônio (A) e ao ar atmosférico (C). Ozonizador (B) e compressor de ar atmosférico (D).

3.5. Determinação do tempo de saturação do gás ozônio nos grãos de arroz

Para a determinação do tempo de saturação do gás ozônio nos grãos de arroz, foi feita a injeção do gás, nas câmaras de fumigação, contendo 500 g de grãos cada. O tempo de saturação foi definido, determinando-se a concentração residual do gás em intervalos de

tempo regulares, utilizando o método iodométrico (APHA, 2005), até que a concentração do ozônio se mantivesse constante.

Os dados de saturação com ozônio foram submetidos à análise de regressão Linear Response Plateau em função do tempo, utilizando o software SAEG (UFV, Viçosa, Brasil).

3.6. Avaliação do efeito fungicida do ozônio em grãos de arroz

Para avaliação do efeito fungicida do gás ozônio, utilizou-se grãos de arroz (14% b.u.) contaminados com *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp.

A quantificação de fungos filamentosos e leveduras em meio de cultura e a ocorrência dos gêneros fúngicos *Aspergillus* e *Penicillium*, nos grãos foi avaliada com a adoção de métodos específicos a cada situação. Na quantificação de fungos filamentosos e leveduras utilizou-se o método de contagem em placas e na detecção dos gêneros fúngicos *Aspergillus* e *Penicillium*, o método de Incubação em Substrato de Papel ou Método do Papel de Filtro (“Blotter Test”) (BRASIL, 2009a)

No método de contagem em placas, 25 g de grãos de arroz foram devidamente homogeneizados em 225 mL de solução salina peptonada a 0,1%, em agitador magnético (Figura 5). A solução foi devidamente diluída (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) e plaqueada em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) acidificado com ácido tartárico a 10%, tendo sido as placas incubadas por cinco dias em câmaras climáticas a 25 °C (DOWNES e ITO, 2001). Os resultados referentes ao método de diluição foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama de amostra (UFC g⁻¹).



Figura 5. Grãos de arroz sendo homogeneizados em 225 mL de solução salina peptonada a 0,1%.

Na detecção dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram utilizados 400 grãos por amostra. Neste método, os grãos foram dispostos individualmente sobre uma camada de papel de filtro umedecido, distanciados entre si de 1 a 2 cm, no interior do recipiente (gerbox). Os recipientes continham tampas transparentes para permitir a passagem integral de luz incidente.

Os recipientes com os grãos ficaram dispostos sob lâmpadas de luz fluorescente branca, em câmaras com fotoperíodo de 12 h por 7-8 dias, a temperatura de 25 ± 2 °C.

Os grãos foram examinados individualmente com auxílio de uma lupa, pela ocorrência de frutificações típicas do crescimento de fungos. Conidióforos com conídios e corpos de frutificação (e.g., picnídios, acérvulos, peritécios) formados nos grãos são características importantes para a identificação das espécies fúngicas. Os resultados foram expressos em percentual de ocorrência dos fungos.

3.7. Avaliação do possível efeito do tratamento do ozônio na qualidade dos grãos de arroz

A avaliação da qualidade dos grãos foi feita antes e após a exposição dos grãos ao ozônio. As análises realizadas foram: teor de água, condutividade elétrica e percentual de germinação.

3.7.1. Determinação do teor de água

O teor de água foi determinado utilizando-se o método da estufa, segundo as normas descritas em Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009b), que prescrevem a utilização de estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 105 °C, durante 24 h. Foram utilizadas três repetições de 30 g de grãos para cada tratamento. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.7.2. Determinação da condutividade elétrica

A condutividade elétrica da solução contendo grãos de arroz foi medida utilizando-se o Sistema de Copo ou Condutividade de Massa (VIEIRA e CARVALHO, 1994). Os testes foram realizados com três repetições de 50 grãos, retirados aleatoriamente de cada tratamento. Os grãos foram pesados em balança com precisão de 0,01 g e colocados em

copos com capacidade para 200 mL, aos quais foram adicionados 75 mL de água destilada. Em seguida, os copos foram postos em câmara climática do tipo BOD à temperatura de 25 °C, durante 24 h. Depois desse período os copos foram retirados da câmara, para que fossem feitas as medições da condutividade elétrica da solução contendo os grãos. As leituras foram feitas com um medidor de condutividade elétrica da marca TecnoPON, modelo mCA-150, com ajuste para compensação de temperatura e eletrodo com a constante da célula de $1 \mu\text{S cm}^{-1}$. Antes de realizar as leituras, o aparelho foi calibrado com uma solução-padrão com condutividade elétrica conhecida à temperatura de 25 °C. O valor da condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) fornecido pelo aparelho foi dividido pela quantidade de matéria seca dos grãos, obtendo-se então o valor expresso em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de matéria seca.

3.7.3. Determinação do percentual de germinação

O percentual de germinação foi determinado pelo teste-padrão de germinação conforme recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009b), 400 grãos por amostra, em oito repetições de 50. O substrato utilizado foi o papel de filtro (papel-germitest), umedecido com água destilada (volume de água igual a 2,5 vezes a massa do papel). Os grãos de arroz foram dispostos sobre duas folhas de papel e, posteriormente, cobertos por mais uma folha do mesmo papel, sendo, então, embrulhados, formando rolos. Os rolos foram colocados em posição vertical dentro de um germinador e mantidos a uma temperatura de 25 ± 1 °C, por um período de 14 dias. A contagem foi realizada aos 14 dias, considerando-se as plântulas normais. Os dados foram expressos em porcentagem média de germinação.

3.8. Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco períodos de exposição ao ozônio (12, 24, 36, 48 e 60 h) com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de regressão e os modelos escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão, no coeficiente de determinação (R^2) e no comportamento do fenômeno.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características dos grãos de arroz antes da exposição ao gás ozônio

As características dos grãos de arroz, antes de serem submetidos ao tratamento com o gás ozônio, estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características dos grãos de arroz, antes da exposição ao gás ozônio.

Análise	Valor
Contagem de fungos filamentosos e leveduras (log UFC g ⁻¹)	3,997
Ocorrência de <i>Aspergillus</i> spp (%)	94,92
Ocorrência de <i>Penicillium</i> spp (%)	94,17
Teor de umidade (% b.u.)	14,3
Condutividade elétrica (μS cm ⁻¹ g ⁻¹)	17,082
Germinação (%)	72,93

4.2. Tempo de saturação do gás ozônio

A equação que descreve a concentração residual do ozônio em função do período de exposição ao gás, durante o processo de saturação da massa de grãos de arroz na concentração de 10,13 mg L⁻¹, de acordo com a análise de regressão, com seu respectivo coeficiente de determinação, encontra-se na Tabela 3 e a Figura 6 apresenta a estimativa do referido comportamento.

Tabela 3. Equação de regressão e seu respectivo coeficiente de determinação (R²), para a concentração residual de ozônio (mg L⁻¹) durante o processo de saturação dos grãos de arroz.

Concentração de ozônio (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	Intervalo	R ²
10,13	$\hat{y} = 0,3713 + 0,332 X_i$	$0 \leq X_i < 13,97$	0,94
	$\hat{y} = 5,0075$	$13,97 \leq X_i \leq 50,00$	

X_i = período de ozonização (min) e \hat{y} = concentração residual de ozônio (mg L⁻¹).

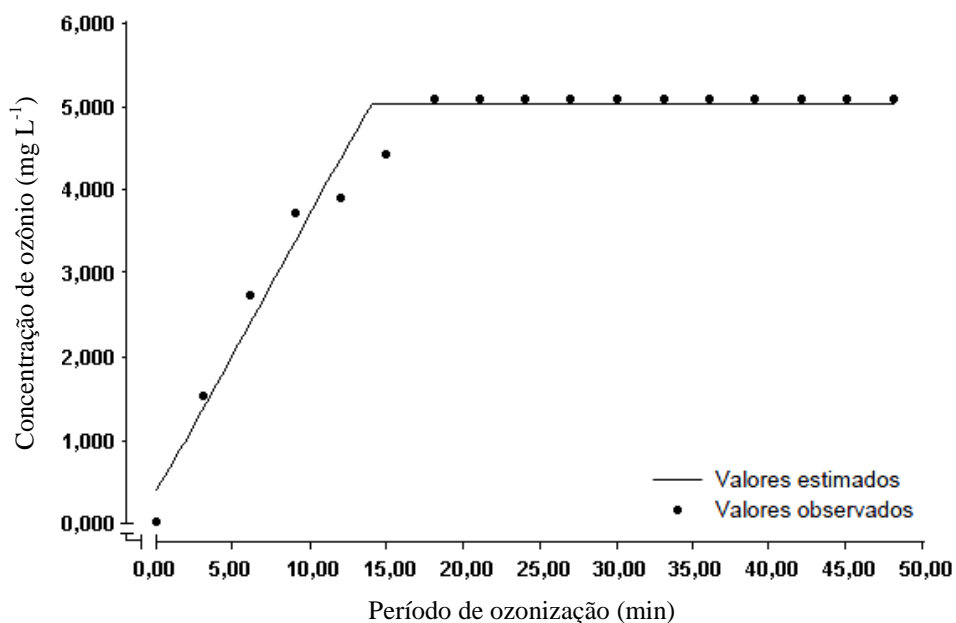


Figura 6. Concentração residual do gás ozônio (mg L^{-1}) em função do período de ozonização (min) durante o processo de saturação dos grãos de arroz, na concentração de $10,13 \text{ mg L}^{-1}$.

