

Radiação ultravioleta C no controle
de *Aspergillus flavus* Link e de outros
contaminantes da castanha-do-brasil



OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

12 CONSUMO E
PRODUÇÃO
RESPONSÁVEIS



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio Ambiente
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
82**

Radiação ultravioleta C no controle
de *Aspergillus flavus* Link e de outros
contaminantes da castanha-do-brasil

*Daniel Terao
Cleísa Brasil da Cunha Cartaxo
Érica Tiemi Konda
Sandra Rodrigues dos Santos*

**Embrapa Meio Ambiente
Jaguarúna, SP
2019**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP-340, Km 127,5, Tanquinho Velho
Caixa Postal 69, CEP: 13918-110, Jaguariúna, SP
Fone: +55 (19) 3311-2610
Fax: +55 (19) 3311-2640
www.embrapa.br/meio-ambiente/
SAC: www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Meio Ambiente

Presidente
Ana Paula Contador Packer

Secretária-Executiva
Cristina Tiemi Shoyama

Membros
*Rodrigo Mendes, Ricardo A. A. Pazianotto,
Maria Cristina Tordin, Daniel Terao, Victor Paulo
Marques Simão, Joel Leandro de Queiroga,
Vera Lucia Ferracini, Marco Antonio Gomes*

Revisão de texto
Nílce Chaves Gattaz

Normalização bibliográfica
Maria de Cléofas Faggion Alencar, CRB-8/1658

Projeto gráfico
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Silvana Cristina Teixeira

Foto da capa
Arquivo Embrapa

1ª edição eletrônica (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Meio Ambiente

Radiação ultravioleta C no controle de *Aspergillus flavus* Link e de outros
contaminantes da castanha-do-brasil / Daniel Terao... [et al.]. – Jaguariúna:
Embrapa Meio Ambiente, 2019.

21 p. il. color. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Meio
Ambiente, 1516-4675; 82).

1. Castanha-do-brasil 2. *Aspergillus flavus* 3. Radiação ultravioleta 4.
Bertholletia excelsa I. Terao, Daniel. II. Cunha, Cleisa Brasil da Cunha. III. Konda,
Érica Tiemi. IV. Santos, Sandra Rodrigues dos. V. Título. VI. Série.

CDD (21 ed.) 634.575

© Embrapa, 2019

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	12
Conclusões.....	19
Agradecimentos.....	19
Referências	19

Radiação ultravioleta C no controle de *Aspergillus flavus* Link e de outros contaminantes da castanha-do-brasil (*)

Daniel Terao¹

Cleísa Brasil da Cunha Cartaxo²

Érica Tiemi Konda³

Sandra Rodrigues dos Santos⁴

Resumo - A castanha-do-brasil tem apresentado alta taxa de contaminação por fungos toxigênicos, em especial o *Aspergillus flavus*. Este trabalho teve como objetivo avaliar o controle de *A. flavus* e da contaminação por bactérias e bolores em castanha-do-brasil utilizando a radiação ultravioleta C (UV-C). No estudo *in vitro* avaliaram-se as doses: 0,12; 0,25; 0,5; 1,0; e 2,0 kJ m⁻². Três experimentos *in vivo* foram conduzidos. Nos dois primeiros avaliou-se a eficiência da UV-C no controle de microrganismos naturalmente presentes em amêndoas *in natura*, e no terceiro experimento as amêndoas passaram por uma esterilização prévia com óxido de etileno, antes de serem inoculadas com o *A. flavus*. As amostras foram plaqueadas e incubadas a 30°C e a partir de 72h foi realizada a avaliação durante cinco dias pela contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os esporos de *A. flavus* são altamente sensíveis à luz UV-C, sendo que a dose de 0,5 kJ m⁻² inibiu sua germinação. A radiação UV-C diminuiu significativamente a contaminação bacteriana, aproximadamente em 2 log de UFC g⁻¹ de castanhas, e de bolores em torno de 1 log de UFC g⁻¹. Em amêndoas artificialmente inoculadas observou-se um controle completo de *A. flavus* a partir da dose de 1,0 kJ m⁻².

Termos para indexação: *Bertholletia excelsa*, UV-C, contaminação microbiana, controle físico, micotoxina, bolores.

¹ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

² Engenheira-agrônoma, mestre em Ciências da Horticultura, pesquisadora da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

³ Engenheira de Alimentos, Centro Universitário de Jaguariúna, Jaguariúna, SP..

⁴ Engenheira-ambiental, profissional autônoma, Artur Nogueira, SP.

