

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS NUCLEARES

**INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA NA COMPOSIÇÃO
NUTRICIONAL E NA CONTAMINAÇÃO POR *Aspergillus*
AFLATOXIGÊNICOS EM AMENDOIM**

Aluna: Laury Francis Costa

Orientadora: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva

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

RECIFE/PE

2011

LAURY FRANCIS COSTA

**INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA NA COMPOSIÇÃO
NUTRICIONAL E NA CONTAMINAÇÃO POR *Aspergillus*
AFLATOXIGÊNICOS EM AMENDOIM**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Radioecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva

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

RECIFE/PE

2011

Catálogo na fonte

Bibliotecária Raquel Cortizo, CRB-4 664

C837i Costa, Laury Francis.

Influência da radiação gama na composição nutricional e na contaminação por *Aspergillus* aflatoxigênicos em amendoim / Laury Francis Costa. - Recife: O Autor, 2011.

59 folhas, il., gráfs., tabs., figs.

Orientadora: Prof^a. Dra: Edvane Borges da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2011.

Inclui Referências Bibliográficas e anexos.

1. Energia nuclear 2. Amendoim. 3. *Aspergillus* aflatoxigênicos 4. Aflatoxina. 5. composição nutricional. I. Silva, Edvane Borges da. (Orientadora). II. Título.

UFPE

621.48 CDD (22. ed.)

BCTG/2011-246

**INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA NA COMPOSIÇÃO
NUTRICIONAL E CONTAMINAÇÃO POR *Aspergillus*
AFLATOXIGÊNICOS EM AMENDOIM**

Laury Francis Costa

APROVADA EM: 17.08.2011

ORIENTADORA: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Idjane Santana de Oliveira

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Erilane de Castro Lima Machado - CAV/UFPE

Profa. Dra. Cláudia Elizabete Pereira de Lima - CAV/UFPE

Prof. Dr. Francisco Fernandes Amâncio - DBR/UFPE

Visto e permitida a impressão

Coordenador do PROTENDEN/UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me iluminou e me deu forças para continuar e seguir em frente, sem desistir.

A meus pais, que amo muito e que sempre me deram apoio e assistência, mesmo de longe, por telefone, ou pertinho, no vai e vem de Petrolândia para Recife. São meu alicerce nesta vida e sempre estiveram presentes em todos os momentos.

A minhas irmãs, Lena e Leide, pelas críticas construtivas, apoio, conselhos, dicas, companhia.

A todos os meus familiares, que torcem por mim à distância: tia Salete, vovó, vovô, Andreia...

A minha orientadora, Edvane Borges, pelo carinho, por acreditar em meu potencial e investir nisso. Espero ter conseguido alcançar suas expectativas.

A minha co-orientadora, Idjane Santana Oliveira, pelo aprendizado na área de fungos, pela paciência, conselhos. Vou me esforçar pra ser uma microbiologista tão experiente como ela.

A minha parceira de aventuras no mestrado e grande amiga, Sloana Lemos, pelo convívio, carinho e troca de experiências. Sua companhia nas idas e vindas para Vitória de Santo Antão ficarão bem guardadas na minha mente.

A todos os meus colegas do GERAR.

A todos os meus colegas do mestrado no Departamento de Energia Nuclear.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Energia Nuclear.

Ao senhor Artur Bibiano de Melo Filho, do Laboratório LEAAL, pelo auxílio nas análises da composição nutricional.

A todos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Centro Acadêmico de Vitória-UFPE, pelo convívio e amizade.

A meus amigos mais próximos, que me acompanharam em todo esse percurso, aguentaram meus momentos de estresse e sumiço, e sempre acreditaram em mim: Marcelo, Tati, Aline, Gabriel, Felix, Waleska, Breno... e como a lista é bem grande, vou

resumir agradecendo a todos que conviveram comigo em todos esses anos e acompanharam de perto meus erros e acertos.

Guardo em meu coração todos os conselhos, críticas, momentos de descontração, dúvidas, desapontamentos diante dos obstáculos, alegria diante de cada conquista, trabalho duro e corre-corre de um lugar para o outro, as broncas e repreensões, o cansaço, os momentos de felicidade, enfim, ao conjunto de todos os sentimentos e amizades que pude compartilhar em todos esses anos até chegar aqui.

INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO GAMA QUANTO NA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E CONTAMINAÇÃO POR *Aspergillus* AFLATOXIGÊNICOS EM AMENDOIM.

Autora: Laury Francis Costa

Orientadora: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva

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

RESUMO

Os cuidados no armazenamento de alimentos, como controle de umidade e temperatura, auxiliam na prevenção das doenças fúngicas nas sementes do amendoim. O desenvolvimento de fungos filamentosos em alimentos e rações pode resultar na produção de toxinas, conhecidas como micotoxinas, provocando resposta tóxica mesmo quando ingeridos em baixa concentração. A radiação ionizante pode ser utilizada como método preventivo de segurança alimentar, promovendo a inibição de brotamentos, retardo na maturação, redução da carga microbiana, eliminação de microorganismos patogênicos, esterilização, desinfecção em grãos, cereais, frutas e especiarias. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da radiação gama na composição nutricional e inibição do crescimento de *Aspergillus* aflatoxigênicos em amostras de amendoim. Foram coletadas amostras diretamente do produtor (Petrolândia-PE) e da Central de Abastecimento de PE (CEASA) e em seguida embaladas dentro/fora da vagem e submetidas à irradiação por bomba de cobalto-60 nas doses de 0, 6, 9, 12 e 15 kGy, em triplicatas. O material foi dividido em duas partes: a) para realizar a análise nutricional do material irradiado e não irradiado; e b) para a análise fúngica, antes e após a irradiação. Os resultados mostraram que as amostras originadas da CEASA-PE apresentaram as maiores taxas de contaminação, não apenas com amendoim não submetido à irradiação, como também para aquelas amostras submetidas às doses de 6, 9 e 12 kGy. A dose de 15 kGy foi a mais eficiente no controle do *Aspergillus* aflatoxigênicos, para ambas as procedências, conseguindo eliminar a ação dos fungos, independentemente dos tratamentos utilizados. Apenas uma amostra não irradiada, originada da CEASA-PE, apresentou produção positiva de aflatoxinas em meio LCA. Não ocorreram diferenças nos valores dos parâmetros nutricionais observados, com o

aumento da dose de radiação a que as amostras foram submetidas. A irradiação mostrou-se um processo eficaz para conservação de amendoins, pois previne o crescimento de fungos, principalmente *Aspergillus* aflatoxigênicos, evitando também a presença da aflatoxina no alimento, tornando-o mais seguro para consumo, sem provocar alterações na composição nutricional do amendoim.

Palavras-chaves: amendoim, *Aspergillus* aflatoxigênicos, aflatoxina, composição nutricional

GAMMA RADIATION INFLUENCE ON THE NUTRITIONAL COMPOSITION AND CONTAMINATION BY *Aspergillus* AFLATOXIGENIC OF PEANUTS.

Autora: Laury Francis Costa

Orientadora: Profa. Dra. Edvane Borges da Silva

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

ABSTRACT

Care in food storage, such as temperature and humidity control, assist in the prevention of fungal diseases in peanut seeds. The development of filamentous fungi in food and feed can result in the production of toxins known as mycotoxins, causing a toxic response, even when ingested in low concentrations. Ionizing radiation can be used as a preventive method of food security, promoting the inhibition of sprouting, delayed maturation, reduced microbial load, elimination of pathogenic microorganisms, sterilization, disinfection in grains, cereals, fruits and spices. This study aimed to evaluate the effects of gamma radiation on the nutritional composition and growth inhibition of aflatoxigenic *Aspergillus* in samples of peanuts. Samples were collected directly from the producer (Petrolândia-PE) and from Central de Abastecimento de Pernambuco (CEASA) and then packed inside / outside of the pod and subjected to irradiation by cobalt-60 pump at doses of 0, 6, 9, 12 and 15 kGy, in triplicate. The material was divided into two parts: a) to conduct a nutritional analysis of non-irradiated and irradiated material, and b) for fungal analysis, before and after irradiation. The results showed that the samples originated from the CEASA-PE had the highest rates of contamination with peanut, not only subjected to irradiation, but also for those samples subjected to doses of 6, 9 and 12 kGy. The dose of 15 kGy was the most efficient in controlling aflatoxigenic *Aspergillus*, for both the localities, since managed to eliminate the action of fungi, regardless of treatments. Only one non-irradiated sample, originated from the CEASA-PE, showed positive production of aflatoxins in LCA. There were no differences in nutritional values of the parameters observed with increasing dose of radiation to which the samples were submitted. Irradiation proved to be an effective

conservation of peanuts, because it prevents the growth of fungi, particularly *Aspergillus* aflatoxigenic, also avoiding the presence of aflatoxin in food, making it safe for consumption, without changing the nutritional composition of peanuts.

Keywords: peanut, aflatoxigenic *Aspergillus*, aflatoxin, nutritional composition

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: À esquerda, amendoim com a vagem aberta, mostrando as diferentes quantidades de sementes. À direita, a flor do amendoineiro.	19
Figura 2: Amendoineiro, com as folhas, flores e frutos.	20
Figura 3: Amendoins com vagem(A) e sem vagem(B), embalados e identificados para irradiação.	27
Figura 4: Distribuição dos amendoins nos meios de cultura: (A) DRBC; (B) AFPA.	30
Figura 5: Aparelho de Soxhlet utilizado para fazer a extração da fração lipídica.	32
Figura 6: Amendoins obtidos de Petrolândia irradiados com dose de 15kGy, em meio DRBC, mostrando ausência de crescimento fúngico e de germinação.	36
Figura 7: Amendoins não-irradiados da CEASA, em meio DRBC, mostrando presença de crescimento de <i>Aspergillus</i> aflatoxigênicos e germinação.	37
Figura 8: <i>Aspergillus</i> aflatoxigênicos em meio LCA, isolados de amendoins da CEASA, sendo submetidas à radiação U.V. (365nm), produzindo fluorescência azul e evidenciando produção de aflatoxina: A. resultado negativo; B. resultado positivo.	39
Figura 9: Crescimento de <i>Aspergillus</i> aflatoxigênicos em amendoins não irradiados, apresentando cor laranja no reverso da placa de Petri, em meio AFPA. A. frente; B. reverso.	41
Figura 10: Ausência de crescimento fúngico em amendoins irradiados com 9kGy em meio AFPA. A. frente da placa; B. reverso.	42
Figura 11: Comparação entre os valores da composição centesimal de amendoim da CEASA submetido a diferentes doses de radiação.	43
Figura 12: Comparação entre os valores da composição centesimal de amendoim de Petrolândia submetido a diferentes doses de radiação.	43
Figura 13: Teor de umidade das amostras de amendoim.	45
Figura 14: Teor de cinzas das amostras de amendoins.	45
Figura 15: Teor de proteínas para as amostras de amendoins	46
Figura 16: Teor de lipídeos das amostras de amendoins	47

Figura 17: Teor de carboidratos das amostra de amendoins. 48

Figura 18: Valor calórico total das amostras de amendoins 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos da radiação em alguns alimentos de acordo com a dose utilizada.	18
Tabela 2: Micotoxinas em grãos e sementes de diversas culturas.	23
Tabela 3: Esquema de distribuição dos amendoins para a análise fúngica em meio de cultura DRBC.	29
Tabela 4: Taxa de infecção por <i>Aspergillus</i> em amendoins irradiados, com/sem vagem e tratamento com hipoclorito, no meio DRBC, nas amostras obtidas da CEASA-PE e de Petrolândia	35
Tabela 5: Taxa de infecção por <i>Aspergillus</i> aflatoxigênicos, em meio AFPA, nos amendoins obtidos do produtor de Petrolândia-PE..	40
Tabela 6: Taxa de infecção por <i>Aspergillus</i> aflatoxigênicos, em meio AFPA, nos amendoins obtidos da CEASA-PE.	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Uso da radiação ionizante na conservação de alimentos	16
2.2 O amendoim	19
2.3 Contaminação alimentar por micotoxinas	22
2.3.1 Aflatoxinas	23
3 METODOLOGIA	27
3.1 Coleta e separação das amostras	27
3.2 Procedimento experimental	28
3.2.1 Processo de irradiação	28
3.2.2 Análise de <i>Aspergillus</i> aflatoxigênicos	28
3.2.3 Análise da composição nutricional	31
3.2.3.1 Proteínas Totais	31
3.2.3.2 Fração Lipídica	31
3.2.3.3 Teor de Umidade	32
3.2.3.4 Resíduo Mineral Fixo (Cinzas)	32
3.2.3.5 Carboidratos Totais	32
3.2.3.6 Valor Calórico Total	33
3.2.3.7 Análise estatística da composição nutricional	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Análise da presença de <i>Aspergillus</i> aflatoxigênicos	34
4.2 Análise da produção de aflatoxinas em meio LCA	38
4.3 Análise da produção de aflatoxinas em meio AFPA	39
4.4 Análise da composição centesimal dos amendoins.	42
5 CONCLUSÃO	51
6 REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	57

1 INTRODUÇÃO

O amendoim é uma leguminosa originária das Américas Central e do Sul, cultivado nas regiões de clima tropical, subtropical e temperado quente, bastante importante na alimentação de humanos e de gado bovino. É uma das principais oleaginosas cultivadas no Brasil. Tal fato deve-se às suas características, como prolificidade, elevada produtividade de forragem, altos teores de proteína bruta e digestibilidade, excelente palatabilidade, adaptabilidade a uma ampla diversidade de ambientes, resistência ao pastejo intenso aliada à ótima competitividade quando associado com gramíneas (MORAES, 2006, NASCIMENTO, 2006).

