

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares

**INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE FUNGOS AFLATOXIGÊNICOS E
COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL EM MIX DE CEREAIS E SEUS COMPONENTES**

LAURY FRANCIS COSTA

Orientadora: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Idjane Santana de
Oliveira

Recife, PE

Julho, 2016

LAURY FRANCIS COSTA

**INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE FUNGOS AFLATOXIGÊNICOS
E COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL EM MIX DE CEREAIS E SEUS
COMPONENTES**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Radioecologia.

Orientador: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva

Co-orientador: Profa. Dra. Idjane Santana de Oliveira

Recife, PE

Julho, 2016

Catálogo na fonte
Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

C837i Costa, Laury Francis.
Influência da radiação gama sobre fungos aflatoxigênicos e
composição nutricional em mix de cereais e seus componentes.
/ Laury Francis Costa. - Recife: O Autor, 2016.
94 f. : il., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva.
Coorientadora: Profa. Dra. Idjane Santana de Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas
e Nucleares, 2016.
Inclui referências bibliográficas e apêndices.

1. Irradiação de alimentos. 2. Aflatoxinas. 3. Mix de
cereais. 4. Gergelim. 5. Linhaça. 6. Aveia. I. Silva, Edvane
Borges da, orientadora. II. Oliveira, Idjane Santana de,
coorientadora. III. Título.

CDD 664.028 (21. ed.)

UFPE
BDEN/2016-29

Influência da Radiação Gama sobre Fungos Aflatoxigênicos e Composição Nutricional em Mix de Cereais e seus Componentes

Laury Francis Costa

APROVADA EM: 22/07/2016

ORIENTADORA: Profa Dra Edvane Borges da Silva

COORIENTADORA: Profa Dra Idjane Santana de Oliveira

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa Dra Edvane Borges da Silva – CAV-UFPE

Profa Dra Simey de Souza Leão Pereira Magnata – CAV-UFPE

Pra Dra Erilane de Castro Lima Machado - CAV-UFPE

Profa Dra Claudia Elizabete Pereira de Lima – Micologia-UFPE

Profa Dra Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo – DBR/UFPE

Visto e permitida a impressão

Coordenador do PROTEN/DEN/UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde e persistência pra sempre prosseguir diante de todos os obstáculos e dificuldades do caminho e me proteger em todas as viagens para realizar experimentos.

A meus pais, pelo estímulo e força em todos os momentos de angústia pra terminar cada etapa, seja por telefone, nas visitas a Recife, nos poucos momentos em Petrolândia. Sempre tiveram uma palavra consoladora quando precisei, mesmo a distância. E sempre compartilharam comigo de cada vitória. Amo muito vocês.

As minhas irmãs, Leide e Lena, pelas críticas e sugestões no momento certo. Eu gostaria de ter passado mais tempo com vocês, mas o trabalho e corre-corre foram me deixando distante. Amo muito vocês duas.

Ao meu marido Paulo, por todo o apoio desde o início do doutorado, pelo companheirismo, paciência, carinho e estar sempre ao meu lado em todos os momentos, seja me acompanhando pra Vitória nos fins de semana e feriados, ou indo me buscar na rodoviária tarde da noite quando não podia ir comigo. Te amo muito.

Aos meus parentes, vovó, vovô, tia Salete, meus primos, tios e tias. Eu peço muitas desculpas por ficar tão ausente e visitar todos tão pouco, mas sempre foram compreensivos e me deram forças pra sempre seguir em frente. Minhas vitórias também são suas.

A minha orientadora professora Edvane, pela amizade e por ter me acompanhado desde o mestrado. Agradeço muito por ter aceitado me orientar desde aquela época, pois foi a partir disso que conheci tanta gente e pude crescer como profissional. Nada disso teria acontecido sem aquele voto de confiança inicial.

A minha co-orientadora, professora Idjane. Agradeço muito por ter cedido o laboratório, pelos conselhos, broncas no momento certo, vivi muitos momentos inesquecíveis naquele laboratório. O entusiasmo da senhora sempre cativou e contagiou todos em volta e sou muito grata por ter trabalhado em um ambiente como esse.

Às minhas amigas Sloana e Ivanesa, pela amizade forte que construímos em todos esses anos. Agradeço muito pela nossa amizade verdadeira e sincera. Estaremos sempre juntas, mesmo com o fim do doutorado, pois fazem parte da minha vida também.

Aos meus colegas do laboratório de microbiologia de Vitória de Santo Antão, especialmente Katy, Cleciana, Laís, Silvio, Laureana, Kelly, Diego, Gilvânia, profa Isabela. Todos me ajudaram em algum momento, dando apoio, cedendo meio de cultura, nas festinhas e reuniões de grupo. Muito obrigada.

Ao pessoal do laboratório de Bromatologia, em especial Silvio e profa Erilane, pelo treinamento e confiança pra me deixar realizar os experimentos. Aprendi muito.

Aos meus colegas do DEN, meus colegas do grupo GERAR, meus colegas do Almirante Soares Dutra, meus colegas da Mauricio de Nassau, pela paciência, pela amizade, pelo apoio.

Agradeço também a todos os professores e funcionários do Departamento de Energia Nuclear, do CETENE, da UFRPE, do CAV. O trabalho só foi possível com a formação, com os laboratórios e com a ajuda de todos os locais envolvidos direta ou indiretamente.

Aos meus amigos de Recife, especialmente Tati e Graciely, meus amigos de Petrolândia, especialmente Gabriel e Aline. Sua amizade me acompanha há muito tempo e agradeço muito a companhia, sinceridade e apoio.

Em todo esse tempo conheci e convivi com muita gente e nunca estive só. O apoio da família, dos amigos, dos colegas de trabalho, dos meus alunos, dos funcionários, o material de trabalho e a energia gasta em tudo valeram muito a pena. Não tenho como agradecer individualmente, pois a relação levaria muitas páginas.

Muito obrigada a todos!!

RESUMO

A irradiação de alimentos utiliza doses de radiação gama previamente estabelecidas, para manter as características nutricionais e físico-químicas dos alimentos e evitar contaminação por micro-organismos. O mix de cereais ou farelos é uma farinha composta por uma mistura de ingredientes, incluindo linhaça, gergelim e aveia. O fungo filamentoso *Aspergillus flavus* pode contaminar esse tipo de alimento e produzir aflatoxina. O objetivo deste estudo foi analisar amostras de mix de cereais, irradiadas ou não, para verificar se a radiação gama consegue inibir a contaminação por fungos aflatoxigênicos, além de manter as características nutricionais do alimento; além de analisar a rotulagem das amostras embaladas. Foram analisadas 9 amostras diferentes de mix de cereal (M1 a M9), em embalagem plástica ou metalizada, comercializado a granel e industrializado. Também foram analisados grãos e farinha de linhaça, gergelim e aveia. Foram feitas análises micológicas (fungos totais e aflatoxigênicos), testes físico-químicos (cinzas, umidade, proteínas, lipídios, carboidratos, Aw) e análise de rotulagem. A menor dose de radiação gama (2,5kGy) foi suficiente pra inibir os fungos aflatoxigênicos na maioria da amostras, e a dose considerada ótima foi de 5kGy. A amostra com maior contaminação fúngica foi a granel M3 ($1,2 \times 10^4$ UFC/g), mas a M8 teve maior variedade de fungos. Foi observado que 75% das amostras a granel e 80% das amostras industrializadas de mix de cereais foram positivos pra fungos aflatoxigênicos. A amostra M2 foi a mais irregular na rotulagem, infringindo a RDC nº360/2003 e RDC nº259/2002. Os testes estatísticos comprovaram que a composição nutricional e a germinação dos grãos não foram afetadas pela radiação. Gergelim só teve contaminação na amostra controle; aveia e linhaça tinham pouca ou nenhuma contaminação. O MALDITOF confirmou o *Aspergillus flavus*. A sugestão é padronizar a lista de ingredientes do mix de cereais, regularizar a rotulagem junto às empresas, e orientar os consumidores a comprar mix de cereais apenas em embalagem lacrada, pois a venda a granel facilita a contaminação por fungos aflatoxigênicos devido à manipulação e má conservação.

Palavras-chave: irradiação de alimentos; aflatoxinas; mix de cereais; gergelim; linhaça; aveia.

ABSTRACT

Food irradiation uses gamma radiation dose previously established for maintaining the nutritional and physicochemical characteristics of the food and prevent contamination by micro-organisms. The cereal mix is made of bran or flour of a mixture of ingredients, including linseed, sesame and oats. The filamentous fungus *Aspergillus flavus* can infect this type of food and produce aflatoxin. The objective of this study was to analyze samples mix of cereals, irradiated or not, to check whether the gamma radiation can inhibit contamination by aflatoxigenic fungi as well as maintaining the nutritional characteristics of the food; besides analyzing the labeling of packaged samples. We analyzed 9 different samples of cereal mix (M1 to M9) in plastic or metallic packaging, sold in bulk and industrialized. They were also analyzed grains and flaxseed meal, sesame and oats. Mycological analyzes were performed (total and aflatoxigenic fungi), physical-chemical (ash, moisture, protein, lipids, carbohydrates, Aw) and analysis of labeling. The lowest dose of gamma radiation (2,5kGy) was sufficient to inhibit the majority of aflatoxigenic fungi in samples and the optimum dose was considered 5kGy. The sample with higher fungal contamination was bulk M3 (1,2x10⁴UFC / g), but the M8 had a greater variety of fungi. It was observed that 75% of bulk samples and 80% of the industrialized mix samples of grain were positive for aflatoxigenic fungi. The sample M2 was the most irregular in the labeling, breaking the RDC 360/2003 and RDC 259/2002. Statistical tests have shown that the nutritional composition and grain germination was not affected by radiation. Sesame only had contamination in the control sample; flax and oats had little or no contamination. The MALDITOF confirmed *Aspergillus flavus*. The suggestion is to standardize the list of ingredients in the mix of cereals, regulate the labeling from the companies, and guide consumers to buy mix of cereals only in sealed packaging, because sale in bulk facilitates contamination by aflatoxigenic fungi due to handling and poor conservation.

Keywords: food irradiation; aflatoxins; mix of cereals; sesame; linseed; oat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Símbolo conhecido como radura cuja presença é obrigatória na embalagem de alimentos que passaram pelo processo de irradiação.	18
Figura 2 – Grão de cereal mostrando suas principais partes: farelo, endosperma e gérmen.	22
Figura 3 - Tipos de sementes de gergelim: A) gergelim preto; B) gergelim integral; C) gergelim bege.	26
Figura 4 - Sementes de linhaça marrom e dourada.	27
Figura 5 – Aveia na forma de grão integral e em flocos	29
Figura 6 - Irradiador Gammacell com fonte de cobalto-60 utilizado para irradiar as amostras de farinhas e grãos embalados, antes de serem analisados quanto à contaminação fúngica e teores nutricionais.	36
Figura 7 - Esquema de análise fúngica de farinhas pelo método de diluições.	37
Figura 8 - Processamento de amostra pelo MALDI TOF utilizando uma colônia bacteriana como exemplo. 1 e 2: Transferência da cepa da placa de petri para a placa metálica do equipamento; 3: Adição de ácido fórmico e matriz; 4: Processamento da amostra com laser; 5: Leitura pelo equipamento e comparação com o banco de dados.	41
Figura 9 - Equipamentos utilizados para análise de proteínas pelo método de Kjeldahl. Digestão (forno de digestão de proteínas, utilizando ácido sulfúrico), Destilação (destilador de nitrogênio, utilizando hidróxido de sódio), Titulação (gotejar ácido clorídrico até ficar rosa).	43
Figura 10 – Gráfico de superfície de resposta comparando as marcas de mix de cereais com as doses de radiação gama, demonstrando que a dose ótima é de 5kGy, destacada pela estrutura na cor verde. Dose 1: não irradiado; Dose 2: 2,5kGy; Dose 3: 5kGy.	49
Figura 11– Fungo filamentosso, possível <i>Aspergillus flavus</i> , crescendo no meio AFPA. (A) micélio visto na frente da placa; (B) coloração amarelada no reverso da placa, confirmando positividade para fungo aflatoxigênico.	51
Figura 12 - Amostra de linhaça marrom e o crescimento de um possível <i>Aspergillus</i> produtor de aflatoxina no AFPA. A) Frente da placa, presença de apenas um grão positivo. B) Reverso da placa, mostrando a coloração amarelo-alaranjado no micélio.	53
Figura 13– Grãos de linhaça na superfície dos meios de cultura DRBC (rosa) e AFPA (amarelo). A) linhaça dourada (2,5kGy) em AFPA. B) linhaça dourada (não irradiado) no DRBC. C) linhaça marrom (2,5kGy) em DRBC. Todos apresentam germinação dos grãos e ausência de crescimento fúngico.	54
Figura 14 – Resultados do teste ANOVA em grãos de linhaça industrializada	55

irradiada comparando o crescimento fúngico em meio DRBC com as doses de radiação. Tipos de dose: 1 (não irradiada), 2 (2,5kGy), 3 (5,0kGy), 4 (7,5kGy), 5 (10kGy).

Figura 15 – Resultados do teste ANOVA comparando a germinação dos grãos de linhaça industrializados no meio AFPA em relação às doses de radiação. Tipos de doses: 1 (não irradiado), 2 (2,5kGy), 3 (5,0kGy), 4 (7,5kGy), 5 (10kGy). 56

Figura 16 – Resultado do teste ANOVA comparando a germinação dos grãos de linhaça não industrializados em relação à dose de radiação. Dose 1: não irradiado; dose 2: 2,5kGy; dose 3: 5kGy; dose 4: 7,5kGy; dose 5: 10kGy. 58

Figura 17 – Comparação entre a germinação dos grãos e os tipos de linhaça: 1- linhaça marrom; 2-linhaça dourada. 59

Figura 18 - Linhaça marrom não irradiada em meio DRBC, mostrando a produção de germinação nos grãos (à esquerda) e em detalhe o grão germinado. 60

Figura 19 – Resultados do teste ANOVA para as amostras de linhaça industrializada de uma mesma empresa, comparando germinação e dose de radiação no meio de cultura DRBC. Dose 1: não irradiado; dose 2: 2,5kGy; dose 3: 5kGy; dose 4: 10kGy. 62

Figura 20 – Resultados do teste ANOVA para as amostras de linhaça industrializada de uma mesma empresa, comparando germinação e dose de radiação no meio de cultura AFPA. Dose 1: não irradiado; dose 2: 2,5kGy; dose 3: 5kGy; dose 4: 10kGy. 62

Figura 21 – Resultados do teste ANOVA para as amostras de linhaça industrializada de uma mesma empresa, comparando germinação e tipos de linhaça. Tipo 1: linhaça marrom; tipo 2: linhaça dourada. 63

Figura 22 - Gergelim bege não irradiado em meio de cultura AFPA, mostrando crescimento de fungos aflatoxigênicos, demonstrado pela coloração amarelada nas colônias fúngicas. A) Frente da placa. B) Reverso da mesma placa. 64

Figura 23 – Grãos de gergelim bege. A) Germinação dos grãos de gergelim bege de amostra não irradiada, no meio AFPA. B) Inibição da germinação dos grãos na dose de 12,5kGy. 65

Figura 24 - Comparação geral entre doses de radiação e composição nutricional das amostras de mix de cereais. Dose 1: não irradiado; dose 2: 2,5kGy; dose 3: 5kGy. 68

Figura 25 – Comparação das médias das variáveis nutricionais de acordo com cada dose de radiação (dose 1: não irradiado; dose 2: 2,5ky; dose 3: 5,0kGy). 70

Figura 26 - Média e mediana do teor de cinzas (em g/100g) das amostras de mix de cereais analisadas. 71

Figura 27 - Média e mediana do teor de umidade (g/100g) das amostras de mix de cereais analisadas.	72
Figura 28 - Média e mediana do valor de Atividade de Água das amostras de mix de cereais analisadas.	73
Figura 29 - Média e mediana do valor de carboidratos (g/100g) das amostras de mix de cereais analisadas.	73
Figura 30 – Média e mediana do teor de proteínas (g/100g) obtidas das amostras de mix de cereais.	74
Figura 31 - Quantidade de lipídios (g/100g) nas amostras de mix de cereais.	74
Figura 32 – Tipos de embalagens encontradas nas amostras de mix de cereais industrializadas. A) embalagem plástica transparente; B) embalagem metalizada; C) embalagem plástica fosca.	77
Figura 33 – Manipulação do alimento vendido a granel pelo vendedor, mostrando a não utilização de luvas no momento da venda e modo de conservação em recipiente plástico.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Crescimento fúngico médio das amostras de mix de cereais, identificando os gêneros de fungos visualizados, de acordo com o tipo de comercialização.	45
Tabela 2 - Crescimento fúngico médio encontrado nas amostras não-irradiadas de aveia industrializada.	50
Tabela 3 – Crescimento fúngico médio encontrado nas amostras irradiadas de aveia em flocos, destacando que houve presença de fungos aflatoxigênicos nas amostras A, C e D.	52
Tabela 4 - Crescimento fúngico e germinação de grãos de linhaça marrom industrializados, irradiados e não irradiados	53
Tabela 5 - Crescimento fúngico e germinação de grãos de linhaça dourada irradiados.	54
Tabela 6 - Análise de grãos de linhaça marrom e dourada, vendidos a granel, mostrando baixa contaminação por fungos aflatoxigênicos, e a variação na taxa de germinação dos grãos de acordo com a dose.	57
Tabela 7 - Valores médios de contaminação fúngica de grãos de linhaça marrom, de 4 marcas diferentes, embalados e estocados por seis meses.	59
Tabela 8 - Análise micológica de grãos e farinha de linhaça marrom e linhaça dourada, de uma mesma marca industrializada, mostrando que houve variação apenas na germinação dos grãos.	61
Tabela 9 - Análise da média, mediana e desvio-padrão da composição nutricional de amostras de mix de cereal na dose 1 (não irradiada).	67
Tabela 10 - Análise da média, mediana e desvio-padrão da composição nutricional de amostras de mix de cereal na dose 2 (2,5kGy).	67
Tabela 11 - Análise da média, mediana e desvio-padrão da composição nutricional de amostras de mix de cereal na dose 3 (5 kGy).	68
Tabela 12 - Análise de Variância Múltipla (MANOVA) das amostras de mix de cereais, comparando as médias da composição nutricional e destacando que a variável umidade está diferente dos demais.	69
Tabela 13 - Resultado do Teste de Kruskal-Wallis para o mix de cereais, comparando os valores da composição nutricional.	71
Tabela 14 - Características das amostras de mix de cereais de acordo com a apresentação comercial.	75
Quadro 1 – Descrição dos ingredientes informados na embalagem das amostras de mix de cereais (M1 a M9).	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFPA – Ágar *Aspergillus flavus e parasiticus*

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BDA – Ágar Batata Dextrose

CEASA/PE – Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco

CETENE - Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

DG18 - Ágar Dicloran Glicerol 18

DRBC - Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol

MANOVA – Múltipla Análise de Variância

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Irradiação de alimentos	17
2.2 Cereais e legislação	21
2.3 Mix de Cereais	23
2.4 Gergelim	25
2.5 Linhaça	26
2.6 Aveia	28
2.7 Fungos contaminantes em alimentos	30
2.8 Micotoxinas	30
2.9 Aflatoxinas	32
2.10 Métodos para detecção de micotoxinas	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Aquisição das amostras	35
3.2 Irradiação dos grãos e farinha	35
3.3 Análise fúngica	36
3.3.1. Análise fúngica de grãos e farinhas.	36
3.3.2 Identificação dos fungos aflatoxigênicos pela técnica MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight)	40
3.4 Análise de composição nutricional do mix de cereais	42
3.4.1 Cinzas ou resíduo mineral fixo	42
3.4.2 Umidade	42
3.4.3 Proteínas	42
3.4.4 Lipídios ou extrato etéreo	43
3.4.5 Carboidratos (glicídios)	43
3.4.6 Atividade de água (Aa ou Aw)	43
3.5 Análise de rotulagem	44
3.6 Análise estatística	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Análise micológica	45
4.1.1 Análise micológica do mix de cereais	45
4.1.2 Análise micológica de aveia	49
4.1.2.1 Aveia industrializada e sem tratamento por irradiação	49
4.1.2.2 Aveia irradiada	51
4.1.3 Análise micológica de linhaça	52
4.1.3.1 Linhaça industrializada	54
4.1.3.2 Linhaça vendida a granel	57
4.1.3.2 Linhaça estocada por 6 meses	59
4.1.4 Análise micológica de gergelim	64
4.2 Análise do efeito da irradiação na composição nutricional do mix de cereais	66
4.3 Análise de rotulagem das amostras do mix de cereais	75
5 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICE	93

1 INTRODUÇÃO

Os métodos de conservação de alimentos objetivam aumentar o tempo de prateleira dos alimentos, mantendo suas características nutricionais, químicas e físicas desde o momento de obtenção ou fabricação até o consumo. São utilizados processos que inibem a ação de micro-organismos deteriorantes, pois podem ser prejudiciais à saúde humana.

A utilização de irradiação gama como método de conservação consiste em expor os alimentos a doses de radiação previamente estabelecidas, de tal forma que as características nutricionais e físico-químicas dos alimentos sejam conservadas desde a produção até a comercialização.

Fatores como armazenamento inadequado e tipo de embalagem podem afetar o tempo de prateleira, principalmente de alimentos manipulados e processados como farinhas, a exemplo dos produtos conhecidos como Multimistura ou Mix de Cereais.

O mix de cereais ou mix de farelos, denominado popularmente como “Ração humana”, é composto por uma mistura de diferentes cereais, farinhas, farelos, fibras e outros ingredientes, tais como guaraná em pó, gelatina em pó, cacau em pó, levedo de cerveja, extrato de soja, linhaça, gergelim, entre outros, e foi regulamentado pelo Informe técnico nº 46 (2011) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 263/2005 da ANVISA.

Fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* podem se desenvolver nesses tipos de alimentos e contaminá-los com metabólitos secundários conhecidos como micotoxinas, que são prejudiciais à saúde humana. A contaminação dos alimentos por micotoxinas pode ocorrer no campo e durante o armazenamento se as condições forem favoráveis para o crescimento de fungos.

As aflatoxinas são consideradas as micotoxinas de maior preocupação e são produzidas por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e, raramente, por *A. nomius*, sendo sua produção influenciada pela temperatura, pH, atividade de água, tensão de oxigênio, pressão osmótica, nutrientes e substâncias fungistáticas. A contaminação por esses fungos pode ocorrer na pré-colheita, mas também pode deteriorar os grãos na pós-colheita, durante o armazenamento.

As análises qualitativas e quantitativas dos alimentos são necessárias para fiscalização, monitoramento e pesquisa dos fungos toxigênicos, variando de acordo com o método e objetivo a ser alcançado. A dificuldade da análise e identificação ocorre muitas vezes devido à distribuição não uniforme das micotoxinas nos lotes contaminados.

Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo geral analisar amostras de mix de cereais e farelos, de marcas diferentes, comercializadas em Recife-PE, para verificar a possível contaminação por fungos aflatoxigênicos e a ação da radiação gama como método de conservação.

Como objetivos específicos, pretendeu-se:

- Avaliar a ocorrência de contaminação por fungos aflatoxigênicos no mix de cereais e na matéria-prima comumente encontrada no mix de cereais (linhaça, gergelim e aveia);
- Analisar a ação da radiação gama na inibição de fungos aflatoxigênicos, tanto nos mixes quanto na aveia, linhaça e gergelim;
- Verificar se a exposição à radiação gama promoveu alterações na composição nutricional desses alimentos.
- Avaliar a rotulagem dos mix de cereais industrializados e embalados e confirmar se atendem ao recomendado pelas legislações vigentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Irradiação de alimentos

A radiação pode ser classificada em ionizante e não-ionizante. A radiação é considerada ionizante se possuir energia suficiente para deslocar elétrons de seus átomos, convertendo-os em partículas eletricamente carregadas denominadas íons, ou seja, ocorre ionização do meio onde houve interação com a radiação; é considerada não ionizante quando não tem essa capacidade (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

O processo de irradiação de alimentos, em especial de grãos, é uma alternativa ao uso dos compostos químicos para o controle de insetos e micro-organismos. A utilização de compostos químicos pode causar contaminação do ambiente, intoxicação de animais e do homem e ocorrência de resíduos tóxicos nos grãos. Portanto, estudar novos métodos de controle de organismos deteriorantes torna-se importante, destacando a irradiação de alimentos (ZANÃO et al, 2009).

A irradiação de alimentos consiste em um tratamento que submete os alimentos embalados ou a granel a uma quantidade controlada de radiação ionizante, por tempo prefixado e com objetivos bem determinados. Esse processo não aumenta a radioatividade normal dos alimentos. É considerado um método seguro e eficiente, pois pode reduzir o risco de infecção alimentar e preservar com o mínimo de impacto o seu valor nutricional, promovendo também a diminuição da dureza e do tempo para cozimento (MARTINEZ, 2011).

