

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - FCF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - PPGCF

IRRADIAÇÃO GAMA NA REDUÇÃO DE CONTAMINAÇÃO DE
CASTANHA-DO-BRASIL (*BERTHOLLETIA EXCELSA*, H.B.K)
POR AFLATOXINAS

CIBELE SOUZA VIANA DA SILVA

MANAUS-AM
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - FCF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - PPGCF

CIBELE SOUZA VIANA DA SILVA

Irradiação gama na redução de contaminação de castanha-do-brasil
(*bertholletia excelsa*, H.B.K) por aflatoxinas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo Felix

Co-orientador (a):

Profa. Dra Ariane Mendonça Kluczkovski

MANAUS-AM
2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586i Silva, Cibele Souza Viana da
Irradiação Gama na redução de contaminação de Castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) por aflatoxinas / Cibele Souza Viana da Silva . 2020
87 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Pedro Henrique Campelo Felix
Coorientadora: Ariane Mendonça Kluczkovski
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Radiação Gama. 2. Aflatoxinas. 3. Castanha-do-Brasil. 4. *Aspergillus flavus*. I. Felix, Pedro Henrique Campelo. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

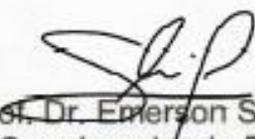
**“Irradiação gama na redução de contaminação de Castanha-do-Brasil
(*Bertholletia excelsa*, H.B.K) por aflatoxinas”**

DISCENTE: CIBELE SOUZA VIANA DA SILVA

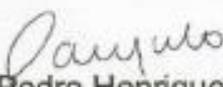
PARECER:

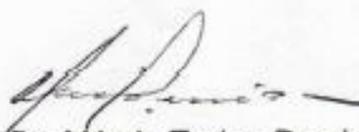
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 31/08/2020.


Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGCF

**A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes
professores:**


Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo Felix
Orientador e Presidente da Banca (UFAM)


Prof. Dr. Márcio Tadeu Pereira
Membro externo (CNEN)


Prof. Dra. Francisca Chagas do Amaral Souza
Membro externo (INPA)

À Deus, que dá força e coragem.
Aos meus pais e esposo, pelo apoio
incondicional para realização deste
trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por seu infinito amor e imensa misericórdia. A Ele todas as vitórias alcançadas. Tu tens sido tão, tão bom para mim.

A minha família, pela paciência e amor, por nunca desistirem de mim e por serem meus maiores incentivadores.

A meu esposo, Bruno Sordi Lopes da Silva, por acreditar em mim mais do que eu mesma, por não me deixar desistir nos momentos mais difíceis, pela compreensão nos meus momentos de desespero e por todo amor que tem tornado essa caminhada mais fácil. Eu te amo.

Ao meu Orientador Dr. Pedro Henrique Câmpelo Felix, por acreditar e confiar este trabalho a mim, por todas as inúmeras dúvidas sanadas, pelo incentivo que motivou a continuar e pela amizade aqui formada. O sr. É uma grande inspiração.

A minha coorientadora Dra. Ariane Mendonça Kluczkovski, Rainha da Castanha, por ceder a matéria-prima para a realiação deste trabalho e por todas as considerações feitas. Seu apoio foi de grande importância.

Ao laboratório de Irradiação Gama do CDTN, na pessoa do Dr. Márcio Tadeu Pereira, por permitir a utilização do laboratório, possibilitando o andamento do projeto.

À Dra. Jaqueline de Araújo Bezerra, pelas dúvidas sanadas e pela ajuda com as análises no RMN.

À Dra Francisca Souza pelo apoio nas análises dos óleos de castanha.

Ao NECTA e ao BIOPHAR pela colaboração, cedendo espaço para a realização dos testes.

Aos meus amigos da FCF por terem tornado essa caminhada mais fácil e descontraída.

Aos professores do PPGCF da Universidade Federal do Amazonas, por todo os ensinamentos.

A CAPES pelo suporte financeiro.

A todos vocês, Muito Obrigada!

RESUMO

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) é um alimento nutricionalmente rico e muito utilizado tanto em sua forma in natura para consumo direto, quanto em formatos granulados e moídos para uso em produtos de panificação, por exemplo. Trata-se de um alimento suscetível à contaminação por fungos produtores de aflatoxinas, que são tóxicas a saúde humana. Sendo assim o controle da contaminação fúngica e micotoxigênica é importante tanto para evitar grandes perdas econômicas e impacto socioambiental na região amazônica, quanto por uma questão de saúde pública. Frente a isso o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da radiação gama nas doses de 1, 10 e 20 KGy em castanhas-do-Brasil inteiras e granuladas, contaminadas por aflatoxinas e inoculadas artificialmente com *Aspergillus flavus* além de analisar o impacto da radiação na qualidade do óleo e composição de ácidos graxos e compostos voláteis, visto que a castanha é um produto rico em ácidos graxos insaturados que favorecem a rancidez oxidativa. Observou-se que todas as doses testadas conseguiram inibir o crescimento fúngico nas amostras inteiras e granuladas. Quanto à contaminação por aflatoxinas a dose de 20 KGy foi a que causou maior redução nas Aflatoxinas totais das castanhas granuladas, reduzindo 20%, enquanto que nas inteiras a redução foi de apenas 6%. Todas as doses causaram um aumento nos índices de acidez e peróxidos de ambos os formatos, porém esse aumento ainda está dentro do limite permitido para validar a qualidade dos óleos vegetais. A composição de ácidos graxos apresentou variação conforme a dose de radiação usada e o formato da castanha. As amostras granuladas apresentaram uma composição bem semelhante, com um leve aumento de ácidos graxos saturados, em especial o ácido esteárico, e diminuição dos insaturados. Já nas amostras inteiras a dose de 1 KGy foi a que mais alterou a composição de ácidos graxos, causando uma elevação nos saturados, em especial o ácido palmítico. Apesar disso, essa alteração nos perfis de ácidos graxos não variou muito do comumente encontrado em castanhas-do-Brasil. Conclui-se que a radiação gama se mostra um tratamento promissor na redução de aflatoxinas e eliminação de fungos aflatoxigênicos em castanhas-do-Brasil, além disso o formato da castanha influenciou na ação da radiação.