Na agroeconomia do Nordeste brasileiro, o amendoim tem se destacado por ser de fácil manejo, ciclo curto e preço atraente no mercado, além de constituir fonte adicional e agregadora de renda em razão das várias formas de produtos que podem ser processados, e que incentivam a agroindústria regional (SANTOS et al, 2006).

Apesar de todas as características atraentes que estimulam o seu cultivo, o amendoim, tal como outras leguminosas e demais vegetais, está sujeito a diversos processos de biodegradação durante seu plantio, colheita, transporte e armazenamento. Buscando minimizar as perdas de vários tipos de alimentos, empregam-se diferentes processos de conservação, como: desidratação, salga, defumação, liofilização, conservação em atmosfera controlada, esterilização, pasteurização e o uso da radiação gama (MORAES, 2006; PRADO et al, 2008).

A irradiação de alimentos é um método preventivo de segurança alimentar e consiste em um processo onde o alimento já embalado ou a granel é submetido a uma quantidade controlada de radiação visando à inibição de brotamentos, retardo na maturação, redução da carga microbiana, eliminação de microorganismos patogênicos, esterilização, desinfecção em grãos, cereais, frutas e especiarias (ROCHA e SOUSA, 2007).

A esterilização utilizando a radiação proporciona uma dieta livre de agentes patológicos presentes na superfície ou no interior dos alimentos devido à má higienização ou processo natural de decomposição (ROCHA e SOUSA, 2007).

Pesquisas realizadas em diferentes países e condições indicam que o consumo de alimentos irradiados não apresenta efeitos nocivos desde que esse tratamento seja realizado dentro de limites e condições controladas, estipulados pela legislação. A composição química dos alimentos pode ser afetada pelos efeitos primários ou secundários da radiação. Portanto, a irradiação deve ser considerada um complemento às boas práticas de higiene e não um substituto (ORDONES, 2005; FORSYTHE, 2002).

Devido ao armazenamento inadequado de produtos vegetais, ainda ocorrem perdas de 20 a 80% da produção total. Os cuidados no armazenamento, com relação, principalmente, ao controle da umidade e temperatura, auxiliam na prevenção das doenças fúngicas nas sementes do amendoim, tanto para o consumo “in natura” quanto para produtos industrializados (NOBREGA e SUASSUNA, 2004).

O desenvolvimento de fungos filamentosos em alimentos e rações pode resultar na produção de toxinas, conhecidas como micotoxinas, as quais provocam resposta tóxica em vertebrados quando ingeridos em baixa concentração. Dentre as micotoxinas, pode-se citar o grupo denominado de aflatoxinas. A exposição do ser humano às aflatoxinas pode ocorrer por via respiratória, durante a colheita, trilha, ensacamento, limpeza, armazenamento e processamento de grãos contaminados (NOBREGA e SUASSUNA, 2004).

A presença de teores elevados de aflatoxinas em amendoim e seus derivados representam sérios problemas para o Brasil. A remoção de micotoxinas pode ser obtida utilizando-se métodos físicos, químicos ou biológicos e as estratégias fundamentam-se na inativação química ou física da toxina. Entre os métodos físicos, pode-se citar o uso da radiação gama (TAHA et al, 2001).

O presente trabalho objetivou avaliar a ação da radiação gama na composição nutricional e na inibição do crescimento fúngico em amendoim, analisando a dose que permita aumentar o tempo de prateleira sem que ocorram alterações significativas em sua composição nutricional. Assim, foram considerados os seguintes objetivos específicos: avaliar os efeitos das doses de radiação gama empregadas e determinar as suas influências na composição nutricional do amendoim; avaliar a influência das doses na inibição da contaminação do amendoim com/sem vagem por *Aspergillus* aflatoxigênicos; verificar a dose mínima que permita inibir o crescimento fúngico e, ao mesmo tempo, sem comprometer a composição nutricional do amendoim.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Uso da Radiação Ionizante na conservação de alimentos

A descoberta da radiação foi um fato bastante importante para a ciência, mas apenas quando os pesquisadores foram capazes de produzi-la artificialmente é que a valorização e aplicabilidade aumentaram. Assim, a energia nuclear passou a ser utilizada na geração de energia elétrica, medicina, indústria, agricultura e pesquisa (CARDOSO, 2002).

Radiação é uma forma de energia emitida por uma fonte e que se propaga de um ponto a outro sob a forma de partículas, com ou sem carga elétrica, ou ainda sob a forma de ondas eletromagnéticas. A radiação é ionizante quando possui energia suficiente para retirar um dos elétrons orbitais de átomos neutros, transformando-os em um par de íons (OKUNO, 2010).

A irradiação é o processo de aplicação desta energia a um material, tal como os alimentos, com a finalidade de esterilizá-los ou preservá-los com a inativação de microrganismos, parasitas, insetos e outras pragas (POLIZEL, 2006).

Quando se trata de conservação de alimentos, é preciso pensar em três características: físicas (cor, odor, textura, sabor), químicas (composição de carboidratos, proteínas, lipídeos etc.) e microbiológicas (presença de microrganismos ou de suas toxinas que podem causar doenças de ordem alimentar aos consumidores). Porém, durante a irradiação, assim como em todo processo de conservação, podem existir alterações de ordem nutricional e sensorial (POLIZEL, 2006).

A irradiação de alimentos é realizada com o intuito de assegurar a qualidade, tanto do ponto de vista de saúde pública como para reduzir perdas consideráveis devido a infestações, agregando também valor para o caso das exportações (FORSYTHE, 2002).

O processo de irradiação em condições controladas não faz com que os alimentos, ou qualquer outro material, tornem-se radioativos. Este processo tem sido bem valorizado devido à sua capacidade de destruir microrganismos patogênicos e deteriorantes, eliminar insetos e retardar o processo germinativo em produtos vegetais,

reduzindo as perdas causadas por deterioração e aumentando a segurança e tempo de vida útil. Interpretações errôneas dos consumidores, que freqüentemente acham difícil avaliar os benefícios dessa técnica de processamento, e a falta de informações têm limitado o uso desta tecnologia (ORNELLAS et al, 2006; LEAL et al, 2004).

A legislação brasileira segue as recomendações internacionais sugeridas pela *Food and Agriculture Organization (FAO)*, *Internatinal Atomic Energy Agency (IAEA)* e *Codex Alimentarium*, da ONU. Atualmente, todas as normas para o emprego desta tecnologia estão descritas na Resolução RDC nº 21 da ANVISA, segundo a qual, qualquer alimento pode ser irradiado desde que sejam observados os limites mínimos e máximos da dosagem aplicada, sendo que a dose mínima deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida e a máxima tem que ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e/ou atributos sensoriais do alimento (ORNELLAS et al, 2006; PRADO et al, 2006).

A irradiação de alimentos consiste no processo em que o material já embalado ou a granel é submetido a uma quantidade controlada de radiação ionizante, como os raios gama, obtido de fontes radioativas como cobalto-60, durante um período específico de tempo, visando a inibição de brotamentos, retardo na maturação, redução da carga microbiana, eliminação de microorganismos patogênicos, esterilização, desinfecção em grãos, cereais, frutas e especiarias. O processo pode ser subdividido em três categorias classificadas de acordo com a quantidade de radiação aplicada: radurização, radicação ou radiopasteurização e radapertização (ROCHA e SOUSA, 2007).

Radurização é um processo pelo qual o alimento é submetido a doses baixas de radiação (<1 kGy) e é aplicado para inibir brotamento em cebolas, batatas e alhos, retardar a maturação de deterioração em frutas e hortaliças, além de agir contra insetos que infestam cereais e leguminosas (ORDOÑES, 2005).

Radicação ou Radiopasteurização é o tratamento do alimento com uma dose intermediária (1 kGy – 10 kGy), suficiente para ocorrer a redução no surgimento de bactérias e fungos presentes na superfície ou no interior de alimentos (ORDOÑES, 2005).

Radapertização consiste na aplicação de uma dose mais alta de radiação (>10 kGy) que permite a destruição de microrganismos contaminantes de alimentos, e é utilizado na conservação de carnes, alimentos preparados e outros produtos (ROCHA e SOUSA, 2007). A tabela 1 apresenta alguns exemplos de alimentos, suas respectivas doses e efeitos.

Tabela 1: Efeitos da radiação em alguns alimentos de acordo com a dose utilizada.

TIPOS DE ALIMENTOS	DOSE (kGy)	EFEITO
CARNE, FRANGO, PEIXE, MARISCO, ALGUNS VEGETAIS, ALIMENTOS PREPARADOS	20 a 70	Esterilização. Os produtos tratados podem ser armazenados (~temperatura ambiente)
ESPECIARIAS E OUTROS TEMPEROS	8 a 30	Reduz o número de microrganismos e destrói insetos. Substitui produtos químicos.
CARNE, FRANGO, PEIXE	1 a 10	Retarda a deterioração. Mata alguns tipos de bactérias patogênicas (Salmonelas).
MORANGOS E OUTRAS FRUTAS	1 a 4	Aumenta o tempo de prateleira, retarda o aparecimento de mofo.
GRÃOS, FRUTAS E VEGETAIS	0,1 a 1	Mata insetos ou evita sua reprodução. Pode substituir parcialmente os fumigantes.
BANANAS, ABACATE, MANGA, MAMÃO E OUTRAS FRUTAS NÃO CÍTRICAS	0,25 a 0,35	Retarda a maturação
CARNE DE PORCO	0,08 a 0,15	Inativa a Trichinela
BATATA, CEBOLA, ALHO	0,05 a 0,15	Inibe o brotamento.

Fonte: ROCHA & SOUSA, 2007.

2.2 O amendoim

O gênero *Arachis* é uma leguminosa nativa da Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Brasil (NASCIMENTO, 2006)

O amendoim é uma planta dicotiledônia, pertencente à família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae* e ao gênero *Arachis*. É anual, herbácea, pubescente, de porte ereto ou rasteiro, suas flores são aéreas mas seus frutos são subterrâneos. O tempo de florescimento ocorre de 3-4 semanas após emergência do solo. O período de frutificação dura de 40-50 dias, onde ocorre o desenvolvimento dos frutos e de maturação, evoluindo até a colheita. A vagem madura apresenta manchas escuras internamente, como pode ser visto na Figura 1 (ATAYDE, 2009).



Figura 1: À esquerda, amendoim com a vagem aberta, mostrando as diferentes quantidades de sementes (Fonte: www.revistapesquisa.fapesp.br). À direita, a flor do amendoimzeiro.