A irradiação dos alimentos é realizada em áreas apropriadas, contendo sala de irradiação, piscina de armazenamento, sistema transportador, console de controle e depósito para separar o material irradiado. Os alimentos a serem irradiados são conduzidos ao interior da câmara de irradiação, recebendo a dosagem de radiação gama adequada, a qual foi pré-calculada em função da taxa de dose, isto é, quantidade de radiação por tempo (SILVA et al, 2010).

O radionuclídeo Co^{60} é a principal fonte de radiação gama utilizada para esta finalidade devido a sua disponibilidade, custo, apresentar-se na forma metálica e ser insolúvel em água, proporcionando, com isso, maior segurança ambiental. A unidade de medida utilizada é o Gray (Gy) ou quilogray (kGy), sendo que um Gray equivale a um Joule de energia por quilograma de alimento irradiado (SILVA et al, 2010).

A irradiação de alimentos tem a finalidade de aumentar o tempo de prateleira (aumenta o tempo de conservação), seja pela diminuição da contaminação por micro-organismos (bactérias, fungos e parasitos), diminuição da infestação por insetos, inibição de germinação de tubérculos e bulbos, retardo na maturação e deterioração de frutas. É um método seguro para a conservação de alimentos se as doses não ultrapassarem 20 kGy. Não há contato direto dos alimentos com o material radioativo e o símbolo chamado de Radura (Figura 1) deve ser colocado na embalagem dos alimentos irradiados para esclarecimento da população (OKUNO; YOSHIMURA, 2010; ZANÃO et al, 2009). Devem constar na embalagem os dizeres: “alimento tratado por processo de irradiação” (ANVISA, 2001).

Figura 1 – Símbolo conhecido como radura cuja presença é obrigatória na embalagem de alimentos que passaram pelo processo de irradiação.



Fonte: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Radura-Symbol.svg>

As radiações ionizantes podem interagir diretamente com componentes celulares como DNA, proteínas e lipídios, provocando alterações estruturais (efeito direto), mas também pode interagir com a água do meio onde os constituintes celulares estão suspensos, causando a radiólise da água (efeito indireto) (BITELLI, 2006). As alterações nos alimentos são as mesmas que ocorrem em outros processos empregados na conservação de alimentos, principalmente quanto à oxidação lipídica, formação de radicais livres, entre outros (CORREIA et al, 2008).

Como não há contato direto dos alimentos com o material radioativo, nenhum resíduo permanece no alimento processado e, quando aplicado de forma adequada, espera-se que nenhum efeito adverso seja observado na qualidade nutricional. As principais vantagens em utilizar a radiação gama são: destruição de micro-organismos,

patogênicos ou não, presentes nos alimentos; alimentos podem ser expostos à irradiação após o empacotamento; vegetais e frutas, quando irradiados, mantêm o seu frescor por longos períodos de tempo (MANTILLA et al, 2010).

No Brasil, existem duas legislações relacionadas a alimentos irradiados: o decreto nº 72.718, de 29 de agosto de 1973, que estabelece normas gerais sobre irradiação de alimentos, e a Resolução RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001, que aprovou o regulamento técnico para irradiação de alimentos.

Com a publicação da Instrução Normativa nº 9 de 24 de fevereiro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), fica reconhecida a legalidade do desenvolvimento e aplicação da irradiação para o tratamento fitossanitário, para prevenir pragas e prolongar a validade de alimentos variados no território brasileiro. A irradiação ionizante pode ser usada para obter certas respostas na praga, como: mortalidade, impedir o desenvolvimento, incapacidade para reprodução e inativação (BRASIL, 2011).

A legislação brasileira não limita a dose a ser aplicada ao alimento, apenas determina que a dose mínima absorvida deva ser suficiente para alcançar a finalidade do uso, e a máxima deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e/ou os atributos sensoriais do alimento (SILVA et al, 2010).

O processo de irradiação dos alimentos pode ser subdividido em três categorias: radurização, radicidação ou radiopasteurização e radapertização. Radurização utiliza doses baixas ($<1\text{kGy}$) para inibição de brotamento em cebolas, batatas, e alhos, retardar a maturação e deterioração de frutas e hortaliças, agir contra insetos. Radicidação ou radiopasteurização utiliza uma dose intermediária (1 a 10kGy) para reduzir a quantidade de bactérias e fungos na superfície ou interior de alimentos. Radapertização é a aplicação de doses mais altas ($>10\text{kGy}$), permitindo a destruição de micro-organismos contaminantes, para conservação de carnes, alimentos prontos e outros produtos. Para aplicação em alimentos, a maioria das doses utilizadas se encontram entre 0,1 e 10,0 kGy (ORDONEZ, 2005; SILVA et al, 2010; OLIVEIRA; SOARES; ALVES, 2013).

As doses altas de radiação suficiente para esterilizar um alimento também podem produzir, por reações secundárias, efeitos indesejados em muitos alimentos, causando alterações de cor, sabor, odor ou outras propriedades físicas. A água sofre radiólise quando é irradiada, formando radicais livres que podem reagir com outras

moléculas presentes no meio. Ao se irradiar em anaerobiose, os sabores e odores desagradáveis são minimizados devido à falta de oxigênio para formar peróxidos, porém a ausência de oxigênio torna o microrganismo mais resistente à radiação (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Existem estudos que mostram a falta de conhecimento de profissionais e da população em geral sobre a aplicação de energia nuclear em várias áreas, inclusive na conservação de alimentos. Costa, Deliza e Rosenthal (1999) afirmaram que as maiores polêmicas giravam em torno da irradiação e da engenharia genética, devido à falta de conhecimento sobre suas potencialidades, e na medida em que cresce o conhecimento sobre benefícios destas tecnologias e possíveis riscos, a aceitabilidade dos produtos pode ser aumentada. É interessante perceber que em 2016 esses mesmos temas (energia nuclear e organismos geneticamente modificados) ainda são assuntos polêmicos e os produtos são de baixa aceitação.

O conhecimento dos consumidores e a divulgação sobre os alimentos irradiados tem sido insuficiente, resultando em baixa aceitação de público. Há vários estudos que pesquisam sobre o nível de conhecimento e aceitação de alimentos irradiados.

Freitas et al (2009) pesquisaram sobre o conhecimento e atitude de consumidores de Recife-PE sobre alimentos irradiados. Cerca de 54% dos entrevistados utilizam ou utilizariam produtos ionizados enquanto 46% rejeitaram sua utilização. A maior aceitação foi no grupo de homens (59%) do que o de mulheres (51%). Foi observado também que a renda familiar e a escolaridade influenciam na melhor aceitação dos produtos irradiados. Quanto maior a renda e maior o grau de instrução dos entrevistados, maior era o grau de aceitação aos produtos e ao processo de irradiação.

O estudo de Silva et al (2010) avaliou o conhecimento e a atitude de nutricionistas que atuam na docência, em instituições de ensino superior em Belo Horizonte-MG, diante de alimentos irradiados, constatando que 86,4% referiram saber o que são alimentos irradiados, mas 71,2% desconhecem o processo, 75,8% desconhecem a legislação, 21,2% desconhecem as finalidades da irradiação, 12,1% consideram os alimentos irradiados como sendo radioativos e 31,8% acreditam que a irradiação de alimentos resulta em redução do valor nutritivo dos alimentos.

A pesquisa de Lima e Oliveira (2014) avaliou as atitudes e o conhecimento dos consumidores de Natal-RN sobre os alimentos irradiados. Verificaram que 66,9% dos

consumidores entrevistados consultam a lista de ingredientes no rótulo dos alimentos embalados, e 13,4% destes disseram ter detectado a frase “ALIMENTO TRATADO POR PROCESSO DE IRRADIAÇÃO”. Além disso, 86,6% consideravam que a irradiação torna o alimento inseguro e 94,9% destes não consumiriam estes alimentos. As mulheres apresentaram atitude menos favorável que os homens em relação aos alimentos irradiados. Assim, a aceitação destes produtos depende da forma como são aplicadas as políticas de segurança alimentar e de educação sanitária, inclusive através do uso de fontes de disseminação da informação em massa.

2.2 Cereais e legislação

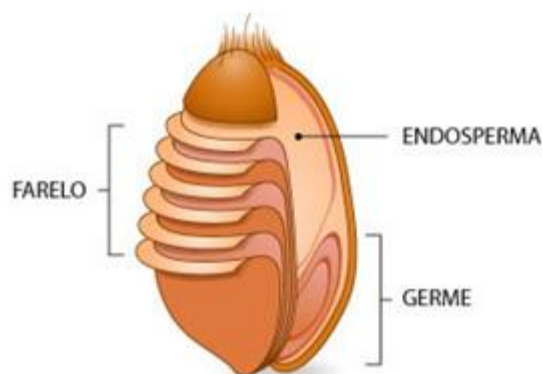
Dos três alimentos mais consumidos no mundo, os cereais ficam em primeiro lugar, os vegetais em segundo, e o leite em terceiro. No Brasil é possível que os itens mais consumidos sejam cereais, leite e frutas (MORATOYA et al., 2013). Dentre os cereais mais consumidos no mundo tem-se trigo, arroz e milho, embora cevada, aveia, centeio, painço e sorgo sejam mais comuns em alguns países do que em outros, dependendo das diferenças climáticas e culturais.

Cereais são designados como plantas, principalmente da família das gramíneas, cultivadas para a produção de grãos e farinhas utilizados para a alimentação humana e animal, sendo que a composição da farinha irá variar de acordo com a origem do grão e dos processos tecnológicos empregados na sua fabricação (IAL, 2008).

O que torna os cereais um dos alimentos mais consumidos pelo homem é a fonte de energia contida na fração de carboidratos nestes grãos (em média 70%), que correspondem a cerca de 50 a 60% do valor calórico total de uma dieta. O carboidrato mais predominante nos cereais é o amido (cerca de 60% da composição química) e o restante é representado por outros polissacarídeos, como pentosanas, beta-glucanas, glicofrutos e celulose (GONÇALVES, 2008).

De uma forma geral, os cereais integrais são compostos de três partes principais: farelo, gérmen e endosperma (Figura 2).

Figura 2 – Grão de cereal mostrando suas principais partes: farelo, endosperma e gérmen.



Fonte: <http://canelestore.blogspot.com.br/2012/03/cereal-integral.html>

Os cereais integrais não passam por processo de refinamento, são fontes ricas em muitos nutrientes, incluindo carboidratos complexos, fibras, minerais, vitaminas, antioxidantes e fito-estrógenos, tais como lignanas. Muitos destes componentes são perdidos do grão durante o processamento e, embora alguns possam ser substituídos (como ocorre na fortificação obrigatória de farinha branca), essa prática ignora os possíveis efeitos sinérgicos dos constituintes naturais (SEAL, 2006).

A RDC nº 263 da ANVISA consiste no regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. De acordo com essa RDC, Produtos de Cereais são aqueles obtidos a partir de partes comestíveis de cereais, podendo ser submetidos a processos de maceração, moagem, extração, tratamento térmico e ou outros processos tecnológicos considerados seguros para a produção de alimentos. Cereais Processados são os produtos obtidos a partir de cereais laminados, cilindrados, rolados, inflados, flocados, extrudados, pré-cozidos, e/ou por outros processos tecnológicos considerados seguros para a produção de alimentos, podendo conter outros ingredientes desde que não descaracterizem os produtos. Já Farelos são os produtos resultantes do processamento de grãos e cereais e ou leguminosas, constituídos principalmente de casca e ou gérmen, podendo conter partes do endosperma (BRASIL, 2005).

Os cereais e derivados são regulamentados pelas seguintes legislações:

- Portaria nº 326 – SVS/MS de 30 de julho de 1997: Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos;

- RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001: Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.
- RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002: Regulamento Técnico sobre rotulagem de alimentos embalados;
- RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003: Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos;
- RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005: Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos, e mistura à base de farelo de cereais.

2.3 Mix de Cereais

A farinha contendo mistura de vários cereais, denominada popularmente como “Ração Humana”, atualmente é designada de “mistura de farelos”, seguida dos nomes comuns dos vegetais utilizados, de acordo com o informe técnico nº 46 da ANVISA (BRASIL, 2011).

Os produtos compostos apenas por uma mistura de cereais, amidos, farinhas e farelos devem atender a RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005, que estabelece as características mínimas de qualidade a que devem obedecer tais produtos. Caso o produto contenha outros ingredientes, além de cereais, amidos, farinhas e farelos (como por exemplo, guaraná em pó, gelatina em pó, cacau em pó, gergelim), é possível enquadrá-lo na categoria de misturas para o preparo de alimentos e alimentos prontos para o consumo, que é regulamentado pela Resolução ANVISA RDC nº 273, de 22 de setembro de 2005.

As seguintes recomendações são feitas pelo Informe Técnico nº 46, de 20 de maio de 2011 da ANVISA (BRASIL, 2011) para esse tipo de alimento:

- A expressão “RAÇÃO HUMANA” não pode ser utilizada como denominação de venda, pois está em desacordo à Resolução RDC nº 259/2002 da ANVISA (deve indicar a verdadeira natureza do alimento).
- Os produtos devem ser obtidos, processados, embalados, armazenados, transportados e conservados em condições que não produzam, desenvolvam e/ou agreguem substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde do

consumidor (Boas Práticas de Fabricação, Portaria SVS/MS n. 326, de 30 de julho de 1997 e Resolução ANVISA RDC n. 275, de 21 de outubro de 2002).

- Os produtos devem atender aos regulamentos técnicos específicos de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação; contaminantes; características macroscópicas, microscópicas e microbiológicas; rotulagem de alimentos embalados; rotulagem nutricional de alimentos embalados; informação nutricional complementar, quando houver, e outras legislações pertinentes.

- Não podem constar no rótulo ou material publicitário do produto alegações de propriedades medicamentosas, terapêuticas e relativas a emagrecimento. Caso exista, a empresa deve registrar o produto na categoria específica e atender às disposições da legislação pertinente.

- O consumo desses produtos para substituir refeições pode trazer prejuízos à saúde, pois não fornecem todos os nutrientes necessários a uma alimentação adequada.

A expressão “Ração humana” poderia induzir a ideia de um alimento completo e, assim, todos os nutrientes essenciais como proteínas deveriam estar presentes. Estes produtos passaram a receber denominações como “Mix de Cereais”, “Mix de Fibras” e “Misturas de Grãos”, entre outras, que ainda são comercializados como produtos prontos para o consumo e apresentam composição extremamente variada, de acordo com a empresa fabricante (MANTOANI; PESSATO; TAVANO, 2013).

Esse alimento é considerado um complemento alimentar e uma das novas tendências de dietas da moda, composta de misturas de cereais e outros ingredientes, como gergelim, extrato de soja, linhaça, quinoa, aveia em flocos, gergelim, açúcar mascavo, gérmen de trigo, gelatina em pó, cacau em pó, guaraná em pó e lêvedo de cerveja. A composição e proporção dos ingredientes podem variar de acordo com o fabricante, e a maioria dos ingredientes é de origem vegetal, integral e sem processamento térmico prévio (BORRÉ; GALVÃO; AZEREDO, 2014).

Os mix de cereais são formulados com diferentes ingredientes disponíveis regionalmente, de baixo custo e baseadas em preparações caseiras ou artesanais; assim, é possível obter diferentes composições, respeitando-se as diferentes culinárias de cada região. Em geral, as partes dos alimentos aproveitados são pobres em calorias, mas

apresentam elevadas concentrações de minerais, vitaminas e fibras (GONÇALVEZ, 2008).

A utilização da forma in natura dos ingredientes de alimentos tipo mix de cereais pode favorecer que alguns fatores antinutricionais permaneçam ativos (MANTOANI; PESSATO; TAVANO, 2013). Os fatores antinutricionais como os inibidores de proteínas, oxalatos, taninos, nitritos, dentre outros, interferem na digestibilidade, absorção ou utilização de nutrientes e, se ingeridos em altas concentrações, podem diminuir a disponibilidade dos aminoácidos essenciais e minerais, além de causar irritações e lesões da mucosa gastrointestinal. Algumas dessas substâncias apresentam pequeno impacto, pois são termolábeis e geralmente são destruídas nas condições normais de preparo doméstico ou industrial dos alimentos (BENEVIDES et al, 2011).

A seguir são apresentadas as características dos cereais mais utilizados em mix de cereais.

2.4 Gergelim

O gergelim (*Sesamum indicum* L.) é a mais antiga oleaginosa conhecida. Apresenta distribuição tropical e subtropical, é tolerante à seca, com ampla adaptabilidade às condições de clima tropical quente e tolerância a déficit hídrico, como a região do Nordeste do Brasil, além de facilidade de cultivo. Destaca-se como a nona oleaginosa mais cultivada do mundo, devido ao óleo extraído de suas sementes, que tem teores e qualidade superiores ao de outras oleaginosas como soja e girassol (COSTA et al, 2007; QUEIROGA et al, 2010).

O principal produto do gergelim é o grão, que é comestível, fornece óleo e farinha, contém vitaminas A, B, C, possuem bom teor de cálcio, fósforo e ferro; além disso, os grãos pretos são mais ricos em cálcio e vitamina A. Suas sementes são pequenas, achatadas, de coloração variando da cor branca a preta, possuem altos teores de ácidos graxos insaturados e proteína digestiva (Figura 3) (BEZERRA et al., 2010).

Figura 3 - Tipos de sementes de gergelim: A) gergelim preto; B) gergelim integral; C) gergelim bege.



Fonte: <http://www.biodiesel-machine.com/pt/sesame-color-sortex.html>

O óleo produzido a partir dos grãos de gergelim é comestível e apresenta grande estabilidade, sendo resistente à rancificação. Os grãos e óleo de gergelim são utilizados na confecção de massas, doces, tortas, tintas, sabões, cosméticos e remédios; os grãos inteiros decorticados (despeliculados) e polidos são muito utilizados em cima de pão de hambúrguer e em outros produtos de panificação (LAGO et al, 2001).

2.5 Linhaça

Linhaça (*Linum usitatissimum*, família Linaceae) é cultivada em mais de 50 países sendo o Canadá o maior produtor mundial. A semente de linhaça desempenha um papel importante na dieta humana, e vários estudos mostraram os seus benefícios para a saúde e prevenção de doenças. É uma fonte importante de fibra e proteína, rica em compostos fenólicos conhecidos como lignanas, responsáveis pelas suas atividades antioxidantes, além de serem associadas com a melhoria do valor nutricional, aumentando a concentração de ômega-3 em diferentes alimentos (SARGI et al, 2013).

A linhaça é uma semente oleaginosa com mais de 200 espécies conhecidas, com a cor do grão variando do amarelo claro ao marrom. Seu nome botânico *Linum usitatissimum* L., significa "mais utilizável". Nos últimos anos, a linhaça tem se tornado popular devido ao seu papel funcional para a boa saúde, o que tem estimulado a produção como grão integral ou na forma de óleo. A farinha pode facilmente ser incorporada a itens da dieta como pães, cereais, *mufins*, margarinas e em saladas (CARDOZO et al, 2010).

Em relação à composição de nutrientes, a linhaça apresenta 28% de fibra dietética, 41% de lipídios e 21% de proteína, 3% de cinzas e o restante de água. O óleo contém vitaminas A, B, D e E, minerais (potássio, cálcio, fósforo, magnésio e enxofre) e aminoácidos. A linhaça apresenta baixa concentração de gordura saturada (9%), sendo a maior parte da gordura do tipo poli-insaturada (73%), especialmente o ácido alfa-linolênico (CARDOZO et al, 2010; CUPERSMID et al, 2012; OLIVEIRA et al, 2014).

Existem dois tipos de linhaça: a marrom e a dourada (Figura 4). A linhaça marrom é cultivada em regiões de clima úmido e quente, como o Brasil, e a linhaça dourada é cultivada em regiões frias, como o Canadá e o norte dos Estados Unidos. No cultivo da linhaça marrom são utilizados agrotóxicos, enquanto a dourada é cultivada de forma orgânica (CUPERSMID et al, 2012).

Figura 4 - Sementes de linhaça marrom e dourada.



Fonte: <http://vegetarianismoveganismo.wordpress.com/linhaca/linhaca-mitos-e-verdades/>

As sementes de linhaça podem ser utilizadas na prevenção e tratamento de doenças, como diabetes tipo 2, doenças no fígado, pressão alta, artrite reumatoide, embolias, auxiliam na redução de riscos de doenças cardiovasculares, aterosclerose e prevenção de certos tipos de câncer. O consumo da semente de linhaça tem se mostrado eficaz na redução de colesterol total e do LDL colesterol, assim como na agregação plaquetária (CUPERSMID et al, 2012).

Apesar do alto valor nutritivo da linhaça, em sua composição existem fatores antinutricionais que podem causar efeitos adversos. A linatina pode interferir na

absorção de vitamina B6, podendo causar sua deficiência e os compostos cianogênicos e o ácido fítico podem quelar minerais como o zinco, o ferro e o cálcio. Além disso, foi demonstrado que óleo rico em ácidos graxos n-3 diminui a absorção e retenção de ferro, diminuindo a concentração de hemoglobina. Foram demonstrados benefícios do consumo da semente na idade adulta, reduzindo colesterol e glicose, porém poucos estudos avaliaram seu consumo exclusivamente durante o período de lactação (CARDOZO et al, 2010).

2.6 Aveia

No Brasil são cultivadas as aveias branca (*Avena sativa* L.) e preta (*A. strigosa* Schieb). As aveias são plantas anuais que se desenvolvem principalmente nos meses mais frios do ano. As brancas distinguem-se das pretas por apresentarem colmos mais grossos e folhas mais largas. Os grãos da branca são em geral maiores e de coloração branca ou amarelada, enquanto os da preta, além de serem menores, apresentam cores que variam do branco ao preto. Os grãos da aveia branca (Figura 5) são utilizados para alimentação animal e humana, já a aveia preta apresenta reduzida produção de grãos e não tem qualidade industrial devido a coloração escura, menor tamanho e baixo rendimento de grãos (MACHADO, 2000).

Figura 5 – Aveia na forma de grão integral e em flocos



Fonte: <https://misturafioapavio.wordpress.com/2015/02/03/agua-de-aveia-faz-prodigios/>

A aveia tornou-se uma cultura bastante importante por apresentar resistência à seca, desenvolverem-se em baixas temperaturas, apresentam tolerância às geadas, ao alumínio, apresentam baixa incidência de pragas e doenças, fácil produção de sementes,

baixo custo da lavoura, aliada a boa produção de forragem e grão. Pode ser cultivada para cobertura do solo, produção de forragem, feno, silagem e grãos, utilizados na alimentação de bovinos de corte e leite. As plantas suportam estresse hídrico e cobrem rapidamente o solo, evitando o desenvolvimento de plantas indesejáveis (MACHADO, 2000).

Este alimento possui alta qualidade nutricional, é rico em proteínas, vitaminas, amidos complexos e fibras, e o farelo da aveia possui alto teor de β -glucanas, um tipo de fibra solúvel presente (LAZZARI, 1997). A composição de lipídios na aveia é favorecida pelo alto teor de ácidos graxos insaturados, dentre eles o linoleico que é considerado essencial para a nutrição humana. Porém, essa composição contribui para a frágil estabilidade dos produtos de aveia e a formação de compostos indesejáveis (ZADERNOWSKI et al., 1999).

Rupollo et al. (2006) realizaram um estudo com armazenamentos de grãos de aveia em sistema hermético por 12 meses e após este período não detectaram aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. O baixo teor de umidade dos grãos influenciou a incidência fúngica durante o armazenamento hermético, e a interação foi significativa entre umidade e período de armazenamento sobre fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Nos tratamentos com umidades inferiores a 15% verificou-se a predominância de outros fungos, cuja incidência decresceu na ordem dos gêneros *Colletotrichum*, *Chaetomium*, *Phoma*, *Bipolaris*, *Alternaria* e *Neurospora*.

2.7 Fatores que favorecem fungos contaminantes em alimentos

Para os micro-organismos conseguirem sobreviver e se multiplicar em um alimento, existem fatores relacionados às características próprias dos alimentos (fatores intrínsecos) e relacionados com o ambiente em que o alimento se encontra (fatores extrínsecos). Fatores intrínsecos: atividade de água (Aa), acidez (pH), potencial de oxirredução (Eh), composição química, presença de fatores antimicrobianos naturais e interações presentes nos alimentos. Fatores extrínsecos: umidade, temperatura ambiental, composição química da atmosfera que envolve o alimento, condições físicas e sanitárias dos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os produtos agrícolas estão constantemente sujeitos à contaminação fúngica. O crescimento de fungos é determinado por vários fatores, destacando-se umidade, aeração, dano provocado por insetos e ácaros, temperatura e tempo de armazenamento. Vecchia e Castilhos-Fortes (2007) verificaram a ocorrência de fungos produtores de micotoxinas, principalmente *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, em granola, com predominância de *Aspergillus*, em três estações do ano. No verão houve maior desenvolvimento micelial e no outono menor crescimento de fungos.