Para a massa de grãos de arroz ozonizada, foi calculado um tempo de saturação de 13,97 min, a partir do qual os valores de concentração residual do gás ozônio se mantiveram constantes. A concentração de saturação foi de $5,0075 \text{ mg L}^{-1}$, o que corresponde a cerca de 49,44 % da concentração inicial adotada.

Utilizando procedimentos semelhantes, Silva (2011) ao ozonizar trigo, nas concentrações de 0,54; 1,07; 1,61 e $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, ao fluxo de $2,0 \text{ L min}^{-1}$, obteve tempos de saturação de 100, 90, 75 e 36 h e concentrações de saturação de 0,23; 0,45; 0,73 e $0,91 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Valores estes que equivalem a 43, 42, 45 e 43 % da concentração inicial do gás injetada na massa de grãos.

Do mesmo modo, Brito Júnior (2013), ao ozonizar grãos de milho, na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$ e ao fluxo de $5,8 \text{ L min}^{-1}$, obteve um tempo de saturação de 138,56 min. A concentração de saturação foi de $0,9874 \text{ mg L}^{-1}$, o que corresponde a 46,1 % da concentração inicial injetada.

4.3. Eficácia do efeito fungicida do ozônio

4.3.1. Quantificação de fungos filamentosos e leveduras

Os valores médios da quantificação de fungos filamentosos e leveduras dos grãos de arroz após o tratamento com ozônio nos períodos de exposição de 12, 24, 36, 48 e 60 h são apresentados na Tabela 4. Houve redução significativa ($p < 0,01$) na contagem de fungos filamentosos e leveduras (FFL), com o aumento do período de exposição ao gás ozônio. Foram constatadas reduções equivalentes a 0,5326; 1,4578; 1,5758; 2,1729 e 3,8127 ciclos log, em relação ao controle, quando os grãos de arroz foram submetidos ao processo de ozonização, nos períodos de 12, 24, 36, 48 e 60 h, respectivamente. A análise de regressão dos dados permitiu o ajuste da equação para contagem de fungos filamentosos e leveduras dos grãos expostos ao ozônio, em função do período de exposição (Tabela 5).

Tabela 4. Valores médios referentes à contagem ($\log \text{ UFC g}^{-1}$) de fungos filamentosos e leveduras nos grãos de arroz submetidos ao ar atmosférico e ao gás ozônio.

Período de exposição (h)	Tratamento	
	Controle	Ozônio
12	3,8245 a	3,2919 b
24	3,8148 a	2,3570 b
36	3,8096 a	2,2339 b
48	3,8163 a	1,6433 b
60	3,8127 a	0,00 b

Médias seguidas de uma mesma letra na linha não diferem entre si, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de “t”.

Tabela 5. Equação de regressão ajustada, para a contagem de fungos filamentosos e leveduras ($\log \text{ UFC g}^{-1}$) em função do período de exposição ao ozônio (h).

Variável	Equação ajustada	Intervalo
FFL	$\hat{y} = 4,2268 - 0,078 X_i$	$12 \leq X_i < 37,66$
	$\hat{y} = 1,2924$	$37,66 \leq X_i \leq 60,00$

X_i = período de exposição (h) e \hat{y} = contagem de fungos filamentosos e leveduras ($\log \text{ UFC g}^{-1}$).

A Figura 7 apresenta a estimativa da contagem de fungos filamentosos e leveduras. Verifica-se que com o aumento do período de exposição ao ozônio, ocorreu a diminuição da contagem de fungos filamentosos e leveduras, e a partir de 37,66 h a contagem se manteve constante.

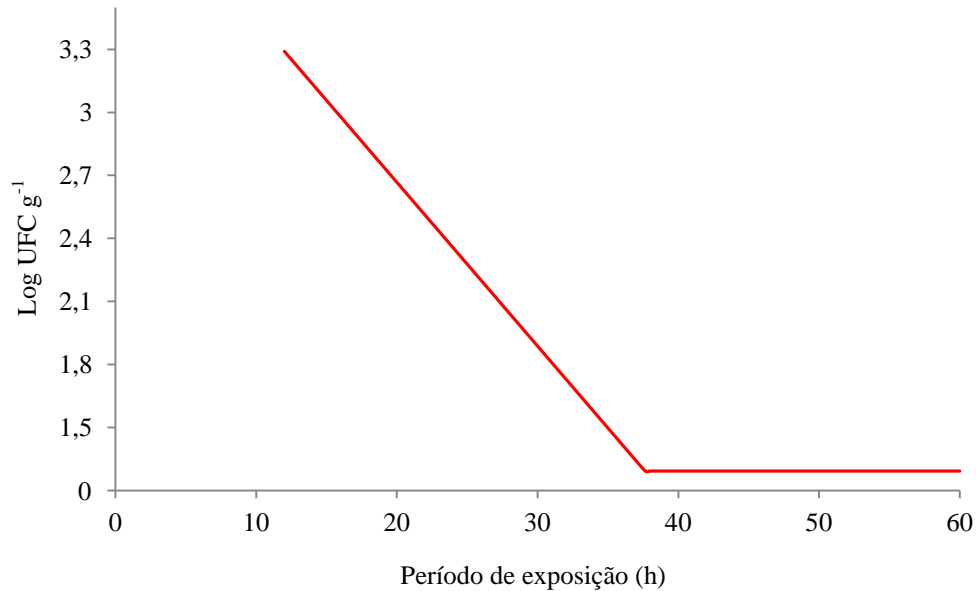


Figura 7. Estimativa da contagem de fungos filamentosos e leveduras (log UFC g⁻¹) nos grãos de arroz expostos ao ozônio em função do período de exposição (h).

É possível observar a diferença ocasionada pela ozonização na contagem de fungos filamentosos e leveduras. Observa-se que o desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras nas placas reduziu gradativamente, com o aumento do período de exposição (Figura 8).

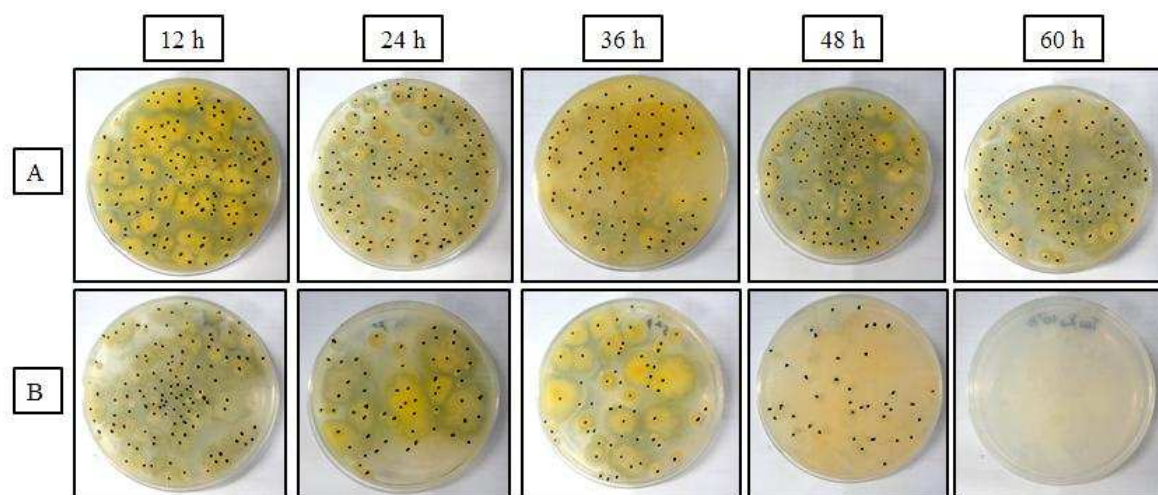


Figura 8. Placas de Petri, contendo fungos filamentosos e leveduras em meio de cultura BDA, provenientes de grãos de arroz submetidos ao ar atmosférico (A) e ao gás ozônio (B), em diferentes períodos de exposição.