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é cultivado em mais de 90 países desde as latitudes de 40° N a 40° S, ocupando posição de destaque entre as mais importantes culturas de interesse econômico, já que é largamente utilizado na alimentação humana e na indústria de produtos alimentícios e farmacêuticos. Este interesse é devido à variedade de produtos que oferece, dentre os quais se destacam os grãos para consumo "in natura" e o óleo que é um dos seus principais derivados (SILVA, 1997).



Figura 2: Amendoineiro com as folhas, flores e frutos.

O amendoim destaca-se dentre as leguminosas oleaginosas e é cultivado nas regiões de clima tropical, subtropical e temperado quente. O ciclo desta planta varia de 90 a 115 dias, para as variedades precoces, e de 120 a 140 dias, para as variedades tardias e desenvolve-se bem em ambientes com temperaturas entre 22°C e 28°C. (ASSUNÇÃO et al, 2008)

No Brasil, 88,6% da produção nacional de amendoim vem da região Sudeste (83,2% em São Paulo); 8,3% do total é produzido na região Sul; e apenas 2,9% na região Nordeste (FAGUNDES, 2002).

O óleo de amendoim é uma alternativa promissora para a obtenção de biodiesel, principalmente pela rota da transesterificação conduzida na presença de catalisadores básicos, pois bons rendimentos em biodiesel são obtidos, mesmo com o emprego de óleo bruto. A semente seca de amendoim contém cerca de 50% de óleo, apresentando em sua composição cerca de 50-60% de ácido oléico, 18-30% de ácido linolêico e 6-12% do ácido palmítico (MENEGHETTI et al, 2007).

Devido ao seu rico valor nutricional, o amendoim ainda contribui para suprir as necessidades protéicas de consumidores, pois contém cerca de 30% de proteína em suas sementes e 50% de proteína no resíduo proveniente da extração do óleo. A grande importância para os centros industriais e de consumo está no fato de suas sementes originarem produtos como o óleo e a farinha, ambos de largo aproveitamento na alimentação humana, ou subprodutos como sabões, sabonetes, cremes emolientes,

farelos e tortas, utilizados nas indústrias de cosméticos ou de rações (FREIRE et al, 1997).

O amendoim é uma rica fonte de proteína e óleo de origem vegetal, contendo os grãos aproximadamente 20-25% de proteína de alta qualidade, 6-8% de água, 10-16% de carboidratos, 3-4% de fibras, 45% de óleo e 1-2% de minerais. O óleo do amendoim é composto por uma série de ácidos graxos, com maior proporção dos ácidos insaturados oléicos (51%) e linoléicos (28%). Além disso, apresenta vitaminas A, B1 e B2, D, encontradas em proporções consideráveis no amendoim cru; e também vitamina E, encontrada em maior concentração no óleo do amendoim (PITTA, 2008).

Os solos ideais para o plantio de amendoim são de textura franca, de média fertilidade, com matéria orgânica igual ou superior a 3%, bem drenado, pH em torno de 6,0-6,5, tolerando condições de má drenagem e encharcamento temporário. Adapta-se a solos ácidos (pH 5,0), de alta toxicidade de alumínio (75%) e pobres em nutrientes. Suas sementes crescem e desenvolvem-se abaixo da superfície do solo (geotropismo) (NASCIMENTO, 2006).

O amendoim pode ser cultivado em diversos tipos de solo, principalmente arenosos, que são mais leves e profundos, facilitando a entrada do esporão que formará o fruto, já que um solo bem arejado, permitindo boa drenagem de água, é o ideal para o cultivo do amendoim. A temperatura ideal para germinação das sementes fica entre 23 e 24°C, porém entre 30-34°C o processo de germinação pode ser acelerado (ATAYDE, 2009).

Aproximadamente, 75% da produção de amendoim no Brasil está concentrada no Estado de São Paulo. Essa produção advém quase totalmente de áreas de reforma de canaviais, nos quais o amendoim é a principal cultura utilizada na rotação com a cana-de-açúcar; outra utilização é a rotação com pastagens, integrando lavoura-pecuária, com o objetivo de reforma de áreas degradadas, mas com condições de solo favoráveis sem necessidade de preparo prévio (CRUSCIO et al, 2007).

Já no Nordeste brasileiro, o amendoim é cultivado por pequenos e médios produtores, com baixo nível tecnológico e para o consumo in natura; além disso, as vagens e os ramos são usados para ração animal ou incorporação no solo como adubo orgânico (NÓBREGA e SUASSUNA, 2004).

2.3 Contaminação alimentar por micotoxinas

Diferentemente das bactérias, os fungos não produzem endotoxinas. Alguns sintetizam exotoxinas (SPICER, 2002). As micotoxinas compreendem um conjunto complexo de substâncias tóxicas, naturalmente produzidas por fungos, diferenciando-se das toxinas bacterianas por não terem natureza proteica nem serem imunogênicas, e podem contaminar grande variedade de alimentos (CIB, 2004).

Segundo Pitt (2000), o desenvolvimento de fungos filamentosos em alimentos e rações pode resultar na produção de toxinas, conhecidas como micotoxinas, as quais provocam resposta tóxica em vertebrados quando ingeridos em baixa concentração.

A contaminação dos alimentos depende muito das condições climáticas, pois nos anos chuvosos até 80% da produção pode ser infectada com tais toxinas, obrigando as empresas que utilizam essa matéria-prima a importar amendoim de outros países. No Brasil, o plantio de grãos resistentes a insetos poderia evitar o desenvolvimento das aflatoxinas, já que os insetos acabam perfurando o alimento, facilitando a entrada de microrganismos degradadores (CIB, 2004).

Há cinco grupos de micotoxinas que ocorrem com bastante frequência em alimentos: deoxinivalenol/ nivalenol, zearalenona, ocratoxina, fumosinas, e aflatoxinas (CTA, 1997). Na Tabela 2 são apresentados os cinco grupos de micotoxinas e seus principais produtores, de acordo com o alimento.

Tabela 2: Micotoxinas em grãos e sementes de diversas culturas.

Micotoxinas	Produto	Fungos
Deoxinivalenol/ nivalenol	Trigo, milho, cevada	<i>Fusarium gramineum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i>
Zearalenona	Milho e trigo	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. rookwellense</i>
Ocratoxina A	Cevada, trigo e outros produtos	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i>
Fumosina B1	Milho	<i>Fusarium moniliforme</i> e várias espécies menos comuns
Aflatoxina B1 e B2	Milho, amendoim e outros produtos	<i>Aspergillus flavus</i>
B1, B2, G1, G2	Milho, amendoim	<i>Aspergillus parasiticus</i>

Fonte: CTA, 1997

2.3.1. Aflatoxinas

Aflatoxinas são metabólitos fúngicos secundários produzidos por algumas linhagens das espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e, mais raramente, *Aspergillus nomius*, e se desenvolvem favoravelmente em ambientes com uma umidade relativa do ar de 85% e temperatura ambiente de 27°C (VIEIRA e MARTINS, 2001; EINLOFT et al, 2009; NEVES, 2009).

A exposição às aflatoxinas pode causar efeitos que variam com a espécie animal, o tempo de exposição, a dose, a dieta, o estado nutricional, o gênero e a idade. Ingestão de alimentos com baixos teores destas micotoxinas, mas por tempo prolongado pode levar a uma produção de carcinomas hepáticos; porém, a ingestão de alimentos com alto grau de contaminação em pouco tempo pode produzir efeitos agudos hepatotóxicos (necrose e degeneração lipídica), sendo chamado de aflatoxicose. Ao cair na circulação

sistêmica, as aflatoxinas são distribuídas para o organismo ligadas a componentes sanguíneos, como proteínas e eritrócitos plasmáticos (ROCHA et al, 2008)

As aflatoxinas apresentam potencial carcinogênico e imunossupressor. O fígado é o órgão alvo para esses compostos, pois além de induzir o câncer no fígado, também podem ocasionar outros efeitos como: cirrose hepática e diminuição da resistência imunológica, propiciando surtos de hepatites virais tipo B, estando também associada à Síndrome de Reye, febre, convulsões, vômito, coma, etc. (MALLMANN et al, 2003).

A aflatoxina B₁ é a micotoxina de maior prevalência e também a de maior toxicidade, provocando profundas alterações como hemorragias devido à inibição dos fatores II e VII da coagulação sanguínea, imunodepressão, lesões agudas e crônicas nos hepatócitos podendo levar a câncer hepático (MALLMANN et al, 2003).

A presença de fungos produtores de aflatoxinas no amendoim é difícil de ser evitada, pois o fungo está distribuído em toda a cadeia produtora do amendoim e seus derivados. Assim, a contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, antes e após a colheita, e durante o transporte e armazenamento do produto (CALDAS et al, 2002). A exposição do ser humano às aflatoxinas pode ocorrer por via respiratória, durante a colheita, trilha, ensacamento, limpeza, armazenamento, processamento e transporte de grãos contaminados (NOBREGA e SUASSUNA, 2004).

A presença de micotoxinas em grãos e outros produtos alimentícios podem prejudicar a saúde de humanos e de outros animais. Em condições de armazenamento, o objetivo da monitoração é detectar a ocorrência de fungos, pois caso não sejam detectados, então não haverá contaminação por micotoxinas. Vários países desenvolvidos estipularam limites para a quantidade de micotoxinas nos produtos importados, impedindo assim a entrada de alimentos que extrapolem os valores estabelecidos (CTA, 1997).

A Resolução MERCOSUL nº 56/94, internacionalizada pelo Ministério da Saúde, Resolução da Diretoria Colegiada (RDC 274) da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, determina que o amendoim, o milho e os derivados de tais alimentos não podem ter micotoxinas em quantidade superior a 20 ppb , ou seja, o nível máximo permitido é de 20 µg/Kg para a soma das aflatoxinas B₁+G₁+B₂+G₂. Se o resultado da análise for superior a 20 µg/kg de aflatoxinas totais, o lote será rejeitado. (ANVISA, 2002).

Alimentos altamente susceptíveis à contaminação por aflatoxinas, como amendoim e milho, fazem parte da dieta alimentar de uma parcela significativa da população, constituindo uma importante fonte de proteínas. Levando isso em consideração, a busca por estratégias e métodos que previnam e desintoxiquem alimentos e rações têm sido necessárias para evitar perdas econômicas e garantir a segurança dos produtos (TAHA et al, 2001).

A ingestão da aflatoxina por animais produtores de leite não apenas reduz a produção, como também transfere de 1 a 3% da toxina ingerida para o leite e, assim, passa para os derivados do leite. O efeito é mais danoso em animais estressados, subnutridos e em estado de convalescença (MIDORIKAWA, 2009).

Foi demonstrado por Zovico et al (1999) que os níveis de aflatoxinas são maiores nos grãos imaturos, enrugados, mofados, descoloridos, sem pele ou quebrados de amendoim. Um dos métodos físicos mais utilizados consiste na separação dos grãos contaminados dos grãos sadios utilizando equipamentos de seleção eletrônica pela cor, seguida ou não por seleção manual. Este método visual não deve ser considerado o ideal, pois o grão pode ter boa aparência e já estar contaminado com a toxina, ou ter influência visual humana quando feito manualmente, ficando submetido a erros de interpretação.

Um estudo feito na Argentina (LOPEZ et al, 2002), fez a determinação de aflatoxina B1 por cromatografia líquida de alto rendimento no soro de 20 pacientes voluntários com enfermidades hepáticas. Apenas em um dos pacientes foi detectada a presença da aflatoxina B1, com concentração de $0.47\text{ng}/\text{cm}^3$ o qual não vivia perto de silos, nem tinha hábitos que o levassem a ter contato com ambiente arriscado. Esse resultado mostra o quanto é difícil identificar a aflatoxina no soro de pacientes, mesmo com doenças hepáticas. Portanto, a prevenção ainda é a melhor solução.

São necessárias quantidades consideráveis de aflatoxinas para realização de estudos referentes às características químicas, à degradação de produtos e ao efeito de doses baixas e altas em animais. Existe instabilidade na síntese de aflatoxinas “in vitro” por *A. flavus* e *A. parasiticus* isolados em laboratórios. Essa instabilidade dificulta a quantificação e a documentação das espécies incidentes. Os fungos micotoxigênicos crescem em vários substratos, porém nem todos são apropriados à produção de toxinas.