Em grãos e produtos processados de soja, os principais fungos contaminantes foram *Aspergillus* e *Fusarium*. O trabalho de Oliveira, Lorini e Mallmann, (2010) mostrou baixa ocorrência de micotoxinas em grãos de soja quando armazenados de forma correta. A grande fonte de contaminação por aflatoxina e zearalenona são as impurezas e/ou matérias estranhas permitidas na legislação brasileira até o limite de 1%.

Geralmente, os fungos começam a se proliferar em grãos de cereais armazenados à medida que os teores de umidade atingem níveis superiores a 13,5%, com atividade de água mínima para as principais espécies de fungos toxigênicos superior a 0,76. Temperaturas abaixo de 10°C inibem o crescimento de fungos toxigênicos; para seu crescimento, as temperaturas ideais são em torno de 25 a 30°C, ainda que algumas espécies de *Aspergillus* se desenvolvam melhor em temperaturas acima de 30°C (ZAITZ et al, 2012).

O modo correto de secagem é a melhor maneira de evitar o crescimento de fungos e produção de micotoxinas em grãos após a colheita. Os fungos não podem crescer, nem as micotoxinas podem ser produzidas em alimentos secos. Por isso a secagem eficiente dos produtos e a sua conservação sem umidade é uma medida eficaz contra o crescimento de fungos e produção de micotoxinas. A atividade de água é fundamental para a produção de micotoxinas, principalmente em substratos com baixa hidratação (FAO, 2013 apud PELUQUE, 2014).

2.8 Micotoxinas

Micotoxina é originária do grego, composto pelos termos *mikes* (fungos) e *toxikon* (toxina ou veneno). Consiste em metabólito secundário, tóxico, produzido por fungo filamentoso, são contaminantes naturais de cereais e outros produtos alimentares em todo o mundo e afetam significativamente a saúde humana e animal, uma vez que,

após a ingestão, contato ou inalação, podem acarretar em problemas à saúde humana, tais como a redução do apetite e desempenho geral, causar doenças, como o câncer, e até a morte. Algumas micotoxinas foram divididas em grupos de acordo com o processo de carcinogênese gerado, segundo o programa da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC): Carcinógenos do grupo 1 (aflatoxina); Carcinógenos do grupo 2B (fumonisina, ocratoxina); e Carcinógeno do grupo 3 (tricoteceno, zearalenona, patulina) (PEREIRA; SANTOS, 2011).

Fatores que afetam a produção de micotoxinas: a) fatores intrínsecos: umidade, atividade de água, tipo de substrato, tipo de planta e composição nutricional; b) fatores extrínsecos: clima, temperatura, oxigênio; c) processamento: secagem, mistura, adição de conservantes, manuseio de grãos; d) fatores implícitos: interações de insetos, cepas fúngicas, ecossistema microbiológico. Geralmente, a contaminação de produtos agrícolas por micotoxinas pode ser evitado usando métodos pré-colheita, como variedades resistentes, gestão de campo, uso de agentes biológicos e químicos, gestão da colheita; e métodos pós-colheita, como melhoria dos métodos de secagem, boas condições de armazenamento, uso de agentes naturais e químicos e irradiação (ADEGOKE; LETUMA, 2013).

Os gêneros de fungos de maior relevância são: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Alternaria*. Há 4 tipos de toxicidade, dependendo dos teores de micotoxinas: aguda, crônica, mutagênica ou teratogênica (ZAITZ et al, 2012).

As principais micotoxinas regulamentadas pelo governo de vários países são: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, deoxynivalenol, zearalenona e patulina, produzidos por espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, e *Penicillium*. As aflatoxinas, fumonisinas e ocratoxinas representam as ameaças mais graves para a saúde humana (REDDY et al., 2011).

A presença do fungo no alimento não implica, obrigatoriamente, em produção de micotoxina, assim como, a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo. A maioria das micotoxinas é termoestável, resistindo a determinados tratamentos térmicos ou processos de desidratação que são suficientes para destruir o micélio vegetativo dos fungos que as produziram (MAZIERO; BERSOT, 2010).

Cacciamani et al (2007) afirmam que os diferentes grupos de micotoxinas são resistentes a temperaturas entre 100 e 210°C, verificadas durante processos industriais

ou domésticos de preparo de alimentos; além disso as temperaturas de fervura e fritura (entre 100 e 150°C) também raramente contribuem para destruição total de micotoxinas.

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana de forma direta ou indireta. Direta: pelo consumo de cereais, oleaginosas e derivados contaminados. Indireta: os animais que se alimentam com rações previamente contaminadas podem excretar micotoxinas no leite, carne e ovos (MAZIERO; BERSOT, 2010). O primeiro passo para prevenir a formação de micotoxina é controlar ou evitar o crescimento de fungos de armazenamento.

2.9 Aflatoxinas

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas por três espécies do fungo *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, que podem contaminar alimentos de consumo humano e animal. Essa micotoxina pode ser ingerida por meio de cereais, amendoim e derivados, e por meio da carne e derivados de animais que se alimentaram de rações elaboradas com grãos contaminados. São de grande importância para a agricultura, pois podem contaminar os alimentos no campo, antes e após a colheita e durante o transporte e armazenamento do produto. A ingestão de níveis acumulativos de aflatoxina pode levar ao desenvolvimento de câncer hepático (KWIATKOWSKI; ALVES, 2007).

As aflatoxinas são classificadas em B1, B2, G1 e G2, com base na fluorescência sob luz ultravioleta a 365 nm (B=Blue, G=Green), e são consideradas as micotoxinas de maior preocupação (STREIT et al, 2012).

O fígado é o órgão alvo e local de biotransformação da aflatoxina em vários outros metabólitos, destacando-se as aflatoxinas M1 e M2, que são produtos de biotransformação de B1 e B2, que aparecem no leite de vacas alimentadas com rações contaminadas, a aflatoxina 8,9 epóxido, que se une com DNA e RNA, e o aflatoxicol, que pode servir de reservatório de toxicidade para a aflatoxina B1 no espaço intracelular. Tais alterações moleculares ocorrem no sistema enzimático citocromo P450 (ZAITZ et al, 2012).

A presença de AFM1 representa riscos para a saúde humana, pois não são destruídos durante o processo de pasteurização e aquecimento. A quantidade de AFM1 encontrada no leite de vaca depende de vários fatores, como raça do animal, período de

lactação, infecções mamárias etc. Pode ser detectado no período de 12 a 24 horas no leite após a ingestão de AFB1, atingindo um nível elevado depois de alguns dias. Quando a ingestão de AFB1 é interrompida, a concentração de AFM1 no leite diminui até ficar indetectável após 72 horas (ALIABADI et al., 2013).

Os limites de tolerância de micotoxinas no Brasil são regulamentados pela RDC nº 07 da ANVISA de 18/02/2011, que estabeleceu os limites máximos para aflatoxinas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2 e AFM1) aceitáveis em alimentos prontos para consumo e em matérias-primas, e aplica-se às empresas que importam, produzem, distribuem e comercializam alimentos citados pelo regulamento (BRASIL, 2011). O Ministério da Saúde estabelece o limite de 30µg/kg para aflatoxinas AFB1+AFG1 em alimentos de consumo humano, e o Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento estabelece o limite de 20µg/kg de aflatoxinas totais para matéria-prima de alimentos e rações.

Não é necessário apenas ingerir o alimento contaminado com o fungo para atingir o fígado. Saad-Hussein et al (2016) investigaram a relação entre a exposição ocupacional aos fungos do ar, a aflatoxina B1 soro (AFB1), e das enzimas hepáticas (albumina, fosfatase alcalina, AST, ALT) de trabalhadores que manuseavam farinha de trigo (padeiros, trabalhadores de moagem). A temperatura e umidade relativa do ar foram mais elevadas em padarias do que em moinho de farinha. A concentração de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* foi mais elevada nas padarias do que nas casas de farinha. Os valores de AFB1, fosfatase alcalina e albumina no soro foram significativamente mais elevados em padeiros em comparação com trabalhadores de moagem. Assim, pode ocorrer exposição crônica a altas concentrações de *Aspergillus* em locais de trabalho, causando elevações nos níveis séricos de AFB1 e das enzimas hepáticas em trabalhadores expostos à poeira de farinha de trigo.

2.10 Métodos de rotina para detecção de micotoxinas

Kwiatkowsk e Alves (2007) afirmam que os métodos mais utilizados para detecção de aflatoxinas são: cromatografia em camada delgada, cromatografia em camada líquida de alta eficiência e imunoenaios, como os testes ELISA, biossensores e imunoensaio de injeção sequencial.

Os métodos analíticos existentes para micotoxina, segundo Aliabadi et al. (2013) podem ser divididos em duas categorias: métodos de triagem e métodos de confirmação.

- Métodos de triagem: métodos rápidos como ELISA, que tem uma ampla gama de aplicabilidade (aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, zearalenona e tricotecenos); biossensores baseados na utilização de anticorpos monoclonais ou policlonais, que estão sendo desenvolvidos para análise de micotoxinas, e tem como principais vantagens, em comparação com os métodos de análise tradicional, possuir detecção rápida, ensaio de baixo custo, alta sensibilidade, alta seletividade, fácil reparação.
- Métodos de confirmação: cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), muitas vezes com detecção por espectrometria de massa. Todos considerados mais vantajosos em comparação à Cromatografia de Camada Delgada.

Os possíveis biomarcadores para avaliar a exposição humana às aflatoxinas são os metabólitos de aflatoxina B1 encontrados na urina, como aflatoxina M1 (AFM1), aflatoxina P1 (AFP1), aflatoxina Q1 (AFQ1), ou a própria AFB1 que pode ser quantificada no sangue após o consumo de alimentos contaminados. Além disso, os adutos AFB-N7-guanina e AFB-albumina ou mutação no gene supressor de tumor p53, presentes em fluidos biológicos, são biomarcadores que podem ser utilizados em estudos epidemiológicos para avaliação da exposição a AFB1, pois são produtos diretos de danos causados a um alvo macromolecular celular crítico (BANDO et al, 2007).

A espectrometria de massa MALDI-TOF pode ser utilizada para identificação de fungos, assim como para detectar aflatoxinas, e é um sistema de identificação rápida de micro-organismos, tornando-se uma ferramenta poderosa para a identificação de espécies de bactérias e fungos em cultura (REICH et al, 2013). Proporciona baixo custo nas análises, agilidade e possibilidade de identificação diretamente das amostras clínicas. As identificações são realizadas ao comparar o espectro de massa do analito com espectros de referência de banco de dados, e existem duas plataformas disponíveis no mercado nacional: Microflex LT (Bruker Daltonics\BD Diagnostics) e VITEK MS (Biomérieux) (ALMEIDA JUNIOR et al., 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

As amostras de mix de cereais utilizadas no experimento foram adquiridas em estabelecimentos que comercializam produtos naturais, em Recife-PE, identificadas como M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9. Foram 4 amostras vendidas a granel, M1, M3, M7 e M8, que foram embaladas na hora da compra em sacos plásticos comuns. Já as amostras M2, M4, M5, M6 e M9 eram comercializadas em embalagem lacrada, de 3 tipos diferentes: embalagem plástica transparente (M2, M4, M6), embalagem metalizada (M9) e embalagem plástica fosca (M5).

Foram analisadas também amostras de grãos e farinha de cereais mais comumente encontrados na composição do mix de cereais: gergelim, linhaça e aveia. Esses grãos foram escolhidos para verificação apenas da microbiota fúngica e possível influência na contaminação dos mix de cereais. Foram obtidos de estabelecimentos de venda de produtos naturais na região metropolitana do Recife-PE, vendido a granel e em embalagem lacrada.

3.2 Irradiação dos grãos e farinha

As amostras foram submetidas à irradiação em fonte de cobalto-60, (Gammacell⁶⁰Co, modelo 220 Excel-MDS Nordion), no Departamento de Energia Nuclear-UFPE.

Cada amostra a granel foi embalada em alíquotas, irradiada e após isso foi subdividida para ser encaminhada para as análises de composição nutricional e análise micológica. Foi separada uma alíquota de cada amostra sem irradiar para ser usada como controle. As amostras industrializadas foram irradiadas na própria embalagem. As doses utilizadas foram 2,5kGy, 5kGy, 7,5kGy e 10kGy. A Figura 6 mostra o equipamento que foi utilizado para esta etapa.

Figura 6 - Irradiador Gammacell com fonte de cobalto-60 utilizado para irradiar as amostras de farinhas e grãos embalados, antes de serem analisados quanto à contaminação fúngica e teores nutricionais.



Fonte: Próprio autor

3.3 Análise fúngica

3.3.1. Análise fúngica de grãos e farinhas.

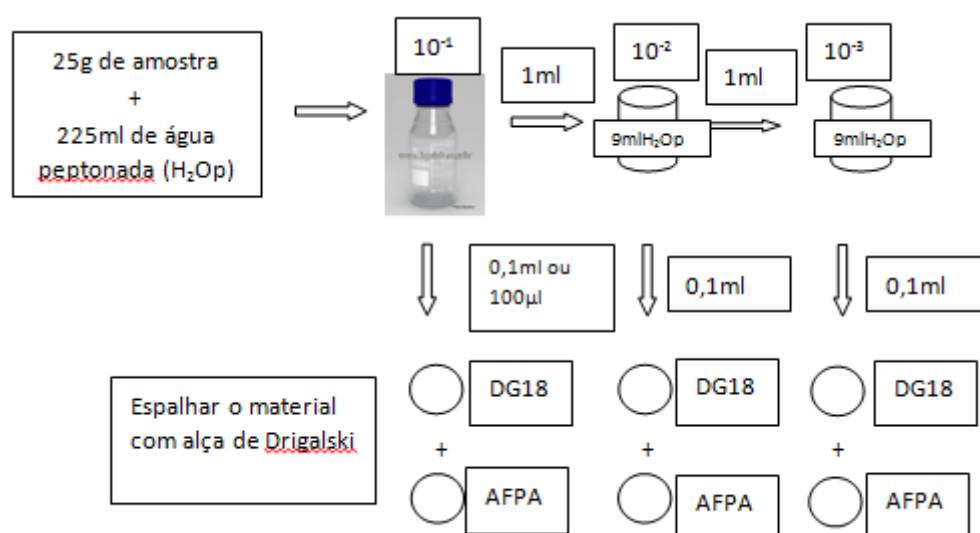
Os testes para crescimento de fungos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Centro Acadêmico de Vitória-CAV-UFPE. De acordo com o tipo de amostra, se grão ou farinha, foi aplicado o método específico descrito na literatura.

a) Grãos: foi feito o plaqueamento direto, ou seja, foram distribuídos 10 grãos de cada amostra, em placa de petri, na superfície do meio de cultura DRBC (Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol) ou DG18 (Ágar Dicloran Glicerol 18) e AFPA (Ágar *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*), em triplicata. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 5 dias. Após esse tempo foram quantificados os grãos que continham crescimento fúngico, e os fungos encontrados foram isolados em meio BDA (Ágar Dextrose Batata) para identificação na microscopia.

b) Farinha: Foi utilizada a técnica de contagem de fungos filamentosos e leveduras pelo método de diluição seriada de SILVA et al (2007), esquematizado na figura 7. Para cada amostra, 25g da farinha foram misturados em 225ml de água peptonada 0,1% em um frasco com tampa de rosca. Foram preparados também dois tubos de ensaio com 9 ml de água peptonada. Depois de homogeneizar a farinha com a água peptonada no

frasco (diluição 1/10), foi transferido 1 ml para o primeiro tubo (diluição 1/100), e após homogeneizar foi transferido 1 ml do primeiro tubo para o segundo tubo (diluição 1/1000). De cada diluição foi inoculado 0,1ml em placas de petri previamente preparadas com os seguintes meios de cultura: DRBC ou DG18 para crescimento fúngico geral, e em AFPA para crescimento de fungos aflatoxigênicos. O inóculo foi espalhado com alça de Drigalski e levado para incubar à temperatura ambiente. Após 3 a 5 dias, foi feita a contagem das colônias e posterior isolamento dos fungos no meio BDA (Ágar Dextrose Batata) e identificação dos gêneros fúngicos por microscopia de campo claro.

Figura 7 - Esquema de análise fúngica de farinhas pelo método de diluições.



Fonte: Adaptado de Silva et al. (2007).

O número de diluições necessárias depende do nível de contaminação esperado e permite, na contagem em placas, a obtenção de número de colônias entre 15 a 150 na contagem de fungos filamentosos e leveduras (SILVA et al., 2007).

O meio de cultura DRBC permite melhor visualização dos fungos provenientes de alimentos devido às seguintes características: corante rosa de bengala, que restringe o diâmetro das colônias de fungos, permitindo que colônias com crescimento lento também se desenvolvam; pH reduzido, que inibe a dispersão dos fungos; dicloran, que

auxilia na redução do diâmetro das colônias; e cloranfenicol, antibiótico que inibe o crescimento das bactérias (LAZARETTI et al, 2000).

O meio de cultura AFPA é um meio recomendado para a rápida detecção e contagem de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, que são potenciais produtores de aflatoxinas. Este meio tem as seguintes vantagens sobre outros: produção melhorada de cor no reverso da placa devido à concentração de citrato férrico e a adição de extrato de levedura, as colônias de *A. parasiticus* e *A. flavus* desenvolvem uma intensa coloração alaranjada no reverso das colônias que é uma característica diferencial dessas espécies, taxa de crescimento melhorada de *A. flavus* devido ao equilíbrio de peptona e extrato de levedura, além de inibição melhorada de bactérias e fungos de crescimento rápido devido à mistura de dicloran e cloranfenicol (FLUKA ANALYTICAL, 2003; CORRY et al, 1995).

3.3.1.1 Análise micológica de aveia conforme disponibilidade de variedade comercial

- **Aveia industrializada e não irradiada:** foi feita uma comparação entre 5 marcas industrializadas (M1 a M5), perfazendo um total de 13 amostras (A1 a A13) sem utilizar o tratamento pelo processo de irradiação, para verificação da qualidade das principais marcas de aveia comercializadas em Recife-PE, com as seguintes características: aveia em flocos tradicional (A1, A6, A9, A11, A13), aveia em flocos finos (A3, A4, A10, A12), farelo de aveia (A7) e farinha de aveia (A2, A5, A8). Foi realizado o método de diluição.
- **Aveia industrializada e irradiada:** foram analisadas amostras de aveia em flocos de 3 marcas industrializadas (A, B, C) e 1 marca a granel (D) após o tratamento com radiação gama, utilizando as doses 2,5kGy e 5kGy. Foi realizado o método de diluição.

3.3.1.2 Análise micológica de linhaça

- **Linhaça industrializada:** Foram analisadas 3 marcas de grãos de linhaça dourada e 4 marcas de grãos de linhaça marrom, irradiadas na própria embalagem com as seguintes doses: não irradiados, 2,5 kGy; 5,0 kGy; 7,5 kGy e

10kGy. Foi realizado o plaqueamento direto em meios de cultura DRBC e AFPA.

- **Linhaça vendida a granel:** Foram utilizados grãos de linhaça marrom obtidos da CEASA/PE e grãos de linhaça dourada obtidos de feira livre de Vitória de Santo Antão-PE. Os grãos foram irradiados nas seguintes doses: não-irradiado, 2,5 kGy, 5,0 kGy, 7,5 kGy, 10 kGy e 12,5 kGy. Foi realizado o plaqueamento direto.
- **Linhaça estocada por 6 meses:** Foram analisadas 4 marcas de grãos de linhaça marrom, que foram irradiados previamente (Doses: não irradiado, 2,5 kGy, 5,0 kGy). Foi realizado o plaqueamento direto em meios de cultura DRBC e AFPA.
- **Linhaça marrom e dourada de uma mesma marca:** grãos e farinhas foram irradiados (Doses: não-irradiado, 2,5 kGy, 5,0 kGy, 7,5 kGy, 10 kGy) e distribuídos nos meios de cultura de acordo com o tipo de amostra: grãos por plaqueamento direto e farinha pelo método de diluição.

3.3.1.3 Análise micológica de gergelim

Foram analisados dois tipos de amostras de grãos de gergelim bege: a granel e industrializada. Os grãos vendidos a granel foram obtidos da CEASA-PE, e irradiados nas seguintes doses: controle (não-irradiado), 2,5kGy, 5,0kGy, 7,5kGy, 10kGy e 12.5kGy. Em seguida foi realizado o plaqueamento direto em meio de cultura.

Foi realizada também uma comparação entre grão de gergelim bege, grão de gergelim preto e farinha de gergelim bege de uma mesma marca, expostas à radiação gama nas seguintes doses: não irradiado, 2,5kGy, 5,0kGy e 10kGy. Foi realizado o plaqueamento direto dos grãos de gergelim em meios de cultura DRBC e AFPA e método da diluição para a farinha de gergelim.

3.3.1.4 Análise micológica de mix de cereais

Foram obtidas 9 amostras de mix de cereais (M1 a M9) que foram irradiados (Doses: não irradiado, 2,5kGy e 5kGy) e realizado o método de diluição em meio de cultura DRBC e AFPA.

3.3.2 Identificação dos fungos aflatoxigênicos pela técnica MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight)

A identificação e confirmação da espécie dos fungos aflatoxigênicos isolados das amostras de mix de cereais do experimento foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), utilizando a técnica MALDI TOF, e equipamento da marca Bruker.

Essa técnica utiliza espectrometria de massa, e tem sido descrita como uma ferramenta eficaz para a identificação de bactérias Gram-positivas, Enterobactérias, bactérias Gram negativas não-fermentadoras, bactérias anaeróbicas, micobactérias e fungos. O método baseia-se na análise de proteínas e comparação com perfis disponíveis armazenados numa base de dados (MIMICA; MARTINO; PASTERNAK, 2013).

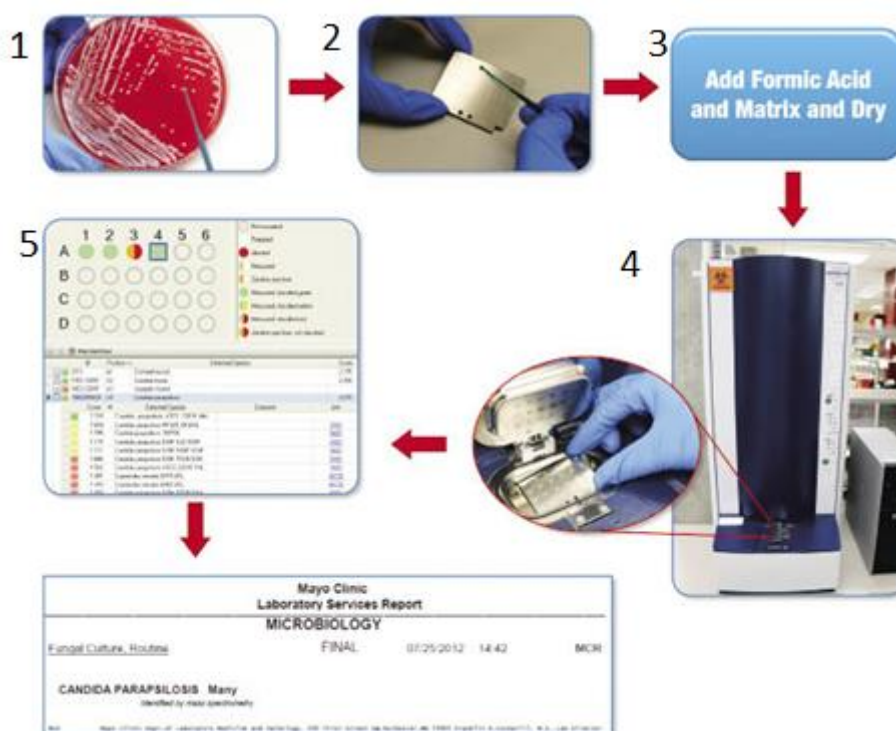
Para identificar o fungo foi preciso inicialmente semeá-lo em meio de cultura líquido (foi utilizado caldo batata dextrose) e o tubo precisou ser agitado todos os dias para que o micélio estivesse pouco aglomerado no momento da análise. Após o crescimento do micélio fúngico por 5 dias, foi aplicado o protocolo abaixo.

O protocolo do equipamento da Bruker Daltonics com os procedimentos de extração dos fungos para realizar a análise podem ser simplificados na figura 8 e consiste nas seguintes etapas:

1. O meio de cultura com o crescimento fúngico foi transferido para um tubo de fundo cônico e deixado sedimentar. Transferiu-se 1,5µl do sedimento para o tubo *Eppendorf* de microcentrífuga e feita a homogenização.
2. O tubo *Eppendorf* foi centrifugado por 2 minutos, a 13000 rpm. Cuidadosamente o sobrenadante foi removido.
3. Adicionou-se 1ml de água destilada no *Eppendorf* e foi centrifugado por 2 minutos, na velocidade máxima. O sobrenadante foi removido e o procedimento foi repetido por mais duas vezes.
4. O pellet foi suspenso em 300µl de água destilada, adicionado 900µl de etanol, homogeneizado e centrifugado por 2 min, na velocidade máxima. Foi removido o sobrenadante por pipetagem.