(*) os dados apresentados no Boletim de Pesquisa foram parcialmente publicados nos Anais do 11º Congresso de Iniciação Científica – CIIC 2017. KONDA, E. T.; CARTAXO, C. B. C.; SOUZA, C. S. M.; ESCHIONATO, R. A.; TERAO, D. **Efeito da irradiação ultravioleta C no controle de *Aspergillus flavus* link da castanha-do-brasil.** In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11, 2017, Campinas. Anais... Campinas: Instituto Agronômico, 2017. N° 17416. 9 p.

Ultraviolet C radiation to control *Aspergillus flavus* Link and other Brazil nut contaminants

Abstract - Brazil nut has presented a high rate of contamination by toxigenic fungi, especially by *Aspergillus flavus*. The objective of this work was to evaluate the control of *A. flavus* and other microbial contaminants such as bacteria and mold in Brazil nut using ultraviolet C (UV-C) radiation. An *in vitro* study was conducted to evaluate the effect of irradiation doses of UV-C at rates of 0.12, 0.25, 0.5, 1.0, and 2.0 kJ m⁻². Three *in vivo* experiments were carried out. Two of them evaluated the efficiency of UV-C to control natural contaminants present in natural nuts. The third experiment used nuts previously sterilized with ethylene oxide, and artificially inoculated with *A. flavus*. Those treated nuts were plated and incubated at 30°C, and evaluated during five days by counting the Colony Forming Units (CFU). The spore of *A. flavus* is very sensitive to UV-C, and 0.5 kJ m⁻² was enough to inhibit the germination. UV-C light significantly reduced bacterial contamination in approximately 2 logs of CFU g⁻¹ of nuts, and for molds around 1 log of UFC g⁻¹. In artificially inoculated nuts, the dose of 1.0 kJ m⁻² was enough to completely control *A. flavus*.

Index terms: *Bertholletia excelsa*, UV-C, microbiological contamination, physical control, mycotoxin, mould.

Introdução

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) da família Lecythidaceae é um produto de grande importância econômica na região Norte do Brasil, sendo que em 2016 foi um dos destaques do extrativismo vegetal não madeireiro, totalizando uma produção de 26.191 t (IBGE, 2017).

Devido às condições ambientais da região e aos precários sistemas de armazenamento e transporte na floresta, as castanhas podem permanecer empilhadas ou ensacadas durante um longo período, em ambiente úmido, favorável à colonização de diversos fungos filamentosos, com destaque para o gênero *Aspergillus* seção Flavi, que tem potencial para síntese de aflatoxinas, um potente carcinógeno que pode causar também lesões hepáticas além de ser mutagênico e teratogênico (Hussein; Brasel, 2001).

Aspergillus flavus, *A. parasiticus* e *A. nomius* têm sido identificados como os principais fungos produtores de aflatoxinas em castanhas-do-brasil, sendo *A. flavus* a espécie mais frequentemente observada em amostras coletadas em diferentes etapas da cadeia produtiva da castanha-do-brasil (Baquião et al., 2013a; Calderari et al., 2013).

Além das aflatoxinas do tipo B, consideradas como de maior potencial carcinogênico, algumas cepas de *A. flavus* podem, ainda, produzir o ácido ciclopiazônico (ACP), responsável por provocar lesões hepáticas, do miocárdio e neurotoxicidade. Baquião et al. (2013b) revelaram que 89,7% das cepas de *A. flavus* isoladas de castanha-do-brasil coletada na floresta Amazônica, eram toxigênicas, das quais 63,2% produziram ACP, isoladamente ou combinado com aflatoxina.

Além da contaminação fúngica, diversas espécies bacterianas podem ocorrer no produto pelo manuseio inadequado. Existem relatos de 250 tipos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), sendo que a maior parte delas é provocada por microrganismos patogênicos altamente perigosos, como *Clostridium botulinum* e *Escherichia coli*. Em geral, os sintomas mais comuns das DTAs são vômitos, diarreia, dor no estômago e, às vezes, febre (Oliveira et al., 2010).

O processamento da castanha-do-brasil, realizado pelas indústrias locais, consiste na lavagem, tratamento térmico, descascamento, seleção, desidratação e embalagem a vácuo. Nesse sentido, Arrus et al. (2005) e Álvares et al. (2012) constataram que as etapas finais de autoclavagem, descascamento e desidratação são eficazes na redução significativa da microbiota encontrada na castanha, incluindo bactérias, *A. flavus* e *A. parasiticus*.

Apesar de diferentes tipos de tratamentos térmicos utilizados nas usinas de beneficiamento de castanha-do-brasil se mostrarem eficazes no controle da contaminação microbiológica, culturalmente ainda existe entre as populações dos estados da Amazônia, a preferência pelo consumo da amêndoa *in natura*, por considerar que ela mantém as características organolépticas originais. Portanto, a amêndoa é comumente encontrada e comercializada nas feiras livres e semáforos das cidades da região, sem passar por nenhum processamento.

