

EFEITO DA IRRADIAÇÃO GAMA (^{60}Co) NA FREQUÊNCIA FÚNGICA DE AMENDOIM *in natura* EM FUNÇÃO DO TEMPO DE PRATELEIRA

Gamma-irradiation effect (^{60}Co) in fungi frequency of peanut *in natura* and after storage

Guilherme Prado¹, Eliana Pinheiro de Carvalho², Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira¹,
Vanessa Andréa Drummond Morais¹, Marize Silva de Oliveira¹,
Ricardo Ferracini Corrêa³, Valbert Nascimento Cardoso⁴

RESUMO

Foi verificado o efeito da irradiação gama (^{60}Co) na capacidade de destruir a microbiota fúngica, em amendoim em grão, cultivar Tatu Vermelho, da safra 2003 (segundo semestre). Os grãos de amendoim, após a irradiação, foram mantidos à temperatura ambiente em embalagem plástica comercial, durante 180 dias. Para a determinação da porcentagem fúngica foi utilizada a técnica do plaqueamento direto utilizando o meio Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), desinfetando ou não os grãos com solução de hipoclorito de sódio. Em grãos de amendoim irradiados e desinfetados externamente, observou-se 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 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. A irradiação gama, na dose de 10 kGy ou superior, demonstrou ser um processo eficaz na redução da microbiota fúngica de amendoim em grão, cultivar Tatu Vermelho.

Termos para indexação: Irradiação gama; aflatoxina B₁; amendoim, *Arachis hypogaea*.

ABSTRACT

Gamma-irradiation effect was verified on the capability of destroying the mycoflora of peanuts grain, Tatu Vermelho cultivar, 2003 crop (second semester). The peanuts grains, after irradiation, were kept at room temperature in plastic bags during 180 days. To determine the percentage of fungi, the direct plating technique was used and the grains were plated out on mycological media dichloran rose bengal chloranphenicol (DRBC), being disinfected or not with sodium hypochlorite solution. Irradiated and disinfected peanuts was observed a reduction of fungi infection at 5 kGy and total fungi destruction at 10 kGy, after 180 days in storage at room temperature. Irradiated and non disinfected grains showed a increase of fungi population with 1 kGy dose, reduction with 5 kGy dose and total destruction with 10 kGy dose. Gamma-irradiation in 10 kGy dose or higher, showed to be an efficient process to reduce the mycoflora of peanuts, Tatu Vermelho cultivar.

Index terms: **Gamma irradiation; aflatoxin B₁; peanut, *Arachis hypogaea*.**

(Recebido para publicação em 22 de novembro de 2005 e aprovado em 20 de março de 2006)

INTRODUÇÃO

Somente nos últimos 30 anos tornou-se claro que o desenvolvimento de fungos filamentosos em alimentos e rações pode resultar na produção de toxinas, conhecidas como micotoxinas, as quais são definidas como metabólitos secundários, ou seja, não apresentam nenhuma função no metabolismo normal que envolve o desenvolvimento dos fungos. São compostos de baixo peso molecular, produzidos no final da fase log de crescimento e que provocam resposta tóxica em vertebrados e outros animais quando ingeridos em baixa concentração (PITT, 2000).

Muitos fungos filamentosos capazes de produzir micotoxinas são também freqüentes contaminantes de alimentos e produtos agrícolas. Os fungos micotoxigênicos associados com a cadeia alimentar abrangem basicamente

três gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (PITT et al., 2000). Os fungos pertencentes aos dois primeiros gêneros são comumente encontrados como contaminantes de alimentos durante a secagem e armazenamento, enquanto o último é descrito como patógeno de plantas que produz micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita (SWEENEY & DOBSON, 1999).