Não há método efetivo para prevenir a contaminação de sementes com aflatoxina e a descontaminação é ineficiente e antieconômica (BIZZETTO et al ,1997).

Metodologias foram desenvolvidas baseando-se na fluorescência do microrganismo, como o meio ágar-coco (CAM-Coconut Agar Medium) e APA (Aflatoxin Producing Ability) para distinguir *Aspergillus* aflatoxigênicos. Análises químicas, como cromatografia delgada, (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e ELISA podem ser adotadas para a detecção da produção de toxina pelo fungo e na quantificação das toxinas presentes nos produtos (BIZZETTO et al,1997).

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta e separação das amostras

Os amendoins utilizados foram obtidos de duas procedências: a) cedidas por um pequeno agricultor da cidade de Petrolândia, localizado no sertão de Pernambuco; b) amostras originadas do Estado de São Paulo e adquiridos na CEASA de Recife-PE (Centro de Abastecimento Alimentar de Pernambuco), no mês de julho de 2010.

Os amendoins foram adquiridos dentro das vagens e, em seguida, a metade do grãos foi retirada das mesmas, foram embalados em filme de PVC e devidamente identificados com etiquetas, onde constava: procedência, dose, presença ou ausência de tratamento com hipoclorito de sódio e número da repetição. Todas as análises foram em triplicata.

O material de cada procedência foi dividido em duas partes: a primeira, com cinco pacotes com 200 grãos para realizar a composição nutricional; e a segunda parte, com cerca de 5 pacotes de amendoins com vagens e 5 pacotes de amendoins sem vagens, para a análise fúngica. A figura 3 mostra os amendoins acondicionados em embalagem de PVC.



Figura 3: Amendoins com vagem (A) e sem vagem (B), embalados e identificados para irradiação.

3.2 Procedimentos experimentais

3.2.1 Processo de irradiação

As amostras embaladas foram submetidas à irradiação em bomba de cobalto-60, fonte Gammacell ⁶⁰Co (modelo 220 Excel-MDS Nordion), no Departamento de Energia Nuclear-UFPE, utilizando as doses de 0 (controle), 6, 9, 12 e 15 kGy, nos dias 19 e 22 de novembro de 2010.

3.2.2 Análise de *Aspergillus* aflatoxigênicos

Para a análise de contaminação por fungos, as amostras foram separadas em triplicata, com e sem vagem, com e sem desinfestação por hipoclorito de sódio a 0,4%, para cada dose e procedência da amostra. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Centro Acadêmico de Vitória-UFPE.

Para cada dose foram analisados 30 grãos. O procedimento consistiu na distribuição de 10 grãos em cada placa de Petri, de tamanho 150x15mm, em meio de cultura DRBC (Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol) acrescido de amoxicilina sódica cristalina (500mg/L de meio), permitindo apenas o crescimento fúngico dos amendoins.

A desinfecção de uma parte dos grãos foi feita utilizando hipoclorito de sódio, a 0,4%, durante 2 minutos, antes do plaqueamento em meio DRBC. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 5 a 7 dias, e em seguida foi avaliada a taxa de infecção dos grãos por *Aspergillus* aflatoxigênicos. A Tabela 3 mostra o organograma utilizado para a identificação e distribuição dos grãos nas placas.

Organograma: Esquema de distribuição do amendoim para a análise fúngica em meio de cultura DRBC.

DOSE (kGy)	PROCEDÊNCIA	VAGEM	TRATAMENTO COM HIPOCLORITO DE SÓDIO (0,4%)	REPETIÇÕES
0			SEM	3
6		SEM	COM	3
9	Petrolândia			
12		COM	SEM	3
15			COM	3
0			SEM	3
6		SEM	COM	3
9	CEASA			
12		COM	SEM	3
15			COM	3

Após o período de uma semana, a partir do crescimento fúngico presente nos grãos no meio DRBC, foi realizado o repique para os meios de cultura CYA (Czapeck Yeast Agar) e BDA (Batata Dextrose Agar) para isolamento dos fungos encontrados.

Os fungos *Aspergillus* aflatoxigênicos isolados no meio BDA foram repicados para o meio de cultura LCA (Ágar Leite de Coco) para observação da produção de fluorescência referente às aflatoxinas B ou G (Blue e Green em inglês, respectivamente). A leitura das placas para evidenciar a produção de aflatoxinas em LCA foi realizada com lâmpada de ultravioleta a 365nm.

Após 7 meses, as amostras de amendoins com vagem e sem vagem, que estavam embaladas e armazenadas em local seco durante todo esse tempo, e que não haviam sido distribuídas em meio de cultura DRBC, foram distribuídas no meio de cultura AFPA (Ágar *Aspergillus flavus e parasiticus*). Para essa análise, não se utilizou o

tratamento com hipoclorito, pois o meio é específico para o crescimento de *Aspergillus aflatoxigênicos*. Para cada dose de radiação, 30 amendoins (10 grãos para cada placa) foram plaqueados em meio de cultura AFPA, e levados para incubação a 25°C por 5 a 7 dias, respeitando o mesmo esquema de distribuição dos grãos em meio DRBC (Tabela 3). A figura 4 ilustra a organização das placas na bancada para a incubação.

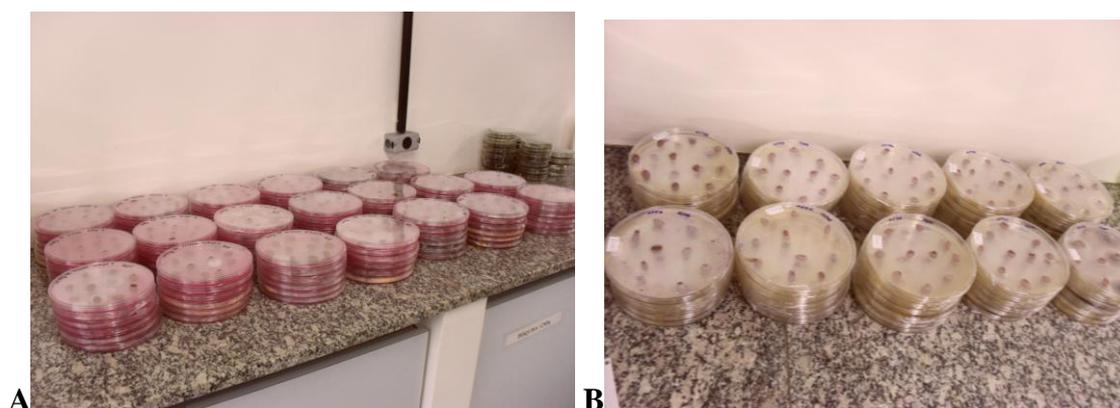


Figura 4: Distribuição dos amendoins nos meios de cultura: (A). DRBC; (B). AFPA.

O método DRBC, apesar do tempo de incubação de cinco a sete dias, permite melhor visualização dos fungos provenientes de alimentos devido às seguintes características: 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 de bactérias (LAZARETTI et al, 2000).

AFPA é um meio de cultura recomendado para a rápida detecção e contagem destas duas espécies de *Aspergillus* (*A. parasiticus* e *A. flavus*), que são potenciais produtores de aflatoxinas. Este meio de cultura mostra as seguintes vantagens sobre outros meios: 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 amarelo/laranja no reverso das colônias e é uma característica diferencial destas 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).

3.2.3 Análise da Composição nutricional

Para a composição nutricional do amendoim, foram necessários cerca de 100g do material para cada dose empregada e a amostra controle (não-irradiada). Foram analisados os teores de proteína, lipídeos, carboidratos, minerais, umidade e o valor calórico total. A metodologia de cada teste foi baseada no protocolo do Instituto Adolfo Lutz (2005), com exceção apenas do teor de carboidratos e Valor Calórico Total, que foram feitos por cálculo. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos (LEAAL) do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. Os métodos analíticos foram os seguintes:

3.2.3.1 Proteínas Totais

A determinação das proteínas totais foi realizada utilizando-se o método Kjeldahl baseado na digestão ácida da matéria orgânica seguido da destilação, sendo o nitrogênio posteriormente dosado por titulação. O valor em nitrogênio será multiplicado pelo fator 6,25 (A.O.A.C, 2000; método 992.15).

3.2.3.2 Fração lipídica

A fração lipídica foi obtida pelo método de extração de fluxo intermitente, utilizando-se éter etílico como solvente sob refluxo, em aparelho de Soxhlet, o qual pode ser visto na figura 5 (A.O.A.C,2000; método 963.15).



Figura 5: Aparelho de Soxhlet utilizado para fazer a extração da fração lipídica.
(Fonte: www.quirumed.com)

3.2.3.3 Teor de 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 (A.O.A.C,2000; método 985.14).

3.2.3.4 Resíduo Mineral Fixo (Cinzas)

Para a obtenção do resíduo mineral fixo (cinzas) foi utilizado o método gravimétrico, baseado na determinação da perda de peso das amostras submetidas a incineração a 550 °C (A.O.A.C,2000; método 923.03).

3.2.3.5 Carboidratos Totais

Os glicídios foram obtidos por diferença, através do somatório das determinações de umidade, proteína, extrato etéreo e cinzas, subtraídos de 100.

3.2.3.6 Valor calórico total (VCT)

O valor calórico total é obtido pelo cálculo envolvendo os valores obtidos de proteínas, lipídios e carboidratos, a partir da expressão abaixo:

$$\text{VCT} = (\text{P} \times 4) + (\text{L} \times 9) + (\text{C} \times 4)$$

Onde: P= proteínas totais, L = teor lipídico e C= carboidratos. Já que 1g de proteínas equivale a 4 kcal, 1g de lipídios equivale a 9kcal e 1g de carboidratos equivale a 4kcal.

Unidade utilizada: kcal

3.2.3.7. Análise estatística da composição nutricional

Para a análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney-Wilcoxon para duas amostras. Este teste não-paramétrico é adequado para comparar os resultados (as médias) de duas amostras independentes e aleatórias, sejam as variáveis numéricas ou ordinais. As tabelas com todos os valores obtidos na composição nutricional encontram-se no anexo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da presença de *Aspergillus* aflatoxigênicos

A Tabela 4 mostra as taxas de infecção por *Aspergillus* aflatoxigênicos no meio DRBC, nas amostras de grãos de amendoim irradiados com / sem vagem, com e sem tratamento prévio com hipoclorito, para as amostras obtidas da CEASA-PE e de Petrolândia.

Pode-se observar pela tabela que as amostras não-irradiadas apresentaram crescimento de *Aspergillus* aflatoxigênicos nas duas procedências pesquisadas. Porém, as amostras da CEASA apresentaram as maiores taxas de infecção, não apenas com amendoim não submetido à irradiação, como também para aquelas amostras submetidas às doses de 6, 9 e 12 kGy. A comparação destes resultados com aqueles obtidos para as amostras adquiridas diretamente de um produtor de Petrolândia-PE indicam que as condições de transporte e/ou armazenamento do lote proveniente de São Paulo, e comprado na CEASA-PE, podem não ter obedecido às condições ideais.

Foi observado na tabela 4 que o tratamento com hipoclorito foi eficaz em reduzir a taxa de infecção por *Aspergillus* aflatoxigênicos em amendoim, no meio DRBC.

Tabela 4: Taxa de infecção por *Aspergillus* aflatoxigênicos em amendoins irradiados, com/sem vagem e tratamento com hipoclorito, no meio DRBC, nas amostras obtidas da CEASA e Petrolândia.

DOSE (kGy)	VAGEM	HIPOCLORITO (0,4%)	CEASA (%)	Petrolândia (%)
0	SEM	SEM	23,3	13
0	SEM	COM	6	6
0	COM	SEM	23,3	13
0	COM	COM	13,3	0
6	SEM	SEM	0	0
6	SEM	COM	0	0
6	COM	SEM	0	0
6	COM	COM	3,3	0
9	SEM	SEM	13,3	0
9	SEM	COM	6,6	0
9	COM	SEM	0	0
9	COM	COM	16,6	0
12	SEM	SEM	20	0
12	SEM	COM	13,3	0
12	COM	SEM	0	0
12	COM	COM	0	0
15	SEM	SEM	0	0
15	SEM	COM	0	0
15	COM	SEM	0	0
15	COM	COM	0	0

Os resultados apresentados na Tabela 4, relativos às amostras provenientes da CEASA-PE, mostraram que a radiação teve ação eficaz no controle dos *Aspergillus* aflatoxigênicos apenas para a dose de 12 kGy, nos amendoins que estavam dentro da vagem. Isto indica que a vagem pode apresentar ação protetora contra a colonização dos fungos. A dose de 15 kGy foi a mais eficiente no controle dos *Aspergillus* aflatoxigênicos na CEASA, pois conseguiu eliminar a presença dos fungos,

independentemente dos tratamentos utilizados. Adicionalmente, a radiação também conseguiu inibir a germinação das sementes.