5. Adicionou-se 50 µl de ácido fórmico a 70% e homogeneizado.
6. Foi adicionado 50 µl de acetonitrila 100% e homogeneizado. O volume de ácido fórmico e de acetonitrila deve ser igual.
7. Centrifugou-se na velocidade máxima por 2 minutos.
8. Foi transferido 1 µl do sobrenadante para o alvo de aço do MALDI, deixou secar.
9. Sobrepôs com 1 µl da matriz, esperou secar.
10. Levou ao equipamento para a leitura.

Figura 8 - Processamento de amostra pelo MALDI TOF utilizando uma colônia bacteriana como exemplo. 1 e 2: Transferência da cepa da placa de petri para a placa metálica do equipamento; 3: Adição de ácido fórmico e matriz; 4: Processamento da amostra com laser; 5: Leitura pelo equipamento e comparação com o banco de dados.



Fonte: <http://news.mayomedicallaboratories.com/2015/04/13/maldi-tof-ms-for-the-diagnosis-of-infectious-diseases-2/>

No MALDI, os peptídeos são cristalizados com uma matriz orgânica, geralmente ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico. Após bombardeamento por laser, a matriz sublima e seus íons transferem a carga para os analitos, resultando na formação de íons peptídicos. A massa molecular dos íons é avaliada em um analisador após passagem por uma

câmara de vácuo, e o tipo mais comum é o TOF (*Time of Flight*) (BARBOSA et al, 2012).

Nos analisadores TOF, os íons resultantes da primeira fase são acelerados por um potencial entre dois eletrodos e atravessam um tubo de vácuo com velocidade inversamente proporcional à sua massa. Quando os íons atingem o detector, o tempo decorrido entre a ionização e a detecção é utilizado para derivar o valor m/z . O detector converte o sinal da passagem do íon em sinal analógico, que é lido e interpretado por uma estação de trabalho. O resultado final é um gráfico de m/z versus intensidade (contagem de íons). Os sinais gerados são comparados com informações disponíveis em bancos de dados, permitindo identificar a proteína de interesse (BARBOSA et al, 2012).

3.4 Análise de composição nutricional do mix de cereais

As análises físico-químicas de cinzas, umidade, proteínas e lipídios das amostras de mix de cereais foram realizadas no Laboratório de Bromatologia, do Centro Acadêmico de Vitória-CAV-UFPE, em triplicata. A metodologia utilizada foi baseada nos “Métodos físico-químicos para análises de alimentos”, do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008) e nos métodos da AOAC (1995).

3.4.1 Cinzas ou resíduo mineral fixo

As amostras foram carbonizadas até cessar a liberação de fumaça e, posteriormente, calcinadas em mufla a 540 °C até peso constante, segundo o método nº 018/IV do IAL (2008) e método 31.1.04 da AOAC (1995).

3.4.2 Umidade

O teor de umidade foi avaliado pelo método gravimétrico, baseado na perda de peso das amostras submetidas a aquecimento em estufa a 105°C até peso constante, segundo o método 012/IV do IAL (2008) e método 31.1.02 da AOAC (1995).

3.4.3 Proteínas

Foi utilizado o método de *Kjeldahl*, baseado na digestão ácida da matéria orgânica, seguido da destilação, sendo o nitrogênio posteriormente dosado por titulação. O valor em nitrogênio foi multiplicado pelo fator de conversão 6,25, segundo

especificado pelo método 037/IV do IAL (2008), e método 31.1.08 da AOAC (1995). As etapas podem ser visualizadas na figura 9.

Figura 9 - Equipamentos utilizados para análise de proteínas pelo método de Kjeldahl. Digestão (forno de digestão de proteínas, utilizando ácido sulfúrico), Destilação (destilador de nitrogênio, utilizando hidróxido de sódio), Titulação (gotejar ácido clorídrico até ficar rosa).



Fonte: Próprio autor

3.4.4 Lipídios ou extrato etéreo

Método de extração direta em *Soxhlet* e posterior evaporação do solvente, de acordo com o método 032/IV do IAL (2008) e método 31.4.02 da AOAC (1995).

3.4.5 Carboidratos (glicídios)

A fração glicídica foi estimada por diferença, subtraindo de 100 o somatório de proteínas, lipídios, cinzas e umidade (GONÇALVES, 2008), utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{Glicídios} = 100 - (\% \text{Umidade} + \% \text{Cinzas} + \% \text{Proteínas} + \% \text{Lipídios})$$

3.4.6 Atividade de água (Aa ou Aw)

Atividade de água é o parâmetro que mede a disponibilidade de água em um alimento e consiste na relação entre a pressão parcial de vapor da água contida em uma solução ou no alimento e a pressão parcial de vapor de água pura, a uma dada

temperatura (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Foi analisado com o equipamento higrômetro AquaLab 4TE, na Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, em triplicata.

3.5 Análise de rotulagem

Os rótulos das amostras industrializadas de mix de cereais foram analisados para verificar se estavam de acordo com a legislação brasileira:

- Rotulagem geral: lei nº 986 (BRASIL, 1969), lei nº8078 (BRASIL, 1990), RDC nº259 (BRASIL, 2002);
- Glúten: lei nº 8543 (BRASIL, 1992) e lei nº10674 (BRASIL, 2003);
- Rotulagem nutricional: RDC nº 360 (BRASIL, 2003).

3.6 Análise estatística

O programa utilizado para a análise estatística dos resultados foi o *Statistics* versão 10.

Para analisar os dados obtidos do experimento foram calculadas, inicialmente, as médias e medianas das análises de composição nutricional do mix de cereais. Para comparar esses dados foram utilizados testes paramétricos (Coeficiente de Pearson, MANOVA, Teste de Levene, Tukey, Fisher) e testes não-paramétricos (Teste de Kruskal-Wallis).

Para a análise de crescimento fúngico foram utilizados os métodos estatísticos: ANOVA, modelos de superfície de resposta e teste de Tukey. As análises foram realizadas considerando um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise micológica

4.1.1 Análise micológica do mix de cereais

Após analisar as amostras de mix de cereais, foi verificado que houve crescimento de fungos totais em todas as amostras não irradiadas, de todas as marcas, no meio DG18, como pode ser observado na tabela 1. Além disso, foi observado que houve presença de *Aspergillus* aflatoxigênicos em todas as amostras controle, com exceção apenas das amostras M7 e M9, portanto apenas 22% das amostras não apresentaram contaminação por fungo aflatoxigênico.

Tabela 1 - Crescimento fúngico médio das amostras de mix de cereais, identificando os gêneros de fungos visualizados, e de acordo com o tipo de comercialização.

Amostra	DG18 (UFC/g)	AFPA	Fungos encontrados	Tipo de comercialização
M1 (controle)	1×10^2	Positivo	<i>Aspergillus spp.</i> ,	A granel
M1 (2,5kGy)	6×10^2	Positivo	<i>levedura</i>	
M1 (5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo		
M2 (controle)	$1,3 \times 10^3$	Positivo	<i>Aspergillus spp.</i>	Industrializada
M2 (2,5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo		
M2 (5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo		
M3 (controle)	$1,2 \times 10^4$	Positivo	<i>Aspergillus spp.</i>	A granel
M3 (2,5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo		
M3 (5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo		
M4 (controle)	$3,1 \times 10^3$	Positivo	<i>Aspergillus spp.</i>	Industrializada
M4 (2,5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo		
M4 (5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo		
M5 (controle)	2×10^3	Positivo	<i>Aspergillus spp.</i> ,	Industrializada
M5 (2,5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo	<i>Levedura</i> ,	
M5 (5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo		
M6 (controle)	$2,3 \times 10^3$	Positivo	<i>Rhizopus sp.</i> ,	Industrializada
M6 (2,5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo	<i>Aspergillus flavus</i>	
M6 (5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo		
M7 (controle)	$1,93 \times 10^3$	Negativo	<i>Aspergillus sp.</i> ,	A granel
M7 (2,5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo	<i>Alternaria sp.</i>	
M7 (5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo		
M8 (controle)	$2,6 \times 10^2$	Positivo	<i>Aspergillus flavus</i> ,	A granel
M8 (2,5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo	<i>Penicillium sp.</i> ,	
M8 (5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo	<i>levedura</i> , <i>Trichoderma sp.</i>	
M9 (controle)	3×10^2	Negativo	<i>Aspergillus spp.</i>	Industrializada
M9 (2,5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo		
M9 (5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo		

Legenda: DG18: meio pra crescimento de fungos totais; AFPA: meio para crescimento de fungos aflatoxigênicos; UFC: unidades formadoras de colônias

A menor dose de radiação utilizada (2,5 kGy) foi suficiente para inibir o crescimento de fungos, principalmente *Aspergillus* sp., de todas as amostras, com exceção apenas da amostra M1 que apresentou crescimento fúngico na amostra não irradiada e irradiada na dose 2,5kGy. Como a amostra M1 é vendida a granel, pode ter ficado exposta no local de venda ao *Aspergillus* sp., que é um fungo de ambiente e facilmente espalha seus esporos, mas apenas se desenvolve quando encontra ambiente propício para isso. Caso o estabelecimento de venda do mix de cereais tenha bastante demanda e boas normas de conservação e manipulação, o risco é mínimo de adquirir um produto contaminado.

A amostra com maior número de fungos foi a amostra M3 ($1,2 \times 10^4$ UFC/g), que também é uma amostra vendida a granel e pode ter tido interferência da manipulação do vendedor no local de comercialização.

Os dados do presente trabalho estão bem próximos aos de Peluque (2014) que analisou 15 marcas de mix de cereais e obteve fungos filamentosos nas amostras analisadas variando de $1,0 \times 10^1$ a 2×10^5 UFC/g, com isolamento de sete cepas de *Aspergillus flavus*. As aflatoxinas B1 e G1 foram detectadas em poucas amostras e em baixos níveis e o autor justificou que os resultados podem ser devidos à baixa atividade de água nos produtos avaliados, a qual foi inferior a 0,63.

Pinheiro e Stefanon (2013) avaliaram 15 amostras de cereais matinais a base de aveia, gergelim, gérmen de trigo, uva passas, mel de abelha, melado de cana, fibra de trigo, açúcar mascavo, linhaça, flocos de milho, flocos de arroz, flocos de cereais, malte de cereais, óleo de arroz, óleo de milho, óleo de soja, castanha do Pará, castanha de caju, adquiridas no comércio de Santa Maria-RS. Das 15 amostras analisadas, nenhuma apresentou valores superiores aos estabelecidos pela ANVISA.

Os fungos que tinham características morfológicas semelhantes ao *Aspergillus flavus* nas amostras de mix de cereais analisadas, tanto em meio de cultura quanto na microscopia de campo claro, foram isolados e processados para análise pelo MALDI-TOF, que confirmou serem realmente *A. flavus*, confirmando que os fungos produtores de aflatoxinas visualizados no meio AFPA eram realmente desta espécie.

O presente trabalho utilizou caldo batata dextrose ao invés de caldo Sabouraud e obteve êxito na extração dos fungos para identificação pelo MALDI. Reich et al (2013) observaram que tentar extrair os fungos do meio sólido é complicado pois os fungos filamentosos crescem profundamente no ágar, complicando a colheita da amostra pois

dificulta a separação do fungo e do meio. Por isso é melhor fazer o repique do fungo que deseja identificar no meio líquido antes de extrair para o MALDI, independente se é amostra clínica ou alimento.

Esta técnica tem sido implantada na caracterização de várias espécies de leveduras e fungos filamentosos. Estudos com fungos filamentosos são menos numerosos, provavelmente devido às dificuldades relacionadas com a heterogeneidade fenotípica e falta de padronização em protocolos de extração de proteínas. Mesmo assim, algumas investigações demonstraram o sucesso de MALDI-TOF na identificação de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e alguns dermatófitos. Para leveduras, principalmente do gênero *Candida*, há alta precisão de identificação e os bancos de dados disponíveis incluem espectros de referência de todas as espécies comumente encontrados em laboratórios (MIMICA; MARTINO; PASTERNAK, 2013).

A técnica tem emergido como uma ferramenta confiável para a classificação e identificação rápida de micro-organismos e representa um forte desafio para métodos de biologia molecular e microscopia. Hoje em dia, os sistemas de MALDI comerciais são acessíveis para trabalho de pesquisa biológica, bem como para aplicações de diagnóstico em medicina clínica, biotecnologia e indústria. São empregados principalmente na biotipagem bacteriana, mas numerosas estratégias experimentais também foram desenvolvidas para a análise de fungos. Muitos gêneros de fungos, tais como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* ou *Penicillium* e também várias leveduras a partir de amostras clínicas (como *Candida albicans*) foram identificados com sucesso por MALDI-TOF MS (CHALUPOVÁ et al, 2014).

O trabalho de Reich et al (2013) avaliou o impacto de diferentes condições de crescimento sobre os resultados de identificação de bactérias e fungos utilizando o método MALDI-TOF. Examinaram 2.900 amostras obtidas a partir de amostras clínicas (swabs, secreções respiratórias, urina, etc.). Cerca de 98,6% dos resultados da identificação de MALDI-TOF confirmavam com os métodos convencionais (por exemplo coloração de Gram, capacidade de degradação de carboidratos, sistema Phoenix) e sequenciamento de ADNr 16S por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Além disso, permite rápida identificação de fungos, contribuindo para tratamento apropriado, já que os métodos tradicionais são mais demorados.

Os desafios para laboratórios de análise de alimentos são tão variados e numerosos como são os requisitos para métodos de identificação bacteriana. Bactérias de deterioração de alimentos, agentes patogênicos de origem alimentar, fermentos e

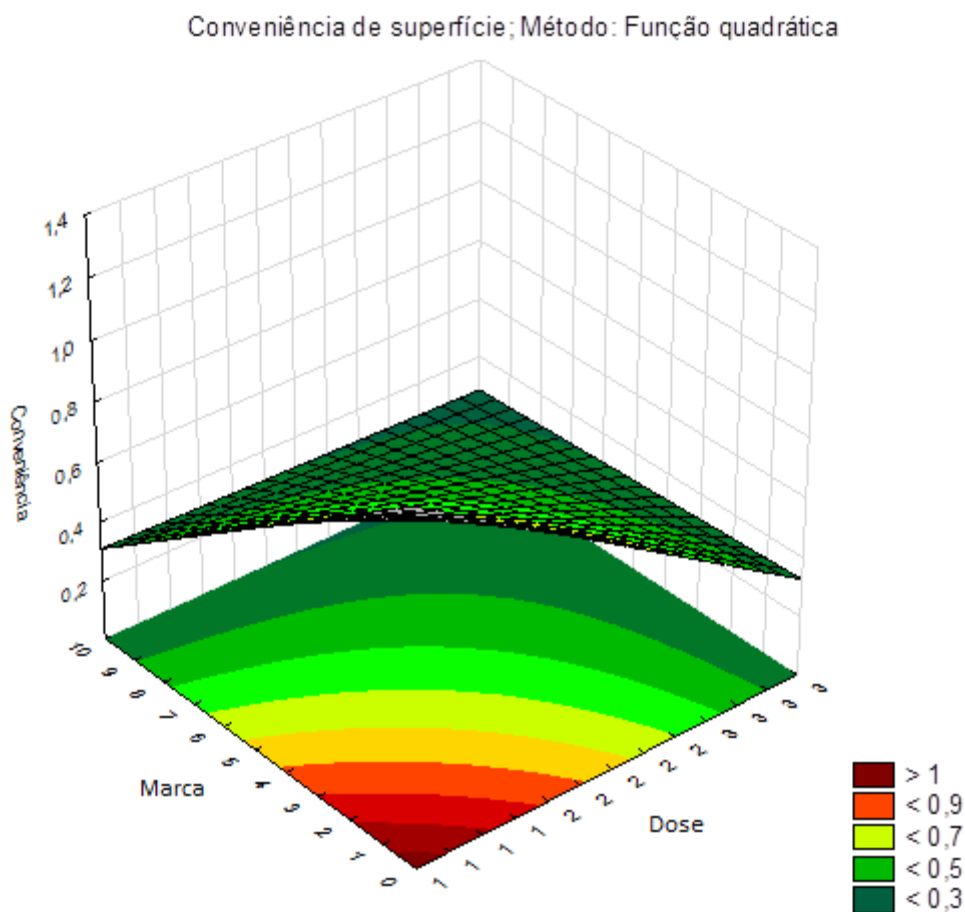
probióticos devem ser identificados com precisão, para que vias de contaminação possam ser descobertas, a fim de evitar a recontaminação e melhorar a higiene das instalações de produção. Todos os tipos de microrganismos associados a alimentos podem ser processados com o mesmo protocolo do MALDI TOF MS e dados confiáveis estão disponíveis dentro de um tempo total de resposta de 16 horas. Recentemente, a plataforma tem tido êxito quando usado para melhorar o diagnóstico veterinário e classificar isolados ambientais (PAVLOVIC et al, 2013).

Prado et al (2005) afirmaram que doses de irradiação gama de 15, 20, 25 e 30 kGy seriam capazes de destruir a aflatoxina B1 em amostras naturalmente contaminadas, porém é importante observar que doses acima de 10kGy podem afetar as características sensoriais dos alimentos.

Utilizando o método estatístico ANOVA, a um nível de confiança de 99%, não há evidências que levem a crer que há diferença entre as marcas de mix de cereais, e a aplicação da irradiação se mostrou eficaz no tratamento. Esses resultados podem ser interpretados graficamente através das técnicas de superfície de resposta, que são ferramentas matemáticas que visam otimizar um processo descrevendo graficamente a influência entre as marcas e a dose de radiação com fatores que impactam a sobrevivência de colônias de fungos.

Os modelos de superfície de resposta podem ser explorados para determinar a *sensibilidade da variável resposta* (cultivo de fungos) em relação à mudança nos níveis de fatores de interesse (dose). Como pode ser visto na Figura 10, há evidências que fundamentam que a aplicação da radiação gama, combinada a qualquer marca analisada, inibirá o crescimento de colônias de fungos, especialmente a uma dose de 5,0 kGy que demonstrou ser a melhor dose. Perceba que a estrutura que parece uma manta está exatamente acima da dose 3 (5kGy).

Figura 10 – Gráfico de superfície de resposta comparando as marcas de mix de cereais com as doses de radiação gama, demonstrando que a dose ótima é de 5kGy, destacada pela estrutura na cor verde. Dose 1: não irradiado; Dose 2: 2,5kGy; Dose 3: 5kGy.



4.1.2 Análise micológica de aveia

4.1.2.1 Aveia industrializada e sem tratamento por irradiação

As amostras de aveia em flocos tradicional apresentaram cerca de 60% de contaminação por fungos totais (3/5), aveia em flocos finos teve 50% de amostras contaminadas (2/4) e farinha de aveia teve 66% (2/3). Apenas a amostra de farelo de aveia (A7) não teve contaminação.

A marca M1 tinha duas variedades de aveia (flocos e farinha) e teve 100% de suas amostras contaminadas por fungos totais, inclusive fungo aflatoxigênico. A amostra A1(flocos tradicional) desta marca apresentou a maior quantidade de fungos, em comparação com todas as outras 12 amostras analisadas (verificar na tabela 2).

A marca M2 teve 50% de suas amostras com contaminação por fungos aflatoxigênicos e o crescimento médio de fungos totais foi de 4×10^2 UFC/g.

A marca M3 teve 100% de suas amostras com presença de fungos, mas nenhuma teve crescimento de fungos aflatoxigênicos.

As aveias das marcas M4 e M5 tiveram total ausência de crescimento fúngico e fungos aflatoxigênicos. A M4 foi a que teve maior variedade de aveia disponível comercialmente (aveia em flocos tradicional, farelo, farinha e flocos finos).

Tabela 2 - Crescimento fúngico médio encontrado nas amostras não-irradiadas de aveia industrializada.

Marca	Amostra	Tipos de aveia	Meio de cultura		Fungos encontrados
			DG18(UFC/g)	AFPA	
M1	A1	Flocos tradicional	$3,3 \times 10^4$	Positivo	Levedura, <i>Aspergillus sp.</i>
	A2	farinha	$1,4 \times 10^2$	Positivo	<i>Penicillium sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i>
M2	A3	Flocos finos	$4,6 \times 10^2$	Negativo	Levedura, <i>Eurothium sp.</i>
	A11	Flocos tradicional	4×10^2	Positivo	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>
M3	A4	Flocos finos	6×10^3	Negativo	<i>Penicillium sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i>
	A5	Farinha	4×10^2	Negativo	<i>Rhizopus sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>
	A6	Flocos tradicional	4×10^3	Negativo	<i>Aspergillus sp.</i>
M4	A7	farelo	$<10^{-2}$	Negativo	0
	A8	farinha	$<10^{-2}$	Negativo	0
	A9	Flocos tradicional	$<10^{-2}$	Negativo	0
	A10	Flocos finos	$<10^{-2}$	Negativo	0
M5	A12	Flocos finos	$<10^{-2}$	Negativo	0
	A13	Flocos tradicional	$<10^{-2}$	Negativo	0

Legenda: DG18: meio pra crescimento de fungos totais; AFPA: meio para crescimento de fungos aflatoxigênicos; UFC: unidades formadoras de colônias

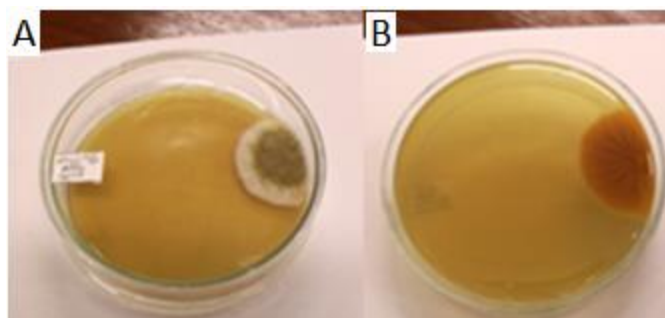
As amostras A7, A8, A9, A10 da mesma marca (M4) e A12 e A13 (M5) não apresentaram crescimento fúngico, o que já era esperado pois são marcas de empresas

consagradas comercialmente, e seguem rígidos padrões de higiene e de Boas Práticas de Fabricação para alimentos industrializados.

Os fungos filamentosos mais encontrados foram: *Aspergillus* sp. Seção *niger* e *flavi* e *Penicillium* sp.

Somente as amostras A1, A2 e A11 apresentaram positividade para fungo aflatoxigênico, produzindo a característica coloração amarelada no reverso da placa no meio AFPA, como pode ser visto na figura 11.

Figura 11– Fungo filamentoso, possível *Aspergillus flavus*, crescendo no meio AFPA. (A) micélio visto na frente da placa; (B) coloração amarelada no reverso da placa, confirmando positividade para fungo aflatoxigênico.



Fonte: próprio autor

Os resultados obtidos foram corroborados por Vidal et al (2013), que analisou farelo de trigo e farelo de aveia disponível comercialmente no mercado espanhol e avaliaram a segurança deste tipo de produto para os consumidores habituais. Amostras de farelo de trigo foram mais frequentemente contaminadas do que as amostras de farelo de aveia. A diferença deste trabalho para o de Vidal et al (2013) é que neste trabalho só foi verificada a presença de fungos produtores de aflatoxinas, enquanto que Vidal et al verificaram aflatoxinas, ocratoxina A, deoxinivalenol e zearalenona. Os resultados deles mostraram que houve maior presença de deoxinivalenol (*Fusarium*), com níveis acima da legislação europeia, e foi mais frequente em amostras de trigo.

4.1.2.2 Aveia irradiada

Observa-se que a amostra que apresentou a maior concentração fúngica não foi a amostra vendida a granel (D), e sim a amostra industrializada C, que também

apresentou maior variedade de gêneros de fungos e foi positivo para fungo aflatoxigênico. A única amostra que não teve a presença de fungos aflatoxigênicos foi a amostra B.

Só houve crescimento fúngico nas amostras não irradiadas, com exceção apenas da amostra mais contaminada C, que teve crescimento também na dose 2,5kGy. Os resultados da análise fúngica podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3 – Crescimento fúngico médio encontrado nas amostras irradiadas de aveia em flocos, destacando que houve presença de fungos aflatoxigênicos nas amostras A, C e D.

Amostra/dose	DRBC (UFC/g)	AFPA	Fungos encontrados	Tipo de amostra
A (controle)	6×10^1	Positivo	<i>Aspergillus niger</i> ,	Industrializada
A (2,5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo	<i>Aspergillus sp.</i> ,	
A (5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo	<i>Penicillium sp.</i>	
B (controle)	3×10^2	Negativo	<i>Aspergillus niger</i> ,	Industrializada
B (2,5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo	<i>Penicillium sp.</i>	
B (5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo		
C (controle)	$5,7 \times 10^2$	Positivo	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus</i>	Industrializada
C (2,5kGy)	4×10^2	Positivo	<i>flavus</i> , <i>Trichoderma sp.</i> ,	
C (5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo	<i>leveduras</i> , <i>Penicilium sp.</i>	
D (controle)	3×10^1	Positivo	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Rhizopus</i>	A granel
D (2,5kGy)	1×10^2	Negativo	<i>sp.</i> , <i>levedura</i> , <i>Penicillium sp.</i>	
D (5kGy)	$<10^{-2}$	Negativo		

Legenda: DRBC: meio pra crescimento de fungos totais; AFPA: meio para crescimento de fungos aflatoxigênicos; UFC: unidades formadoras de colônias

Analisando estatisticamente pelo método de ANOVA, verificou-se que a um nível de significância igual a 5%, não há evidências que as médias da amostra, dose de radiação e tipo de comercialização estejam associadas à presença de colônias de fungos, pois os valores de p foram maiores que 0,05 (Amostra: $p = 0,1715$; Dose: $p = 0,0723$).