Uma redução de 2 e 3 ciclos log foi verificada em grãos de amendoim ozonizados nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹, respectivamente, pelo período de exposição de 96 h por Alencar et al. (2012). Da mesma forma, Brito Júnior (2013) obteve uma redução de 2 ciclos log na contagem de fungos filamentosos e leveduras, quando ozonizou grãos de milho, com uma concentração de ozônio de 2,14 mg L⁻¹, por um período de 50 h. No entanto, a concentração de 0,54 mg L⁻¹ por um período de 100 h, não foi eficiente para promover redução significativa na contagem de fungos filamentosos e leveduras em grãos de trigo (SILVA, 2011).

Os resultados apresentados no presente trabalho corroboram os resultados encontrados por Alencar et al. (2012) e Brito Júnior (2013), pois também ocorreu redução de, aproximadamente, 3 ciclos log na contagem de fungos filamentosos e leveduras.

A exposição ao ozônio de produtos hortícolas como pimenta preta, cenoura, alface e morango resultou em reduções de 2 a 6 ciclos log na contagem de fungos e leveduras (RAY e BHUNIA, 2008; PELOSO et al., 2010).

O tratamento de morangos com o gás ozônio na concentração de 50 mg L⁻¹ por 60 min, reduziu significativamente em 1,3 ciclos log a contagem de fungos e leveduras em relação ao controle (PONCE et al., 2010). Oliver et al. (2012), também observou redução de 1,0 ciclo log no Número Mais Provável (NMP) de *E. coli* quando ozonizou morangos na concentração de 4,0 mg L⁻¹ por 20 min.

É importante ressaltar que cada grupo de microrganismo apresenta sensibilidade específica ao ozônio, as bactérias são mais sensíveis que os fungos filamentosos e leveduras, e as células vegetativas mais sensíveis que os esporos (PASCUAL et al., 2007).

Outro ponto que se deve levar em consideração é que existe correlação positiva entre a umidade relativa (UR) do ambiente e a toxicidade ao ozônio, ou seja, quanto maior a umidade relativa, maior a toxicidade do gás ozônio (OZKAN et al., 2011). Esses autores observaram maior efeito sanitizante do ozônio em ambiente com 95% de UR, ou seja, ambientes com umidade relativa baixa necessitam de maiores concentrações de ozônio para o mesmo efeito sanitizante que ambientes com umidade relativa mais elevada.

A utilização da solução saturada de Cloreto de Sódio (NaCl, 75% de UR) no presente trabalho pode ter aumentado o efeito fungicida do ozônio nos grãos de arroz.

4.3.2. Índice de ocorrência dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*

Os valores médios do índice de ocorrência de *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp dos grãos de arroz após o processo de ozonização em diferentes períodos de exposição, são apresentados na Tabela 6. Observou-se redução significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) no percentual de grãos contaminados por *Penicillium* spp e no percentual de grãos contaminados por *Aspergillus* spp, com o aumento do período de exposição. A análise de regressão dos dados permitiu o ajuste da equação para o índice de ocorrência de *Penicillium* spp e de *Aspergillus* spp dos grãos expostos ao ozônio, em função do período de exposição (Tabela 7).

Tabela 6. Valores médios referentes ao índice de ocorrência de *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp (%) nos grãos de arroz submetidos ao ar atmosférico e ao gás ozônio.

Período de exposição (h)	<i>Penicillium</i> spp* (%)		<i>Aspergillus</i> spp** (%)	
	Controle	Ozônio	Controle	Ozônio
12	93,42 a	63,58 b	93,67 a	90,92 b
24	92,33 a	26,42 b	92,08 a	74,42 b
36	90,92 a	7,17 b	92,92 a	45,50 b
48	89,92 a	0,00 b	92,17 a	17,92 b
60	89,42 a	0,00 b	92,42 a	0,00 b

Médias seguidas de uma mesma letra na linha, para cada variável, não diferem entre si, ao nível de *1% e **5% de probabilidade, pelo teste de “t”.

Tabela 7. Equação de regressão ajustada, para o índice de ocorrência de *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp (%), em função do período de exposição ao ozônio (h).

Variável	Equação ajustada	Intervalo	R ²
Penicillium	$\hat{y} = 100,75 - 3,097 X_i$	$12 \leq X_i < 31,76$	
	$\hat{y} = 2,3889$	$31,76 \leq X_i \leq 60,00$	
Aspergillus	$\hat{y} = 119,1667 - 2,051 X_i$	$12 \leq X_i < 58,09$	0,9854
	$\hat{y} = 0,00$	$58,09 \leq X_i \leq 60,00$	

X_i = período de exposição (h) e \hat{y} = índice de ocorrência de *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp (%).

As Figuras 9 e 10 apresentam a estimativa do índice de ocorrência de *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp. Verifica-se que com o aumento do período de exposição ao ozônio, ocorreu a diminuição no percentual de grãos contaminados por *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp. A partir de 31,76 e 58,09 h, respectivamente, o índice de ocorrência desses gêneros se manteve constante.

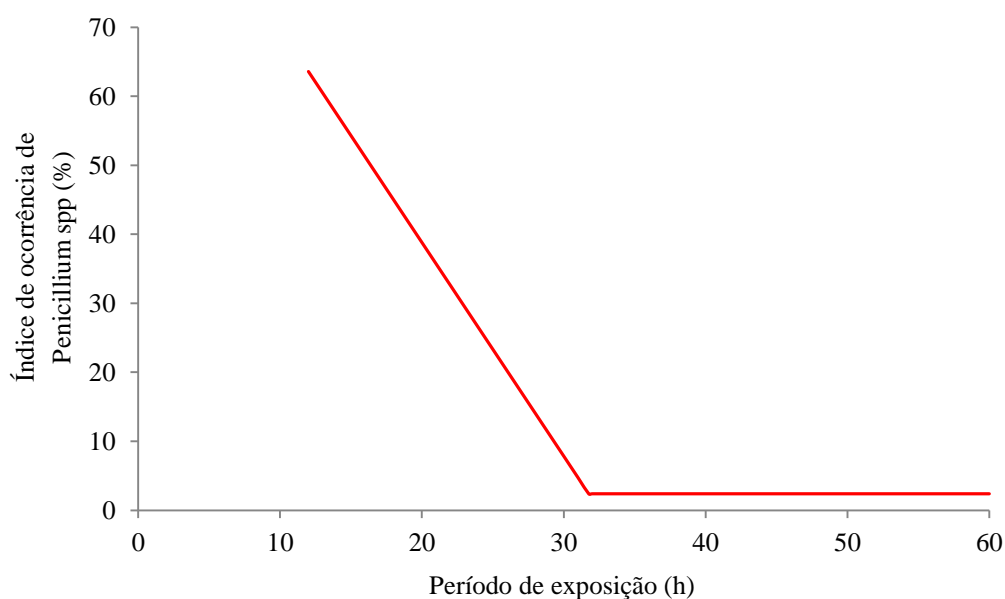


Figura 9. Estimativa do índice de ocorrência de *Penicillium* spp (%) nos grãos de arroz expostos ao ozônio em função do período de exposição (h).

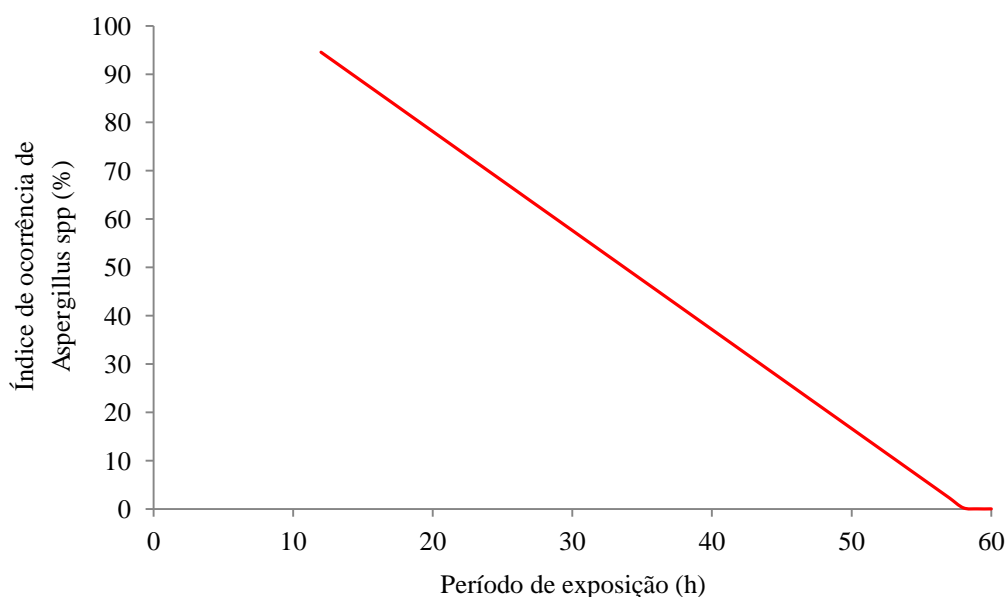


Figura 10. Estimativa do índice de ocorrência de *Aspergillus* spp (%) nos grãos de arroz expostos ao ozônio em função do período de exposição (h).