Arrus et al., (2005) alertam para os relatos de infecção alimentar pelo consumo de amêndoas, dentre as quais de castanha-do-brasil contaminadas por bactérias patogênicas presentes em produtos *in natura*, isto é, sem processamento prévio.

Além disso, o risco de elevação dos níveis de aflatoxinas ao longo da cadeia produtiva, e a impossibilidade de remoção dessas micotoxinas sem o uso de produtos químicos tóxicos, ou sem promover significativas perdas em valor funcional e nutricional, levam à necessidade de se buscar novos meios de desinfecção da castanha-do-brasil (BARASAN, 2009).

Para minimizar essa contaminação, buscam-se métodos de tratamento pós-colheita, meios naturais de controle e sem risco à saúde do consumidor, de forma a não comprometer o status de produto orgânico, uma vez que muitas áreas de produção de castanha-do-brasil na região possuem essa certificação (Souza et al., 2004b; Silva, 2008; Brose, 2016).

Atualmente existe grande demanda por alimentos livres de resíduos químicos, e dentre as tecnologias alternativas disponíveis no controle de contaminantes biológicos na pós-colheita, a irradiação UV-C tem se mostrado eficiente, preservando os aspectos qualitativos do produto (Barasan, 2009; Terao et al., 2015).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência da radiação UV-C no controle de *A. flavus* e de contaminantes bacterianos em amêndoas *in natura* de castanha-do-brasil, como um método limpo e sustentável, que não altere sensorialmente o produto irradiado.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Ambiental na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

Ensaio *in vitro*

O isolado de *A. flavus*, obtido da Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMMA 1412), foi cultivado em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Para estudar o efeito da irradiação na inibição da germinação de esporos do fungo, preparou-se a suspensão de esporos, ajustou a concentração para 1×10^3 esporos mL^{-1} , usando-se um hemacitômetro. Adicionou-se 3 mL desta suspensão de esporos em placas de Petri de 50 mm de diâmetro, as quais foram mantidas abertas e irradiadas com luz UV-C.

Após a irradiação, pipetou-se alíquotas de 0,1 mL da suspensão de esporos para placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA e espalhou-as uniformemente sobre a superfície, usando uma alça de Drigalski esterilizada. Em seguida, estas placas foram incubadas em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, avaliando-as diariamente, durante cinco dias, pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

A irradiação foi realizada em um irradiador construído com material acrílico, conforme descrito em Terao et al. (2017), que impede a passagem da luz para o ambiente externo, com fonte de luz instalada na parte superior, formada por uma superfície refletora em formato côncavo, constituída por uma lâmpada germicida Osram Puritec HNS de 36 W de potência, com concentração de emissão de luz na faixa de 253,7 nm, que emitia uma potência média de $370 \mu\text{W cm}^{-2}$ à distância de 46 cm.

As doses avaliadas foram: 0,12; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 kJ m⁻², ajustando-se o tempo de exposição de acordo com a Eq. (1):

$$t(s) = D / I$$

D é a dose de irradiação UV-C em kJ m⁻² e I a potência do emissor de luz em W m⁻².

O estudo do efeito da irradiação UV-C no crescimento micelial do fungo foi feito retirando-se, da borda de colônias de *A. flavus* com sete dias de incubação, discos de meio BDA contendo estruturas fúngicas em crescimento ativo, que foram depositados no centro de placas de Petri com meio BDA, as quais foram abertas e irradiadas com luz UV-C no interior do irradiador. As doses avaliadas foram 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 kJ m⁻². Utilizaram-se doses mais elevadas nos ensaios de crescimento micelial na tentativa de encontrar uma dose que fosse inibitória.

Após irradiadas, as placas foram fechadas e incubadas em BOD a 30 ± 2°C, no escuro. Avaliou-se diariamente o desenvolvimento do fungo pela medição do crescimento micelial em dois sentidos ortogonais, com o auxílio de um paquímetro digital.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com seis repetições, considerando-se uma placa de Petri como unidade experimental.

Ensaio *in vivo*

Foram realizados três experimentos:

Experimento 1: usou-se amêndoas *in natura*, provenientes de castanhas recém descascadas no local de origem, obtidas em feira livre de Rio Branco-AC, sem terem passado pelo processo de esterilização, nem sido inoculadas.

Experimento 2: usou-se amêndoas obtidas pelo descascamento asséptico, em laboratório, de castanhas coletadas no mesmo ano no estado do Acre, sem terem passado pelo processo de esterilização, nem sido inoculadas.

Experimento 3: usou-se amêndoas previamente esterilizadas com Óxido de Etileno durante um período de 20 horas, na empresa Acecil-Central de

Esterilização Comércio e Indústria Ltda, em Campinas-SP, e em seguida foram inoculadas artificialmente com *A. flavus*.