4.1.3 Análise micológica de linhaça

4.1.3.1 Linhaça industrializada

Após a análise das 3 marcas de grãos de linhaça dourada (LD1 a LD3) e 4 marcas de linhaça marrom (LM1 a LM4) irradiadas, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 4 (linhaça marrom) e Tabela 5 (linhaça dourada).

Tabela 4 - Crescimento fúngico e germinação de grãos de linhaça marrom industrializados, irradiados e não irradiados

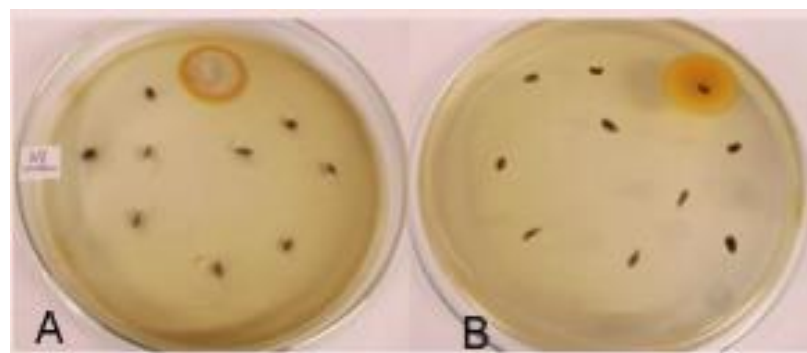
Doses		Não irradiado		2,5 kGy		5,0 kGy		7,5 kGy		10 kGy	
Meios		DRBC	AFPA	DRBC	AFPA	DRBC	AFPA	DRBC	AFPA	DRBC	AFPA
LM1	F	3%	0	3%	0	0	0	0	0	0	0
	G	73%	70%	70%	43%	63%	45%	33%	10%	3%	7%
LM2	F	17%	7%	7%	3%	3%	0	0	0	0	0
	G	67%	73%	70%	47%	67%	63%	67%	57%	37%	23%
LM3	F	50%	10%	20%	3%	7%	3%	3%	0	7%	0
	G	90%	43%	77%	67%	77%	80%	83%	70%	70%	80%
LM4	F	20%	7%	13%	0	0	0	13%	0	7%	0
	G	87%	93%	90%	90%	70%	93%	77%	90%	73%	60%

Legenda: F: crescimento fúngico; G: germinação do grão; DRBC: crescimento de fungos totais; AFPA: crescimento de fungos aflatoxigênicos.

Na amostra LM3 não irradiada de linhaça marrom foi observado o crescimento dos seguintes fungos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurothium*, *Curvularia*, *Alternaria*. Para as amostras LM1, LM2 e LM3 foi observado que 1 em cada 30 grãos (no meio DRBC) apresentou contaminação nas amostras controles, porém a dose de 2,5 kGy promoveu a diminuição dessa contaminação.

As amostras que apresentaram positividade no AFPA foram exclusivamente de linhaça marrom, no entanto a quantidade de fungos produtores de aflatoxinas ficou na faixa de 3 a 10%. A característica cor indicativa de positividade no meio AFPA em uma amostra de linhaça marrom pode ser observada na Figura 12.

Figura 12 - Amostra de linhaça marrom e o crescimento de um possível *Aspergillus* produtor de aflatoxina no AFPA. A) Frente da placa, presença de apenas um grão positivo. B) Reverso da placa, mostrando a coloração amarelo-alaranjado no micélio.



Fonte: próprio autor

Tabela 5 - Crescimento fúngico e germinação de grãos de linhaça dourada irradiados.

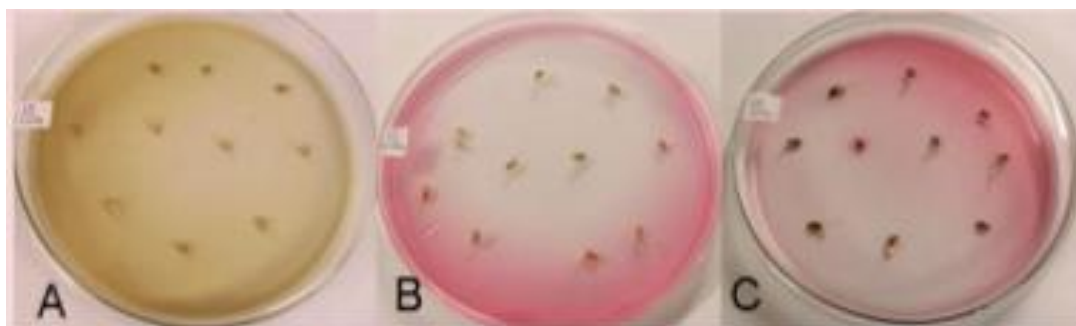
Doses	Meios	Não irradiado		2,5 kGy		5,0 kGy		7,5 kGy		10 kGy	
		DRBC	AFPA	DRBC	AFPA	DRBC	AFPA	DRBC	AFPA	DRBC	AFPA
LD1	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	70%	73%	63%	57%	73%	50%	30%	30%	17%	3%
LD2	F	17%	0	10	0	0	0	0	0	0	0
	G	100%	83%	87%	97%	87%	90%	87%	97%	80%	80%
LD3	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	G	87%	93%	90%	97%	83%	70%	53%	63%	50%	40%

Legenda: F: crescimento fúngico; G: germinação do grão no meio de cultura; LD: amostras de linhaça dourada; DRBC: crescimento de fungos totais; AFPA: crescimento de fungos aflatoxigênicos.

Para a linhaça dourada, na amostra LD2 (no DRBC, não irradiado e em 2,5kGy) ocorreu o crescimento de fungo do gênero *Aspergillus* em duas seções taxonômicas: flavi e nigri. Em todas as amostras e doses de linhaça dourada houve ausência de fungos aflatoxigênicos.

A taxa de germinação dos grãos no meio DRBC e AFPA, tanto para linhaça marrom quanto para linhaça dourada variou bastante, em todas as doses, porém pelo fato de o grão conseguir germinar indica que a radiação gama não afetou a viabilidade dos grãos de linhaça (Figura 13).

Figura 13—Grãos de linhaça na superfície dos meios de cultura DRBC (rosa) e AFPA (amarelo). A) linhaça dourada (2,5kGy) em AFPA. B) linhaça dourada (não irradiado) no DRBC. C) linhaça marrom (2,5kGy) em DRBC. Todos apresentam germinação dos grãos e ausência de crescimento fúngico.

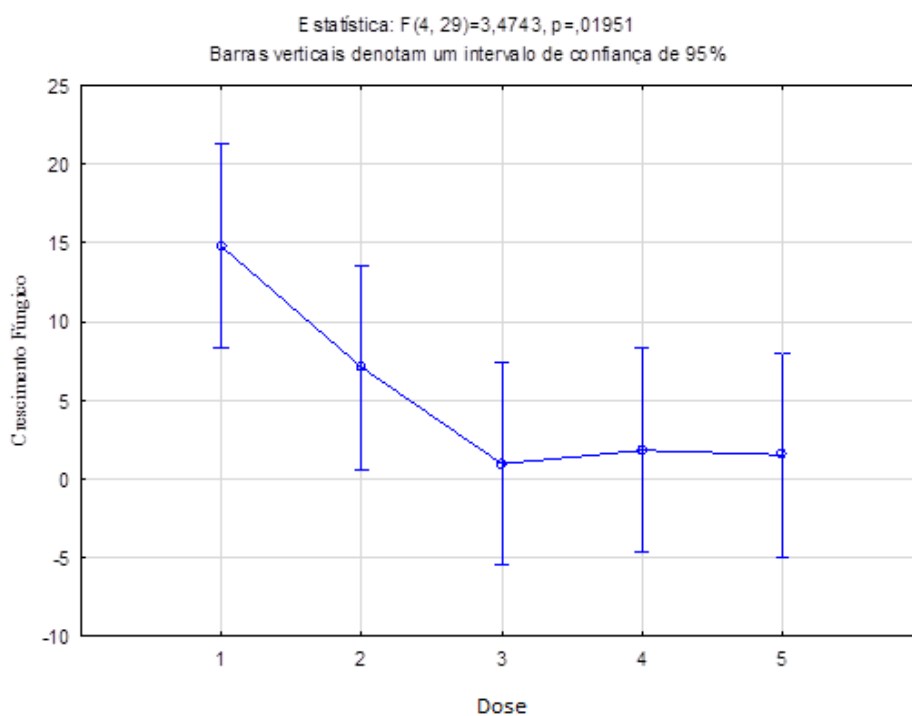


Fonte: próprio autor

Analisando estatisticamente os resultados, no DRBC foi testada a hipótese de igualdade entre as médias dos tipos de linhaça, assim como a sua interação com a irradiação. Assim, foi realizada uma análise por ANOVA para verificar se há diferenças entre os tipos de linhaça comparando às doses de radiação.

A um nível de significância de 5%, existem evidências que levam a crer que há diferença entre as médias do tipo de linhaça ($p = 0,0232$) e há diferença entre alguma média do grupo de dose de radiação ($p = 0,0195$), bem como na interação desses fatores ($p = 0,0010$). Na Figura 14 é possível verificar as médias dos grupos de dose de radiação em análise.

Figura 14 – Resultados do teste ANOVA em grãos de linhaça industrializada irradiada comparando o crescimento fúngico em meio DRBC com as doses de radiação. Tipos de dose: 1 (não irradiada), 2 (2,5kGy), 3 (5,0kGy), 4 (7,5kGy), 5 (10kGy).



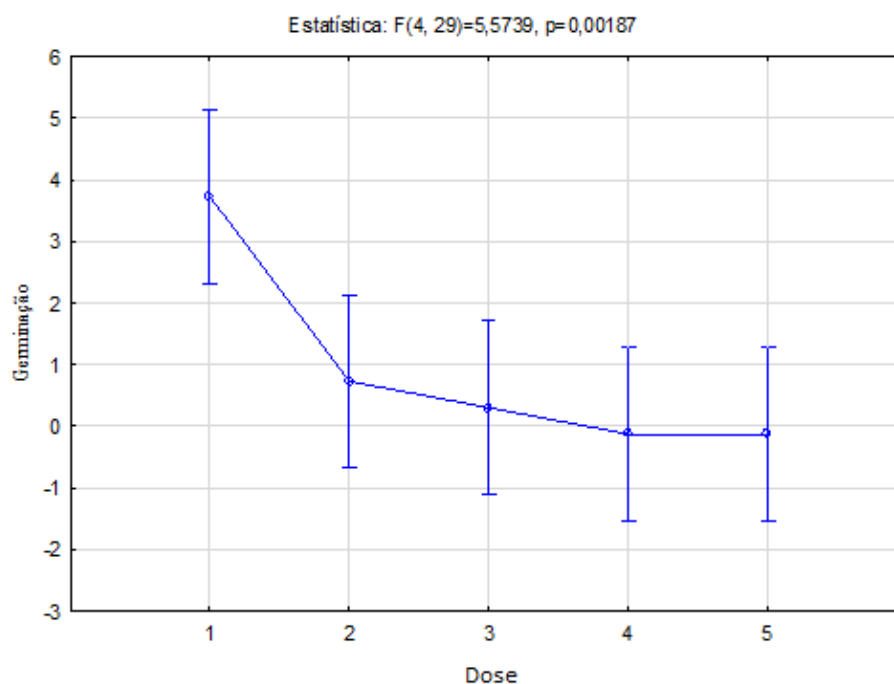
Utilizando o teste de Tukey, observou-se que há diferença entre as médias quando comparados os grupos de dose 1 e 3, 1 e 4, 1 e 5, a um nível de significância igual a 5%. A figura 14 deixa bem evidente essa diferença, pois os intervalos da dose 1 (não irradiado) não encontram o intervalo da dose 3 (5kGy), por exemplo.

Também há indícios que as médias entre os grupos de linhaça marrom e dourada são distintas, pois houve significância através da ANOVA para este fator, apresentando um valor-p igual a 2,3%.

Sob a análise do AFPA, também foi testada a hipótese de igualdade entre as médias dos dois tipos de linhaça, assim como a sua interação com as doses de radiação. Novamente realizou-se um teste ANOVA para verificar se havia diferenças entre os fatores (Tipo de linhaça: $p=0,0072$; Dose: $p=0,0019$) e a sua interação.

A um nível de significância de 1%, existem evidências que levam a crer que há diferença significativa entre as médias do tipo de linhaça, na dose de radiação, bem como na interação desses fatores. Na Figura 15 é possível verificar as médias dos grupos de dose de radiação em análise e visualizar que o intervalo da dose 1 (não irradiado) não tem valores em comum com as outras doses.

Figura 15 – Resultados do teste ANOVA comparando a germinação dos grãos de linhaça industrializados no meio AFPA em relação às doses de radiação. Tipos de doses: 1 (não irradiado), 2 (2,5kGy), 3 (5,0kGy), 4 (7,5kGy), 5 (10kGy).



Utilizando o teste de Tukey foi observado que há diferença entre a média do grupo de dose 1 (não irradiado) em relação aos demais, a um nível de significância igual a 5%.

Também há indícios que as médias entre os grupos de linhaça marrom e dourada são distintas, pois houve significância obtida da ANOVA para este fator, apresentando um valor-p igual a 0,7%.

4.1.3.2 Linhaça vendida a granel

As amostras de linhaça marrom e douradas vendidas a granel foram irradiadas e analisadas da mesma forma que as amostras industrializadas. As amostras não-irradiadas de linhaça marrom apresentaram 4% de taxa de contaminação por fungos aflatoxigênicos, enquanto que na linhaça dourada houve ausência dos mesmos. A radiação gama inibiu a contaminação por fungos em todas as amostras irradiadas.

Foi observado que os grãos germinaram no meio AFPA, havendo diminuição na taxa de germinação com o aumento da dose. No caso da linhaça marrom, a taxa de germinação foi: 84% (2,5kGy), 74% (5kGy), 50% (7,5kGy), 36% (10kGy), 10% (12,5kGy). Quanto à linhaça dourada, nas doses de 2,5kGy, 5kGy, 7,5kGy e 10kGy foram, respectivamente, 27%, 33%, 23% e 3% de germinação, havendo ausência na maior dose (12,5kGy).

Na linhaça marrom, apesar da diminuição da germinação com o aumento da radiação, suas taxas foram maiores do que a linhaça dourada, indicando uma resistência maior à radiação (tabela 6).

É importante lembrar que os grãos de linhaça só apresentaram germinação no momento em que estavam no meio de cultura. Enquanto estavam embalados, antes e após irradiação, não havia germinação.

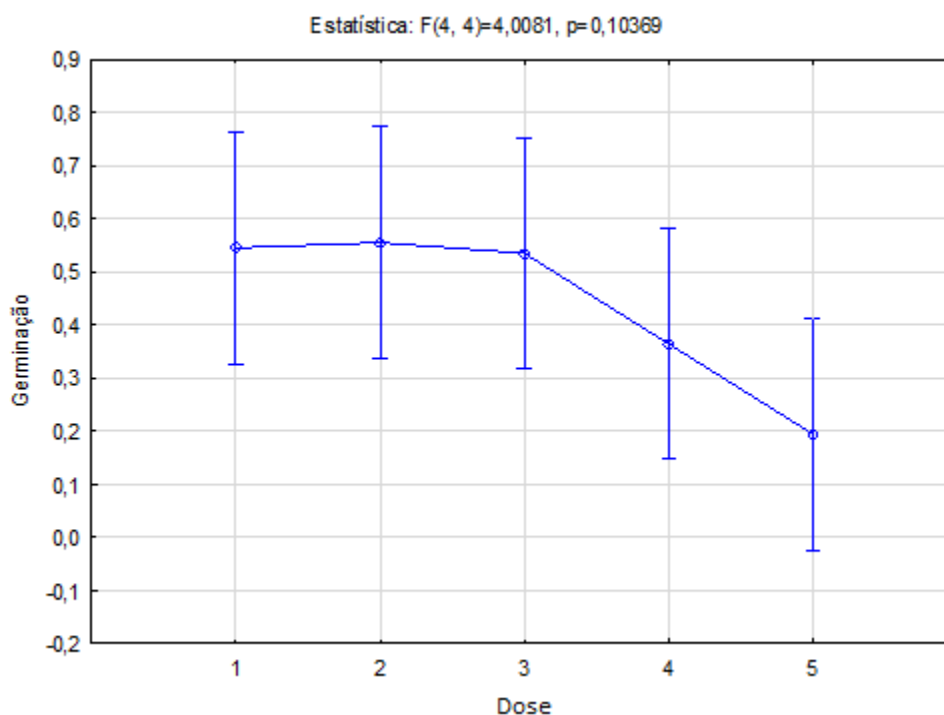
Tabela 6 - Análise de grãos de linhaça marrom e dourada, vendidos a granel, mostrando baixa contaminação por fungos aflatoxigênicos no meio AFPA, e a variação na taxa de germinação dos grãos de acordo com a dose.

Dose	Linhaça marrom		Linhaça dourada	
	Fungo aflatoxigênico	Germinação	Fungo aflatoxigênico	Germinação
Não-irradiado	4%	62%	0	47%
2,5 kGy	0	84%	0	27%
5,0 kGy	0	74%	0	33%
7,5 kGy	0	50%	0	23%
10 kGy	0	36%	0	3%
12,5 kGy	0	10%	0	0

Para analisar a hipótese de igualdade entre as médias dos tipos de linhaça, provenientes de CEASA/PE (marrom) e de Vitória de Santo Antão-PE (dourada), assim como a sua interação com as doses de radiação, realizou-se um teste ANOVA para verificar se há diferenças entre os tipos de linhaça *versus* doses de radiação.

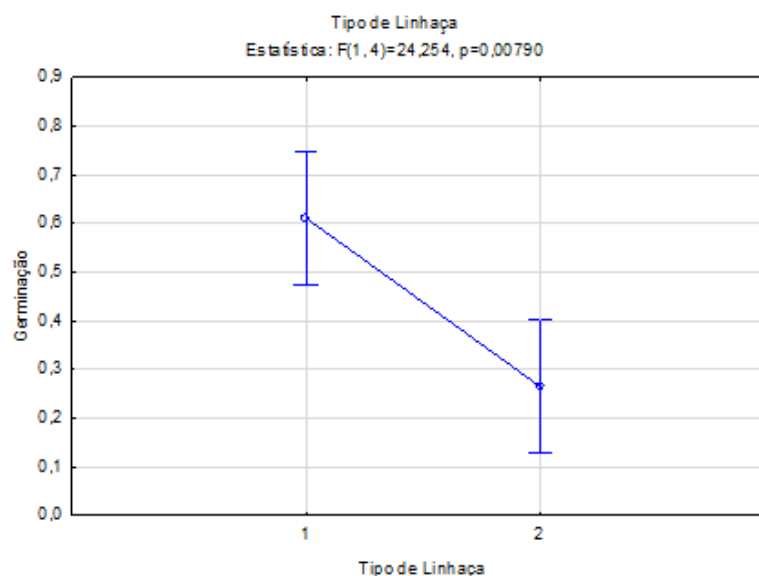
A um nível de significância de 1%, existem evidências que levam a crer que há diferença entre as médias do tipo de linhaça ($p = 0,007902$), entretanto não houve evidências que as doses de radiação modificam a média de germinação ($p = 0,103690$). Isso pode ser melhor visualizado na Figura 16, onde é possível verificar as médias dos grupos de doses 1 a 3 (não irradiada, 2,5kGy e 5kGy, respectivamente) bem próximas, enquanto que as médias de germinação começam a cair um pouco nas doses 4 e 5 (7,5 e 10kGy, respectivamente), mas ainda assim os intervalos se encontram.

Figura 16 – Resultado do teste ANOVA comparando a germinação dos grãos de linhaça não industrializados em relação à dose de radiação. Dose 1: não irradiado; dose 2: 2,5kGy; dose 3: 5kGy; dose 4: 7,5kGy; dose 5: 10kGy.



Segundo o teste F, proveniente do teste ANOVA, verifica-se que o grupo de linhaça marrom tem média de germinação superior ao de linhaça dourada (figura 17), e que a dose de radiação não impactou na germinação dos grupos (figura 16).

Figura 17 – Comparação entre a germinação dos grãos e os tipos de linhaça: 1-linhaça marrom; 2-linhaça dourada.



A linhaça marrom demonstrou ser mais resistente à radiação.

4.1.3.2 Linhaça estocada por 6 meses

Quando foram analisadas amostras de linhaça irradiada e estocada por 6 meses, verificou-se que não houve crescimento de fungos aflatoxigênicos em nenhuma amostra irradiada, demonstrando que a radiação conseguiu inibir a contaminação dos grãos por fungos totais, inclusive os aflatoxigênicos, durante o tempo de estocagem. A germinação dos grãos de linhaça diminuiu com o aumento da dose de radiação gama (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores médios de contaminação fúngica de grãos de linhaça marrom, de 4 marcas diferentes, embalados e estocados por seis meses.

Dose	Meios decultura	LM1		LM2		LM3		LM4	
		F	G	F	G	F	G	F	G
Não irradiado	DRBC	0	6,3	0	4,5	1	7	0	8
	AFPA	0	2,6	0	3,5	0	4	0	6
2,5 kGy	DRBC	0	4,6	0	6	0	6,3	0	7
	AFPA	0	1,6	0	2,2	0	3	0	5,5
5,0kGy	DRBC	0	1,6	0	4	0	4,5	0	6,3
	AFPA	0	1,3	0	1,5	0	3	0	4,2

Legenda: F: crescimento fúngico; G:germinação de grãos no meio de cultura; LM: marcas de linhaça marrom

Foi observado na tabela 7 que a linhaça germinou no DRBC e no AFPA. Na amostra LM1 ocorreu germinação até a dose de 5kGy; na amostra LM2 até 7,5kGy; na LM3 e LM4 ocorreu germinação em todas as doses. A germinação do grão pode ser vista na figura 18.

Figura 18 - Linhaça marrom não irradiada em meio DRBC, mostrando a produção de germinação nos grãos (à esquerda) e em detalhe o grão germinado.



Fonte: próprio autor

Conforme apresentou a Tabela 7, não foi observado crescimento fúngico, exceto em uma das amostras não irradiadas. Assim, foi testada apenas a hipótese de igualdade entre as médias de germinação, pois no meio de cultura DRBC e AFPA há indícios que as médias entre marcas e doses de radiação são diferentes, bem como sua respectiva interação, pois o valor-p foi abaixo de 0,05 para todos (Dose: $p = 0,034109$; Marca: $p = 0,044651$).

Houve diferença significativa da germinação no meio DRBC, tanto entre as doses quanto entre as marcas, pois o valor p foi de 3,4% e 4,4%, respectivamente. Já o valor- p está muito abaixo do nível de significância, rejeitando assim a hipótese de igualdade, ou seja, há variação entre as marcas e entre as doses para a germinação dos grãos no meio AFPA (Dose: $p=0,001644$; Marca: $p = 0,000063$).

No momento em que foi feita a obtenção das amostras para análise, percebeu-se que algumas empresas apresentavam variação da forma de apresentação do mesmo produto, ou seja, uma mesma empresa comercializava grão e farinha de linhaça, tanto marrom quanto dourada. Então houve o interesse em realizar também a análise de tipos diferentes de linhaça fabricados por uma mesma empresa. Os resultados podem ser vistos na Tabela 8.

Tabela 8 - Análise micológica de grãos e farinha de linhaça marrom e linhaça dourada, de uma mesma marca industrializada, mostrando que houve variação apenas na germinação dos grãos.