Na Figura 11, é possível observar a diferença ocasionada pela ozonização no índice de ocorrência de *Penicillium* spp e de *Aspergillus* spp em diferentes períodos de exposição.

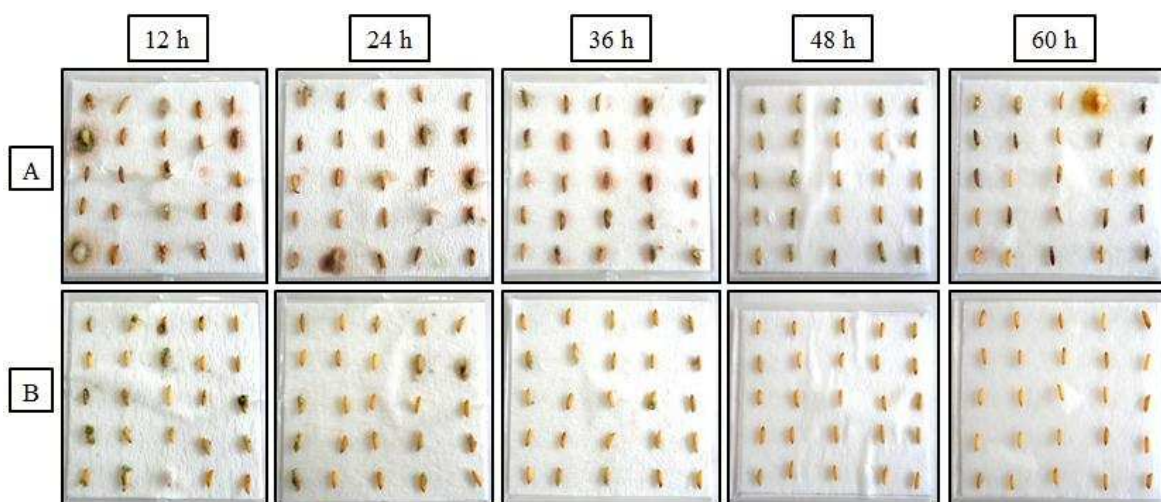


Figura 11. Gerbox, contendo grãos de arroz submetidos ao ar atmosférico (A) e ao gás ozônio (B), em diferentes períodos de exposição.

Comparando-se os índices médios de ocorrência de *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp, observa-se redução no crescimento de ambos. Os resultados sugerem que *Aspergillus* spp foi mais tolerante ao efeito fungicida do gás ozônio do que *Penicillium* spp.

Vale ressaltar que o gás ozônio, além de atuar como agente inibidor do crescimento e desenvolvimento de *Aspergillus* spp e *Penicilium* spp, também estendeu seu efeito fungicida aos demais fungos presentes na superfície dos grãos.

Observando os grãos de arroz com o auxílio de um microscópio estereoscópio Leica S6D, conectado a um sistema de captura de imagem, é possível observar o efeito fungicida do processo de ozonização à medida que se aumentou o período de exposição (Figura 12).

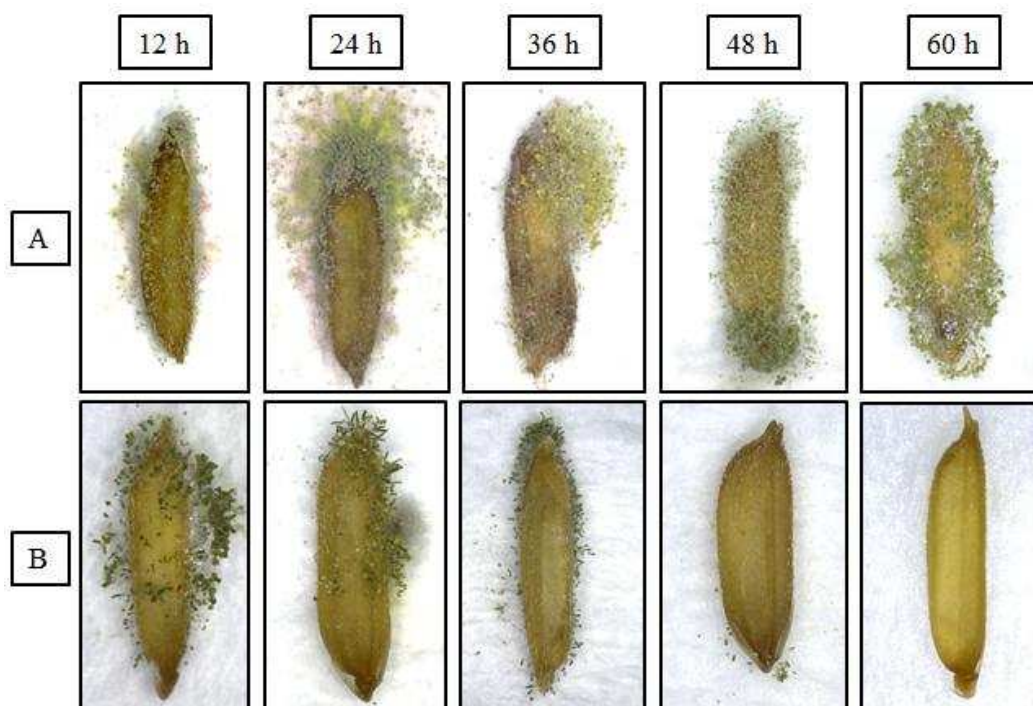


Figura 12. Grãos de arroz observados com o auxílio de um microscópio estereoscópio, submetidos ao ar atmosférico (A) e ao gás ozônio (B), em diferentes períodos de exposição.

Observa-se (Figura 12) que nos grãos de arroz ozonizados nos períodos de exposição de 12, 24, 36 e 48 h, nem todos os esporos fúngicos deixaram de germinar, porém produziram colônias de tamanho bastante reduzido, esparsas e com baixo vigor. Vijayanandraj et al. (2006), estudando o efeito do ozônio sobre *Aspergillus niger*, perceberam alterações na morfologia do fungo. Os conídios tratados com ozônio, à concentração de $4,8 \text{ mg L}^{-1}$, por 5, 10 e 15 min, produziram colônias não-esporulantes.

A inibição do desenvolvimento de microrganismos pelo ozônio é um processo bastante complexo. O ozônio age sobre diversos constituintes da parede e da membrana celular, bem como em componentes do conteúdo da célula, enzimas e ácidos nucleicos (GREENE et al., 2012). Desta forma, os microrganismos são inativados devido a lise do

envoltório celular, levando ao escoamento do conteúdo citoplasmático, em decorrência da ação do ozônio molecular ou dos radicais livres gerados durante a decomposição do mesmo (PASCUAL et al., 2007; CULLEN et al., 2010).

Reduções significativas da infecção fúngica em grãos de trigo, aveia e ervilha devido à exposição ao gás ozônio foram observadas por Ciccarese et al. (2007). Dentre os fungos avaliados por esses autores, destacam-se os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Fusarium*.

Resultados semelhantes foram observados por Alencar et al. (2012) na ozonização de amendoim. Estes autores relataram que o percentual de grãos de amendoim infectados por *A. flavus* e *A. parasiticus* reduziu significativamente quando os mesmos foram ozonizados nas concentrações de 13 e 21 mg L⁻¹, por um período de 96 h.

Realizando testes in vitro, Silva e Venâncio (2008) avaliaram a sensibilidade de *A. flavus* e *A. parasiticus* ao ozônio e obtiveram taxas de inativação que variaram entre 98 e 100%, para as concentrações de 10 e 20 mg L⁻¹. Os autores concluíram que o ozônio é eficaz no controle de conídios das estirpes testadas.

4.4. Efeito do ozônio na qualidade dos grãos de arroz

4.4.1. Teor de água

Os valores médios do teor de água (% b.u.) dos grãos de arroz após o tratamento com ozônio e ar atmosférico, em diferentes períodos de exposição, são apresentados na Tabela 8. O teor de água apresentou variação significativa ($p < 0,01$) entre os tratamentos, nos períodos de exposição de 12, 24, 36, 48 e 60 h. O valor médio estimado do teor de água dos grãos reduziu 1,0% quando o período de exposição foi de 60 h. A análise de regressão dos dados permitiu o ajuste da equação para teor de água dos grãos expostos ao ozônio, em função do período de exposição (Tabela 9).

A Figura 13 apresenta a estimativa do teor de água dos grãos de arroz expostos ao ozônio. Verifica-se que com o aumento do período de exposição, houve diminuição no teor de água dos grãos de arroz e a partir de 55,33 h, a perda de água dos grãos de arroz cessou.