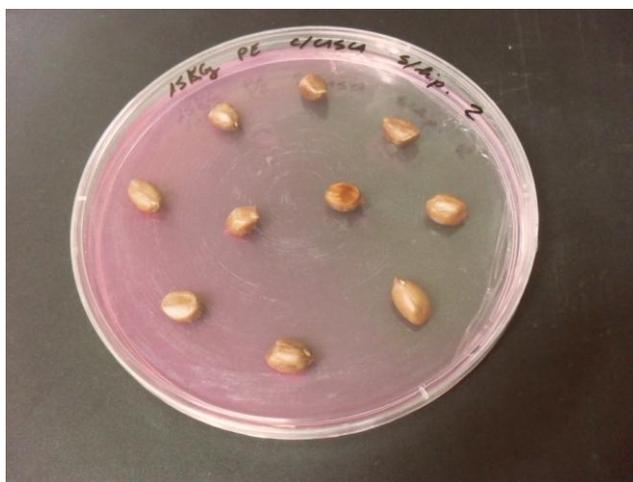


Figura 6: Amendoins obtidos de Petrolândia, irradiados com dose de 15kGy, em meio DRBC, mostrando ausência de crescimento fúngico e de germinação.

A radiação inibiu o crescimento de fungos e a germinação em todas as amostras irradiadas de Petrolândia, como pode ser visto na tabela 4.

As taxas de infecção por *Aspergillus* aflatoxigênicos em amostras obtidas de produtor de Petrolândia-PE foram de 13% (sem hipoclorito) e de 6% (com hipoclorito), apenas nos amendoins não-irradiados. Como as amostras foram obtidas diretamente de um produtor rural, as mesmas não passaram por condições de transporte e armazenamento semelhantes àquelas amostras obtidas da CEASA-PE.

Na Figura 7 observa-se o crescimento de fungos nas amostras não-irradiadas de amendoim, onde foi possível observar também a germinação das sementes. Em todas as amostras irradiadas onde houve crescimento fúngico não ocorreu germinação.



Figura 7: Amendoins não-irradiados da CEASA em meio DRBC, mostrando presença de crescimento de *Aspergillus* aflatoxigênicos e germinação.

Segundo o estudo de Alves et al (2011), sementes de amendoim não irradiadas tiveram germinação de 60%, no armazenamento em polietileno trançado, e a perda da germinação aumentou com o aumento da dose de irradiação, à exceção da dose de 0,5 kGy, para esse tipo de embalagem. Houve forte redução da germinação das sementes a partir da dose de 2,5 kGy. Eles afirmam que baixas doses de radiação apresentam a capacidade de estimular os biosistemas, invertendo o efeito com o aumento da dose, o que pode explicar o resultado do aumento da germinação para a irradiação de 0,5 kGy (teoria denominada Hormese). No presente estudo, todos os amendoins não-irradiados, seja da CEASA ou de Petrolândia, apresentaram germinação.

Santos et al. (2010) submeteram sementes de amendoim, variedade Havana, a várias doses de irradiação e concluíram que o tratamento com radiação gama afetou negativamente o vigor e a germinação das sementes de amendoim; as doses de 0,5, e 1,5 kGy resultaram em perda de germinação; a dose de 3 kGy inviabilizou a utilização das sementes para o plantio e doses acima de 12 kGy comprometeram totalmente o vigor e a germinação das sementes. No presente estudo a partir de 6 kGy já havia total inibição de germinação dos grãos de Petrolândia e da CEASA.

Prado et al (2006), ao analisarem amendoins irradiados, perceberam que em grãos irradiados e desinfetados houve uma redução da infecção fúngica a 5 kGy e destruição total de fungos a 10 kGy, após 180 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Em grãos irradiados e não desinfetados externamente com hipoclorito foram

verificados, em função do tempo de armazenamento, aumento da população de fungos com a dose de 1 kGy, redução com a dose de 5 kGy e eliminação total com a aplicação de 10 kGy. Este estudo corrobora com os dados obtidos das amostras de Petrolândia.

Nas amostras analisadas foram encontrados outros fungos em pequenas quantidades, devido à contaminação pelo ar ou oriundos das vagens, e foram isolados em meio BDA e CYA: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Aspergillus niger*.

Gonçalez (2008) realizou um trabalho em Junqueirópolis-SP, demonstrando que a presença de *A. flavus* no solo do local do plantio contribuiu para a contaminação por aflatoxinas nas cascas de amendoim nos frutos maduros, antes da colheita. Ele relatou que os principais fungos isolados nas cascas de amendoim foram: *Fusarium* ssp. (78,75 %), *Rhizopus* ssp. (14,1 %) e *A. flavus* (11,75 %), *A. niger* (2,5 %), *Trichoderma* ssp. (0,8 %), *Penicillium* ssp. (0,7 %). O resultado encontrado por ele está bem próximo do resultado observado no presente trabalho.

As cascas de amendoim são utilizadas para confecção de cama de frangos, ração de gado leiteiro e como fonte de fibras para ruminantes, portanto o estudo dos mecanismos de contaminação por fungos toxigênicos oriundos das cascas tem importância na elaboração de medidas preventivas.

4.2 Análise da produção de aflatoxinas em meio LCA

A amostra que produziu fluorescência em meio LCA, ou seja, com produção de aflatoxinas, foi apenas a amostra não-irradiada, obtida da CEASA-PE, sem vagem, com tratamento por hipoclorito. Todos os outros *Aspergillus* isolados não apresentaram fluorescência, indicando que quase 100% dos isolados não são toxigênicos. A Figura 8 ilustra o fungo *A. flavus* já isolado em meio LCA, sendo submetido à radiação Ultravioleta (365nm), onde é possível observar a diferença de fluorescência entre uma amostra com resposta positiva e negativa de aflatoxina.

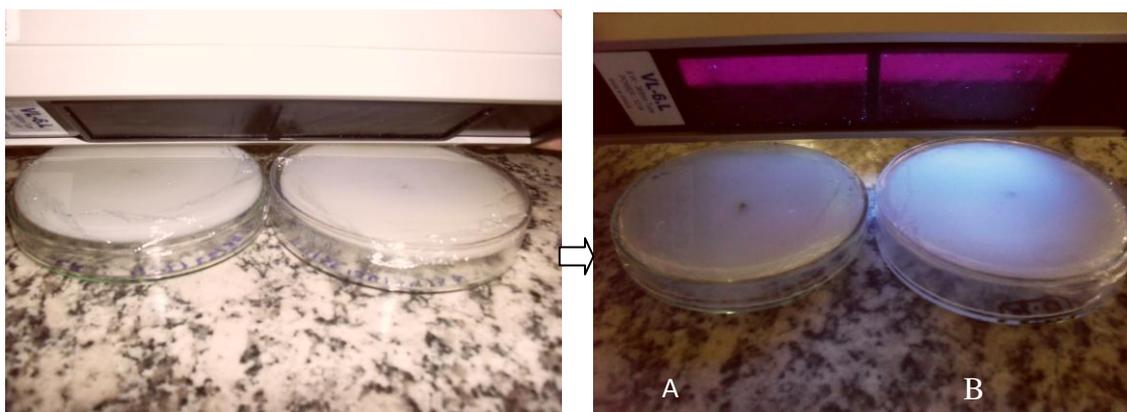


Figura 8: *Aspergillus* aflatoxigênicos em meio LCA, isolados de amendoins da CEASA, sendo submetidas à radiação U.V. (365nm), produzindo fluorescência azul e evidenciando produção de aflatoxina: A. resultado negativo; B. resultado positivo.

O meio LCA fornece melhores condições para o crescimento de *Aspergillus* aflatoxigênicos devido à disponibilidade de proteínas, carboidratos com predominância de sacarose, lipídeos, fibras e cinzas existentes no leite de coco, além de manifestar fluorescência de média e alta intensidade após 48 horas de incubação (BIZZETTO et al, 1997). Porém, é um meio que indica apenas presença ou ausência de aflatoxinas, não sendo possível sua quantificação.

Mallmann et al (2003), ao analisarem 664 amostras de amendoim, utilizando cromatografia, verificaram que 31,33% das amostras comercializadas no Rio Grande do Sul apresentaram contaminação por aflatoxinas. Destas, 47,1% apresentaram contaminação acima do permitido pela Legislação (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), e a maioria dessas amostras era proveniente de produtores informais que comercializavam seu produto sem fiscalização.

4.3 Análise da produção de aflatoxinas em meio AFPA

Nas amostras obtidas de Petrolândia, foi observado que a radiação gama inibiu o crescimento de fungos em todas as amostras irradiadas e apresentou baixa taxa de infecção por *Aspergillus* aflatoxigênicos nas amostras não-irradiadas, com ou sem vagem, sendo 20% a taxa média da infecção. Os dados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 5: Taxa de infecção por *Aspergillus* aflatoxigênicos, em meio AFPA, nos amendoins obtidos do produtor de Petrolândia-PE.

DOSE (kGy)	VAGEM	<i>Aspergillus</i> aflatoxigênicos (%)	Outros fungos(%)
0	SEM	13,3	30
0	COM	30	27
6	SEM	0	0
6	COM	0	0
9	SEM	0	0
9	COM	0	0
12	SEM	0	0
12	COM	0	0
15	SEM	0	0
15	COM	0	0

Tabela 6: Taxa de infecção por *Aspergillus* aflatoxigênicos, em meio AFPA, nos amendoins obtidos da CEASA-PE.

DOSE (kGy)	VAGEM	<i>Aspergillus</i> aflatoxigênicos (%)	Outros fungos(%)
0	SEM	43,3	30
0	COM	40	30
6	SEM	6,6	10
6	COM	0	27
9	SEM	0	0
9	COM	0	0
12	SEM	0	0
12	COM	0	17
15	SEM	0	27
15	COM	0	33

Nas amostras da CEASA, a taxa de infecção para *Aspergillus* aflatoxigênicos foi de 43,3% e 40%, respectivamente, para amendoins não irradiados, sem/com vagens; e em média 3,0% para a dose de 6 kGy, conforme Tabela 6.

Foi observado também o crescimento de *Aspergillus niger* e outros fungos nas amostras não-irradiadas de Petrolândia e da CEASA.

Na Figura 9 observam-se amendoins não irradiados, onde é evidente a coloração laranja dos *Aspergillus* aflatoxigênicos no reverso da placa e sua diferença para o fungo *Aspergillus niger* que apresenta coloração diferente na frente da placa (preto) e ausência de coloração laranja no reverso da placa. Esse resultado mostra que a coloração diferencial do meio AFPA facilita bastante na identificação, isolamento e cálculo da taxa de infecção por *Aspergillus* aflatoxigênicos.

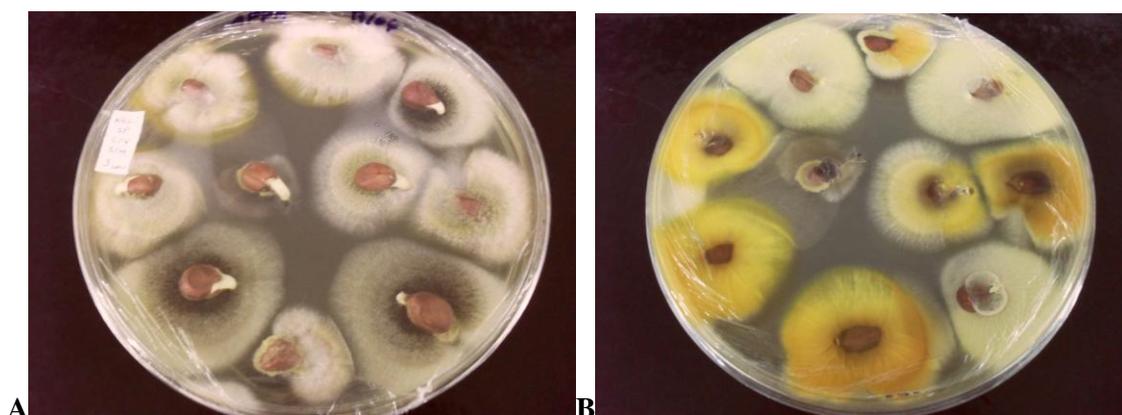


Figura 9: Crescimento de *Aspergillus* aflatoxigênicos em amendoins não irradiados, apresentando cor laranja no reverso da placa de Petri em meio AFPA: A. frente; B. reverso.