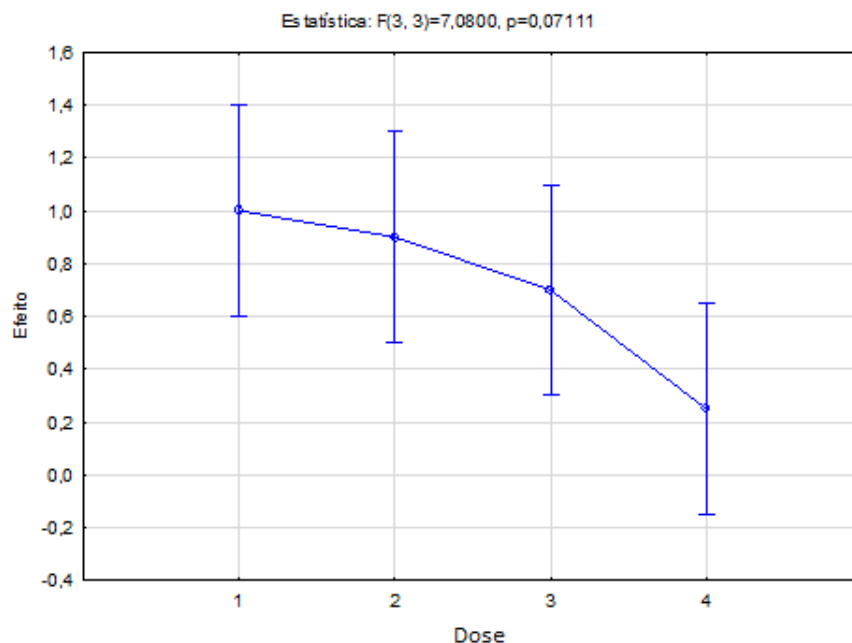
Tipos de linhaça	DOSE	Meios de cultura	Grãos		Farinha
			F	G	F
Linhaça marrom	Não-irradiado	AFPA	0	40%	0
		DRBC	0	100%	0
	2,5 kGy	AFPA	0	60%	0
		DRBC	0	90%	0
	5,0 kGy	AFPA	0	90%	0
		DRBC	0	70%	0
	10 kGy	AFPA	0	20%	0
		DRBC	0	50%	0
	Não irradiada	AFPA	0	0	0
		DRBC	7%	100%	0
Linhaça dourada	2,5 kGy	AFPA	0	100%	0
		DRBC	0	90%	0
	5,0 kGy	AFPA	0	70%	0
		DRBC	0	70%	0
	10 kGy	AFPA	0	0	0
		DRBC	0	0	0

Legenda: F: crescimento fúngico; G: germinação dos grãos em meio de cultura.

A contaminação fúngica em farinha e grão foi praticamente nula para todas as amostras, seja irradiada ou não, indicando que a empresa estava de acordo com as boas práticas de fabricação e possui controle de qualidade rígido. Apenas uma amostra (linhaça dourada) apresentou contaminação, e ainda assim baixa (7%). Houve germinação dos grãos de linhaça marrom em todas as doses, e a redução foi de 50% da amostra controle para a maior dose (10kGy). Já a linhaça dourada não apresentou germinação na maior dose. Não houve presença de fungos aflatoxigênicos em nenhuma amostra.

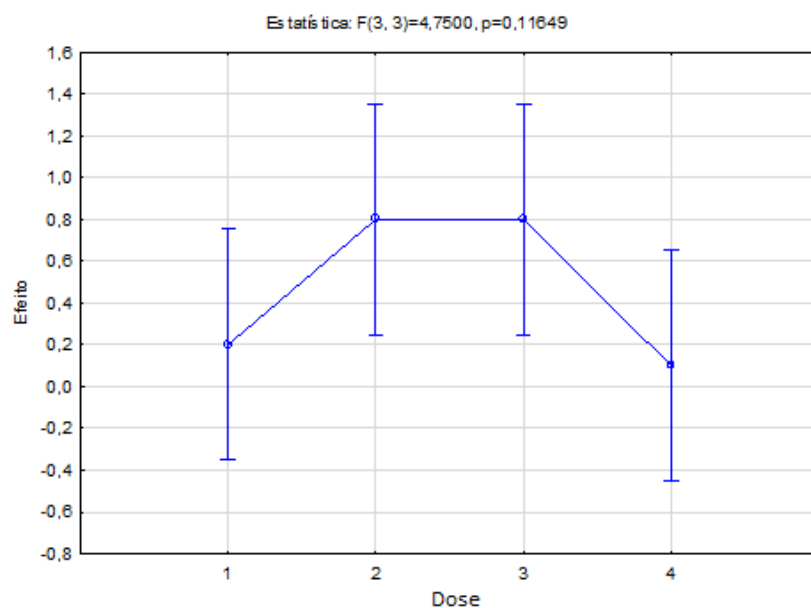
Ao realizar o teste ANOVA, a hipótese de igualdade entre as médias de germinação não foi rejeitada, a um nível de 5% de significância, nos meios de cultura DRBC e AFPA, entre os fatores marca e dose de radiação e suas interações. Os resultados do teste ANOVA podem ser visualizados nas Figuras 19, 20, 21.

Figura 19 – Resultados do teste ANOVA para as amostras de linhaça industrializada de uma mesma empresa, comparando germinação e dose de radiação no meio de cultura DRBC. Dose 1: não irradiado; dose 2: 2,5kGy; dose 3: 5kGy; dose 4: 10kGy.



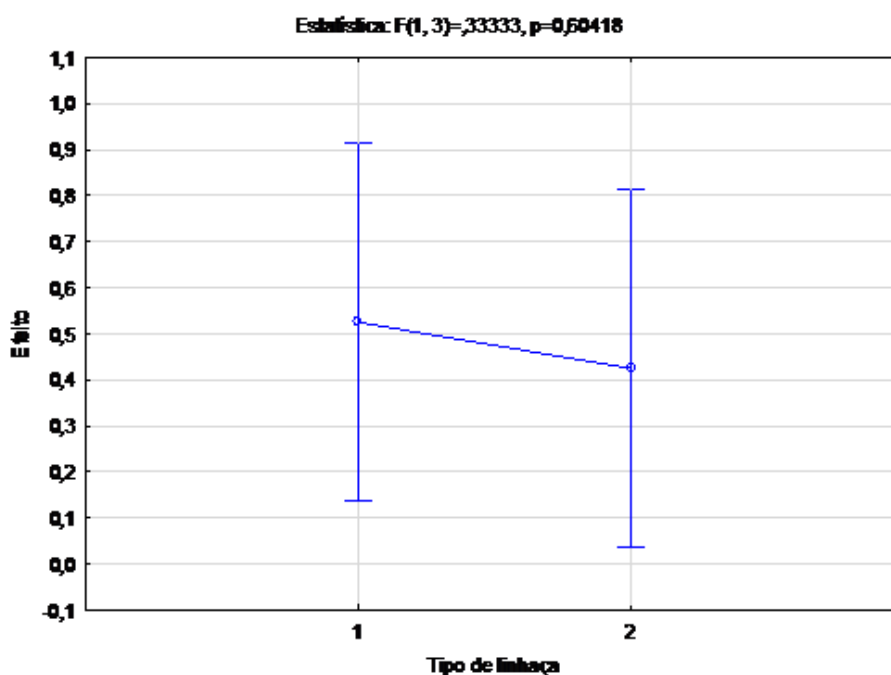
Ao visualizar a figura 19 é perceptível que há uma leve diminuição das médias de germinação conforme há o aumento da dose de radiação, mas o valor-p foi de 7%, indicando que a diferença entre as doses não é significativa.

Figura 20 – Resultados do teste ANOVA para as amostras de linhaça industrializada de uma mesma empresa, comparando germinação e dose de radiação no meio de cultura AFPA. Dose 1: não irradiado; dose 2: 2,5kGy; dose 3: 5kGy; dose 4: 10kGy.



A Figura 21 mostra que não houve diferença significativa entre os tipos de linhaça, as médias de germinação foram muito próximas e o valor-p foi de 60%, confirmando a hipótese de igualdade entre as amostras.

Figura 21 – Resultados do teste ANOVA para as amostras de linhaça industrializada de uma mesma empresa, comparando germinação e tipos de linhaça. Tipo 1: linhaça marrom; tipo 2: linhaça dourada.



Xu et al (2008) analisaram farinha de linhaça marrom e dourada testando a atividade fungistática frente aos fungos *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, e *Penicillium* sp. Os resultados mostraram que o crescimento de *F. graminearum* foi completamente inibido em todas as concentrações de farinha de linhaça em meio BDA e a inibição dos outros três microrganismos aumentou com o aumento das concentrações de farinha de linhaça, concluindo que a linhaça possui atividade fungistática e poderia ser utilizado como um alimento multifuncional.

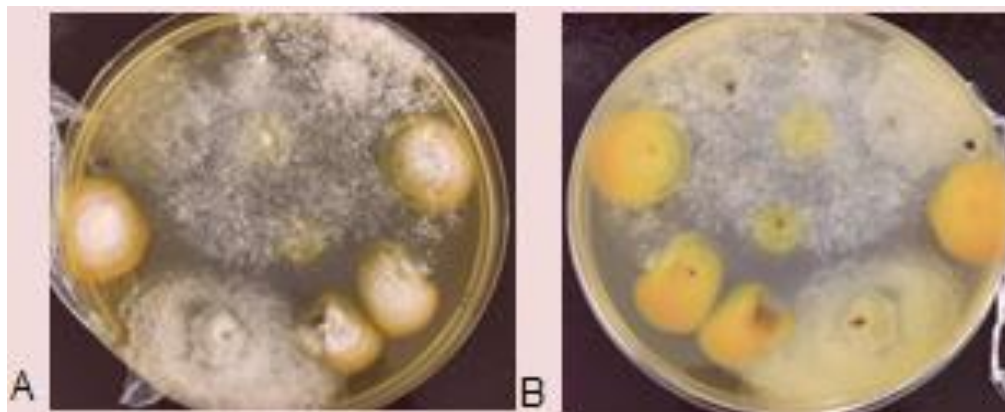
Rodrigues et al (2012) e Durante (2002) afirmaram que baixas doses de radiação gama não influenciam na qualidade dos alimentos e aumenta o tempo de prateleira dos mesmos, sem provocar aumento significativo na temperatura, no sabor, textura ou outras propriedades tecnológicas e sensoriais importantes.

Nascimento, Leôncio e Rosa (2011) analisaram 17 amostras de farinha de linhaça, de 13 marcas diferentes, comercializada em supermercado, mercadinhos e lojas de produtos naturais da cidade de Natal/RN, verificando que todas apresentaram a presença de fungos filamentosos e leveduras, variando entre o valor mínimo de 10 UFC/g e máximo de 2.000×10^3 UFC/g. Os resultados do presente trabalho se aproximaram apenas aos valores mínimos dos autores citados, provavelmente devido a uma melhor conservação das amostras nos estabelecimentos comerciais em Recife-PE.

4.1.4 Análise micológica de gergelim

A análise de grãos de gergelim bege, vendidos a granel e industrializado, após tratamento com radiação, resultou em crescimento de fungos aflatoxigênicos apenas nas amostras que não foram irradiadas (88%), pois a menor dose (2,5kGy) foi suficiente para inibir a presença desses fungos (a Figura 22 mostra a característica cor alaranjada no reverso da placa).

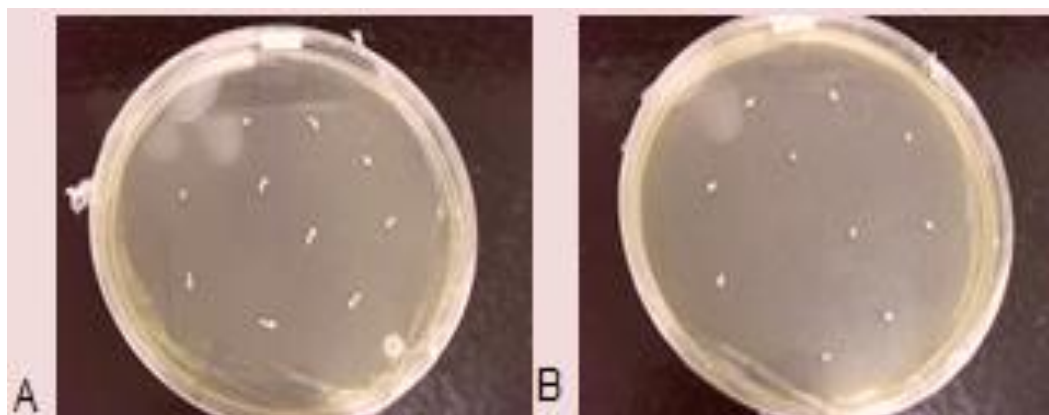
Figura 22 - Gergelim bege não irradiado em meio de cultura AFPA, mostrando crescimento de fungos aflatoxigênicos, demonstrado pela coloração amarelada nas colônias fúngicas. A) Frente da placa. B) Reverso da mesma placa.



Fonte: próprio autor

Ocorreu germinação das sementes no meio de cultura em todas as doses, com exceção apenas de 12,5kGy que inibiu totalmente a germinação e a contaminação por fungo. A germinação foi de 64% (não irradiado), 84% (2,5kGy), 82% (5kGy), 62% (7,5kGy), 8% (10kGy). A figura 23 mostra a germinação dos grãos na superfície do meio de cultura, dependendo da dose.

Figura 23 – Grãos de gergelim bege. A) Germinação dos grãos de gergelim bege de amostra não irradiada, no meio AFPA. B) Inibição da germinação dos grãos na dose de 12,5kGy.



Fonte: próprio autor

Esses dados indicam que a viabilidade das sementes para plantio foi conservada, mesmo sendo submetida à irradiação gama, e ao mesmo tempo a radiação inibiu totalmente os fungos aflatoxigênicos, adequando a qualidade sanitária dos grãos de gergelim para alimentação humana. É importante frisar que as amostras não irradiadas apresentaram esse nível de contaminação principalmente devido à manipulação dos grãos, pois o CEASA/PE é um local de grande circulação de pessoas.

Foi realizada também a análise de grãos de gergelim bege e preto e farinha de gergelim bege de uma mesma marca industrializada, expostas à radiação gama. Não houve crescimento de fungos em nenhuma amostra, nem mesmo na amostra controle (não irradiada), em nenhuma diluição no caso da farinha, e em nenhuma dose indicando que os três produtos da empresa tinham ótima qualidade.

Reddy et al (2011) investigaram o potencial de produção de aflatoxina B1 (AFB1) por cinco cepas de *Aspergillus flavus*, previamente isolados de grãos de sorgo, em cereais (cevada, milho, arroz, trigo e sorgo), sementes oleaginosas (amendoim e gergelim) e leguminosas. Os maiores valores de AFB1 foram encontrados em grãos de arroz e amendoim, e os menores valores foram observados em leguminosas e sementes de gergelim, portanto todos os grãos alimentares testados foram susceptíveis ao crescimento de *A. flavus* e a subsequente produção de AFB1.

Mbah e Akueshi (2009) realizaram experimentos com duas espécies de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* Link, e *Sesamum radiatum* Schumach) inoculadas com um fungo de armazenamento (*Aspergillus flavus*) previamente isolado a partir de sementes de gergelim. Os resultados mostraram que o *S. indicum* inoculado com *A.*

flavus e incubado durante um período de 20 dias mostrou a presença de aflatoxina B1 estimada em 25 ppb. Enquanto as sementes de *S. radiatum* inoculadas com o mesmo fungo teste e no mesmo período de tempo não apresentou presença de aflatoxina. Todas as sementes inoculadas e incubadas durante 10 e 15 dias não mostraram presença de aflatoxina. Os resultados mostram o perigo de consumir sementes infestadas de gergelim, que aparentemente estão sem infestação por *A. flavus* para um observador casual.

Faria, Ukan e Sousa (2010) avaliaram o efeito de sementes de gergelim (*Sesamum indicum*) no desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote de formigas do gênero *Acromyrmex spp.* As sementes de gergelim inibiram o crescimento do fungo basidiomiceto cultivado por formigas. As sementes de gergelim podem ser carregadas para dentro dos formigueiros e, caso exerçam ação fungicida, poderiam ser utilizadas como iscas formicidas naturais.

A radiação mostrou ser um método eficaz na conservação de grãos e farinhas, separadamente ou na forma de multimistura, mas os locais que possuem equipamentos que utilizam radiação gama para tratamento de alimentos ainda são muito restritos, localizando-se principalmente no Estado de São Paulo. Como essas empresas são utilizadas principalmente para irradiação de produtos para exportação, seria interessante que fosse construído um tipo de irradiador de pequeno porte, acessível economicamente, para que pequenos empresários tivessem acesso a essa tecnologia, ou que as empresas de irradiação de alimentos fossem mais bem distribuída pelas regiões do Brasil.

4.2 Análise do efeito da irradiação na composição nutricional do mix de cereais

O experimento deu-se por meio de 9 unidades experimentais de mix de cereais. Investigou-se 9 marcas (M1 a M9), cada marca foi subdividida em 3 partes, e em cada parte foi aplicado um tratamento com radiação gama (dose 1: não irradiado; dose 2: 2,5kGy; e dose 3: 5,0kGy), resultando assim em 9 amostras para cada marca, gerando o total de amostras igual a 81.

Para o grupo que não recebeu radiação (grupo controle), na tabela 9 verifica-se que as medidas de tendência central de cada variável nutricional estão bastante

próximas, ou seja, as variáveis têm médias próximas das suas respectivas medianas; também é possível verificar que não há grande variabilidade nas variáveis.

Tabela 9 - Análise da média, mediana e desvio-padrão da composição nutricional de amostras de mix de cereal na dose 1 (não irradiada).

VARIÁVEL	Dose 1 – Não irradiado				
	Média	Mediana	Min	Max	DP
Carboidrato	59,3250	56,6851	50,0111	81,5583	9,37532
Proteína	19,5182	22,3125	5,6340	24,9051	6,28147
Lipídio	10,4916	11,0934	0,9160	15,1734	4,11330
Atividade de Água	0,5478	0,5467	0,3958	0,6359	0,05427
Cinza	3,5523	3,6433	1,6165	4,6645	0,97264
Umidade	7,1268	6,5256	4,0887	10,4353	1,97732

Legenda: DP:desvio-padrão

Para o grupo que recebeu 2,5kGy de radiação (tabela 10), verifica-se que os padrões em relação à dose 1 foram mantidos, e as medidas de tendência central seguem próximas; entretanto, houve um aumento na variabilidade, especialmente para a variável umidade.

Tabela 10 - Análise da média, mediana e desvio-padrão da composição nutricional de amostras de mix de cereal na dose 2 (2,5kGy).

VARIÁVEL	Dose 2 - 2,5kGy				
	Média	Mediana	Min	Max	DP
Carboidrato	57,1781	57,3227	47,7976	76,8692	8,124193
Proteína	20,3236	22,2059	5,4905	26,1168	6,136024
Lipídio	9,7144	9,8678	1,3556	14,8724	3,781814
Atividade de Água	0,5468	0,5504	0,4412	0,6200	0,041030
Cinza	3,3628	3,3579	1,5725	4,6237	0,900461
Umidade	9,6592	7,9595	4,4222	17,0302	4,333921

Legenda: DP-desvio-padrão

Para o grupo que recebeu 5,0kGy de radiação, verifica-se que as medidas de tendência central de cada variável nutricional estão bastante próximas e também é possível verificar que não há grande variabilidade nas variáveis (Tabela 11).

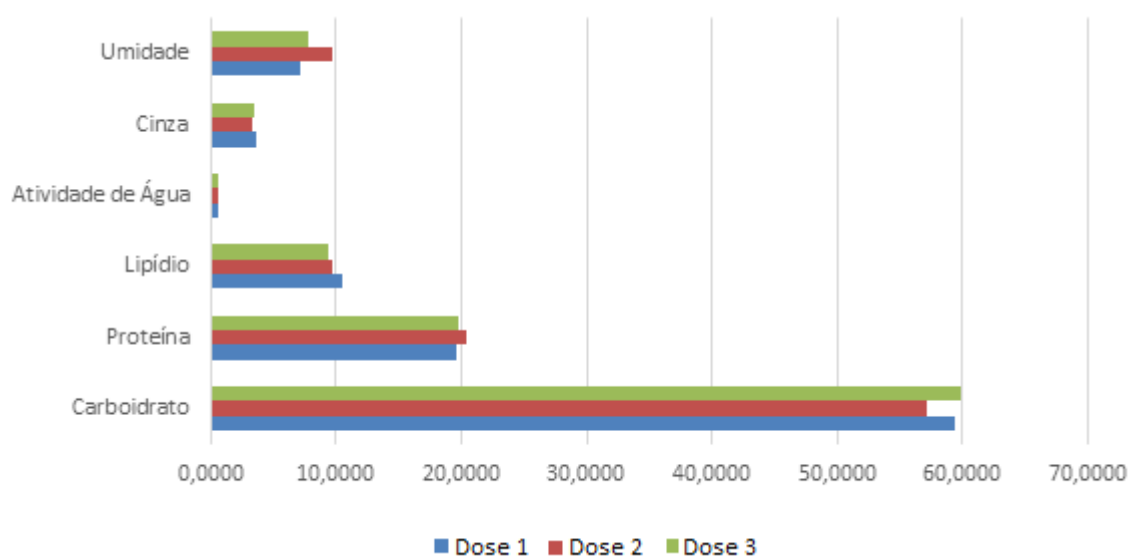
Tabela 11 - Análise da média, mediana e desvio-padrão da composição nutricional de amostras de mix de cereal na dose 3 (5 kGy).

VARIÁVEL	Dose 3 – 5kGy				
	Média	Mediana	Min	Max	DP
Carboidrato	59,8693	57,1294	48,9007	81,7004	9,501216
Proteína	19,6982	22,8969	5,6620	26,5574	6,553002
Lípido	9,3060	9,4898	0,9985	14,3417	3,374211
Atividade de Água	0,5401	0,5541	0,3809	0,6214	0,058309
Cinza	3,4373	3,5010	1,6316	4,7297	0,895808
Umidade	7,7056	8,2207	4,9982	9,8938	1,491226

Legenda: DP: desvio-padrão

Comparando as médias nutricionais das amostras por variáveis e projetando seus respectivos resultados para cada dose de radiação, verifica-se que há pouca variação entre as doses, seguindo a tendência representada pelas tabelas (Figura 24). Entretanto realizou-se um teste de comparação de médias para verificar a significância estatística dessa afirmação.

Figura 24 - Comparação geral entre doses de radiação e composição nutricional das amostras de mix de cereais. Dose 1: não irradiado; dose 2: 2,5kGy; dose 3: 5kGy.



Seguindo com os resultados das estatísticas descritivas, houve interesse em testar a hipótese para verificar se há diferença entre as médias e medianas dos grupos em relação às doses de radiação aplicadas (não irradiado, 2,5kGy e 5,0 kGy), assim a hipótese geral testada foi:

- H_0 – A radiação não altera os valores nutricionais dos mix de cereais.
- H_1 – A radiação altera os valores nutricionais dos mix de cereais.

O primeiro passo foi verificar se há relações entre as variáveis nutricionais, utilizando o coeficiente de Pearson, que examinou que todas as variáveis estão correlacionadas, a um nível de significância de 5%, exceto a variável atividade de água que está relacionada apenas com a variável cinza. Dessa forma foi realizada a análise paramétrica com enfoque multivariado.

A análise de variância multivariada (MANOVA) verificou que não há evidências suficientes que levem a crer que, a um nível de significância de 5%, possa rejeitar a hipótese que não há alteração entre as médias das variáveis nutricionais devido à exposição à radiação gama, nas doses 2,5 e 5 kGy, com exceção da variável umidade (Tabela 12). Em outras palavras, não existe diferença entre as médias das doses de radiação para cada variável, exceto a variável umidade.

Tabela 12 - Análise de Variância Múltipla (MANOVA) das amostras de mix de cereais, comparando as médias da composição nutricional e destacando que a variável umidade está diferente dos demais.

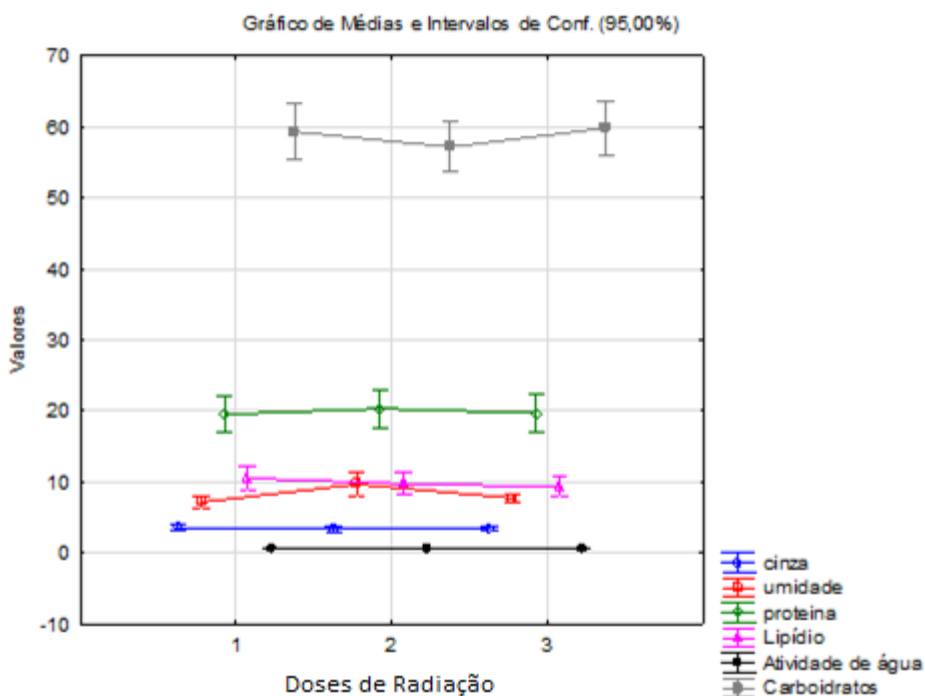
Variável	Teste	Valor-p
Carboidrato	0,596181	0,553646
Proteína	0,105860	0,899691
Lipídio	0,661151	0,519320
Atividade de Água	0,175923	0,839015
Cinza	0,288404	0,750255
Umidade*	5,680696	0,004998

A variável umidade tem uma assimetria em torno da média e contém *outliers* (observações discrepantes). Visto isso, foram buscadas evidências que apoiassem o resultado da MANOVA através do teste de homogeneidade de variância de Levene, que a um nível de significância de 0,0005% rejeitou a hipótese que a variância da umidade é igual à população. Assim, a estimativa do teste da MANOVA para essa variável umidade não pode ser levada à risca, pois os dados não são normais e não se pode

relacionar a mudança entre as médias das doses de radiação como fator que poderia ser relevante para a explicação do fenômeno. Mesmo assim, apenas com os resultados da MANOVA não há informação em qual dose existe diferença entre as médias na variável umidade.