Inoculação

O isolado de *A. flavus* (CMMA 14-12), obtido da Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental em Jaguariúna-SP, foi cultivado em placas de Petri com meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) durante sete dias. O inóculo foi preparado com a adição de 10 mL de água destilada esterilizada (ADE) sobre as colônias, liberando-se os conídios com auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. A suspensão foi ajustada na concentração de 1×10^5 esporos mL^{-1} usando um hemacitômetro.

Amêndoas previamente esterilizadas em óxido de etileno foram inoculadas pulverizando-se a suspensão de conídios de *A. flavus*, utilizando-se um volume aproximado de 7 mL para cada amostra de 20 amêndoas. Em seguida, as amêndoas inoculadas foram mantidas em câmara úmida durante 24h, e permaneceram em BOD no escuro a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, durante seis dias, a fim de completar o processo de contaminação pelo fungo.

Irradiação UV-C

A irradiação UV-C foi realizada no irradiador previamente descrito, e as doses avaliadas foram: 1,0; 2,0 e 3,0 kJ m^{-2} . Após serem irradiadas as amêndoas foram mantidas por 24 horas em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Como testemunha, foram usadas amêndoas não inoculadas e não irradiadas.

Avaliação e delineamento experimental

De cada tratamento foram coletadas, aleatoriamente, 11 sub-amostras de 10g cada. Cada sub-amostra foi triturada com o Mixer Ri1600/01 250W e diluída em 90 mL de água destilada estéril (ADE), obtendo-se uma suspensão de fragmentos da castanha na concentração 10^{-1} de amêndoas trituradas. Procedeu-se nova diluição de 1 mL desta suspensão em 10 mL de ADE e finalizou-se numa suspensão na concentração 10^{-2} . Coletaram-se alíquotas de 100 μL de cada suspensão final, que foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio BDA + ampicilina, e espalhadas com alça de Drigalski

esterilizada. Essas placas foram incubadas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ em BOD, no escuro durante cinco dias, e realizou-se, então, a avaliação pela contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC).

Para avaliar a contagem de bactérias e de bolores, utilizou-se a mesma metodologia descrita, plaqueando-se as amostras em meio Plate Count Agar (PCA), e incubando-se a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ em BOD no escuro. As avaliações foram feitas diariamente, durante cinco dias, pela contagem de UFC.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 11 repetições, considerando-se uma placa de Petri como unidade experimental. Os dados foram submetidos a análise de variância e separação de médias pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$), usando o software SAS, versão 9.2 (SAS Institute, Cary, NC.).

Resultados e Discussão

Avaliação de contaminantes bacterianos e bolores

No Experimento 1, as amêndoas provenientes de castanhas coletadas, descascadas e manuseadas no local de origem apresentaram elevados níveis de contaminação com bactérias e bolores na testemunha.

A contagem de bactérias na testemunha resultou em $8,7 \times 10^4$ UFC g^{-1} de amêndoas e mostrou-se superior à obtida por Souza et al. (2004a), ao avaliar amostras coletadas em diferentes etapas de uma unidade de beneficiamento de castanha-do-brasil na Amazônia. Os resultados foram similares aos de Freire e Offord (2002), ao avaliar amêndoas de castanha-do-brasil sem esterilização, obtidas em mercados de varejo no Brasil, quando observaram contaminação por diferentes tipos de bactérias que variaram de $1,1 \times 10^2$ UFC g^{-1} a $1,07 \times 10^5$ UFC g^{-1} de amêndoas.

A contaminação por bolores foi da ordem de $2,7 \times 10^4$ UFC g^{-1} de amêndoas, mostrando-se, também, superior à encontrada por outros autores como Álvares et al. (2009) que, ao monitorarem a qualidade de castanhas provenientes de três castanhais no Brasil, encontraram $2,94 \log$ UFC g^{-1} e

3,52 log UFC g⁻¹, antes e após o armazenamento por 90 dias na floresta, respectivamente.

A elevada contaminação encontrada nas amêndoas *in natura* pode ser atribuída ao descascamento manual e à manipulação do produto em local inapropriado, sem observar os princípios das boas práticas de fabricação. A contaminação deveu-se, também, por ser produto *in natura*, ou seja, não foi previamente submetido a nenhum processo de desidratação, que indiretamente promove a redução da população microbiana, uma vez que utiliza temperaturas letais a muitas espécies de microrganismos, bem como reduz a umidade do substrato, tornando-o inadequado para o crescimento microbiano, conforme discorre Arrus et al. (2005)

Com relação à contaminação bacteriana, as doses de 2 e 3 kJ m⁻² diferiram significativamente da testemunha na contagem do número de UFC. As doses de 1 e 2 kJ m⁻² não diferiram entre si, diferenciando-se da dose de 3 kJ m⁻², que promoveu uma redução em torno de 73% do número de UFC bacterianas. (Figura 1).