A Figura 10 mostra uma placa com amendoins irradiados na dose de 9kGy, na qual se pode evidenciar a ausência de fungos e de germinação, diferentemente das amostras não-irradiadas, que além de apresentar presença de fungos também apresentaram germinação. Todas as amostras irradiadas inibiram o aparecimento de germinação.

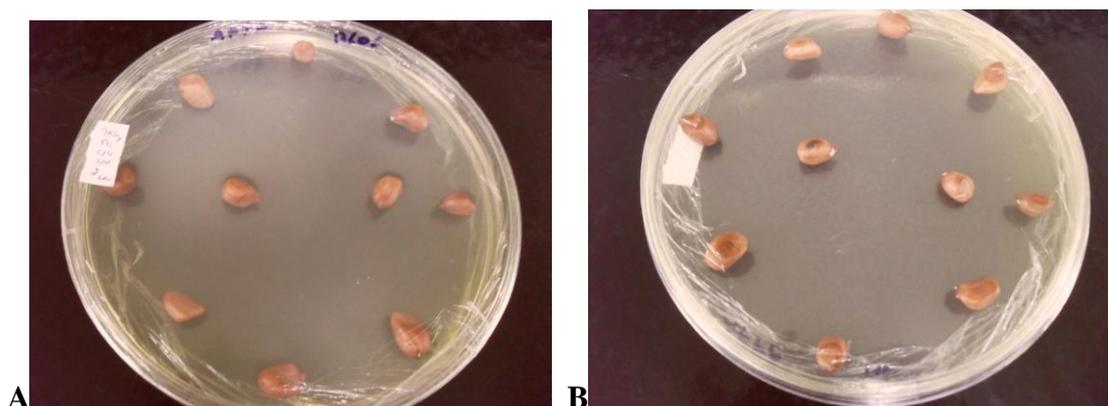


Figura10: Ausência de crescimento fúngico em amendoins irradiados com 9kGy, em meio AFPA. A. frente da placa; B. reverso.

4.4 Análise da composição centesimal dos amendoins.

Nas Figuras 11 e 12 podem ser visualizados os gráficos gerados a partir dos dados obtidos dos testes da composição nutricional das amostras obtidas da CEASA e do produtor de Petrolândia, desde a amostra controle (não-irradiada) até a dose de 15 kGy, onde pode ser feita uma comparação geral dos cinco testes realizados.

Nas figuras seguintes (Figuras 13 a 18), os gráficos podem ser observados separadamente, possibilitando uma comparação mais minuciosa entre a amostra da CEASA e de Petrolândia. Provavelmente as variedades dos amendoins são diferentes para as duas procedências. As características do solo onde foram colhidos e o armazenamento após a colheita podem ter influenciado na quantidade de seus nutrientes.

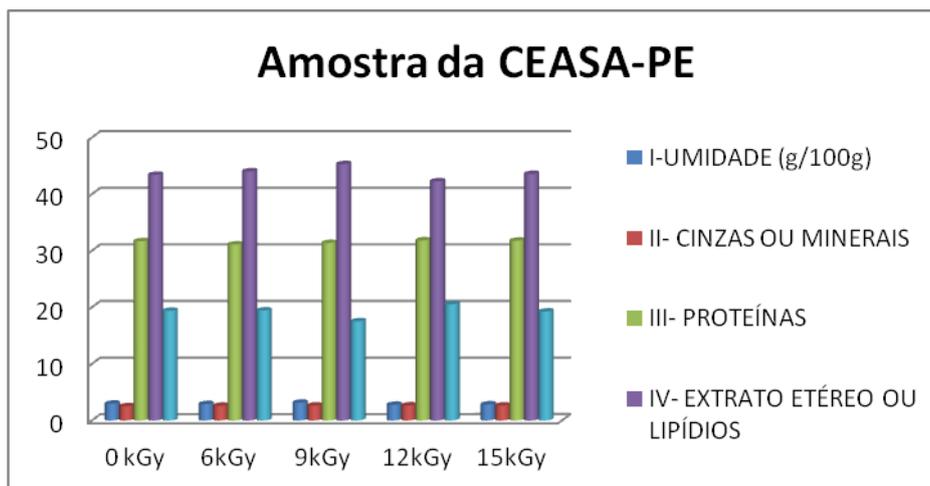


Figura 11: Comparação entre os valores da composição centesimal de amendoim submetido a diferentes doses de irradiação. Amostras da CEASA.

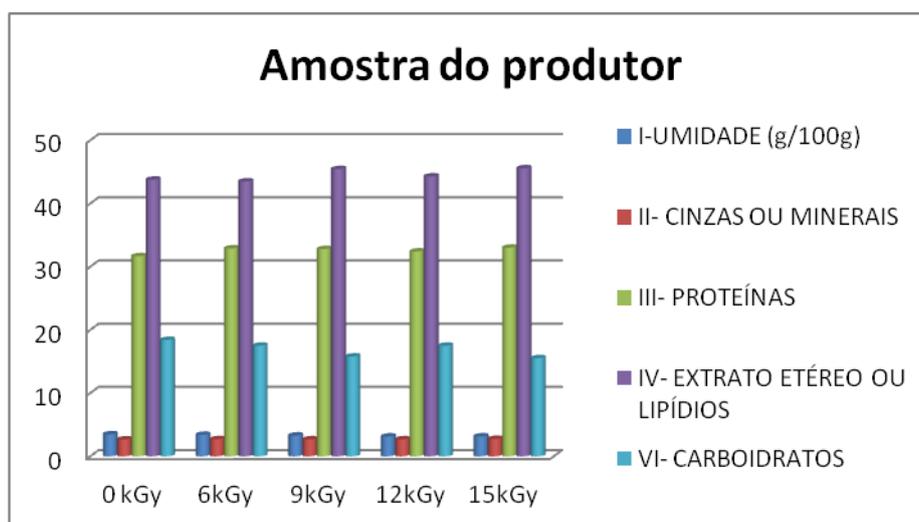


Figura12: Comparação entre os valores da composição centesimal de amendoim submetido a diferentes doses de irradiação. Amostras de Petrolândia.

De acordo com Camargo et al, (2011), a composição de ácidos graxos em grãos de amendoim varia entre cultivares, sendo a relação entre ácidos Oleico e Linoleico (O/L) determinante da vida de prateleira do amendoim ou de produtos que contenham amendoim em sua composição.

Estudos sobre os efeitos das radiações ionizantes em macronutrientes (carboidratos, lipídios e proteínas) demonstram que não há variações significativas em doses de até 10 kGy. Entre micronutrientes, os aminoácidos essenciais, ácidos graxos essenciais, minerais e a maior parte das vitaminas não são afetados nas condições normais de irradiação. Poucas vitaminas, como B₁ e E, são parcialmente decompostas. Para minimizar perdas dessas vitaminas, deve-se diminuir a concentração de oxigênio durante a irradiação e armazenamento, utilizando embalagem a vácuo ou atmosfera de nitrogênio (PRADO, 2005).

Os teores de umidade (figura 13) para as amostras da CEASA apresentaram valor mínimo de 2,76g/100g (a 12 kGy), e o valor máximo de 3,12g/100g (a 9 kGy). Já para as amostras de Petrolândia, o valor mínimo foi de 3,14g/100g (a 12 kGy) e o valor máximo foi de 3,48g/100g (não irradiado). Pela estatística, os valores não foram significativos a 5% para CEASA, mas foram significativos para Petrolândia.

Os valores encontrados no presente trabalho corroboraram com o estudo de Alves et al (2011), que afirmaram que nos fatores dose e embalagens a influência da umidade é pequena quando comparada com o tempo, devendo-se essas variações, provavelmente, à umidade relativa do ar e à temperatura durante o período do armazenamento.

A umidade é de grande importância econômica por refletir o teor de sólidos de um produto e sua perecibilidade. Quando está fora das recomendações técnicas resulta em perdas na estabilidade química, na deterioração microbiológica, alterações fisiológicas (brotação) e na qualidade geral dos alimentos (VICENZI, 2008).

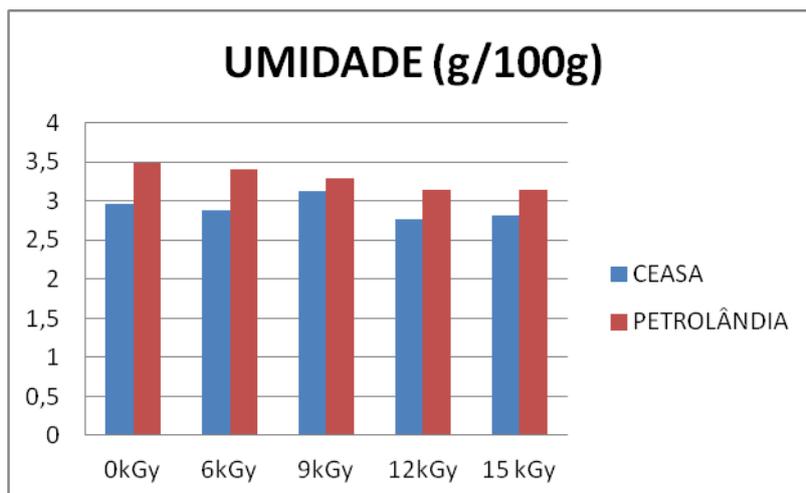


Figura 13: Teor de umidade das amostras de amendoim.

Os teores de cinzas (figura 14) para as amostras da CEASA apresentaram o valor mínimo de 2,51g/100g (não irradiado) e valor máximo de 2,63g/100g (15 kGy). Já as amostras de Petrolândia apresentaram valor mínimo de 2,67g /100g (não irradiado) e valor máximo de 2,75g /100g (15 kGy). Observou-se que os amendoins de Petrolândia apresentaram teores de cinzas mais altos do que os teores encontrados para os amendoins da CEASA para todas as doses analisadas. Pela estatística, os valores foram significativos a 5% para a CEASA e para Petrolândia.

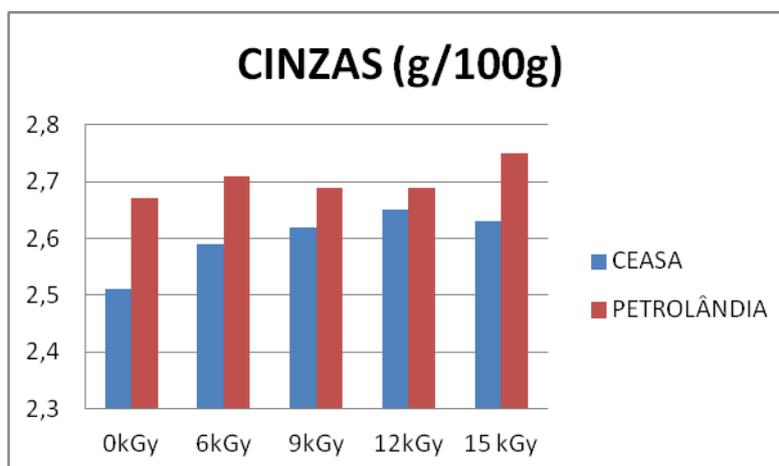


Figura 14: Teor de cinzas das amostras de amendoim.

O teor mínimo de proteína (figura 15) para as amostras da CEASA foi de 31,09 g/100g (6 kGy) e o valor máximo foi de 31,82g /100g (12 kGy). Para as amostras de Petrolândia, o valor mínimo foi de 31,66g /100g (não irradiado) e o valor máximo de 33,01g/100g (15 kGy).