Os testes de Tukey e Fisher verificaram que a dose 2 de radiação (2,5 kGy) possuía média superior aos demais, a um nível de significância de 5%, e seus respectivos resultados dos valores-p foram de 0,04 e 0,015. A figura 25 apresenta as médias das variáveis nutricionais para cada dose de radiação e seus respectivos intervalos de confiança.

Figura 25 – Comparação das médias das variáveis nutricionais de acordo com cada dose de radiação (dose 1: não irradiado; dose 2: 2,5 kGy; dose 3: 5,0 kGy). Observe que a umidade é a única que está diferente das demais.



O resultado das diferenças entre as médias da dose de radiação para a variável umidade não deve ser rigoroso, pois por meio do teste de Levene a variação dos grupos é diferente entre si, e isso implica que o resultado da MANOVA não é tão confiável. Utilizando o gráfico de dispersão, verificou-se que a variável umidade tem presença de dados discrepantes e isso provavelmente foi decorrente de alguma interferência durante a experimentação, devido a variação da temperatura da estufa, por exemplo. Por isso, é possível que a variação entre as doses de radiação para a variável umidade seja de fato

diferente, alterando suas respectivas médias. Assim, as médias não foram alteradas pela radiação.

Através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis verificou-se que as medianas das variáveis nutricionais não sofreram alteração à medida que se aplicou a radiação gama, considerando um nível de significância de 5%, ou seja, não houve significância estatística que evidencie modificação entre as medianas dos grupos de doses de radiação para cada variável (Tabela 13).

Tabela 13 - Resultado do Teste de Kruskal-Wallis para o mix de cereais, comparando os valores da composição nutricional.

Variável	Teste	Valor-p
Carboidrato	1,148079	0,5632
Proteína	0,358073	0,8361
Lipídio	3,314758	0,1906
Atividade de Água	0,008565	0,9957
Cinza	1,646224	0,4391
Umidade	3,852506	0,1457

Dessa forma, não há evidências estatísticas que levem a crer que a aplicação da radiação gama na dose de 2,5kGy e 5,0kGy modifiquem os valores nutricionais dos mix de cereais a um nível de 95% de confiança.

Analisando cada amostra de acordo com o nutriente, é possível visualizar e comparar os dados observando os gráficos nas figuras 26 a 31.

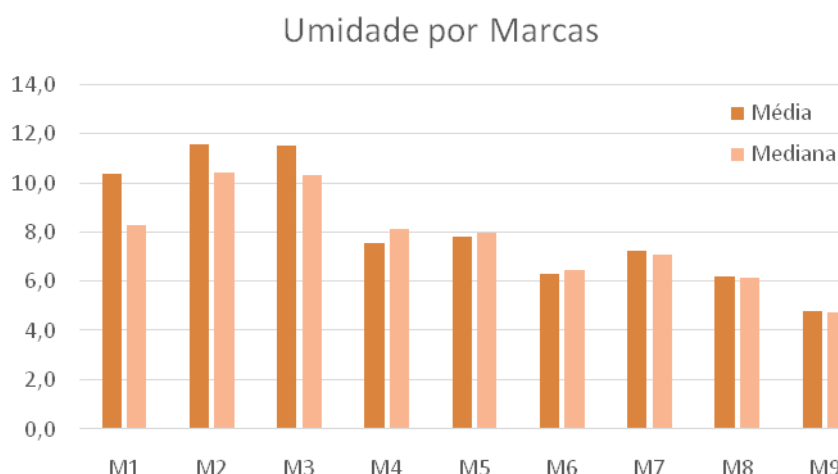
Figura 26 - Média e mediana do teor de cinzas (em g/100g) das amostras de mix de cereais analisadas.



A amostra M2 foi a que apresentou os menores valores de cinzas, já a amostra M8 teve mais que o dobro do mesmo teor, sendo a amostra com a maior quantidade de resíduo mineral fixo.

Valores maiores de cinzas podem ser um indicativo de teores significativos de Ca, P, Fe e Mg, como também, indicam contaminação por material estranho ao produto ocasionado por falhas em algumas etapas do processamento (SOUZA et al, 2008).

Figura 27 - Média e mediana do teor de umidade (g/100g) das amostras de mix de cereais analisadas.

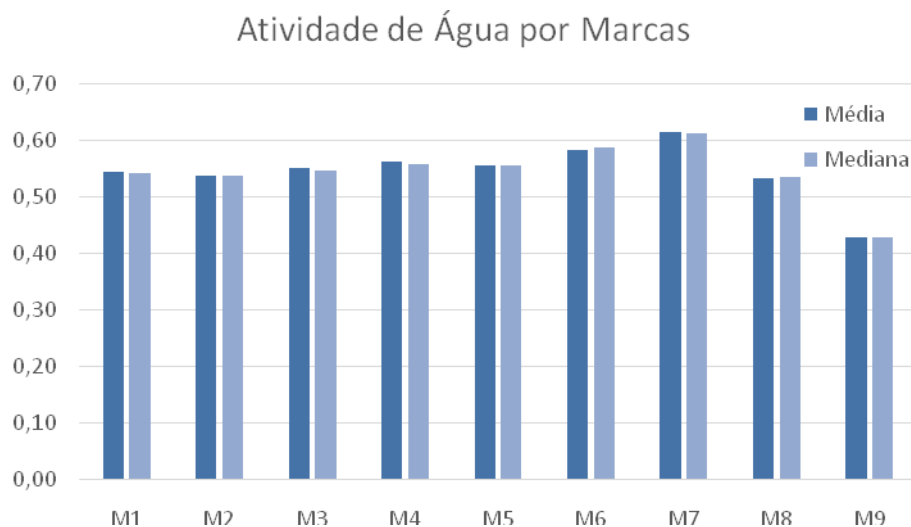


A amostra M2 e M3 apresentaram os maiores valores de umidade, já a mostra M9 foi a que teve menor taxa de umidade.

A avaliação do teor de umidade da farinha tem grande importância, em razão da sua influência na vida de prateleira de alimentos, já que níveis maiores que 13% podem proporcionar crescimento microbiano e deterioração em curto tempo. Dessa forma, baixos percentuais de umidade são favoráveis a uma maior estabilidade e vida-de-prateleira do produto (SOUZA et al, 2008).

Segundo Molins (2001), há uma tendência para redução do conteúdo de água com o aumento da dose, e pode ser justificado pela proporcionalidade da radiólise das moléculas de água com a duração e a dose da radiação. De acordo com Park et al. (2007), ocorre ligeiro aquecimento durante o processo de radiação, de modo que o prolongamento do tratamento certamente aumentaria a taxa de evaporação da água contida na amostra.

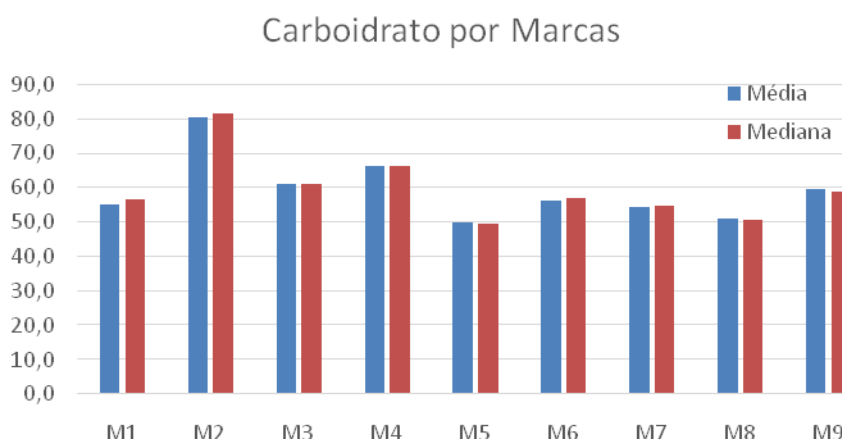
Figura 28 - Média e mediana do valor de Atividade de Água das amostras de mix de cereais analisadas.



A atividade de água (Aa) das amostras analisadas foi, em média, abaixo de 0,6, sendo consideradas na categoria de alimentos de baixa umidade. Foi o único componente em que as amostras demonstraram resultados próximos.

Os valores de Aa variam de 0 a 1 e considera-se o valor de 0,6 como limitante para a multiplicação de qualquer micro-organismo. As bactérias exigem atividade de água mais alta que os fungos, e os fungos deteriorantes podem se multiplicar em Aa de até 0,8 (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Os fungos xerofílicos são capazes de crescer em atividade de água abaixo de 0,85, como os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Eurotium* (SILVA et al, 2007).

Figura 29 - Média e mediana do valor de carboidratos (g/100g) das amostras de mix de cereais analisadas.



A amostra M2, além de apresentar o menor valor de cinzas, também apresentou os menores valores de proteínas (Figura 30) e menores valores de lipídios (Figura 31), comportando-se totalmente diferente das outras amostras. Como a análise do teor de carboidratos foi realizado por diferença, isso explica os maiores valores de M2 para carboidratos (Figura 29).

Figura 30 – Média e mediana do teor de proteínas (g/100g) obtidas das amostras de mix de cereais.

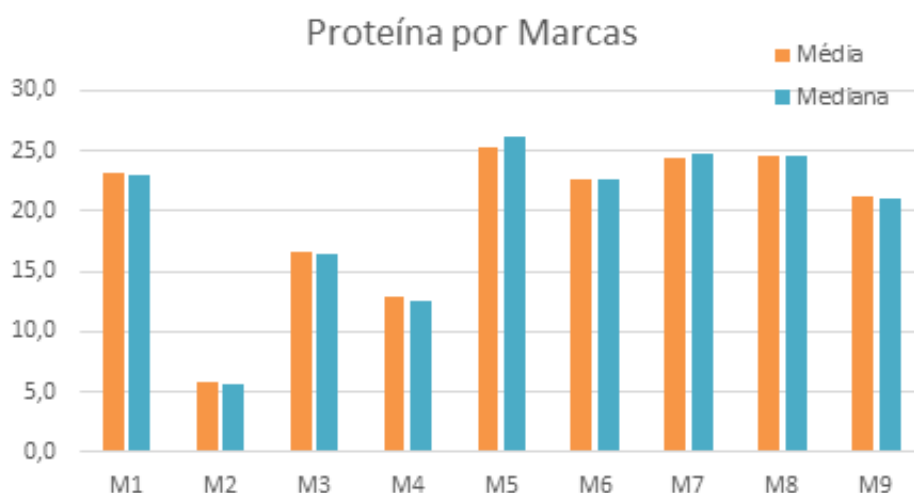
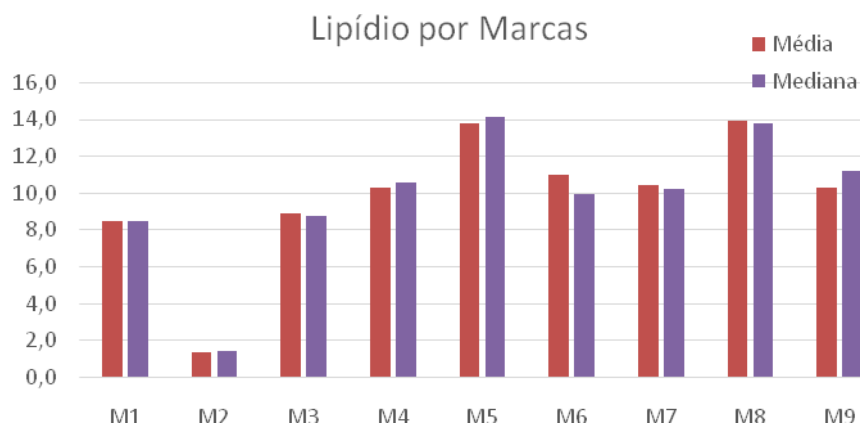


Figura 31 - Média e mediana do teor de lipídios (g/100g) nas amostras de mix de cereais.



A amostra M5 foi a que apresentou os maiores teores de proteínas (figura 30) e lipídios (figura 31).

4.3 Análise de rotulagem das amostras do mix de cereais

Na Tabela 14 estão as formas de apresentação comercial das amostras de mix de cereais e as descrições informadas no rótulo de cada produto analisado. Observou-se a variabilidade de termos utilizados como nome comercial e de ingredientes utilizados na composição dos produtos e informados na embalagem dos mesmos e tem a função de facilitar a visualização das não-conformidades.

Tabela 14 – Características das amostras de mix de cereais de acordo com a apresentação comercial.

Amostras	Nome comercial	Apresentação comercial (tipo de venda e de embalagem)	Local de fabricação
M1	Mix de farelos	A granel/ plástico transparente	Não informado.
M2	Farinha “seca barriga”	Industrializado/plástico transparente/200g	Não informado; só possui CNPJ, que é de Campina Grande-PB
M3	Farinha “seca barriga”	A granel/ plástico transparente	Não informado
M4	Mix de farinhas funcionais	Industrializado/ plástico transparente/200g	Não informado.
M5	Mistura Premium	Industrializado/plástico fosco/ 250g	Abreu e Lima-PE
M6	Mix de farelos	Industrializado/plástico transparente/300g	Jaboatão dos Guararapes-PE
M7	Mix de cereais	A granel/ plástico transparente	Não informado.
M8	Farinha “seca barriga”	A granel/ plástico transparente	Camaragibe-PE
M9	“Seca Barriga”, mix de farinhas termogênicas	Industrializado/ embalagem metalizada/250g	Delmiro Gouveia-AL

O quadro 1 tem a função de facilitar a visualização dos componentes informados na embalagem das amostras de mix de cereais para comparação entre elas. Apenas as amostras M5 e M6 informam que possuem glúten, e apenas a amostra M5 possui conservante.

Borre, Galvão e Azeredo (2014) já haviam verificado que os fabricantes de mix de cereais usam diferentes quantidades dos ingredientes na formulação do produto, ocasionando grande variabilidade entre as marcas, não havendo, portanto, padronização. Esse fato também foi observado no presente estudo, quando foi feita a comparação entre os componentes informados nos rótulos das amostras.

As amostras industrializadas adquiridas para análise de rotulagem foram obtidas em embalagens lacradas. Os tipos de embalagem podem ser observados na figura 32.

Figura 32 – Tipos de embalagens encontradas nas amostras de mix de cereais industrializadas. A) embalagem plástica transparente; B) embalagem metalizada; C) embalagem plástica fosca.



As amostras vendidas a granel estavam conservadas no local de venda geralmente em frascos de plástico com tampa, e eram manipuladas pelo vendedor, que não usava luvas nem máscara e utilizava uma pá ou um copo descartável que ficava dentro do frasco (Figura 33). Esse comportamento foi observado para a maioria das amostras vendidas a granel.

Figura 33 – Manipulação do alimento vendido a granel pelo vendedor, mostrando a não utilização de luvas no momento da venda e modo de conservação em recipiente plástico.



Fonte: Próprio autor

Das amostras a granel analisadas, na amostra M1 a vendedora tinha a lista de componentes escrita a mão e não informava onde foi produzido; a vendedora da amostra M3 informou que os componentes eram provavelmente iguais à amostra industrializada M2, pois eram do mesmo fabricante, mas não havia lista dos ingredientes disponível no local de comercialização do produto, ocorrendo o mesmo para a amostra. Já a amostra M8 havia uma cópia da embalagem original contendo todos os ingredientes, exposta junto ao recipiente de onde o vendedor retirava as porções.

Mesmo sendo uma venda a granel, é importante que o consumidor saiba quais componentes estão presentes no mix de cereais, pois pode ter a presença de componentes que desencadeiem uma reação alérgica ou pode conter glúten, prejudicial para pessoas que possuem intolerância ao glúten ou doença celíaca.

A doença celíaca (DC), ou enteropatia sensível ao glúten, é caracterizada por uma combinação de 4 fatores: suscetibilidade genética, exposição ao glúten, fator ambiental desencadeante e resposta autoimune. O glúten consiste na fração peptídica específica de proteínas (prolaminas) presente no trigo (glutenina e gliadina), centeio (secalina) e cevada (hordeína), e são resistentes à digestão completa por enzimas do trato gastrointestinal. Esses peptídeos afetam o epitélio do intestino delgado de

indivíduos com doença celíaca, causando resposta inflamatória e achatamento das vilosidades intestinais. Na sensibilidade ao glúten, os indivíduos possuem sintomas inespecíficos, sem a resposta imune da DC ou danos intestinais; na Intolerância ao glúten os indivíduos apresentam sintomas e podem ou não ter DC. Sintomas: náuseas, cólicas abdominais ou diarreia após a ingestão de glúten (MAHAN; ESCOTT-STUMP; RAYMOND, 2012).

Está na Lei Federal nº 8.543, de 23 de dezembro de 1992, no Art. 1º: “Todos os alimentos industrializados que contenham glúten, como trigo, aveia, cevada, malte e centeio e/ou seus derivados, deverão conter, obrigatoriamente, advertência indicando essa composição, que deve ser impressa nos rótulos e embalagens dos produtos industrializados em caracteres com destaque, nítidos e de fácil leitura” (BRASIL, 1992).

A Lei Federal nº 10.674 de 16 de maio de 2003 determina que todos os alimentos industrializados devem conter em seu rótulo e bula, obrigatoriamente, as inscrições "contém Glúten" ou "não contém Glúten", conforme o caso, como medida preventiva e de controle da doença celíaca (BRASIL, 2003).

O Artigo 6º do Código de Defesa do Consumidor é bem claro quanto aos direitos básicos do consumidor: “I - A proteção da vida, saúde e segurança contra os riscos provocados por práticas no fornecimento de produtos e serviços considerados perigosos ou nocivos; II - A educação e divulgação sobre o consumo adequado dos produtos e serviços, assegurando a liberdade de escolha; III - A informação adequada e clara sobre os diferentes produtos e serviços com especificação correta de quantidade, características, composição, qualidade e preço, bem como sobre os riscos que apresentem; IV - A proteção contra a publicidade enganosa e abusiva (BRASIL, 1990).

Em relação às amostras industrializadas, rotuladas e embaladas, foram observadas algumas inconsistências em relação às seguintes resoluções da ANVISA: RDC 259 (BRASIL, 2002) e RDC 360 (BRASIL, 2003).

A RDC nº 259/2002 estabelece que os alimentos embalados não devem ser descritos ou apresentar rótulo que utilize: vocábulos, sinais, denominações, etc. que possam tornar a informação falsa, incorreta, insuficiente, ou que possa induzir o consumidor a equívoco, erro, confusão ou engano, em relação à verdadeira natureza, composição, procedência, tipo, qualidade, quantidade, validade, rendimento ou forma de uso do alimento; atribua efeitos ou propriedades que não possuam ou não possam ser

demonstradas; ressalte qualidades sobre reais ou supostas propriedades terapêuticas que alguns componentes ou ingredientes tenham ou possam ter. É obrigatório apresentar: denominação de venda do alimento, lista de ingredientes, conteúdos líquidos, origem, nome ou razão social e endereço do importador (no caso de alimentos importados), lote, prazo de validade, instruções sobre o preparo e uso do alimento (BRASIL, 2002).

De acordo com a RDC nº 360/2003 da ANVISA, é obrigatório declarar no rótulo as seguintes informações nutricionais: valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras saturadas, gorduras trans, fibra alimentar e sódio, medida caseira da porção informada na tabela nutricional, utilizando utensílios domésticos como colher, xícara, etc., além da informação nutricional complementar relativa à declaração facultativa de propriedades nutricionais (BRASIL, 2003).

As instruções sobre o preparo e uso do alimento, quando necessário, devem constar no rótulo e não devem ser ambíguas nem dar margem a falsas interpretações, para garantir a correta utilização do alimento pelo consumidor. Além disso, as informações devem ter um contraste de cores que assegure sua correta visibilidade (ALMEIDA-MURADIAN; PENTEADO, 2015).

Ao analisar atentamente os rótulos das amostras industrializadas foi observado o seguinte:

- M2: Informa a Isenção de registro (ANVISA/2010), modo de usar (1 colher de sopa meia hora antes das refeições em suco ou água; não substituir refeições pela farinha; beber bastante água); “Benefícios” (suas fibras provocam sensação de saciedade; contribui para diminuição do colesterol LDL; ajuda a retardar o envelhecimento; ajuda a regular o intestino; ativa a circulação); não contém tabela com valores diários de referência informando valor energético, proteínas, etc.; não contém endereço do fabricante nem número de atendimento ao consumidor.
- M4: Informa a isenção de registro (não cita a fonte); modo de usar (“1 colher de sopa antes das refeições, suco ou água; não substituir as refeições e sim associá-la; inclua na preparação de pães, bolos e doces”); tabela com valores diários de referência (valor energético, carboidrato, proteínas, gorduras, fibra alimentar, sódio); não contém endereço do fabricante e número de atendimento ao consumidor (só contém nome fantasia e CNPJ).

- M5: Informa a Isenção de registro (ANVISA/2010); modo de usar (consumir 3 colheres de sopa ao dia); tabela com valores diários de referência (valor energético, carboidrato, proteínas, gorduras, fibra, sódio, ferro, cálcio); contém endereço do fabricante e número de atendimento ao consumidor.

- M6: Informa a Isenção de registro (no Ministério da Saúde); modo de usar (“consumir 3 colheres de sopa em 300ml de leite desnatado, ou combinar com sucos, iogurtes, frutas, vitaminas, açaí, etc.”); tabela com valores diários de referência (valor energético, carboidrato, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibra, sódio, colesterol); contém endereço do fabricante e número de atendimento ao consumidor.

- M9: Não informa isenção de registro; modo de usar (“1 colher de sopa em 1 copo de água, leite desnatado ou suco de frutas natural; consumir até 3 vezes ao dia, de preferência meia hora antes das refeições; ingerir bastante água ao longo do dia”); tabela com valores diários de referência (valor energético, carboidrato, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, colesterol, fibra, sódio, ferro, cálcio, magnésio); contém endereço do fabricante e número de atendimento ao consumidor.

De todas as amostras industrializadas deste trabalho, apenas a amostra M2 não continha a tabela nutricional na embalagem. A tabela nutricional da amostra M9 é quase ilegível, em letras muito pequenas.

A amostra M6 tem um diferencial em relação às outras marcas: informa no rótulo o nutricionista responsável; além disso, que o produto não contém guaraná do Amazonas, não tem adição de açúcar, e após aberto conservar em ambiente refrigerado e consumir em até 30 dias.

As amostras com maior número de ingredientes foram M2 (22) e M9 (21). Mesmo com uma quantidade grande, a amostra M9 está entre as que tiveram menor contaminação fúngica. As amostras que informavam que continham glúten foram a M5 e M6, e realmente tinham trigo em sua lista de ingredientes.

Nas amostras M2 e M4 não havia endereço do produtor e nem telefone de SAC (Serviço de Atendimento ao Consumidor); além disso, o tipo de rótulo utilizado na amostra M4 dificultava a leitura de algumas informações importantes (cor escura ao fundo e cor da letra amarela, um pouco borrada, prejudicando a visualização e leitura do texto com letras menores). Portanto, se o consumidor se sentir lesado por ingerir um

produto destas marcas ou tiver dúvidas, a quem vai recorrer? Como garantir a qualidade do produto que está sendo consumido se não se conhece o produtor nem o local de origem para fazer alguma reclamação?

A isenção de registro pela ANVISA (BRASIL, 2010), que está presente na embalagem das amostras, indica que o alimento foi considerado na categoria “produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos”. A partir do momento em que o produto é considerado na categoria “alimentos com alegações de propriedade funcional e ou de saúde”, passa a ser obrigatório o registro do mesmo na ANVISA. Por isso, a embalagem da amostra M2 pode ser considerada irregular, pois informa certos benefícios, como “contribuição para diminuição do colesterol LDL”, que não é permitido, de acordo com BRASIL (2011).