Tabela 8. Valores médios referentes ao teor de água (% b.u.) dos grãos de arroz submetidos ao ar atmosférico e ao gás ozônio.

Período de exposição (h)	Tratamento	
	Controle	Ozônio
12	14,0 a	13,9 b
24	14,0 a	13,6 b
36	13,8 a	13,4 b
48	13,6 a	13,1 b
60	13,5 a	12,9 b

Médias seguidas de uma mesma letra na linha não diferem entre si, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de “t”.

Tabela 9. Equação de regressão ajustada e seu respectivo coeficiente de determinação (R^2), para o teor de água (%), em função do período de exposição ao ozônio (h).

Variável	Equação ajustada	Intervalo	R^2
UMID	$\hat{y} = 14,1829 - 0,023 X_i$	$12 \leq X_i < 55,33$	0,9932
	$\hat{y} = 12,9226$	$55,33 \leq X_i \leq 60,00$	

X_i = período de exposição (h) e \hat{y} = teor de água (%).

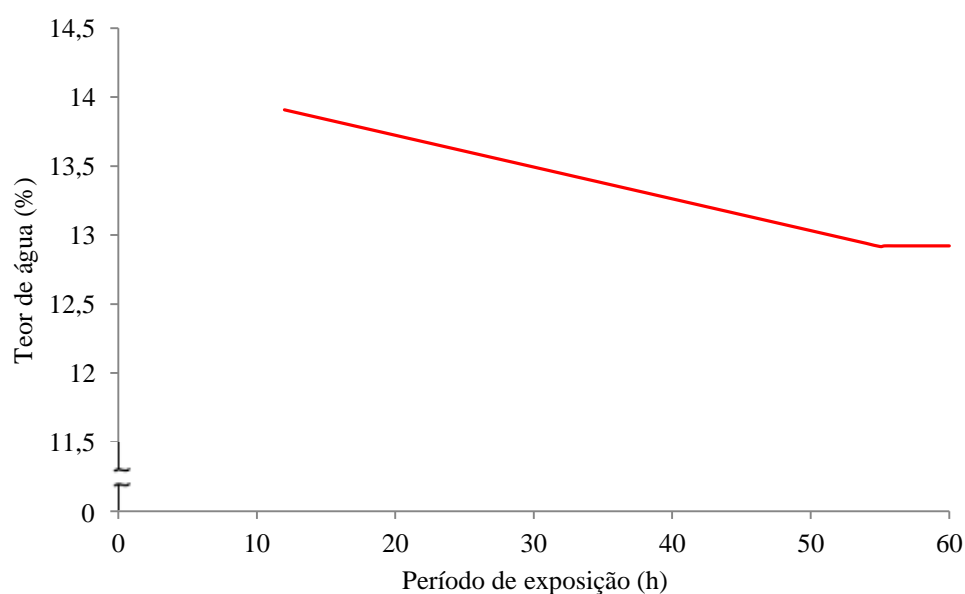


Figura 13. Estimativa do teor de água (%) dos grãos de arroz expostos ao ozônio em função do período de exposição (h).

Resultados análogos ao presente trabalho, foram observados por Wang et al. (2010), que detectaram redução no teor de água do milho ozonizado (12,86%) em relação ao milho controle (15,56%), após exposição ao ozônio na concentração de 4,8 mg L⁻¹ e ao fluxo contínuo de 0,4 L min⁻¹, por um período de 12 h. Alencar et al. (2012), também obteve resultados parecidos na ozonização de grãos de amendoim. Estes autores constataram decréscimo significativo do teor de água dos grãos, o valor médio do teor de água reduziu de 7,6% para 4,4%, quando o período de exposição foi de 96 h.

A redução do teor de água dos grãos com o aumento do período de exposição, independentemente da exposição ao ar atmosférico ou ao gás ozônio, pode ser explicada pelo equilíbrio higroscópico entre os grãos de arroz e o meio (ar atmosférico ou ozônio). O teor de água de equilíbrio é alcançado quando a pressão parcial de vapor de água no produto se iguala à do ar que o envolve (CORRÊA et al., 2005). Com o objetivo de reduzir essa perda de água, no presente trabalho, foi utilizada uma solução saturada de Cloreto de Sódio (NaCl, 75% de UR).

4.4.2. Condutividade Elétrica

Os valores médios da condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) da solução que continha os grãos de arroz após o tratamento com ozônio e ar atmosférico, em diferentes períodos de exposição, são apresentados na Tabela 10. A condutividade elétrica apresentou variação significativa ($p < 0,01$) entre os tratamentos e períodos de exposição (12, 24, 36, 48 e 60 h). A análise de regressão dos dados permitiu o ajuste da equação para a condutividade elétrica da solução que continha os grãos de arroz expostos ao ozônio, em função do período de exposição (Tabela 11).

A avaliação da condutividade elétrica constitui um dos procedimentos analíticos com o propósito de se analisar o vigor e a condição fisiológica dos grãos. Os resultados expressam a quantidade de íons lixiviados do interior dos grãos para o meio externo, retratando o seu grau de deterioração (VIEIRA e CARVALHO, 1994).

A Figura 14 apresenta a estimativa da condutividade elétrica da solução que continha os grãos de arroz expostos ao ozônio. Verifica-se que com o aumento do período de exposição, houve aumento na condutividade elétrica e a partir de 56,31 h, a condutividade elétrica da solução que continha os grãos de arroz se manteve constante.

Tabela 10. Valores médios referentes à condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) da solução que continha os grãos de arroz submetidos ao ar atmosférico e ao gás ozônio.

Período de exposição (h)	Tratamento	
	Controle	Ozônio
12	17,13 a	40,57 b
24	17,50 a	46,28 b
36	18,24 a	53,90 b
48	19,05 a	62,80 b
60	19,83 a	71,53 b

Médias seguidas de uma mesma letra na linha não diferem entre si, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de “t”.

Tabela 11. Equação de regressão ajustada e seu respectivo coeficiente de determinação (R^2), para a condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$), em função do período de exposição ao ozônio (h).

Variável	Equação ajustada	Intervalo	R^2
COND	$\hat{y} = 32,3431 + 0,618 X_i$	$12 \leq X_i < 56,31$	0,9906
	$\hat{y} = 67,1644$	$56,31 \leq X_i \leq 60,00$	

X_i = período de exposição (h) e \hat{y} = condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$).

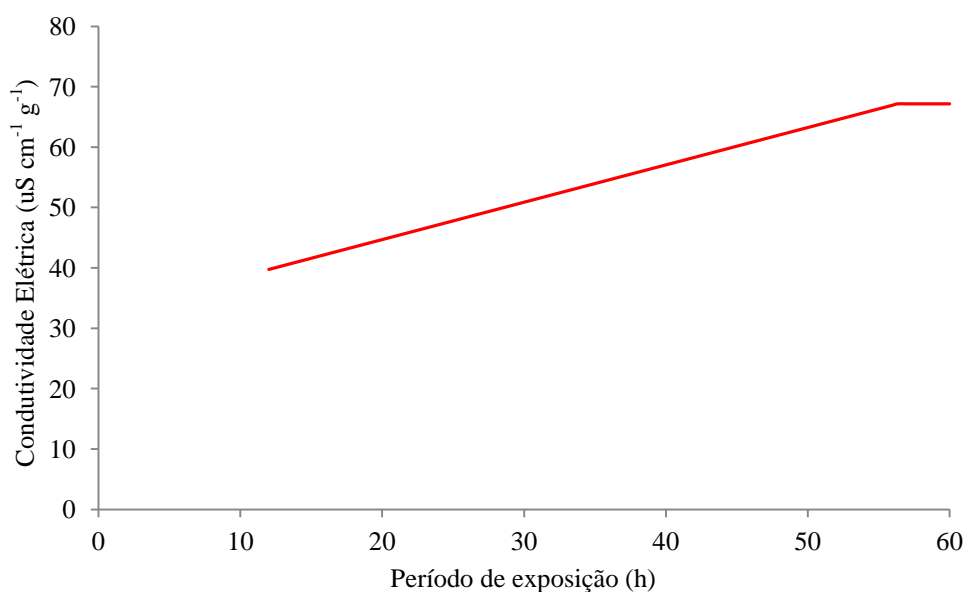


Figura 14. Estimativa da condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) da solução que continha os grãos de arroz ozonizados, em função do período de exposição (h).

Resultados semelhantes foram obtidos por Rozado et al. (2008) que observaram aumento significativo da condutividade elétrica da solução que continha os grãos de milho expostos ao gás ozônio, por 264 h. Silva (2011), também observou aumento dos valores de condutividade elétrica em grãos de trigo ozonizados, na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$, nos períodos de exposição de 20, 40 e 60 h.