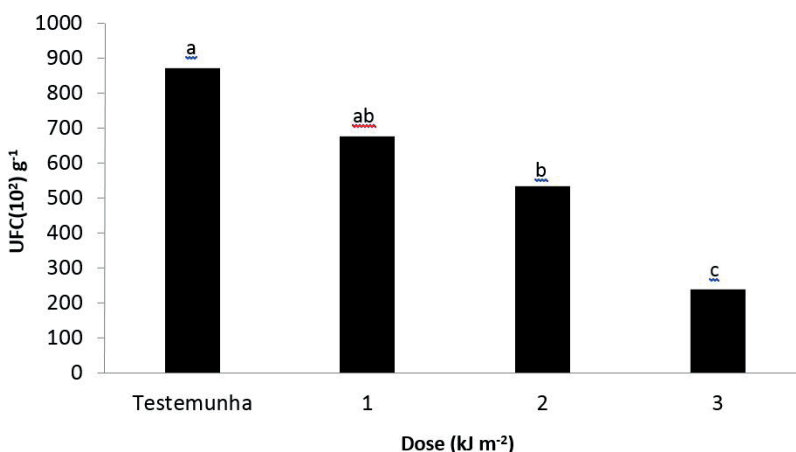


Figura 1. Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias contaminantes por grama de amêndoas *in natura* de castanha-do-brasil submetidas a diferentes doses de irradiação UV-C, após período de cinco dias de incubação a 30 ± 2°C e 80% UR. Médias de 11 repetições por tratamento, seguidas de letras diferentes são significativamente distintas de acordo com o teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Por outro lado, observou-se que devido ao elevado nível de contaminação apresentado nessa amostra, as doses avaliadas não foram suficientes para controlar eficientemente os bolores, sendo que nenhuma das doses diferiu da testemunha (dados não apresentados).

No experimento 2, apesar das castanhas terem sido descascadas e manuseadas assepticamente em laboratório, as amêndoas apresentaram níveis elevados de contaminação por bactérias e bolores, tanto na casca como na amêndoa, demonstrando que a contaminação da castanha-do-brasil ocorre de fato no campo, chegando bastante contaminada para o beneficiamento.

Apesar de inferiores ao Experimento 1, os níveis de contaminação bacteriana foram da ordem de $1,5 \times 10^4$ UFC g^{-1} na amêndoa, e de 1×10^4 UFC g^{-1} na casca. Os níveis de bolores chegaram à ordem de 60 UFC g^{-1} na amêndoa e de 40 UFC g^{-1} na casca.

Com relação à contaminação bacteriana, observou-se no Experimento 2 que todas as doses avaliadas, de 1 a 3 $kJ m^{-2}$, foram eficientes para o controle, tanto na amêndoa como na casca. Ao aplicar-se a dose de 3 $kJ m^{-2}$ na amêndoa houve a redução de aproximadamente 2 log UfC g^{-1} (Figuras 2 A e B).

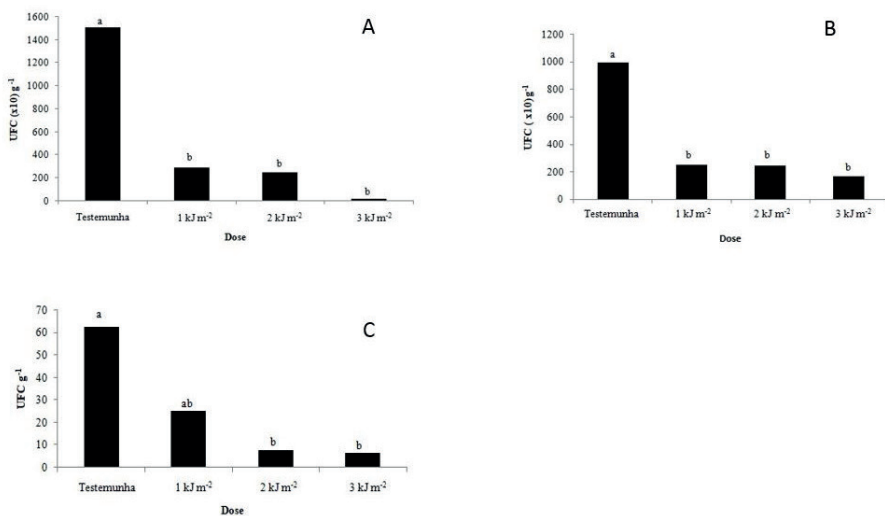


Figura 2. Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias contaminantes por grama de amêndoas *in natura* (A), de casca (B), e de bolores (C) em castanha-do-brasil descascadas assepticamente, submetidas a diferentes doses de irradiação UV-C, após período de cinco dias de incubação a $30 \pm 2^\circ C$ e 80% UR. Médias de 11 repetições por tratamento, seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

De acordo com Freire e Offord (2002) os principais agentes contaminantes encontrados em castanha-do-brasil foram as bactérias *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *B. macerans*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *E. sakasakii* e *Rothayibacter tritici*; e as leveduras, *Pichia* sp. e *Rhodotorula* sp.