O processo de prevenção e controle das micotoxinas, após mais de 40 anos da sua descoberta, ainda não apresentou um modelo seguro, eficaz e de solução definitiva. A técnica de radiação ionizante é um processo físico que está sendo utilizado atualmente com o objetivo de aumentar a vida de prateleira e aprimorar a segurança dos alimentos pela desinfecção de grãos, especiarias, vegetais e frutas secas; inibição de brotamento de bulbos; destruição de parasitas em carnes vermelhas e retardo na

¹Fundação Ezequiel Dias – Rua Conde Pereira Carneiro, 80 – 30510-010 – Belo Horizonte, MG – gui@funed.mg.gov.br

²Universidade Federal de Lavras – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG.

³Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/CDTN – Rua Prof. Mário Werneck, s/n – Campus Pampulha – 30.123-970 – Belo Horizonte, MG.

⁴Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG – Av. Antônio Carlos, 6627 – campus UFMG Pampulha – 31.270-901 – Belo Horizonte, MG.

maturação de frutas e vegetais, sem alterar a temperatura natural do produto (CAST, 2003).

Algumas investigações descritas na literatura mundial destacam a eficiência da irradiação gama, em diferentes doses, na destruição de espécies fúngicas de *Aspergillus* e *Penicillium* em diferentes alimentos (AZIZ et al., 2002; AZIZ & MAHROUS, 2003; RODRIGUES-JORGE & GARZÓN, 1993). Entretanto, a realização deste trabalho se justifica pelo fato de ainda não ter sido relatado o efeito da irradiação gama na capacidade de redução da porcentagem fúngica natural do amendoim, cultivar Tatu Vermelho, plantado no Brasil, em função da dose aplicada e do tempo de armazenamento.

No Brasil, a legislação que trata do emprego da irradiação em alimentos é a Resolução RDC N.º 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001). As doses a serem aplicadas devem ser compatíveis com os efeitos desejados, não tendo a legislação fixado valores mínimos ou máximos.

O objetivo do trabalho foi verificar o efeito da irradiação gama (^{60}Co), em diferentes níveis, na porcentagem de infecção fúngica de amendoim *in natura*, cultivar Tatu Vermelho, com e sem o processo de desinfecção dos grãos, em função do tempo de prateleira.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas amostras de amendoim em grão *in natura* (18 kg) enviadas pela Santa Helena Indústria de Alimentos S. A. (Ribeirão Preto - São Paulo), cultivar Tatu Vermelho, da safra do segundo semestre de 2003, isentas de aflatoxinas.

Preparo das amostras para o processo de irradiação

Para cada experimento, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, contendo cerca de 500 g cada, reproduzindo a embalagem comercial exposta no comércio. Todo este procedimento foi executado em câmara de fluxo laminar.

Procedimento de irradiação e acondicionamento posterior das amostras

O processo de irradiação foi executado no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN/MG. A taxa de dose utilizada foi por volta de $6,0 \text{ kGy.h}^{-1}$ e o irradiador com uma fonte de ^{60}Co é de tecnologia da Nordion Canadian.

Para o experimento 1 (amostras em duplicata) foram utilizadas as doses de irradiação gama de 0, 1, 5 e 10 kGy. Imediatamente após o processo de irradiação foi efetuada a determinação da porcentagem fúngica, representando o tempo zero. As embalagens que continham o restante das amostras foram devidamente fechadas e deixadas à temperatura ambiente durante 20, 60 e 180 dias, sendo determinada a população de fungos para cada tempo.

Para o experimento 2 (amostras em triplicata) foram utilizadas as doses de 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 kGy. Após o processo de irradiação foi efetuada também a determinação da porcentagem fúngica, representando o tempo zero. As embalagens que continham o restante das amostras foram devidamente fechadas, e deixadas à temperatura ambiente durante 60 e 180 dias, sendo novamente efetuada a determinação da contaminação fúngica.

Meio de cultivo

Foi utilizado o meio de cultura Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC/Difco), conforme recomendado por King et al. (1979) e Pitt & Hocking (1999).

Isolamento e determinação fúngica

A quantificação da contaminação fúngica foi efetuada utilizando a técnica do plaqueamento direto, segundo Pitt & Hocking (1999), considerada por Ismail (2000) a técnica adequada para isolamento de fungos em amendoim em grão.