Resultados contrários foram obtidos por Brito Júnior (2013), pois observou não ter ocorrido variação significativa nos valores de condutividade elétrica na solução contendo os grãos de milho, entre os tratamentos com o gás ozônio e o ar atmosférico, nos diferentes períodos de exposição.

Levando-se em consideração que a elevação do valor da condutividade elétrica indica que ocorreu a liberação de íons para a solução aquosa pela lixiviação de eletrólitos dos tecidos dos grãos (VIEIRA e CARVALHO, 1994) e que tal fato está relacionado à deterioração dos mesmos, pode-se inferir que os grãos de arroz ozonizados poderão apresentar uma pequena redução no vigor.

4.4.3. Germinação

Os valores médios da germinação (%) dos grãos de arroz após o tratamento com ozônio e ar atmosférico, em diferentes períodos de exposição, são apresentados na Tabela 12. A germinação dos grãos de arroz apresentou variação significativa ($p < 0,01$) entre os tratamentos com o ar atmosférico e com o gás ozônio, com exceção dos períodos de exposição de 12 e 24 h, respectivamente. A análise de regressão dos dados permitiu o ajuste da porcentagem de germinação dos grãos expostos ao ozônio, em função do período de exposição (Tabela 13)

A Figura 15 apresenta estimativa da germinação dos grãos de arroz expostos ao ozônio. Verifica-se que com o aumento do período de exposição, houve diminuição na germinação dos grãos de arroz e a partir de 52,26 h, o percentual de germinação dos grãos de arroz se manteve constante.

Tabela 12. Valores médios da germinação (%) dos grãos de arroz submetidos ao ar atmosférico e ao gás ozônio.

Período de exposição (h)	Tratamento	
	Controle	Ozônio
12	64,84 a	62,85 a
24	64,32 a	60,50 a
36	63,54 a	52,69 b
48	63,45 a	50,87 b
60	62,93 a	48,61 b

Médias seguidas de uma mesma letra na linha não diferem entre si, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de “t”.

Tabela 13. Equação de regressão ajustada e seu respectivo coeficiente de determinação (R^2), para a germinação (%), em função do período de exposição ao ozônio (h).

Variável	Equação ajustada	Intervalo	R^2
GERM	$\hat{y} = 67,6649 - 0,365 X_i$	$12 \leq X_i < 52,26$	0,9352
	$\hat{y} = 48,6111$	$52,26 \leq X_i \leq 60,00$	

X_i = período de exposição (h) e \hat{y} = germinação (%).

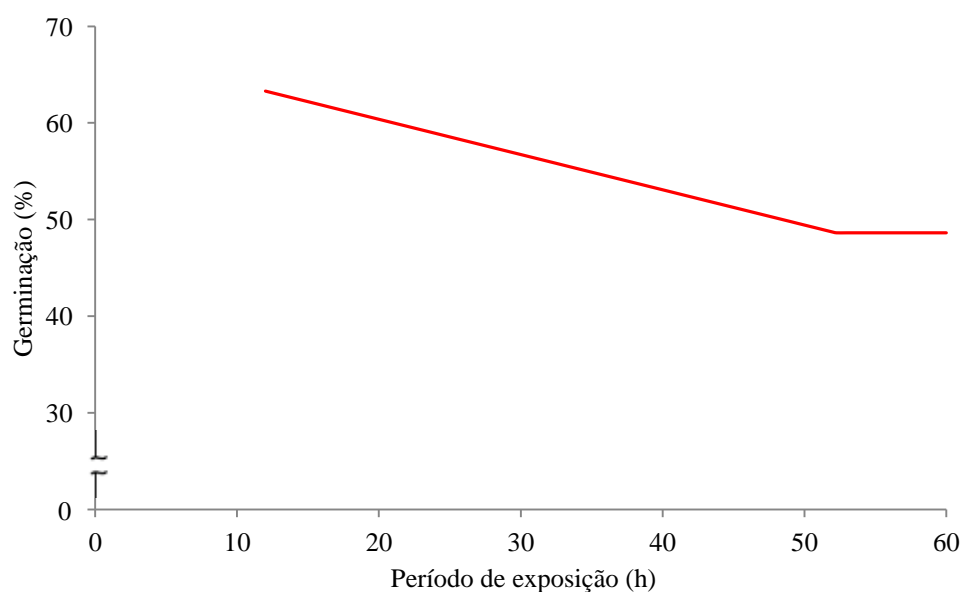


Figura 15. Estimativa da germinação (%) dos grãos de arroz ozonizados, em função do período de exposição (h).

Os menores valores de germinação provavelmente foram ocasionados pela alta concentração de ozônio utilizada e também pelo aumento do período de exposição. SILVA (2011), também observou diminuição na germinação de grãos de trigo ozonizados, na concentração de $2,14 \text{ mg L}^{-1}$ e períodos de exposição de 20, 40 e 60 h.

Resultados semelhantes foram obtidos por Rozado et al. (2008) para grãos de milho ozonizados na concentração de 50 ppm (equivalente a $0,11 \text{ mg L}^{-1}$) por 264 h. Esses autores relataram que o percentual de germinação apresentou valores menores e que a condutividade elétrica aumentou significativamente quando comparados aos grãos tratados apenas com ar atmosférico.

O comportamento da condutividade elétrica dos grãos de arroz ozonizados no presente trabalho correlaciona-se negativamente (-0,9566) com os resultados de germinação, ou seja, quando a condutividade elétrica aumenta, a germinação diminui. Grãos com maiores valores de condutividade elétrica apresentam maiores taxas de degradação da membrana celular e, conseqüentemente, menor percentual de germinação (VIEIRA e KRZYZANOWSKI, 1999).

Santos (2008) observou que não houve efeito significativo da ozonização sobre as características fisiológicas dos grãos de milho, tais como teor de água, condutividade elétrica e germinação, em relação ao controle. Resultados estes que confirmam os encontrados por Pereira (2006), quando verificou que o tratamento com o gás ozônio na concentração de 50 ppm, em comparação com o tratamento com ar atmosférico, não afetou as características fisiológicas dos grãos de milho. Resultados semelhantes já haviam sido apresentados por Mendez et al. (2003), quando os autores não observaram qualquer efeito negativo da ozonização sobre a qualidade e características nutricionais dos grãos de trigo, de milho e de arroz submetidos a um tratamento com 50 ppm de ozônio por um período de 30 dias.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho e os objetivos propostos, conclui-se que:

- A concentração e o tempo de saturação do gás ozônio nos grãos de arroz foi de 5,0075 mg L⁻¹ e 13,97 min, respectivamente.
- A ozonização dos grãos de arroz, na concentração de 10,13 mg L⁻¹ e 60 h de exposição ao ozônio, reduziu em 3,8127 ciclos log a contagem de fungos filamentosos e leveduras e em, aproximadamente, 100% o índice de ocorrência de *Aspergillus spp* e *Penicillium spp*.
- O valor médio do teor de água dos grãos de arroz ozonizados reduziu 1,0% e a partir de 55,33 h de exposição, a perda de água cessou.
- A condutividade elétrica da solução que continha os grãos de arroz ozonizados aumentou e a germinação reduziu, e a partir de 56,31 e 52,26 h de exposição, respectivamente, se mantiveram constantes.

Os resultados demonstrados neste estudo confirmam o efeito fungicida do gás ozônio em grãos de arroz e podem contribuir para o desenvolvimento de novas pesquisas, que poderão apontar a concentração e o período de exposição ideais, de tal modo a impedir o crescimento e o desenvolvimento de fungos, sem afetar a qualidade dos grãos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUAYO, E.; ESCALONA, V.H.; ARTES, F. Effect of cyclic exposure to ozone gas on physicochemical, sensorial and microbial quality of whole and sliced tomatoes. **Postharvest Biology and Technology**, v.39, p.169-177, 2006.
- AKBAS, M.Y.; OZDEMIR, M. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. **Food Microbiology**, v.25, p.386-391, 2008.
- AKBAS, M.Y.; OZDEMIR, M. Effect of different ozone treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.86, p.2090-2104, 2006.
- ALENCAR, E.R.; FARONI, L.R.A.; SOARES, N.F.F.; SILVA, W.A.; CARVALHO, M.C.S. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, n.4, p.899–905, 2012.
- ALLEN, B.; WU, J.; DOAN, H. Inactivation of Fungi Associated with Barley Grain by Gaseous Ozone. **Journal of Environmental Science and Health, Part B-Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.B38, n.5, p.617–630, 2003.
- ALMAGUER, M.; ROJAS, T.I.; RODRÍGUEZ-RAJO, F.J.; AÍRA, M.J. Airborne fungal succession in a rice field of Cuba. **European Journal of Plant Pathology**, v.133, p.473-482, 2012.
- AMAYA, D.B.R.; SABINO, M. Mycotoxin Research in Brazil: The last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.1-11, 2002.
- ANDRADE, E.T.; COUTO, S.M.; QUEIROZ, D.M.; FARONI, L.R.A.; PEIXOTO, B.A. Qualidade de sementes de milho armazenadas em silo metálico cilíndrico. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v.28, n.2, p.23-30, 2003.
- APHA; AWWA; WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21 ed. **American Public Health Association**, Washington, 2005. 937p.
- BARBONI, T.; CANNAC, M.; CHIARAMONTI, N. Effect of cold storage and ozone treatment on physicochemical parameters, soluble sugars and organic acids in *Actinidia deliciosa*. **Food Chemistry**, v.121, p.946-951, 2010.
- BIANCHINI, A. Estudo Comparativo entre Manejos de Secagem e Armazenamento de Arroz na Incidência de Fungos Toxigênicos e Micotoxinas. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 103p. **Dissertação de Mestrado**.

