



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

EFEITO DA IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA C NO CONTROLE DE *ASPERGILLUS FLAVUS* LINK DA CASTANHA-DO-BRASIL

Érica Tiemi **Konda**¹; Cleisa Brasil da Cunha **Cartaxo**²; Caroline dos S. **Souza**³; Raquel Andrade **Eschionato**⁴; Daniel **Terao**⁵

Nº 17416

RESUMO – A castanha-do-brasil, produto do extrativismo vegetal não madeireiro, importante para a economia e exportação nacional, tem apresentado alta taxa de contaminação por fungos toxigênicos, em especial o *Aspergillus flavus*, que sintetiza a aflatoxina, apresentando potencial carcinogênico. Este trabalho teve como objetivo avaliar o controle de *A. flavus* e de outros contaminantes bacterianos e bolores em castanha-do-brasil pelo uso da irradiação ultravioleta C (UVC). Foram realizados dois experimentos, sendo que no primeiro avaliou-se a eficiência da irradiação UVC no controle de contaminantes naturais presentes em castanhas *in natura*, sem ter passado por nenhum tratamento pós-colheita, enquanto que no segundo experimento as castanhas passaram por uma esterilização prévia com óxido de etileno, sendo em seguida inoculadas com o *A. flavus*. Avaliaram-se as doses de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 kJm⁻². Depois da irradiação as castanhas permaneceram em repouso por 24 h e, em seguida, foram trituradas e plaqueadas, e avaliadas após 72 h de incubação. O delineamento foi inteiramente casualizado com 11 repetições. Com relação à contaminação bacteriana, todas as doses de irradiação avaliadas diferiram significativamente da testemunha. O melhor controle foi obtido na dose de 3 kJ m⁻², em torno de 73%. Para bolores as doses de 4 e 5 kJ m⁻² foram eficientes no controle, sendo que a dose de 5 kJ m⁻² apresentou um controle ao redor de 51% de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de fungos contaminantes. Em castanhas artificialmente inoculadas observou-se um controle completo de *A. flavus* a partir da dose de 1,0 kJ m⁻². Conclui-se que a irradiação UVC é viável no controle de *A. flavus* em castanha-do-brasil.

Palavras-chaves: UVC, contaminação microbiana, controle alternativo.

¹ Autora, Bolsista Embrapa: Graduação em Engenharia de Alimentos, FAJ, Jaguariúna-SP; ericakonda@yahoo.com.br

² Pesquisadora de Embrapa Acre

³ Colaboradora Bolsista Embrapa: Graduação em Engenharia de Alimentos, FAJ, Jaguariúna-SP

⁴ Colaboradora Bolsista PIBIC/CNPq: Graduação em Engenharia de Alimentos, FAJ, Jaguariúna-SP

⁵ Pesquisador Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; daniel.terao@embrapa.br



ABSTRACT– Brazil nut, product of non-timber plant extractivism, important product for the national economy and exports, has shown a high rate of contamination by toxigenic fungi, especially *Aspergillus flavus*, which synthesizes aflatoxin, presenting carcinogenic potential. The objective of this work was to evaluate the control of *A. flavus* and other fungal and bacterial contaminants in Brazil nuts using ultraviolet C (UVC) irradiation. Two experiments were carried out. The first one evaluated the efficiency of UVC irradiation to the control of natural contaminants present in natura nuts, without having undergone any post-harvest treatment, whereas in the second experiment the nuts underwent previous sterilization with ethylene oxide, and then inoculated with *A. flavus*. The doses of 1.0; 2.0; 3.0; 4.0 and 5.0 kJ m⁻² were evaluated. After irradiation the nuts were stored for 24 h and then powdered and plated, and after being evaluated after 72 h incubation. The trials were laid out in completely randomized design with 11 replications. Regarding bacterial contamination, all evaluated doses differed significantly from the control. The best result was obtained at the dose of 3 kJ m⁻², around 73%. For molds, the doses of 4 and 5 kJ m⁻² were efficient, and the dose of 5 kJ m⁻² showed a reduction around 51% of Colony Forming Units (CFU) of contaminating fungi. In artificially inoculated nuts the UV-C irradiation promoted a complete control of *A. flavus* from the dose of 1.0 kJ m⁻². It was concluded that UVC irradiation is feasible in the control of *A. flavus* in Brazil nuts.