Os grãos de amendoim de cada uma das amostras do experimento 1 foram desinfetados externamente, por imersão, em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,4%, por 2 minutos. Posteriormente, de cada uma das duas amostras irradiadas, por dose de irradiação aplicada, distribuíram-se, em duplicata, 5 grãos/placa, em um total de 10 placas (50 grãos) contendo o meio de cultivo DRBC, preparado como sugerido por Taniwaki & Silva (2001). Foram utilizados, portanto, 200 grãos de cada amostra por nível de irradiação. Seguiu-se incubação a 25°C durante 5 dias, e então foi observado o crescimento fúngico. Os resultados foram expressos em porcentagem de contaminação fúngica interna após 0, 20, 60 e 180 dias de acondicionamento à temperatura ambiente.

As amostras irradiadas do experimento 2 (em triplicata), não sofreram o processo de desinfecção e foram distribuídas, da mesma forma, utilizando 5 grãos/placa, em um total de 10 placas (50 grãos) contendo o meio DRBC. Foram utilizados, portanto, 150 grãos de cada amostra por nível de irradiação. Seguiu-se incubação a 25°C durante 5 dias, e então foi observado o crescimento fúngico. Os resultados foram

expressos em porcentagem de infecção após 0, 60 e 180 dias de acondicionamento à temperatura ambiente.

Delineamento experimental e análise estatística

No experimento que envolveu desinfecção externa com hipoclorito, a análise estatística foi feita por meio de um delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial, cujos fatores foram doses (0, 1, 5 e 10 kGy) e tempo (0, 20, 60 e 180 dias). Os dados foram submetidos à análise de variância para verificar a presença de efeitos significativos e, nestes casos, foi aplicado o teste de Tukey para determinar as diferenças entre as médias, em nível de 5% de significância. Foram utilizados os recursos do *software* estatístico SAS (SAMPAIO, 1998; SAS INSTITUTE, 1996).

Em relação à variável porcentagem de infecção sem desinfecção externa, foi utilizada a técnica exploratória de dados, mais especificamente os gráficos “Box-Plot” (BUSSAB & MORETTIN, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se pela Tabela 1 que a irradiação gama reduziu a contaminação fúngica em amendoim, previamente desinfetado, nas três doses utilizadas e

durante todo o intervalo de tempo do experimento. Na dose de 10 kGy não foi observado crescimento fúngico, mesmo após 6 meses de armazenamento à temperatura ambiente. Chiou et al. (1990), verificando o grau de contaminação fúngica natural em grãos de amendoim, após irradiação com ^{60}Co em doses de 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0 kGy, observaram que a 2,5 kGy, 45% das sementes ainda apresentavam fungos viáveis, mostrando crescimento após 3 dias de incubação a 30°C, em meio de Ágar Dextrose Batata. Os fungos foram completamente eliminados em dose igual ou maior a 5,0 kGy.

Os resumos das análises estatísticas referentes à Tabela 1 são mostrados nas Tabelas 2 e 3. O valor correspondente a 10 kGy (0%) não foi incluído.

Considerando o nível de significância fixado em 5% e analisando os resultados mostrados na Tabela 2, pode-se verificar que os efeitos principais, doses de irradiação gama e tempo foram significativos, isto é, seus respectivos níveis apresentaram pelo menos uma média diferente das demais. Em relação à interação doses*tempo, observou-se resultado significativo ($p < 0,05$). Assim sendo, constatou-se dependência entre os fatores avaliados. Portanto, tornou-se necessária melhor investigação por meio do desdobramento das doses em função do tempo, cujos resultados estão na Tabela 3.

TABELA 1 – Porcentagem de contaminação fúngica em amendoim *in natura*, previamente irradiado (^{60}Co) e externamente desinfetado, seguido de armazenamento à temperatura ambiente por diferentes períodos de tempo.