Dermici e Panico (2008) afirmam que a radiação ultravioleta C (UV-C), pode controlar a contaminação bacteriana e fragmentos de microrganismos que podem afetar a integridade e qualidade de produtos alimentícios em geral, podendo reduzir o crescimento em até seis ciclos Log de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, e *Staphylococcus aureus*.

Devido ao menor grau de contaminação presente nas amêndoas utilizadas no Experimento 2, as doses de radiação avaliadas controlaram eficientemente os bolores, reduzindo na dose de 3 kJ m⁻² aproximadamente 1 log de UFC g⁻¹ (Figura 2 C).

A irradiação UV-C não provocou nenhum dano aparente na superfície da amêndoa, mesmo na dose mais elevada de 3 kJ m⁻².

Apesar do controle de bactérias e bolores obtido com o tratamento UV-C não ter sido completo em castanhas *in natura*, naturalmente contaminadas, esse método se mostrou viável, levando-se em conta o elevado nível de contaminação do material.

Boas práticas de coleta e de manuseio no descascamento e manipulação da castanha devem ser incorporadas ao processo produtivo, para que a irradiação UV-C possa, de maneira integrada, proporcionar o controle completo da contaminação por microrganismos.

Avaliação de controle de *A. flavus*

Os testes *in vitro* revelaram que o esporo de *A. flavus* apresentou elevada sensibilidade à luz UV-C, sendo que a 2,0 kJ m⁻² inibiu completamente a germinação do esporo, não diferindo da dose de 0,5 kJ m⁻², que inibiu 98,4% (Figura 3). Essas doses são ainda menores do que Begum et al. (2009) (4,644 kJ m⁻²) utilizaram para promover a redução de 3 log de UFC de *A. flavus* em meio CYA, confirmando o potencial do método para uso no controle da germinação de esporos de *A. flavus*.

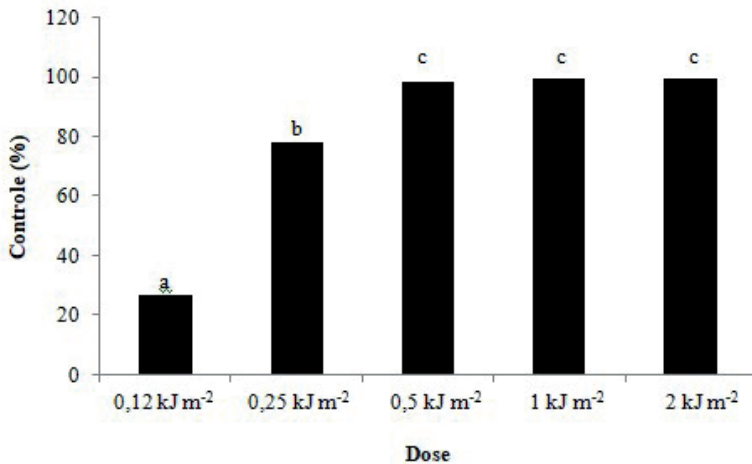


Figura 3. Controle de germinação de esporos de *Aspergillus flavus* submetidos a diferentes doses de irradiação UV-C, após o período de cinco dias de incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e 80% UR. Médias de 11 repetições por tratamento, seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Porém, para controlar o desenvolvimento micelial, doses elevadas de até 5 kJ m^{-2} não foram suficientes para inibir o crescimento micelial do fungo (dados não apresentados).