Keywords: UVC, microbiological contamination, alternative control.

1 INTRODUÇÃO

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), da família Lecythidaceae é um produto de grande importância econômica na região norte do Brasil, sendo que, em 2015 foi um dos destaques do extrativismo vegetal não madeireiro, totalizando uma produção de 40.643 t. (IBGE,2015).

Devido ao precário sistema de coleta na floresta, as castanhas permanecem empilhadas próximas à base das castanheiras durante um período, em ambiente úmido, favorável à colonização de diversos fungos toxigênicos, com destaque para o *Aspergillus flavus* Link, que tem potencial para síntese de aflatoxina, um potente carcinógeno, que pode causar, também, lesões hepáticas. Para minimizar essa contaminação, tem-se buscado métodos de tratamento pós-colheita, meios naturais de controle e sem risco à saúde consumidor, de forma a não comprometer o status de produto orgânico (SOUZA et al., 2004).



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

Além da contaminação fúngica, diversas espécies bacterianas podem ocorrer no produto pelo manuseio inadequado e à precária logística local. Existem relatos de 250 tipos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), sendo uma boa parte transmitida por microrganismos patogênicos, sendo eles altamente perigosos, como *Clostridium botulinum* e *Escherichia coli*. No geral, os sintomas mais comuns do DTA são vômitos, diarreia, dor no estômago e às vezes, febre (OLIVEIRA et al., 2010). 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. sakasaki* e as leveduras *Pichiasp.*, *Rothayibacter triticie* *Rhodotorulas sp.*

Mostrando eficiência em sua aplicação, a radiação ultravioleta C (UVC) é uma grande aliada no controle de contaminantes bacterianos e fragmentos de microrganismos que podem afetar a integridade e qualidade do alimento, reduzindo o crescimento de seis ciclos Log de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, e *Staphylococcus aureus* (DERMICI; PANICO, 2008).

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 UVC tem se mostrado eficiente, preservando os aspectos qualitativos do produto (TERAO et al., 2015).

Santos et al. (2016) observaram que o esporo de *A. flavus* apresenta elevada sensibilidade à luz UVC sendo que a dose de 0,5 kJ m⁻² possibilitou um controle superior a 98% de UFC, com inibição significativa na germinação de esporos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência da radiação UVC no controle de *A. flavus* e de contaminantes bacterianos em castanha-do-brasil, como uma tecnologia limpa e sustentável, que não altera sensorialmente o produto irradiado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos que foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Ambiental na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

2.1 Castanhas



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

Castanhas *in natura*, provenientes do estado do Acre, recém-colhidas e descascadas manualmente no local, sem terem recebido nenhum tratamento pós-colheita, foram transportadas via aérea e encaminhadas ao Laboratório.

Experimento 1: as castanhas utilizadas não passaram por nenhum tratamento prévio de esterilização, mantendo a infecção natural ocorrida no processo de coleta, descascamento e manuseio no local de origem.

Experimento 2: as castanhas foram previamente esterilizadas em uma empresa especializada, com Óxido de Etileno, durante um período de 20 horas e, em seguida, inoculadas com o fungo *A. flavus*.

2.2 Fungo e inoculação

O isolado de *A. flavus* foi obtido da Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMMA 14-12).

O fungo foi cultivado em placas de Petri com meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) durante sete dias. O inóculo foi preparado pela adição de 10mL água destilada esterilizada (ADE) e raspadas com uma alça de Drigalski esterilizada. A suspensão foi ajustada na concentração de 1×10^5 esporos mL^{-1} .

A inoculação foi realizada no Experimento 2 pela pulverização da suspensão de inóculo sobre as castanhas, em volume aproximado de 7 mL para 20 castanhas. Em seguida, estas foram mantidas em câmara úmida durante 24 h, após esse período foram armazenadas em BOD, no escuro a 30 ± 2 °C, durante 6 dias.