- BORREGO, S.; GUIAMET, P.; GÓMEZ DE SARAIVA, S.; BATISTINI, P.; GARCÍA, M.; LAVÍN, P.; PERDOMO, I. The quality of air at archives and the biodeterioration of photographs. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.64, p.139-145, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos – PARA 2011**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/58a5580041a4f6669e579ede61db78cc/Relat%C3%B3rio+PARA+2011-12+-+30_10_13_1.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 08 de dezembro de 2014a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <<http://agrofit.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 13 de novembro de 2014b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009a. 202p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de coleta de amostras do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem vegetal**. Secretaria de Defesa Agropecuária.– Brasília: Mapa/ACS, 2013. 37 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análises de Sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009b. 399p.
- BRITO JÚNIOR, J.G. Ozônio como agente fungicida e seu efeito na qualidade dos grãos de milho. Viçosa: UFV, 2013. 56p. **Tese de Doutorado**.
- BRONDANI, G.; VEY, I.H.; MADRUGA, S.R.; TRINDADE, L.L.de; VENTURINI, J.C. Diferenciais de custos em culturas de arroz: a experiência do Rio Grande do Sul. **Revista Universo Contábil**, Blumenau, v.2, n.1, p.61-74, 2006.
- BUTT, A.R.; YASEEN, S.I.; JAVAID, A. Seed-borne mycoflora of stored rice grains and its chemical Control. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v.21, n.2, p.193-196, 2011.
- CHAIDEZ, C.; LOPEZ, J.; VIDALES, J.; CAMPO, N.C. Efficacy of chlorinated and ozonated water in reducing Salmonella typhimurium attached to tomato surfaces. **International Journal of Environmental Health Research**, v.17, p.311-318, 2007.

- CICCARESE, F.; SASANELLI, N.; CICCARESE, A.; ZIADI, T.; AMBRICO, A.; MANCINI, L. Seed disinfestation by ozone treatments. In: IOA Conference and Exhibition, 2007, Valência - Espanha. **Proceedings...** Valência: International Ozone Association, 2007.
- CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos**. CONAB, 2014. Disponível em: <http://conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_10_23_10_20_02_boletim_graos_outubro_2014.pdf> Acesso em: 13 de novembro de 2014.
- COELHO, C. S. P.; FURLONG, E.B.; ALMEIDA, T.L. Migração de micotoxinas durante a parboilização do arroz. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, n.12, p.39- 44, 1999.
- CORRÊA, P.C.; GONELI, A.L.D.; RESENDE, O.; RIBEIRO, D.M. Obtenção e modelagem das isotermas de dessecção e do calor isotérmico de dessecção para grãos de trigo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, vol. 7, n. 1, p. 39-48, 2005.
- COSTA, A.R. Ozônio como agente fungicida na pós-colheita do mamão (*Carica papaya* L.). Viçosa: UFV, 2012. 76p. **Dissertação de Mestrado**.
- CULLEN, P.J.; VALDRAMIDIS, V.P.; TIWARI, B.K.; PATIL, S.; BOURKE, P.; C.P. Ozone processing for food preservation: an overview on fruit juice treatments. **Ozone: Science & Engineering**, v.32, p.166-179, 2010.
- DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **American Public Health Association**, Washington, 2001. 676p.
- DRUVEFORS, U.Ä.; SCHNÜRER, J. Mold-inhibitory activity of different yeast species during airtight storage of wheat grain. **FEMS Yeast Research**, v.5, p.373-378, 2004.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), **International Year of Rice**. FAO, 2004. Disponível em: <http://www.fao.org/rice2004/en/rice6.htm> Acesso em: 13 de novembro de 2014.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), **Rice Market Monitor**. FAO, 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Rice/Images/RMM/RMM_OCT14_R.pdf> Acesso em: 13 de novembro de 2014.
- FARONI, L.R.A.; SILVA, J.S. Manejo de pragas no ecossistema de grãos armazenados. In: SILVA, J.S. (Ed.). **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas**. Viçosa: Aprenda Fácil, p.371-406, 2008.

- FREDLUND, E.; THIM, A.M.; GIDLUND, A.; BROSTEDT, S.; Nyberg, M.; Olsen, M. Moulds and mycotoxins in rice from the Swedish retail market. **Food Additives & Contaminants**, v.26, p.527-533, 2009.
- GARCIA, M.J.M.; BIAGGIONI, M.A.M.; FERREIRA, W.A.; KOHARA, E.Y.; ALMEIDA, A.M. Sucessão de espécies de fungos em milho armazenado em sistema aerado. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v.27, n.2, p.14-22, 2002.
- GABLER, F.M.; SMILANICK, J.L.; MANSOUR, M.F.; KARACA, H. Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.55, n.2, p.85-90, 2010.
- GRAHAM, D. M. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, v.6, n.51, p.72-75, 1997.
- GREENE, A.K.; GÜZEL-SEYDIM, Z.B.; SEYDIM, A.C. Chemical and physical properties of ozone. In: O'DONNELL, C.; TIWARI, B.; CULLEN, P. J.; RICE, R. G. (Eds.) **Ozone in food processing**. West Sussex, UK: The Atrium, p.19-29, 2012.
- GROFF, R. Secagem convencional do arroz. In: Simpósio Sul-Brasileiro de Qualidade do Arroz, 2003, Pelotas. **Anais...** Pelotas, p.263-274, 2003.
- GUIMARÃES, I.C.O.; PEREIRA, J.; CORNÉLIO, V.M.O.; BATISTA, L.R.; EVANGELISTA, R.M.; FERREIRA, E.B. Comparação de metodologias para detecção de fungos em arroz irradiado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.69, p.194-200, 2010a.
- GUIMARÃES, I.C.O.; SOUZA, A.R.M.; CORNÉLIO, V.M.O.; PEREIRA, J.; VILLELA, V.A. Identificação de *Aspergillus* spp. toxigênico em arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, p.60-62, 2010b.
- HILL, A.G.; RICE, R.G. **Handbook of Ozone Technology and Applications**. Michigan: Ann Arbor Science, 1982.
- HUDSON, J.B.; SHARMA, M. The practical application of ozone gas as an anti-fungal (anti-mold) agent. **Ozone-Science & Engineering**, v.31, n.4, p.326-332, 2009.
- KELLS, S.A.; MASON, L.J.; MAIER, D.E.; WOLOSHUK, C.P. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. **Journal of Stored Products Research**, v.37, p.371-382, 2001.
- KENNEDY, G.; BURLINGAME, B. Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. **Food Chemistry**, v.80, p.589-596, 2003.

- KHADRE, M.A.; YOUSEF, A.E.; KIM, J.G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. **Journal of Food Science**, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001.
- KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; CHISM, G.W. Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. **Journal of Food Safety**, v.19, p.17-34, 1999.
- KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; KHADRE, MA. Ozone and its current and future application in the food industry. In: TAYLOR, S.L. (Ed.) **Advances in Food and Nutrition Research**. New York: Academic Press, v.45, p.167-218, 2003.
- KLICH, M.A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, v.8, n.6, p.713-722, 2007.
- KUMAR, V.; BASU, M.S.; RAJENDRAN, T.P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v.27, p.891–905, 2008.
- LESLIE, J.F.; LOGRIECO, A.F. **Mycotoxin Reduction in Grain Chains**. 1.ed. Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2014. 376p.
- MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, n.1-2, p.131-139, 2007.
- MAKUN, H.A.; GBODI, T.A.; AKANYA, O.H.; SALAKO, E.A.; OGBADU, G.H. Fungi and some mycotoxins contaminating rice (*Oryza sativa*) in Niger State. **African Journal of Biotechnology**, Nigeria, v.6, p.99-108, 2007.
- MCKENZIE, K.S.; KUBENA, L.F.; DENVER, A.J.; ROGERS, T.D.; HITCHENS, G.D.; BAILEY, R.H.; HARVEY, R.B.; BUCKLEY, S.A.; PHILLIPS, T.D. Aflatoxicosis in turkey poults is prevented by treatment of naturally contaminated corn with ozone generated by electrolysis. **Poultry Science**, v.77, p.1094–1102, 1998.
- MENDEZ, F.; MAIER, D.E.; MASON, L.J.; WOLOSHUK, C. P. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and performance. **Journal of Stored Products Research**, v.39, n.1, p.33-44, 2003.
- MYLONA, K.; SULYOK, M.; MAGAN, N. Relationship between environmental factors, dry matter loss and mycotoxin levels in stored wheat and maize infected with *Fusarium* species. **Food Additives & Contaminants**. v.29, p.1118-1128, 2012.