Irradiação Gama (kGy)	Tempo (dias)			
	0	20	60	180
	% Infecção ¹			
0	24a	16a	17a	15a
1	21a	12a	7b	6b
5	6b	8b	5b	3b
10	0	0	0	0

¹ Os valores numéricos representam a média de 4 repetições.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na vertical não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

TABELA 2 – Análise de variância para a resposta porcentagem de contaminação fúngica.

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Doses	2	650.2500	51.336	0.0000
Tempo	3	193.4444	15.272	0.0000
Doses*Tempo	6	44.6944	3.529	0.0075
Erro	36	12.6666		
Total	47			

Coefficiente de variação (%) = 31,6.

Constatou-se que o efeito dose para todos os tempos avaliados apresentou pelo menos uma média diferente das demais para nível de significância de 5%. A identificação dessas diferenças foi registrada pelo teste de Tukey, conforme mostrado na Tabela 1.

Considerando que provavelmente a indústria de alimentos venha futuramente a utilizar a irradiação gama como uma alternativa no processo de conservação e garantia de qualidade de grãos, não irá realizar o processo de desinfecção após a irradiação, os dados da Tabela 4 refletem melhor a realidade.

Observa-se que a porcentagem de infecção fúngica nas amostras de amendoim em grão, não irradiadas e sem desinfecção, aumentou de 82% para 90,7% e para 100%, no tempo de 0, 60 e 180 dias, respectivamente. Resultados idênticos foram obtidos por Bhattacharya & Raha (2002) na Índia, após observarem durante um ano, em um armazém da cidade de Santinikihan, a microbiota fúngica de amendoim em grão. O grau inicial de contaminação fúngica foi de 70%, atingindo 100% no final do experimento.

Para um melhor entendimento dos resultados obtidos foi executada análise exploratória da porcentagem de contaminação através dos gráficos denominados por "Box-Plot". As médias são representadas por pontos e a

variabilidade dos resultados pela amplitude de cada caixa. O valor nulo corresponde a um traço. Em doses inferiores a 10 kGy notaram-se respostas diferenciadas, ocasionando uma variabilidade que é demonstrada pelas amplitudes de cada caixa (Figuras 1, 2 e 3).

Foi observado aumento da porcentagem de grãos contaminados depois de 60 e 180 dias, quando as amostras foram irradiadas com 1 kGy e não foram desinfetadas com hipoclorito. A partir de 5 kGy, os níveis de contaminação fúngica apresentaram valores inferiores após o tempo inicial de armazenamento, indicando que a partir dessa dose, mesmo que não tenha ocorrido morte dos fungos, ocorreu algum tipo de injúria que afetou o desenvolvimento. Nota-se também que, com a irradiação com ^{60}Co em doses de 10, 15, 20, 25 e 30 kGy os níveis de contaminação foram reduzidos para 0%, tanto no início da estocagem como depois de 6 meses de permanência à temperatura ambiente. Aziz & Youssef (2002) observaram também que com uma irradiação de 5 kGy (^{60}Co) os fungos em amendoim em grão eram praticamente eliminados, sendo que a contagem inicial de $8,2 \times 10^4$ UFC/g foi reduzida para <10 UFC/g, sugerindo que a irradiação gama é uma boa alternativa para o controle de fungos em amendoim em grão, quando uma dose de 5 kGy ou maior for aplicada.

TABELA 3 – Análise de variância dos níveis de doses de irradiação gama fixado o tempo.

FV	GL	QM	Pr>Fc
Doses /0	2	380.3333	0.0000
Doses /20	2	72.3333	0.0067
Doses /60	2	185.3333	0.0000
Doses/180	2	146.3333	0.0001
Resíduo	36	12.6667	

TABELA 4 – Porcentagem de contaminação fúngica em amendoim *in natura*, previamente irradiado (^{60}Co) e sem desinfecção, seguido de armazenamento à temperatura ambiente por diferentes períodos de tempo.

Irradiação (kGy)	Tempo (dias)		
	0	60	180
	% Infecção ¹		
0	82,0	90,7	100,0
1	59,1	64,0	75,3
5	17,3	7,3	4,0
10	0	0	0
15	0	0	0
20	0	0	0
25	0	0	0
30	0	0	0

1 – Valores numéricos representam média de 3 repetições.