Para o teor de proteínas, os amendoins não irradiados de Petrolândia apresentaram valores iguais ao da CEASA. Porém, observa-se que o aumento da dose de radiação provocou variações nos teores de proteínas, principalmente para as amostras de Petrolândia, que tiveram os seus teores aumentados, enquanto que nas amostras da CEASA houve pouca alteração. Pela estatística, os valores não foram significativos a 5% para CEASA, mas foram significativos para Petrolândia.

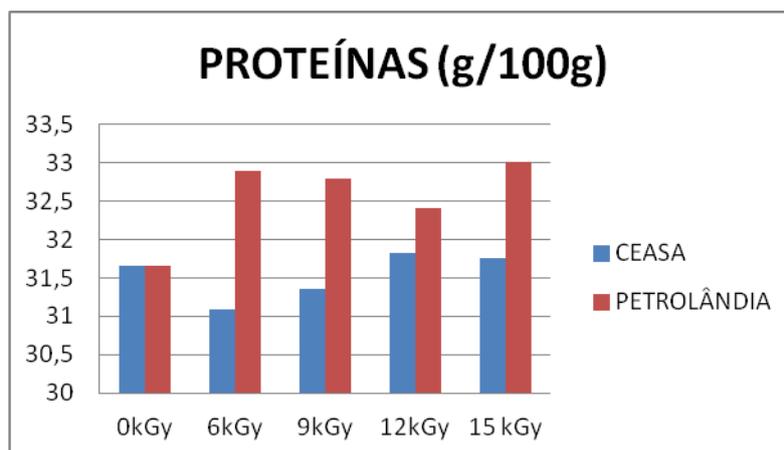


Figura 15: Teor de proteínas para as amostras de amendoim.

As amostras da CEASA apresentaram um valor mínimo dos teores de lipídeos (figura 16) de 42,25g/100g (12kGy) e o valor máximo de 45,29g/100g (9 kGy). Já as amostras de Petrolândia apresentaram os seguintes valores: mínimo de 43,49g/100g (6 kGy) e máximo de 45,57g /100g (15 kGy).

Os valores obtidos para o teor de lipídeos de amendoins de Petrolândia foram maiores do que os valores encontrados para a amostra da CEASA, a única exceção é na dose de 6 kGy. Nas doses 9 e 15 kGy os amendoins de Petrolândia apresentaram teores de lipídeos de, aproximadamente, 45g/100g, superiores à amostra não irradiada, e superando todos os valores encontrados nos amendoins da CEASA. A amostra da

CEASA teve um aumento progressivo até alcançar valor máximo na dose de 9 kGy, e depois atingiu um valor próximo ao controle na dose de 15 kGy. Pela estatística, os valores da CEASA e de Petrolândia não foram significativos a 5%.

Ao comparar as cultivares de amendoim IAC Tatu-ST e IAC-Runner 886 submetidos à radiação gama, Camargo et al (2011) concluíram que a irradiação alterou o perfil de ácidos graxos, diminuindo a porcentagem de ácidos graxos saturados, aumentando a porcentagem de ácidos graxos insaturados e aumentando a porcentagem de ácido linoleico, precursor de ácidos graxos de cadeia muito longa que atuam no desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina. Portanto, no presente trabalho, o aumento no teor de lipídeos causado pela radiação pode ser considerado como benéfico.

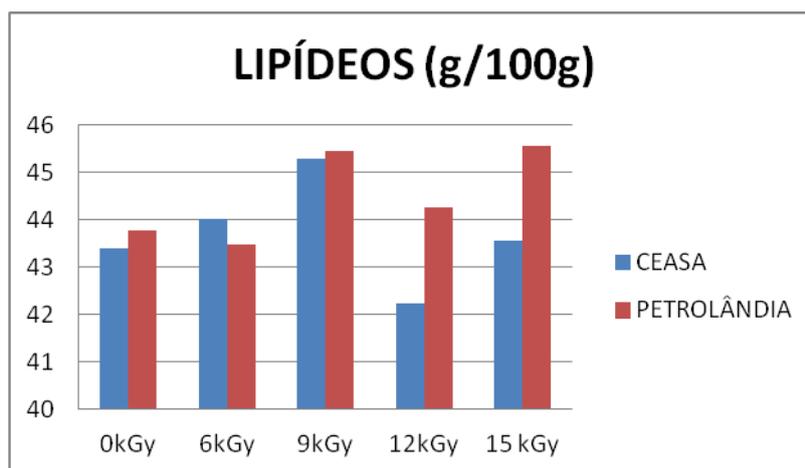


Figura 16: Teor de lipídeos das amostras de amendoim.

As amostras da CEASA apresentaram um valor mínimo de 17,31g/100g (9 kGy) para os teores de carboidratos (figura 17) e valor máximo de 20,52g/100g (12 kGy). As amostras de Petrolândia apresentaram um valor mínimo de 15,52g/100g (15 kGy) e valor máximo de 17,51g/100g (6 kGy).

Os amendoins da CEASA apresentaram valores de carboidratos maiores do que as amostras de Petrolândia, porém ambas as amostras apresentaram o mesmo comportamento com o aumento das doses de radiação. Pela estatística, os valores não foram significativos a 5% para a CEASA, mas foram significativos para Petrolândia.

A amostra não irradiada e as doses de 6 e 15 kGy da CEASA apresentaram valores bem próximos (aproximadamente 19 g/100g) quanto ao teor de carboidratos, enquanto que nos amendoins de Petrolândia todas as amostras irradiadas tiveram valores menores do que o valor controle (não irradiado).

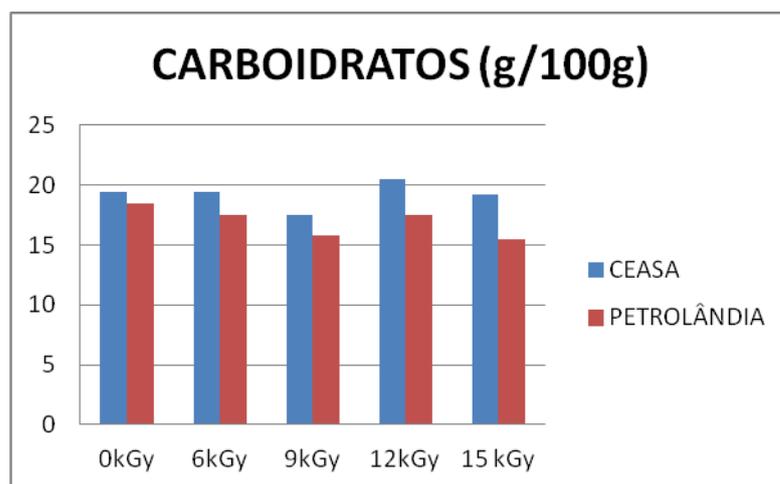


Figura 17: Teor de carboidratos das amostras de amendoim.

O valor calórico total (figura 18) das amostras da CEASA apresentaram o valor mínimo de 589,61kcal/100g (12 kGy) e o valor máximo de 603,09 kcal/100g (9 kGy). Enquanto que as amostras de Petrolândia apresentaram um valor mínimo de 593,01kcal/100g (6 kGy) e valor máximo de 604,25kcal/100g (15 kGy). Pela estatística, os valores da CEASA e de Petrolândia não foram significativos a 5% .

Nos amendoins da CEASA, o valor calórico total teve um aumento progressivo até alcançar valor máximo na dose de 9 kGy, e se aproximou do valor controle na dose de 15 kGy. Quanto aos amendoins de Petrolândia, o valor calórico total apresentou valores mais altos nas doses de 9 e 15 kGy. CEASA e Petrolândia tiveram teores de aproximadamente 603 kcal/100g na dose de 9 kGy. Esta variação na dose de 9kGy pode ser explicada pelo aumento observado nos teores de lipídios, já que o mesmo está incluso no cálculo, junto com os valores do carboidrato e da proteína

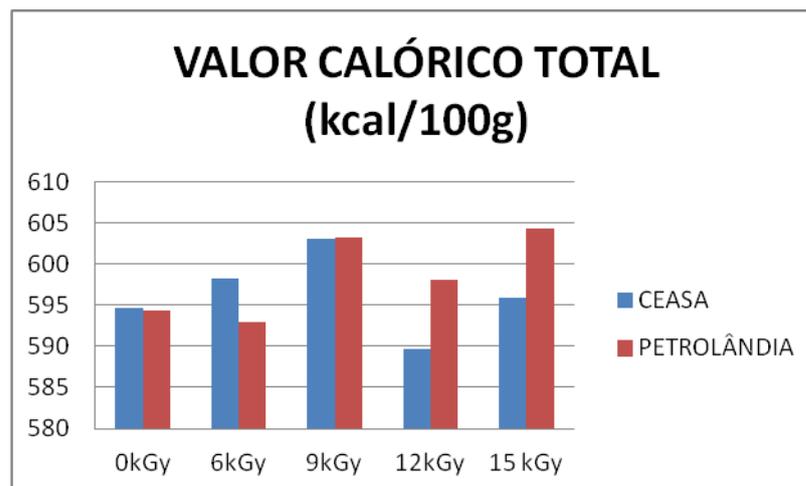


Figura 18: Valor calórico total das amostras de amendoim.

Em resumo, observou-se no presente trabalho que:

- ✓ As amostras controle (não-irradiadas) apresentaram brotamento e altas taxas de crescimento fúngico, seja de *Aspergillus* ou de fungos provenientes da vagem ou do ar.
- ✓ As amostras submetidas à radiação não apresentam brotamento, mas em doses mais baixas algumas amostras apresentam crescimento de outros fungos.
- ✓ As doses 9, 12 e 15 kGy são eficientes para evitar a infestação por *Aspergillus* aflatoxigênicos, mas podem não impedir a contaminação por outros fungos provenientes da vagem.
- ✓ As amostras provenientes da CEASA mostraram que as condições de transporte e armazenamento não foram adequadas, facilitando a contaminação prévia ao processo de irradiação.
- ✓ Quando transportados dentro das vagens, os amendoins apresentaram maior resistência à ação de fungos.
- ✓ A irradiação mostrou-se um processo confiável para conservação de amendoins, pois evita o desenvolvimento de fungos, principalmente *Aspergillus* aflatoxigênicos.

- ✓ A exposição à radiação ionizante, nas doses de 6, 9, 12 e 15 kGy provocou alterações significativas nos amendoins de Petrolândia para os teores de Umidade, Minerais, Proteínas e carboidratos.
- ✓ Na CEASA, houve alteração significativa apenas para o teor de cinzas.

5 CONCLUSÃO

A irradiação mostrou-se um processo eficaz para conservação de amendoins, pois previne o crescimento de fungos, principalmente *Aspergillus* aflatoxigênicos (*A. flavus*, *A. parasiticus*), evitando também a presença da aflatoxina no alimento, tornando-o mais seguro para consumo e aumentando o tempo de prateleira, sem provocar alterações na composição nutricional do amendoim.

6 REFERÊNCIAS

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Edited by Wilian Horwitz, 17th ed., 2000.

ALVES, N. M. C.; ALMEIDA, F. A. C.; GOMES, J. P.; LEAL, A. S. C. & SILVA, M. M. Viabilidade e microflora de sementes de amendoim irradiadas com cobalto (^{60}Co). *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambiental*, v.15, n.3, p.289–295, 2011.

ANVISA. Resolução nº 274, de 15 de outubro de 2002. Aprova o regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 de outubro de 2002.

ASSUNÇÃO, H. F.; ESCOBEDO, J. F.; CARNEIRO, M. A. C. Eficiência de uso da radiação e propriedades óticas da cultura do amendoim. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 38, n. 3, p. 215-222, jul./set. 2008.

ATAYDE, D. D. Microbiota fúngica e determinação de aflatoxinas em cultivar de amendoim plantado em diferentes regiões produtoras no Estado de São Paulo. Dissertação de mestrado apresentado ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BIZZETTO, A.; HOMECHIN, M.; DESTRO, D. Comparação de substratos utilizados para detecção de toxinas produzidas por *Aspergillus flavus* em soja, *Revista UNIMAR* 19(3):709-719, 1997.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e Ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Rev Saúde Pública*; v.36, n.3, p. 319-319; 2002.