Nos ensaios em que se avaliaram castanhas que foram previamente esterilizadas e inoculadas artificialmente com suspensão de esporos de *A. flavus*, observou-se um controle altamente eficaz da irradiação UV-C, sendo que todas as doses avaliadas de 1,0 a $3,0 \text{ kJ m}^{-2}$ controlaram 100% da contaminação fúngica, comparando-se com a testemunha, inoculada artificialmente, que apresentou, em média, 230 UFC g^{-1} (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito de doses de irradiação UV-C no controle de *Aspergillus flavus* em amêndoas de castanha-do-brasil artificialmente inoculadas após período de cinco dias de incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e 80% UR. Médias de 11 repetições por tratamento, seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tratamento	Unidades Formadoras de Colônia (UFC) g ⁻¹	Controle (%)
Testemunha	230	
1,0 kJ m ⁻²	0	100
2,0 kJ m ⁻²	0	100
3,0 kJ m ⁻²	0	100

É importante destacar que nesse experimento utilizaram-se amêndoas previamente esterilizadas e irradiadas após inoculação artificial recente com *A. flavus*, isto é, o processo de infecção na superfície da castanha estava no início, portanto, presente majoritariamente na forma de esporos. De maneira prática, pode-se inferir que o uso da irradiação U-VC será mais eficaz em castanhas novas, recém descascadas e com baixo potencial de inóculo do fungo. Conforme observado nos testes *in vitro* a irradiação UV-C é altamente eficaz na inibição da germinação de esporos de *A. flavus*; no entanto, não apresenta efeito significativo no desenvolvimento do micélio.

Basaran (2009) estudou o efeito de UV-C em avelãs contaminadas, sem prévia esterilização, e ainda artificialmente inoculadas com suspensão concentrada de esporos de *Aspergillus parasiticus* na ordem de 10^6 UFC g⁻¹ e observou que a inativação adequada do fungo só foi obtida após exposição do produto a doses elevadas de UV-C, da ordem de 99,9 KJ m⁻², por um período de seis horas. Possivelmente, a baixa eficiência da radiação UV-C no controle do fungo, neste trabalho, se deve a que amêndoas irradiadas apresentaram infecções avançadas na forma micelial.

A radiação UV-C é dependente da espécie fúngica estudada. Begum et al. (2009) avaliaram a irradiação UV-C no controle de quatro fungos contaminantes de alimentos: *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium corylophilum* e *Eurotium rubrum*, e verificaram que a eficiência do processo varia de acordo

com a estrutura celular da espécie fúngica. Comparativamente, a irradiação UV-C a $4,644 \text{ kJ m}^{-2}$, reduziu para 19% o número de esporos viáveis de *A. flavus* e para menos de 1% de *P. corylophilum* e *E. rubrum*, após 15s de exposição. Após 30s de exposição, cerca de 6% de esporos de *A. niger* ainda eram viáveis, enquanto que nenhum deles conseguiu sobreviver nas demais espécies avaliadas, durante o mesmo tempo de exposição.

Segundo Bartnicki et al. (2010), que realizaram estudos da irradiação UV-C no controle de *Cryptosporiopsis perennans* em pós-colheita de maçãs, no primeiro experimento as doses de 0,037 a $0,150 \text{ kJm}^{-2}$ controlaram mais de 70% a sobrevivência do patógeno em relação à testemunha, enquanto que no segundo experimento as doses de 0,75; 1,5 e $3,0 \text{ kJm}^{-2}$ reduziram acima de 99%.

A eficácia germicida da luz UV-C se deve ao seu efeito na desnaturação das proteínas de microrganismos e na desorganização da membrana plasmática, inibindo a germinação e retardando o seu desenvolvimento (Wolfe, 1990).

Além de sua eficácia no controle microbiológico, o uso desta metodologia é viável, uma vez que as lâmpadas germicidas são acessíveis e facilmente encontradas no mercado, estando disponíveis para os pequenos produtores ou até mesmo para uso doméstico. Isso mostra a importância de um estudo mais aprofundado, já que a eficiência da irradiação depende do tempo de exposição e intensidade na emissão da energia da lâmpada.

No entanto, uma vez que a exposição à luz UV-C pode causar injúria na epiderme e danos irreversíveis às estruturas oculares, mesmo não causando desconforto durante a exposição, a adoção deste método está diretamente dependente do desenvolvimento de equipamento seguro para aplicação da irradiação, bem como do uso de EPI's adequados para a proteção do operador.

Conclusões

Em castanhas inoculadas artificialmente a irradiação UV-C proporcionou o controle completo de *A. flavus* a partir da dose de 1 kJ m^{-2} , e demonstrou maior eficiência no controle da germinação de esporos do que no crescimento micelial. Com relação à contaminação microbiana natural, a dose de 3 kJ m^{-2} proporcionou uma redução de contaminação bacteriana em aproximadamente $2 \log$ de UFC g^{-1} de castanhas, e de bolores, ao redor de $1 \log$ de UFC g^{-1} . Verificaram-se níveis similares de contaminação na casca e na castanha. Para que a irradiação UV-C possa proporcionar um controle adequado do *A. flavus* e de outros contaminantes microbianos em castanha-do-brasil é fundamental que boas práticas de coleta e de manuseio no descascamento e manipulação da castanha sejam incorporadas ao processo produtivo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Empresa Acecil - Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda, pelo serviço de esterilização das castanhas utilizadas nos trabalhos.