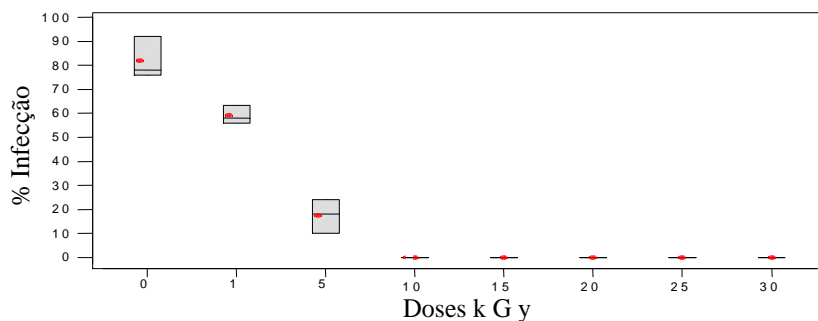


FIGURA 1 – Box-Plot para as doses de irradiação fixado o tempo 0 (dias) – início do experimento.

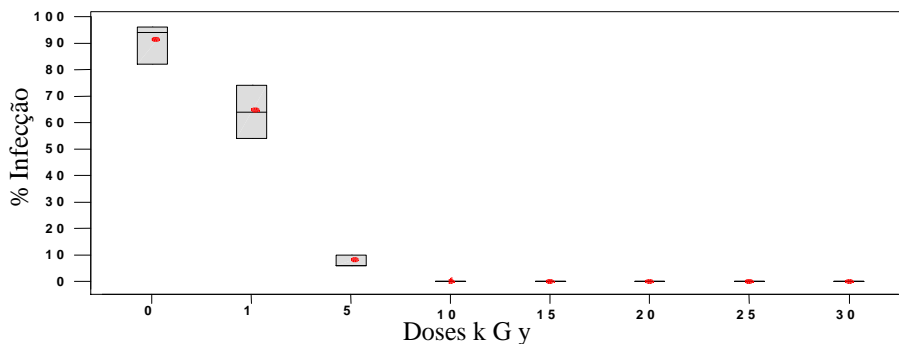


FIGURA 2 – Box-Plot para as doses de irradiação fixado o tempo 60 (dias).

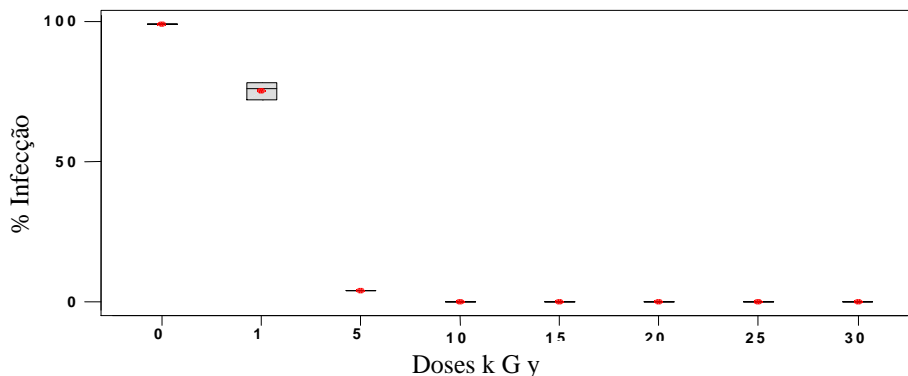


FIGURA 3 – Box-Plot para as doses de irradiação fixado o tempo 180 (dias).