CAMARGO, A. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; MANSI, D. N.; DOMINGUES, M. A. C.; ARTHUR, V. Efeitos da radiação gama na cor, capacidade antioxidante e perfil de ácidos graxos em amendoim (*Arachis hypogaea* L.), *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 31, n.1, p. 11-15, jan.-mar. 2011

CARDOSO, E. M. Apostila educativa: Aplicações da Energia Nuclear. Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), 2002. Disponível em: www.cnen.gov.br.

CIB, Conselho de Informações sobre Biotecnologia, ano 2, n. 5, agosto 2004.
Disponível em: www.cib.org.br

CRUSCIOL, C. A. C.; SORATTO, R. P. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.11, p.1553-1560, nov. 2007.

CTA, Centro Técnico para a Cooperação Agrícola e Rural/ ACP-EU. Micotoxinas em grãos. *Folheto técnico*, número 3, Países Baixos, junho de 1997.

EINLOFT, T. C.; HOELTZ, M.; NOLL, I. B. Aflatoxina B1 em amendoim e produtos derivados comercializados na cidade de Porto Alegre. X Salão de Iniciação Científica – PUCRS, 2009.

FAGUNDES, M. H. Sementes de Amendoim: alguns comentários. **SUGOF/GEFIP**, Outubro/2002.

FREIRE, R. M. M.; NARAINJ, N.; SANTOS, R. C.; FARIAS, S. R ; QUEIROZ, M. S. R. Composição Centesimal de Sementes de Amendoim de Três Tipos Botânicos. *Rev.oleag.fibr.*, Campina Grande,v.1, n.1, p. 135-142 dez. 1997.

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

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia de segurança alimentar**. Trad. Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt. – Porto Alegre: Artmed, 2002.

GONÇALEZ, E.; SOUZA, T. N.; ROSSI, M. H.; FELICIO, J.D.; CORRÊA, B. Avaliação da Micoflora e Ocorrência de Micotoxinas em cascas de Amendoim em Diferentes Estágios de Maturação da vagem, *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1380-1386, set./out., 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**/coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

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 ervamate. *B.CEPPA*, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 163-170, jul./dez. 2000.

LEAL, A. S.; KRAMBROCK, K.; GUEDES, K.; RODRIGUES, R. R. Ressonância paramagnética eletrônica–RPE aplicada à análise de especiarias irradiadas (com radiação gama). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 24, n.3, p. 427-430, jul. - set. 2004 427

LOPEZ, C.; RAMOS, L.; BULACIO, L.; RAMADAN, S.; RODRIGUEZ, F. Aflatoxin B1 content in patients with hepatic diseases. *Medicina (B. Aires)*, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, v. 62, n. 4, agosto 2002 .

MALLMANN, C. A.; KOWALSKI, C. H.; ALMEIDA, C. A.; MÜRMAN, L.; SILVEIRA, V. G. Prevalência de aflatoxinas em amendoim e seus derivados, destinados ao consumo humano, no Estado do Rio Grande do Sul. ANAIS. 2º SIMPÓSIO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2003.

MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; MEDEIROS, A. C. Obtenção de Biodiesel Metílico e Etílico a Partir do Óleo de Amendoim (*Arachis hypogaea* L.), por Transesterificação, em Presença de Catalisador Ácido e Básico. Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 2007.

MIDORIKAWA, G. E. O. Desenvolvimento de um método de PCR específico para detecção de *Aspergillus flavus* aflatoxigênicos em grãos brasileiros. Dissertação de mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, 2009.

MORAES, S. A. AMENDOIM: Principais doenças, manejo integrado e recomendações de controle. Acessado em: 11/7/2006. Disponível em: http://www.infobios.com/Artigos/2006_2/Amendoim/index.htm.

NASCIMENTO, I. S. O cultivo do amendoim forrageiro. *Bras. Agrociência*, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 387-393, out-dez, 2006.

NÓBREGA, F. V. A.; SUASSUNA, N. D. Análise sanitária de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) armazenadas em algumas áreas do estado da Paraíba, *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 4, n. 2, 2º Semestre, 2004.

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

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

ORNELLAS, C. B. D.; GONÇALVES, M. P. J.; SILVA, P. R.; MARTINS, R. T. Atitude do consumidor frente à irradiação de alimentos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, n.1, p. 211-213, jan.-mar. 2006.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, Oxford, v. 38, p. 17-22, Supplement 1, 2000.

PITTA, Rafael Major. Resistência de genótipos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) de hábitos de crescimento ereto e rasteiro a *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) /Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008.

POLIZEL, G. G. O uso da radiação no controle microbiológico dos alimentos de origem animal. Monografia de Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal e Vigilância Sanitária em Alimentos apresentado à Universidade Castelo Branco (UCB), São Paulo, nov. 2006.

PRADO, G. Influência da irradiação gama (^{60}Co) na microbiota fúngica e na aflatoxina B_1 em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) / Tese de doutorado em Ciência dos Alimentos, UFLA. Lavras-MG, 2005.

PRADO, G.; CARVALHO, E. P.; MADEIRA, J. E. G. C. ; MORAIS, V. A. D.; OLIVEIRA, M. S. ; CORRÊA, R. F.; CARDOSO, V. N. Efeito da irradiação gama (Co-60) na frequência fúngica de amendoim in natura em função do tempo de prateleira. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 30, n. 5, p. 930-936, set./out., 2006.

PRADO, G.; LEAL, A. S.; OLIVEIRA, M. S.; MORAES, V. A. D.; MADEIRA, J. E. G. C.; VIEIRA, I. F. R.; LIMA, A. S.; MOREIRA, A. P. A.; ANDRADE, M. C. Influência da radiação gama (^{60}Co) na Ocratoxina a e na microbiota fúngica de café (*Coffea arabica* L.). *R. Bras. Armaz.*, Viçosa - Especial Café, MG, n. 10, p. 42 - 48, 2008.

ROCHA, M. A. A.; SOUSA, Q-H. F. O uso de alimentos irradiados no tratamento de pacientes com baixa imunidade, Brasília-DF, set 2007. Disponível em <http://www.crtr01.org.br/html/pdf/irradiacao.pdf>

ROCHA, M. D.; MAIA, P. P.; RODRIGUES, M. A. C.; MARTINS, I. Incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas-MG, Brasil, *Revista Brasileira de Toxicologia* v.21, n.1, p.15 – 19, 2008

SANTOS, R. C.; FREIRE, R. M. M.; SUASSUNA, T. M. F.; REGO, G. M. Novas Cultivares BRS Havana: nova cultivar de amendoim de pele clara. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.41, n.8, p.1337-1339, ago. 2006.

SANTOS, T. S.; ALMEIDA, F. de A. C.; SUASSUNA, T. de M. F.; COUTINHO, W. M.; ALMEIDA, P. B. A. Resposta de sementes de amendoim a diferentes doses de radiação gama (60Co). *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.14, p.1074–1078, 2010.

SILVA, L. C. Respostas ecofisiológicas e desempenho agrônômico do amendoim cv. BR1 submetido a diferentes lâminas e intervalos de irrigação. Tese (Doutorado) em Recursos Naturais da Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande - PB, 1997.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. Livraria Varela Editora, 2ª edição, São Paulo: 2001.

SPICER, W. J. **Bacteriologia, Micologia e Parasitologia Clínicas**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 2002.

TAHA, O. G.; FONSECA, T. T.; SYLOS, C. M. Efeito da radiação microondas na redução dos teores de aflatoxinas em amendoim. *Alim. Nutr.* São Paulo, v. 12, p. 163-170, 2001.

VICENZI, R. Apostila de Análise de Alimentos, Química Industrial de Alimentos, UNIJUI, 2008.

VIEIRA, J. L. F. & MARTINS, N. M. Determinação de aflatoxinas em amostras de leite e amendoim consumidas na cidade de Belém-Pará. **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**, v.1, n.2, Julho de 2001. Disponível em: <http://www.ufpa.br/revistaic>

ZOVICO, C.; FONSECA, H.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; GLÓRIA, E. M.; BORGUINI, R. G.; SILVEIRA, V. P.; PIEDADE, S. S.; BARBIN, D. Seleção eletrônica pela cor na descontaminação de amendoim contaminado com aflatoxinas. *Sci. agric.*, Piracicaba, v. 56, n. 2, 1999.

ANEXOS

A - MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NO EXPERIMENTO

DRBC (Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol)

Digestão Péptica de tecido animal: 5.00g

Dextrose: 10.00 g· Fosfato Monopotássico: 1.00g

Sulfato de Magnésio: 0.50 g

Rosa Bengala: 0.02 g

Dicloran: 0.002 g

Agar: 15.00g

Preparo: Utilizar 15,75g de meio e adicionar água destilada para completar 1000ml.
Autoclavar.

AFPA (Ágar *Aspergillus flavus e parasiticus*)

Peptona bacteriológica: 10g

Extrato de levedura: 20g

Citrato férrico amoniacal: 0,5g

Cloranfenicol: 100mg

Ágar: 15g

Água destilada: 1 litro

Dicloran: 2mg (0,2% em etanol, 1ml)

Preparo: Dissolver todos os ingredientes e autoclavar a 121°C por 15 min.

LCA (Leite de Coco Agar)

Leite de coco: 100 ml

Dextrose: 10g

Ágar: 17g

Água destilada: 1000 ml

Preparo: Fundir o Agar em 500 ml de água destilada. Adicionar a dextrose e o leite de coco. Completar o volume para 1000 ml. Autoclavar. O leite de coco pode ser substituído por 500 ml de água de coco.

BDA (Batata Dextrose Agar)

Discos de batata sem pele: 200g

Dextrose: 20g

Ágar: 17g

Água destilada: 1000 ml

Preparo: Ferva os discos de batata em 500 ml de água destilada por 30 minutos. Filtrar o caldo. Fundir o ágar em 500 ml de água destilada. Adicionar a dextrose ao caldo e misture tudo no recipiente contendo o ágar fundido. Ajustar o volume com água para 1000ml. Distribuir o meio em tubos ou frascos de erlenmeyer e esterilizar em autoclave.

CYA (Czapek Yeast Autolysate)

NaNO₃: 0,3g

Extrato de levedura: 0,5g

Sacarose: 3g

K₂HPO₄.3H₂O: 0,13g

MgSO₄.7H₂O: 0,05g

KCl: 0,05g

FeSO₄.7H₂O: 0,001g

CuSO₄.5H₂O: 0,0005g

ZnSO₄.7H₂O: 0,001g

Ágar: 2g

Preparo: Misturar todos os ingredientes, fundir o ágar no aparelho de microondas e autoclavar.

B - RESULTADOS DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Relação entre composição centesimal e doses utilizadas em amendoins obtidos da CEASA.

DOSES (kGy)	0	6	9	12	15
I-UMIDADE(g/100g)	2,96	2,88	3,12	2,76	2,82
II- CINZAS OU MINERAIS (g/100g)	2,51	2,59	2,62	2,65	2,63
III- PROTEÍNAS (g/100g)	31,66	31,09	31,36	31,82	31,76
IV- EXTRATO ETÉREO OU LIPÍDEOS(g/100g)	43,40	44,01	45,29	42,25	43,55
VI- CARBOIDRATOS (g/100g)	19,37	19,43	17,51	20,52	19,24
VII- Valor Calórico Total (kcal/100g)	594,72	598,17	603,09	589,61	595,95

Relação entre composição centesimal e doses utilizadas em amendoins obtidos de pequeno produtor de Petrolândia-PE.

DOSES (kGy)	0	6	9	12	15
I-UMIDADE (g/100g)	3,48	3,40	3,29	3,14	3,15
II- CINZAS OU MINERAIS (g/100g)	2,67	2,71	2,69	2,69	2,75
III- PROTEÍNAS (g/100g)	31,66	32,89	32,79	32,41	33,01
IV- EXTRATO ETÉREO OU LIPÍDIOS (g/100g)	43,78	43,49	45,44	44,27	45,57
VI- CARBOIDRATOS (g/100g)	18,41	17,51	15,79	17,49	15,52
VII- Valor Calórico Total (kcal/100g)	594,30	593,01	603,28	598,03	604,25