2.3 Irradiação UVC

A aplicação da irradiação com luz UVC foi feita em um irradiador construído em material acrílico, que impede a passagem da luz para o ambiente, 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, emitindo à distância de 46 cm uma potência média de $370 \mu\text{W cm}^{-2}$. As doses avaliadas foram: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 kJ m^{-2} , que corresponderam aos tempos de exposição de 4 min e 40 s; 9 min e 20 s; 14 min; 18 min e 40 s e 23 min e 20 s, respectivamente. Após receberem a irradiação, as castanhas foram mantidas por 12 horas em uma sala escura e refrigerada a 20 ± 2 °C. Como testemunha foram usadas castanhas não irradiadas.



2.4 Avaliação e delineamento experimental

Após o período de armazenamento, 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 na concentração 10^{-1} . Procedeu-se nova diluição de 1 mL desta suspensão em 10 mL de ADE finalizando numa suspensão na concentração 10^{-2} . Coletou-se alíquotas de 100 μ L da cada suspensão final, que foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) +Ampicilina, e espalhadas com alça de Drigalski esterilizada. Estas placas foram mantidas incubadas a 23 ± 2 °C, em sala escura, durante 72 horas, quando, então, foi realizada a avaliação pela contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 11 repetições. Os dados foram submetidos à Análise de Variância e separação de médias pelo teste Scott-Knott, usando o programa SISVAR.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento, as castanhas estavam naturalmente e altamente contaminadas com bolores e bactérias, ocorrido durante o processo de coleta, descascamento e manuseio na região produtora. O nível de contaminação observado no tratamento testemunha foi da ordem de $8,7 \times 10^5$ UFC g^{-1} para bactérias e $2,7 \times 10^5$ UFC g^{-1} para bolores. Estes níveis de contaminação estão em concordância com os valores encontrados por Arrus et al. (2005).

Com relação à contaminação bacteriana, todas as doses de irradiação avaliadas diferiram significativamente da testemunha na contagem do número de UFC. As doses de 1 e 2 $kJ\ m^{-2}$ não diferiram entre si, diferindo das doses de 3 a 5 $kJ\ m^{-2}$ que também não diferiram entre si. O controle obtido na dose de 3 $kJ\ m^{-2}$ foi em torno de 73%. Figura 1.

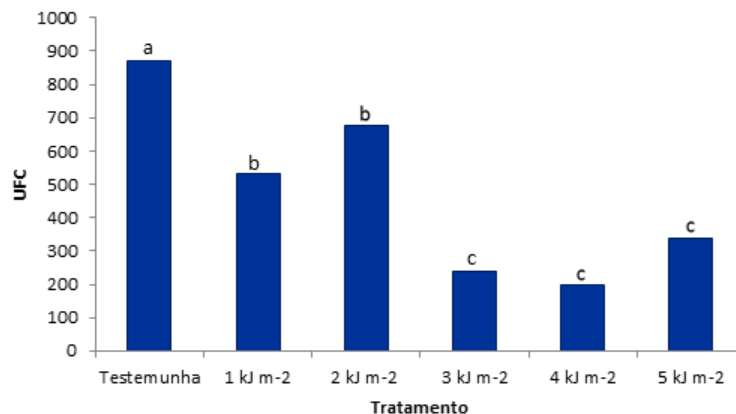


Figura 1. Efeito da irradiação UVC no número de Unidades formadoras de colônias (UFC) bacterianas contaminantes em castanha-do-brasil.

Por outro lado, observou-se que para bolores somente as doses de 4 e 5 kJm⁻² foram eficientes no controle, diferindo estatisticamente da testemunha e das doses de 2 e 3kJ m⁻², obtendo-se com a dose de 5 kJ m⁻² um controle ao redor de 51% de UFC de fungos contaminantes em castanha-do-brasil. Figura 2.