Borre, Galvão e Azeredo (2014) avaliaram a qualidade nutricional, rotulagem, composição física e higiênico-sanitária de 10 marcas de “Ração Humana” disponíveis no mercado em Niterói-RJ. Todas as marcas apresentaram informações nutricionais incorretas relacionadas à rotulagem e/ou composição química, e qualidade comprometida segundo aspectos físicos. Assim, todas as amostras estavam impróprias para o consumo, além de não apresentarem informações nutricionais e de rotulagem fidedignas.

As amostras M2, M3, M8 e M9 possuíam a denominação de “Alimento Termogênico” ou “Seca Barriga”. Um dos vendedores informou que era um produto muito procurado pra pessoas que faziam regime e que era mais completo que o mix de cereais.

Os termogênicos são substâncias usadas por praticantes de atividade física que visam manter o metabolismo acelerado para uma maior queima calórica ao longo do dia e consequente perda de peso. Seus compostos geralmente causam uma elevação da pressão arterial, portanto, aqueles que sofrem problemas cardíacos não devem consumir, ou então devem procurar médico ou nutricionista antes do uso. O trabalho de Braga (2014) constatou que existe uma maior procura pelos termogênicos por parte do grupo do sexo feminino em 66,67% das lojas.

Os alimentos termogênicos são aqueles que apresentam um maior nível de dificuldade em ser digeridos pelo organismo, fazendo com que esse consuma maior quantidade de energia e caloria para realizar a digestão, pois induzem o metabolismo a trabalhar com ritmo acelerado, gastando assim mais calorias. Devem ser consumidos

comacompanhamento de nutricionistas, não deve ser consumido de forma exagerada e nem à noite, pois pode prejudicar o sono ou provocar sintomas como dor de cabeça, tontura, insônia e problemas gastrointestinais. Hipertensos e indivíduos com problemas cardíacos devem ter cuidados aumentados, pois alguns desses alimentos fazem o coração trabalhar mais rápido (BENITES et al, 2010).

Para manter o metabolismo, é necessária a combinação de carboidratos de grãos e proteínas, pois isso reduz o consumo do músculo que pode ocorrer durante a perda de peso. Fibras dietéticas também podem aumentar o efeito termogênico, pois consumir mais fibras e grãos inteiros ajuda o corpo a produzir mais energia durante a digestão. Outra vantagem das fibras é ajudar o alimento a se mover pelo trato digestivo, reduzindo o tempo que levaria para a gordura ser absorvida, além de aumentar o tempo de saciedade (JONES, 2012).

Todos os grupos de alimentos devem compor a dieta diária. Alimentação saudável pressupõe que nenhum alimento específico, ou grupo deles isoladamente, é suficiente para fornecer todos os nutrientes necessários para uma boa nutrição e manutenção da saúde. Até as dietas para perda ou manutenção do peso corporal que exigem redução energética devem atender ao padrão alimentar e nutricional considerado adequado, devendo ser orientado por nutricionista ou médico (BRASIL, 2006).

5 CONCLUSÕES

As doses 2,5kGy e 5kGy foram eficientes para conservação das amostras, seja grão ou farinha, prevenindo o crescimento fúngico, principalmente de fungos aflatoxigênicos, mantendo viáveis os grãos, já que conseguem germinar mesmo após o tratamento com radiação gama, quando em ambiente favorável. A dose de 5kGy foi considerada a dose ótima, pois nenhum fungo foi encontrado a partir desse valor.

A amostra de mix de cereal mais contaminada por fungos foi a amostra a granel M3 ($1,2 \times 10^4$ UFC/g), mas a que apresentou maior variedade de fungos foi a amostra a granel M8 (*Aspergillus* sp., *Penicillium*, sp., levedura, *Trichoderma* sp.). Foi observado que 75% das amostras a granel e 80% das industrializadas de mix de cereais foram positivos para fungos aflatoxigênicos.

Os testes estatísticos comprovaram que a composição nutricional do mix de cereais não foi afetada pela radiação.

Das amostras industrializadas de mix de cereais, a amostra M2 foi a que apresentou mais irregularidades de rotulagem, indo contra a RDC nº360/2003 (ausência de tabela nutricional) e RDC nº259/2002 (atribuição de efeitos ou propriedades que não possuem), além de não informar endereço e telefone do produtor. Com relação às amostras a granel, apenas 25% informavam local de produção, exposto no local de venda e apenas uma amostra informava a lista de ingredientes, deixando o consumidor muito vulnerável.

Gergelim só teve contaminação fúngica nas amostras controles (não irradiadas); aveia e linhaça tinham pouca ou nenhuma contaminação.

A sugestão é padronizar a lista de ingredientes do mix de cereais, regularizar a rotulagem junto às empresas, fiscalizando se está conforme a legislação, e orientar os consumidores a comprar mix de cereais apenas em embalagem lacrada, pois a venda a granel facilita a contaminação por fungos devido à manipulação e/ou má conservação.

REFERÊNCIAS

ADEGOKE, G. O.; LETUMA, P. Strategies for the Prevention and Reduction of Mycotoxins in Developing Countries, Chapter 5. In: Makun, H. A. **Mycotoxin and food safety in developing countries**. InTech Prepress, Novi Sad, Croatia, ISBN 978-953-51-1096-5, 2013.

ALIABADI, M. A.; ALIKHANI, F. E.; MOHAMMADI, M.; DARSANAKI, R. K. Biological Control of Aflatoxins. **European Journal of Experimental Biology**, n.3, v.2, p.162-166, 2013.

ALMEIDA JUNIOR, J.N.; DI GIOIA, T.R; DOI, A.M.; ROSSI, F. Aplicação da tecnologia de espectrometria de massa MALDI-TOF em laboratórios de microbiologia clínica. **Microbiologia in foco**, n.23, p.10-15, 2014.

ALMEIDA-MURADIAN, L B.; PENTEADO, M.V.C. **Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos**. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

AOAC.ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC International**.16th Edition. Arlington, 1995.

BANDO, E.; GONCALES, L. N.; TAMURA, N. K.; MACHINSKI JUNIOR, M. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, vol.43, n.3, p.175-180, 2007.

BARBOSA, E. B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G. M.; HENRIQUE, T.; MARQUI, A. B. T.; TAJARA, E. H. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Ver Assoc Med Bras**, n.58, v.3, p.366-375, 2012.

BENEVIDES, C.M.J.; SOUZA, M.V.; SOUZA, R.D.B.; LOPES, M.V. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, n.18, v.2, p.67-79, 2011.

BENITES J., CARDOSO J., CONTI T., MARTINS J., SONH V. **Uso de alimentos termogênicos no tratamento da obesidade**. Rio de Janeiro, junho de 2010.

BEZERRA, S.A.; DANTAS NETO, J.; AZEVEDO, C.A.V.; SILVA, M.B.R.; SILVA, M.M. Produção do gergelim cultivado sob condições de estresse hídrico e diferentes doses de adubação. **Engenharia Ambiental** - Espírito Santo do Pinhal, v. 7, n. 3, p. 156-165, 2010.

BITELLI, T. **Física e dosimetria das radiações**. 2^a ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

BORRE, J. L.; GALVAO, P. N.; AZEREDO, V. B. Análise da rotulagem e qualidade nutricional de diferentes marcas de “ração humana”. **Nutrição Brasil**, n.13, v.2, 2014.

BRAGA, R.M. Avaliação dos Suplementos Termogênicos mais Comercializados na Cidade de João Pessoa – Uma Abordagem Farmacológica e Social. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal da Paraíba, 2014. Disponível em: <http://rei.biblioteca.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/617/1/RMB22072014.pdf>

BRASIL. Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969 - Institui normas básicas sobre alimentos.

BRASIL. Código de Defesa do Consumidor. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências.

BRASIL. Lei nº 8.543, de 23 de dezembro de 1992. Determina a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten, a fim de evitar a doença celíaca ou síndrome celíaca.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico para irradiação de alimentos.

BRASIL. ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados.

BRASIL. Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003. Obriga que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca.

BRASIL. ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 263 de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos, 2005.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 27, de 6 de agosto de 2010. Dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 46, de 20 de maio de 2011. Esclarecimentos sobre produtos comercializados com a denominação “RAÇÃO HUMANA”.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos.

BRASIL. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 24 de fevereiro de 2011. Adotar as diretrizes da Norma Internacional para Medidas Fitossanitárias - NIMF nº 18 como orientação técnica para o uso da

irradiação como medida fitossanitária com o objetivo de prevenir a introdução ou disseminação de pragas quarentenárias regulamentadas no território brasileiro.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Guia alimentar da população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília: 2006.

CARDOZO, L. F. M. F.; SOARES, L. L.; CHAGAS, M. A.; BOAVENTURA, G. T. Maternal consumption of flaxseed during lactation affects weight and hemoglobin level of offspring in rats. **Jornal de Pediatria**, n.86, v.2, 2010.

CHALUPOVÁ, J.; RAUS, M.; SEDLÁŘOVÁ, M.; ŠEBELA, M. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnology Advances**, n. 32, p.230–241, 2014.

CORREIA, L.F.M.; FARAONI, A. S.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Efeitos do processamento industrial de alimentos sobre a estabilidade de vitaminas. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.19, n.1, p. 83-95, 2008.

CORRY, J.E.L. et al. *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar (AFPA). **Culture Media for Food Microbiology**, Elsevier Science, p. 254-256, 1995.

COSTA, M. L. M.; GONDIM, T.M.S.; ARAÚJO, I.M.S.; MILANI, M.; SOUSA, J. S.; FEITOSA, R. M. Características Físico-químicas de Sementes de Genótipos de Gergelim. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 867-869, 2007.

COSTA, M.C.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A. Revisão: tecnologias não convencionais e o impacto no comportamento do consumidor. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 17, n. 2, p.187-210, 1999.

CUPERSMID, L.; FRAGA, A. P. R.; ABREU, E. S.; PEREIRA, I. R. O. Linhaça: composição química e efeitos biológicos. **e-Scientia**, Belo Horizonte, v.5, n.º 2, p. 33-40, 2012.

DURANTE, R.W. Food processors requirements met by radiation processing. **Radiation Physics and Chemistry**, v.63, Issues 3-6, p. 289-294, 2002.

FARIA, A. B.C.; UKAN, D.; SOUSA, N. J. Efeito das Sementes de Gergelim (*Sesamum sp.*) sobre o Fungo Simbionte de Formigas do Gênero *Acromyrmex spp* (*Formicidae: Hymenoptera*). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.12, n.1, 2010.

FLUKA ANALITICAL. 17121. **Aspergillus Differentiation Agar Base** (AFPA Base), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Industriestrasse, 25, Postfach, CH-9471, Buchs/Switzerland, 23, November, 2004.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

FREITAS, P.A.P.; SOUZA, M.A.M.; SANTOS, E.A.; SANTANA, N.M.; OLIVEIRA, A.C.S.; TORRES, R.; CAMPOS, A.B.; SILVA, L.R.S.; PADILHA, M.R.F.;

SHINOHARA, N.K.S. Atitude dos consumidores recifenses em relação a alimentos Irrradiados. Anais. **IX JEPEX-** Jornada de ensino, pesquisa e extensão, 2009. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R1442-2.pdf>

GONÇALVES, C.G. Avaliação química e microbiológica da Multimistura tratada por irradiação gama. Dissertação. Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais, Ciência e Tecnologia das Radiações, 2008.

IAL- Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea, 4ª Edição, 1ª Edição Digital, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JONES, J. The thermogenic diet. Learn how food can do the hard work of weight loss. Energize Health, 2012.

KWIATKOWSKI, A.; ALVES, A. P. F. Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. **SaBios-Rev. Saúde e Biol.**, Campo Mourão, v.2, n.2, p.44-53, 2007.

LAGO, A.A.; CAMARGO, O.B.A.; SAVY FILHO, A.; MAEDA, J.A. Maturação e produção de sementes de gergelim cultivar IAC-China. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 363-369, fev. 2001.

LAZARETTI, K.E.S.; BEUX, M.R.; PIMENTEL, I.C.; TALAMINI, A.; GABARDO, J. Comparação entre os meios de cultura para contagem de fungos no controle microbiológico de erva-mate. **B.CEPPA**, Curitiba, v.8, n.2, p.163-170, 2000.

LIMA, A. L. B.; OLIVEIRA, A.G.R.C. Atitudes e conhecimento dos consumidores sobre os alimentos irradiados: um inquérito conduzido em Natal, Brasil. **Vig Sanit Debate**, n.2, v.2, p. 81-87, 2014.

MACHADO, L. A. Z. **Aveia: forragem e cobertura do solo**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, Coleção Sistema Plantio Direto, 2000.

MAHAN, L. K; ESCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J.L. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 13ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

MANTILLA, S. P. S.; SANTOS, E. B. ; VITAL, H. C.; MANO, S. B.; FRANCO, R. M. Atmosfera modificada e irradiação: métodos combinados de conservação e inocuidade alimentar. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VIII, n.15, 2010.

MANTOANI, A. C.; PESSATO, T. B.; TAVANO, O. L. Digestibilidade e antinutricionais em mix de cereais. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 38, n. 3, p. 245-255, 2013.

MARTINEZ, P. C. C. **Efeito da radiação gama e do processo da germinação sobre as características nutricionais do feijão**. Dissertação (Mestrado). Piracicaba, 2011.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande. v.12, n.1, p. 89-99, 2010.

MBAH, M. C.; AKUESHI, C. O. Aflatoxin in mould infested sesame seeds. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 8, n.3, p. 391-394, 2009.

MIMICA, M.J.; MARTINO, M.D.V.; PASTERNAK, J. MALDI-TOF MS in the clinical microbiology laboratory. **J Bras Patol Med Lab**, v. 49, n. 4, p. 256-259, agosto, 2013.

MOLINS, R.A. **Food irradiation: Principles and applications**. John Wiley & Sons Inc., p.469, 2001.

MORATOYA, E. E.; CARVALHAES, G. C.; WANDER, A. E.; ALMEIDA, L. M. M. C. Mudanças no padrão de consumo alimentar no Brasil e no mundo. **Revista de Política Agrícola**, n. 1, p.72-84, 2013.

NASCIMENTO, I.C.; LEÔNCIO, G.M.C.; ROSA, M.S. Análise de bolores e leveduras em farinha de linhaça (*LinumUsitatissimum*) comercializada no município de natal/rn. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 36, Supl., p. 150, 2011.

OKUNO, E.; YOSHIMURA, E.M. **Física das radiações**. São Paulo: Oficina de textos, 2010.

OLIVEIRA, M. A.; LORINI, I.; MALLMANN, C. A. As micotoxinas e a segurança alimentar na soja armazenada. **Braz. J. Food Technol.**, III SSA, novembro, p. 87-91, 2010.

OLIVEIRA, K.C.F.; SOARES, L.P.; ALVES, A.M. Irradiação de alimentos: extensão da vida útil de frutas e legumes. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.7, n.2, p.52-57, 2013.

OLIVEIRA, M. L.; ARTHUR, V.; POLES, L. F.; SILVA, L. C. A. S.; OLIVEIRA, A. L. Evaluation of production and gamma radiation effects in pasta enriched with brown flaxseed bagasse (*Linum usitatissimum* L.). **European International Journal of Science and Technology**, v.3, n.7, 2014.

ORDONEZ, J.A. **Tecnologia de alimentos**. Vol.1. Componentes dos alimentos e processos. Porto alegre: Artmed, 2005.

PARK, K. J. ; ANTONIO, G. C.; OLIVEIRA, R. de; PARK, K. J. B. **Conceitos de processos e equipamentos de secagem**. Campinas: UNICAMP, 2007.

PAVLOVIC, M.; HUBER, I.; KONRAD, R.; BUSCH, U. Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. **Open Microbiol J.** n.7, p.135–141, 2013.

PELUQUE, E. Isolamento, identificação molecular e potencial toxigênico de fungos e ocorrência de micotoxinas em misturas de cereais comercializadas no Brasil. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária, Pirassununga, 2014.

PEREIRA, K. C.; SANTOS, C. F. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. **Ensaio e ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 147-165, 2011.

PINHEIRO, R.; STEFANON, E. B. C. Presença de aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (clae) em cereais matinais adquiridos no comércio do município de Santa Maria – RS. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, v. 14, n. 1, p. 39-45, 2013.

PRADO, G.; Influência da radiação gama (Co-60) na microbiota fúngicas e na aflatoxina B1 em amendoim (*Arachis hypogaea*). Tese de doutorado. Ciências de Alimentos, UFLA, Lavras, 2005.

QUEIROGA, V. P.; GONDIM, T. M. S.; FIRMINO, P.T.; SILVA, A. C.; QUEIROGA, D. A. N. Colheita manual e diferentes formas de aproveitamento de grãos de gergelim. **RevistaAgro@mbiente On-line**, v. 4, n. 2, p. 110-117, 2010.

REDDY, K.R.N; Raghavender, C.R.; Salleh, B.; Reddy, C.S.; Reddy, B.N. Potential of aflatoxin B1 production by *Aspergillusflavus* strains oncommercially important food grains. **International Journal of Food Science and Technology**, n.46, p.161–165, 2011.

REICH, M.; BOSSHARD, P.P.; STARK, M.; BEYSER, K.; BORGMANN, S. Species Identification of Bacteria and Fungi from Solid and Liquid Culture Media by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **J Bacteriol Parasitol**, S5-002, 2013.

RODRIGUES, F.; FANARO, G.B.; DUARTE, R.C.; KOIKE, A.C.; VILLAVICENCIO, A.L.C.H. A sensory evaluation of irradiated cookies made from flaxseed meal. **Physics and Chemistry**, n. 81, p.1157–1159, 2012.

RUDDICK-COLLINS, L. Meal induced thermogenesis and appetite: methodological issues and responses to energy restriction. Submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science (Research). Institute of Health and Biomedical Innovations, Faculty of Health, Queensland University of Technology, 2012. Acesso em: 13/05/2016. Disponível em: http://eprints.qut.edu.au/60243/1/Leonie_Ruddick-Collins_Thesis.pdf

RUPOLLO, G.; GUTKOSKI, L. C.; MARTINS, I. R.; ELIAS, M. C. Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de micotoxinas em grãos de aveia. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 118-125, 2006.

SARGI, S. C.; SILVA, B. C.; SANTOS, H. M. C.; MONTANHER, P. F.; BOEING, J. S.; SANTOS JÚNIOR, O. O.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Antioxidant capacity and chemical composition in seeds rich in omega-3: chia, flax, and perilla. **Food Science Technology**, Campinas, v.33, n. 3, p. 541-548, 2013.

SEAL, C.J. Whole grains and CVD risk. **Proceedings of the Nutrition Society**, n.65, p.24–34, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ª edição, São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SILVA, R. C.; PINO, L. M.; SPOTO, M. H. F.; D'ARCE, M. A. B. R. Estabilidade oxidativa e sensorial de farinhas de trigo e fubá irradiados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 30(2), p.406-413, 2010.

SILVA, K. D.; BRAGA, V.O.; QUINTAES, K.D.; HAJ-ISA, N. M. A.; NASCIMENTO, E. S. Conhecimento e atitudes sobre alimentos irradiados de nutricionistas que atuam na docência. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 645-651, 2010.

SOUZA, J. M. L.; NEGREIROS, J.R.S.; ÁLVARES, V.S.; LEITE, F. M. N.; SOUZA, M. L.; REIS, F. S.; FELISBERTO, F.Á.V. Variabilidade físico-química da farinha de mandioca. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 907-912, 2008.

STREIT, E; SCHATZMAYR, G; TASSIS, P; TZIKA, E; MARIN, D; TARANU, I; TABUC, C; NICOLAU, A; APRODU, I; PUEL, O; OSWALD, IP. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed-focus on Europe. **Toxins (Basel)**, n.4, v.10, p. 788-809, Oct, 2012.

VECCHIA, A. D.; CASTILHOS-FORTES, R. Contaminação fúngica em granola comercial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, n.27, v.2, p.324-327, abr.-jun, 2007.

VIDAL, A.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, March, p.133–138, 2013.

XU, Yingying; HALL III, Clifford; WOLF-HALL, Charlene; MANTHEY, Frank. Fungistatic activity of flaxseed in potato dextrose agar and a fresh noodle system. **International Journal of Food Microbiology**, n. 121, p. 262–267, 2008.

ZADERNOWSKI, R.; POLAKOWSKA, H. N.; RASHED, A. A. The influence of heat treatment on the activity of lipo and hydrophilic components of oat grain. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 23, p. 177-191, 1999.

ZAITS, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.R.; FRAMIL, V.M.S. **Compêndio de Micologia médica**. 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

ZANÃO, C. F. P.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; SARMENTO, S. B. S.; ARTHUR, V. Efeito da irradiação gama nas características físico-químicas e sensoriais do arroz (*Oryza sativa* L.) e no desenvolvimento de *Sitophilus oryzae* L. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 29(1): 46-55, 2009.

APÊNDICE A

Tabela 1 – Médias e medianas das análises de composição nutricional das amostras de mix de cereais submetidas à irradiação (médias em g/100g)

Carboidrato	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
Média	54,87427	80,20560	61,01491	66,03153	49,79199	56,10019	54,46999	50,77636	59,43889
Mediana	56,61783	81,36095	61,07981	66,26166	49,39921	56,88186	54,84276	50,76085	58,64772
Proteína									
Média	23,19248	5,73263	16,59844	12,85129	25,29096	22,60973	24,39408	24,57279	21,14782
Mediana	23,01443	5,69474	16,41928	12,62358	26,10707	22,72838	24,77399	24,58894	21,07911
Lipídio									
Média	8,43634	1,30086	8,83899	10,24589	13,75517	10,95913	10,42721	13,88783	10,29337
Mediana	8,44497	1,37525	8,75691	10,52500	14,08352	9,94155	10,19751	13,73994	11,19330
Atividade de Água									
Média	0,54302	0,53703	0,55124	0,56226	0,55549	0,58269	0,61387	0,53128	0,42711
Mediana	0,54210	0,53750	0,54670	0,55750	0,55510	0,58780	0,61080	0,53430	0,42820
Cinza									
Média	3,84915	1,62544	2,35531	3,31764	3,46509	4,05453	3,46573	4,58517	4,33919
Mediana	3,71516	1,61955	2,34930	3,26436	3,49764	4,02007	3,47618	4,62368	4,43371
Umidade									
Média	10,35632	11,54229	11,51643	7,54555	7,80144	6,27642	7,24299	6,17784	4,78072
Mediana	8,29341	10,42318	10,30567	8,12590	7,97191	6,47833	7,08873	6,13121	4,73194

APÊNDICE B

Tabela 1 – ANOVA das amostras de aveia irradiada

	G.L.	SS	MS	F	Valor-p
Intercepto	0	-	-	-	-
Dose	2	1,1667	0,5833	4,20	0,072338
Amostra	2	0,6667	0,3333	2,40	0,171468
Origem	0	-	-	-	-
Erro	6	0,8333	0,1389	-	-
TOTAL	11	2,6667	-	-	-

Tabela 2 – ANOVA dos grãos de linhaça industrializados em relação ao crescimento dos fungos em DRBC.

	G.L.	SS	MS	F	Valor-p
Intercepto	1	936,021	936,0214	13,37112	0,001007
Nível	4	972,857	243,2143	3,47433	0,019508
Linhaça	1	402,193	402,1929	5,74535	0,023199
Erro	29	2030,093	70,0032	-	-
TOTAL	34	3405,143	-	-	-

Tabela 3 – ANOVA dos grãos de linhaça industrializados em relação ao crescimento no meio AFPA

	G.L.	SS	MS	F	Valor-p
Intercepto	1	27,7714	27,77143	8,419355	0,007018
Nível	4	73,5429	18,38571	5,573925	0,001871
Linhaça	1	27,7714	27,77143	8,419355	0,007018
Erro	29	95,6571	3,29852	-	-
TOTAL	34	196,9714	-	-	-

Tabela 4 – ANOVA dos grãos de linhaça a granel em relação à germinação das amostras

	G.L.	SS	MS	F	Valor-p
Intercepto	1	1,927210	1,927210	156,1759	0,000236
Nível	4	0,197840	0,049460	4,0081	0,103690
Linhaça	1	0,299290	0,299290	24,2536	0,007902
Erro	4	0,049360	0,012340	-	-
TOTAL	9	0,546490	-	-	-

Tabela 5 – ANOVA de linhaça industrializada estocada por 6 meses no DRBC

	G.L.	SS	MS	F	Valor-p
Intercepto	1	364,1008	364,1008	368,5024	0,000001
Dose	2	12,3517	6,1758	6,2505	0,034109
Marca	3	14,9092	4,9697	5,0298	0,044651
Erro	6	5,9283	0,9881		
TOTAL	11	33,1892			

Tabela 6 – ANOVA de linhaça industrializada estocada por 6 meses no AFPA

	G.L.	SS	MS	F	Valor-p
Intercepto	1	122,8800	122,8800	1161,071	0,000000
Dose	2	4,7450	2,3725	22,417	0,001644
Marca	3	19,9800	6,6600	62,929	0,000063
Erro	6	0,6350	0,1058	-	-
TOTAL	11	25,3600	-	-	-