Observa-se que a porcentagem de contaminação fúngica inicial dos grãos de amendoim, sem desinfecção com hipoclorito, atingiu 82%, enquanto 24% dos grãos estavam contaminados inicialmente com fungos após o processo de desinfecção. Portanto, o valor de 24%, representa, na realidade, a porcentagem de fungos que efetivamente invadiram os grãos. Aziz et al. (1994), analisando amostras de grãos de amendoim comercializadas

no Cairo (Egito), observaram crescimento fúngico em 75% das sementes desinfetadas superficialmente, enquanto detectou-se crescimento de fungos em 85% das sementes não desinfetadas. Em amostras de amendoim coletadas em diferentes supermercados de dois países tropicais da África (Uganda e Kênia), foram registrados 69% e 74%, respectivamente, de infestação com fungos após descontaminação com hipoclorito (ISMAIL, 2000).

CONCLUSÕES

O amendoim em grão não irradiado e não desinfetado externamente proporcionou aumento do grau de contaminação fúngica durante o período de armazenamento.

Irradiação gama (⁶⁰Co) na dose de 5 kGy é capaz de reduzir a porcentagem fúngica de amendoim em grão, após 20, 60 e 180 dias à temperatura ambiente, quando comparada à contaminação inicial e independentemente da utilização do processo de desinfecção.

Irradiação gama (⁶⁰Co) na dose de 10 kGy ou superior é capaz de eliminar a contaminação fúngica (0%) de amendoim em grão, por 6 meses, à temperatura ambiente, independentemente do processo prévio de desinfecção.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZIZ, N. H.; ABDEL-EL-AAL, S. S.; HEGAZIE, S. M. Peanut (*Arachis hypogaea* L.) as a substrate for growth and aflatoxin production by aflatoxigenic strains of *Aspergillus spp.* under some environmental conditions. **Al-Azhar Journal of Microbiology**, Cairo, v. 26, n. 1, p. 51-59, 1994.
- AZIZ, N. H.; EL-ZEANY, S. A.; MOUSSA, A. A. Influence of γ -irradiation and maize lipids on the production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus*. **Nahrung Food**, Cairo, v. 46, n. 5, p. 327-331, Oct. 2002.
- AZIZ, N. H.; MAHROUS, S. R. Effects of gamma irradiation and chemical composition of some crop seeds on aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus*. **Journal of Agricultural Sciences Mansoura University**, Cairo, v. 28, n. 1, p. 649-661, 2003.
- AZIZ, N. H.; YOUSSEF, B. M. Inactivation of naturally occurring of mycotoxins in some egyptian foods and agricultural commodities by gamma irradiation. **Egyptian Journal of Food Science**, Cairo, v. 30, n. 1, p. 167-177, 2002.
- BHATTACHARYA, K.; RAHA, S. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 155, n. 3, p. 135-141, 2002.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento para irradiação de alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 jan. 2001.
- BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística básica**. 5. ed. São Paulo: Atual, 2003. 205 p.
- CHIOU, R. Y. Y.; LIN, C. M.; SHYU, S. L. Property characterization of peanut kernels subjected to gamma irradiation and its effect on the outgrowth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 210-213, Jan./Feb. 1990.
- COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins: economics and health risks**. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, 2003. (Task Force Report, 139).
- ISMAIL, M. A. Deterioration and spoilage of peanuts and desiccated coconuts from two sub-Saharan tropical East African Countries due to the associated mycobiota and their degradative enzymes. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 150, n. 2, p. 67-84, 2000.
- KING, A. D.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-Rose Bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 37, n. 5, p. 959-964, 1979.
- PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000. Supplement 1.
- PITT, J. I.; BASÍLICO, J. C.; ABARCA, M. L.; LÓPEZ, C. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 41-46, 2000. Supplement 1.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Methods for isolation, enumeration and identification. In: _____. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. Gaithersburg: Aspen, 1999. p. 21-57.
- RODRIGUES-JORGE, M.; GARZÓN, E. S. Control mediante radiaciones gamma de flora fúngica presente en alimentos de consumo humano y animal. **Alimentaria**, Madrid, v. 95, p. 115-117, 1993.
- SAMPAIO, M. B. I. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.
- SAS INSTITUTE. **Users guide: statistics 1989-1996**. Version 6.11. Cary North Carolina, 1996.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 175, n. 2, p. 149-163, June 1999.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2001. 82 p.