- MOLINIÉ, A.; FAUCET, V.; CASTEGNARO, M.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. **Food Chemistry**, v.92, p.391-400, 2005.
- NAITO, S.; TAKAHARA, H. Ozone contribution in food industry in Japan. **Ozone: Science & Engineering**, v.28, n.6, p.425-429, 2006.
- NOVAK, J.S.; YUAN, J.T.C. The Ozonation Concept: Advantages of Ozone Treatment and Commercial Developments. In: Tewari, G.; Juneja, V.K. (Eds.) **Advances in Thermal and Non-Thermal Food Preservation**. Ames: Blackwell Publishing, p.185-193, 2007.
- OLIVER, J.C.; GERMANO, J.L.; VEIGA, S.M.O.M. Eficiência de sanificantes alternativos sobre frutos contaminados artificialmente com *Escherichia coli*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.10, n.2, p.351-359, 2012.
- OZKAN, R.; SMILANICK, J.L.; KARABULUT, O.A. Toxicity of ozone gas to conidia of *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, and *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.60, p.47-51, 2011.
- ÖZTEKIN, S.; ZORLUGENC, B.; ZORLUGENC, F.K. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. **Journal of Food Engineering**, v.75, p.396-399, 2006.
- PASCUAL, A.; LLORCA, I.; CANUT, A. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. **Food Science & Technology**, v.18, p.S29-S35, 2007.
- PELOSO, A.G.F., CARVALHO, P.N. de, VEIGA, S.M.O.M.; NASCIMENTO, L.C., FIORINI, J.F. Avaliação da eficiência de diferentes sanificantes em alface (*Lactuca sativa*) e de suas influências na vida útil do produto. **Revista Higiene Alimentar**. v.24, n.180/181, p.122-127, 2010.
- PEREIRA, A.M.; FARONI, L.R.A.; SOUSA, A.H.; PAES, J.L.; SILVA, M.T.C. Evaluation of oil extracted from corn grains ozonized at different levels of grain mass temperature. In: INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED PRODUCT PROTECTION, 9, 2006, Campinas. **Proceedings...** Campinas: Associação Brasileira de Pós-Colheita – ABRAPÓS, 2006.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 2.ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997, 593p.
- PITT, J.I. Toxicogenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, v.38, n.1, p.17-22, 2000.

- PONCE, A.R.; BASTIANI, M.I.D.; MINIM, V.P.; VANETTI, M.C.D. Características físico-químicas e microbiológicas de morango minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, 2010.
- PRUDENTE, A.D.; KING, J.M. Efficacy and safety evaluation of ozonation to degrade aflatoxin in corn. **Journal of Food Science**, v.67, n.8, 2002.
- RAILA, A.; LUGAUSKAS, A.; STEPONAVIČIUS, D.; RAILIENĖ, M.; STEPONAVIČIENĖ, A.; ZVICEVIČIUS, E. Application of ozone for reduction of mycological infection in wheat grain. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.13, n.2, p.287-294, 2006.
- RAMIREZ, M.L.; CHULZE, S.; MAGAN, N. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.291-296, 2006.
- RAY, B.; BHUNIA, A. **Fundamental Food Microbiology**. 4.ed. New York: CRC Press Taylor & Fancis Group, 2008, 475p.
- REDDY, K.R.N.; ABBAS, H.K.; ABEL, C.A.; MURALIDHARAN, K. Mycotoxigenic fungi, mycotoxins, and management of rice grains. **Toxin Reviews**, v.27, p.287-317, 2008.
- ROZADO, A.F.; FARONI, L.R.A.; URRUCHI, W.M.I.; GUEDES, R.N.C.; PAES, J.L. Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, p.282-285, 2008.
- SAKAI, A.; TANAKA, H.; KONISHI, Y.; HANAZAWA, R.; OTA, T.; NAKAHARA, Y.; SEKIGUCHI, S.; OSHIDA, E.; TAKINO, M.; ICHINOE, M.; YOSHIKAWA, K.; YOSHIZAWA, T.; TAKATORI, K. Mycological examination of domestic unpolished rice and mycotoxin production by isolated *Penicillium islandicum*. **Journal of the Food Hygiene Society of Japan**, v.46, p.205-212, 2005.
- SANTOS, J.E. Difusão e cinética de decomposição do ozônio no processo de fumigação de grãos de milho (*zea mays*). Viçosa: UFV, 2008. 49p. **Tese de Doutorado**.
- SHEELAMARY, M., MUTHUKUMAR, M., Effectiveness of ozone in inactivating *Listeria monocytogenes* from Milk Samples. **World Journal of Young Researchers**, v.1, n.3, p.40-44, 2011.
- SILVA, O.F.; VENÂNCIO, A. supressão de *aspergillus* produtores de aflatoxinas e ácido ciclopiazonico por ozônio. **Revista de Ciências da Vida**, v.28, suplemento, 2008.

- SILVA, T.A. processo de ozonização dos grãos de trigo: Cinética de reação e efeito na qualidade destes e da farinha. Viçosa: UFV, 2011. 118p. **Dissertação de Mestrado.**
- SOSBAI (SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO). **Reunião Técnica da Cultura do Arroz Irrigado.** Porto Alegre: SOSBAI, 2010.
- STORCK, C.R. Variação a composição química em grãos de arroz submetidos a diferentes beneficiamentos. Santa Maria: UFSM, 2004. 121p. **Dissertação de Mestrado.**
- SUSLOW, T.V. **Basic of ozone applications for postharvest treatment of fresh produce.** 8p., 2003. Disponível em: <http://www.ozonio.com.br/Water_Disinfection1891.pdf>. Acesso em: 13 de novembro de 2014.
- TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Campinas: **Núcleo de Microbiologia/ITAL**, 82p., 2001.
- TIWARI, B. K. & MUTHUKUMARAPPAN. Ozone in fruit and vegetable processing. In: O'DONNELL, C.; TIWARI, B.; CULLEN, P.J.; RICE, R.G. (Eds.) **Ozone in food processing.** West Sussex, UK: The Atrium, p.55-80, 2012.
- TONON, S.A., MARUCCI, R.S.; JERKE, G.; GARCIA, A. Mycoflora of paddy and milled rice produced in Northeastern Argentina and Sothern Paraguay. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.231-235, 1997.
- UDAGAWA, S.; TATSUNO, T. Safety of rice grains and mycotoxins – a historical review of yellow rice mycotoxicoses. **Yakushigaku Zasshi**, v.39, p.321-342, 2004.
- VIJAYANANDRAJ, V.R.; PRASAD, D.N.; MOHAN, N; GUNASEKARAN, M. Effect of ozone on *Aspergillus niger* causing black rot disease in onion. **Ozone: Science and Engineering**, v.28, p.347-350, 2006.
- VICTORIN, K. Review of the genotoxicity of ozone. **Mutation Research**, v.277, p.221-238, 1992.
- VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes.** Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.
- VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F.C.H.; VIEIRA, R.D.; FRANCA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes.** Londrina: ABRATES, p. 4-20, 1999.
- WANG, S.; LIU, H.; LIN, J; CAO, Y. Can ozone fumigation effectively reduce aflatoxin B1 and other mycotoxins contamination on stored grain? In: 10th International Working Conference on Stored-Product Protection, 2010, Estoril – Portugal. **Proceedings...** Estoril, 2010.

- WHANGCHAI, K.; SAENGNIL, K.; UTHAIBUTRA, J. Effect of ozone in combination with some organic acids on the control of postharvest decay and pericarp browning of longan fruit. **Crop Protection**, v.25, p.821-825, 2006.
- WU, J.; DOAN, H.; CUENCA, M.A. Investigation of gaseous ozone as an antifungal fumigant for stored wheat. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.81, n.7, p.1288-1293, 2006.
- YOUNG, J.C.; ZHU, H.; ZHOU, T. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.417-424, 2006.
- ZHOU, Z.; BLANCHARD, C.; HELLIWELL, S.; ROBARDS, K. Fatty acid composition of three rice varieties following storage. **Journal of Cereal Science**, v.37, n.3, p.327-335, 2003.