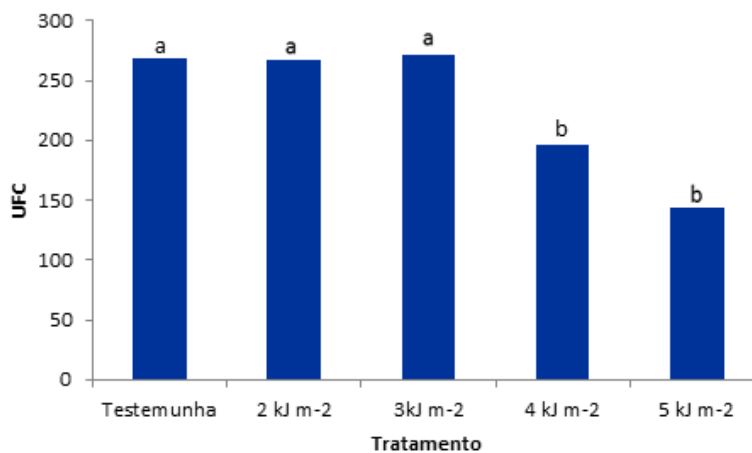


Figura 2. Efeito da irradiação UVC no número de Unidades formadoras de colônias (UFC) de bolores em castanha-do-brasil.

Apesar do controle obtido com o tratamento UVC não ter sido completo em castanhas *in natura*, naturalmente contaminadas, a tecnologia se mostrou viável, apresentando um nível 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 deverão ser incorporadas ao processo



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

produtivo, para que a irradiação UVC possa, de maneira integrada, proporcionar o controle completo dos contaminantes microbianos.

Já no segundo experimento, onde as castanhas haviam sido previamente esterilizadas e inoculadas artificialmente com suspensão de esporos de *A. flavus*, em concentração padronizada, observou-se um efeito de controle altamente eficaz da irradiação UV-C, sendo que a partir da dose se 1,0 kJ m⁻² houve controle completo do fungo em comparação à testemunha que apresentou, em média, 230 UFCg⁻¹.

Seria interessante avaliar doses menores que 1,0 kJ m⁻², uma vez que Santos, et al. (2016) observaram em teste *in vitro* que a dose de 0,5 kJ m⁻² controlou 98% de UFC de *A. flavus*, não diferindo da dose de 2,0 kJ m⁻², que controlou completamente a germinação de esporos.

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

Segundo Bartnicki et al. (2010), que realizou estudos da irradiação UVC no controle pós-colheita de *Cryptosporiopsis perennans* em maçãs, as doses de 0,037 a 0,150 kJm⁻² controlaram em mais de 70% a sobrevivência do patógeno em relação à testemunha, enquanto que no segundo experimento as doses de 0,750; 1,500 e 3,000 kJm⁻² reduziram acima de 99%.

Além de sua eficácia no controle microbiológico, o uso desta tecnologia é viável, uma vez que as lâmpadas germicidas são acessíveis e facilmente encontradas no mercado, sendo 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 (Gonçalves, 2005).

4 CONCLUSÃO

A irradiação UVC é eficaz no controle de contaminantes microbianos em castanha-do-brasil. Doses a partir de 1 kJ m⁻² proporcionaram o controle completo de *A. flavus* em castanhas inoculadas artificialmente.

5 AGRADECIMENTOS

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



6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

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.

GONÇALVES, M. P. J.; GOMES, P. M. C.; CORRÊA, R.F.; SOUZA, M. C. Estudo das irradiações gama e UVC como métodos de conservação para comercialização do suco de beterraba vermelha de mesa utilizado como corante natural. In: International Nuclear Atlantic Conference, 2005. Santos. **Anais...**Santos: ABEN, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 30, p. 1-48, 2015.

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

SANTOS, S. R.; VIECELLI, M. P.; PONTE, M. S.; NASCIMENTO R. S.; TERAPO, D. **Efeito da radiação ultravioleta C no desenvolvimento vegetativo e na germinação de esporos de *Aspergillus flavus* link da castanha-do-Brasil**. In: Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 2016. Campinas. **Anais...**Campinas: CIIC, 2016.

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, 2004. 61 p.

TERAPO, 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.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

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