Referências

ÁLVARES, V. S.; CASTRO, I. M.; COSTA, D. A.; LIMA, A. C.; MADRUGA, A. L. S. Qualidade da castanha-do-brasil do comércio de Rio Branco, Acre. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 2, p. 269-274, 2012.

ÁLVARES, V. S.; LEITE, F. M. N.; MADRUGA, A. L. S.; SOUZA, J. M. L.; COSTA, D. A. Monitoramento da cadeia produtiva de castanha-do-brasil quanto à contaminação por coliformes e fungos em três castanhas no Acre. In: SEMINÁRIO ANUAL DE COOPERAÇÃO UFAC/UF 7., 2009, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco: UFA/UF, 2009. p. 211-217.

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

- BAQUIÃO, A. C.; OLIVEIRA, M. M. M.; REIS, T. A.; ZORZETE, P.; ATAYDE, D. D.; CORREA, B. Monitoring and Determination of Fungi and Mycotoxins in Stored Brazil Nuts. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 8, p. 1414–1420, 2013a.
- BAQUIÃO, A. C.; OLIVEIRA, M. M. M.; REIS, T. A.; ZORZETE, P.; ATAYDE, D. D.; CORREA, B. Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **Food Chemistry**, v. 139, p. 1127–1132, 2013b.
- BARTNICKI, V. A.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; AMARANTE C. V. T.; CASTRO, L. A. S.; RIZZATTI, M. R.; DE SOUZA, J. A. V. Água aquecida e radiação UV-C no controle pós-colheita de *Cryptosporiopsis perennans* em maçãs. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 124-131, 2010.
- BASARAN, P. Reduction of *Aspergillus parasiticus* on hazelnut surface by UV-C treatment. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 1857-1863, 2009.
- BEGUM, M.; HOCKING, A. D.; MISKELLY, D. Inactivation of food spoilage fungi by ultra violet (UV-C) irradiation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 74-77, 2009.
- BROSE, M. E. Cadeias produtivas sustentáveis no desenvolvimento territorial: a castanha na Bolívia e no Acre, **Brasil Interações**, v. 17, n. 1, p. 77-86, 2016.
- CALDERARI, T. O. IAMANAKA, B. T.; FRISVAD, J. C.; PITT, J. I.; SARTORI, D.; PEREIRA, J. L.; FUNGARO, M. H. P.; TANIWAKI, M. H. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Brazil nuts: from rainforest to consumer. **International Journal of Food Microbiology**, v.160, p.267–272, 2013.
- DERMICI, A.; PANICO, L. Pulsed ultravioleta light. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 5, p. 443-446, 2008.
- FREIRE, C.O.; OFFORD, L. Bacterial and yeast counts in Brazilian commodities and spices. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 145-148, 2002.
- HUSSEIN, S.H.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolismo, and impacto f mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.
- IBGE. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**. Rio de Janeiro: IBGE, 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2017>. Acesso em: 25 abr. 2018.
- OLIVEIRA, A.B.A.; PAULA, C.M.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M.R.I.; TONDO, E.C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.
- SILVA, S. M. P. Análise da formação do mercado de castanha no Acre sob a ótica da Nova Sociologia Econômica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOCIOLOGIA, 14, 2008, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: SBS, 2008. 19 p.
- SOUZA, J. M. L.; CARTAXO, C. B. C.; LEITE, F. M. N.; REIS, F. S. **Avaliação microbiológica de amêndoas de castanha-do-brasil em usinas de beneficiamento no Acre**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2004a. 24 p. (Embrapa Acre. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 39).
- SOUZA, J. M. L.; CARTAXO, C. B. C.; LEITE, F. M. N.; SOUZA, L. M. **Manual segurança e qualidade para a cultura da castanha-do-brasil**. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004b. 61 p.
- TERAO, D.; CAMPOS, J.S.C.; BENATO, E.A.; HASHIMOTO, J.M. Alternative strategy on control of postharvest diseases of mango (*Mangifera indica* L.) by use of low dose of ultraviolet-C irradiation. **Food Engineering Reviews**, v. 7, p. 171-175, 2015.

TERAO, D.; NECHET, K. L.; PONTE, M. S.; MAIA, A. H. N.; ANJOS, V. D. A.; HAFELD-VIEIRA, B. A. Physical postharvest treatments combined with antagonistic yeast on the control of orange green mold. **Scientia Horticulturae**, v. 224, p. 317-323, 2017.

WOLFE, R. L. Ultraviolet disinfection of potable water. **Environmental Science & Technology**, v. 24, p. 768-772, 1990.

Embrapa

Meio Ambiente

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

CGPE número 15309