Palavras-chave: **Radiação gama; Aflatoxinas; Castanha-do-Brasil; *Aspergillus flavus*.**

ABSTRACT

Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) is a nutritionally rich food and is widely used both in its natural form for direct consumption, as well as in granulated and ground formats for use in bakery products, for example. It is a food susceptible to contamination by fungi producing aflatoxins, which are toxic to human health. Thus, the control of fungal and mycotoxigenic contamination is important both to avoid major economic losses and socioenvironmental impact in the Amazon region, and for public health reasons. In view of this, the objective of this study was to evaluate the effects of gamma radiation at doses of 1, 10 and 20 KGy in whole and granulated Brazil nuts, contaminated by aflatoxins and artificially inoculated with *Aspergillus flavus* in addition to analyzing the impact of radiation on oil quality and composition of fatty acids and volatile compounds, as the nut is a product rich in unsaturated fatty acids that favor oxidative rancidity. It was observed that all doses tested were able to inhibit fungal growth in whole and granulated samples. As for contamination by aflatoxins, the dose of 20 KGy was the one that caused the greatest reduction in the total Aflatoxins of the granulated nuts, reducing 20%, while in the whole the reduction was only 6%. All doses caused an increase in the acidity and peroxide indices of both formats, however this increase is still within the limit allowed to validate the quality of vegetable oils. The composition of fatty acids varied according to the radiation dose used and the shape of the nut. The granulated samples had a very similar composition, with a slight increase in saturated fatty acids, especially stearic acid, and a decrease in unsaturated acids. In the whole samples, the dose of 1 KGy was the one that most changed the composition of fatty acids, causing an increase in saturated acids, especially palmitic acid. Despite this, this change in fatty acid profiles did not vary much from that commonly found in Brazil nuts. It is concluded that gamma radiation shows a promising treatment in the reduction of aflatoxins and elimination of aflatoxigenic fungi in Brazil nuts. In addition, the shape of the Brazil nut influenced the action of radiation.

Keywords: **Gamma radiation; Aflatoxins; Brazil nuts; *Aspergillus flavus*.**

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Esquema geral do processo de oxidação lipídica	15
Figura 2 – Fluxograma de beneficiamento da castanha-do-Brasil	17
Figura 3 – Estruturas químicas das Aflatoxinas	22
Figura 4 – Métodos de prevenção e descontaminação de micotoxinas	26
Figura 5 – Espectro eletromagnético	28
Figura 6 – Penetrabilidade das radiações ionizantes	29
Figura 7 – Formação do Isótopo radioativo Cobalto – 60	30
Figura 8 – Ação de produtos da radiólise da água sobre AFL	33
Figura 9 – Amostras de castanhas-do- Brasil granuladas e inteiras embaladas	35
Figura 10 – Fluxograma de divisão das amostras	36
Figura 11 – Câmara de Irradiação do LIG, no CDTN	38
Figura 12 – Prensa Mecânica utilizada para extração do óleo	40
Figura 13 - Placas para pesquisa de microbiota	44
Figura 14 – Degradação de AFB1 por irradiação com feixe de elétrons	52
Figura 15 - Espectro de RMN ¹ H dos óleos de castanha irradiados	65
Tabela 1 - Composição química centesimal e valor energético da castanha-do-Brasil.....	13
Tabela 2- Principais ácidos graxos presentes na castanha-do-Brasil.....	14
Tabela 3 - Classificação das principais micotoxinas.....	19
Tabela 4 - Distância das amostras para a fonte de radiação de acordo com a dosagem final desejada.....	38
Tabela 5 - Número de UFC/g de <i>A. flavus</i> em amostras inoculadas artificialmente: não irradiadas e irradiadas	45
Tabela 6 - Concentração de aflatoxinas em castanhas contaminadas artificialmente: Não irradiadas e irradiadas.....	47
Tabela 7 - Estudos sobre redução de AFL em alimentos tratados com radiação gama.....	50
Tabela 8 - Valores de índice de Acidez (em mg KOH/g) obtidos das amostras de óleo de Castanha-do-Brasil, irradiadas e não irradiadas.....	54
Tabela 9 - Valores de índice de peróxido (em mEq/kg) obtidos das amostras de óleo de Castanha-do-Brasil, irradiadas e não irradiadas.....	56
Tabela 10 - Composição por CG de Ácidos graxos Saturados e Insaturados presentes nas amostras não irradiadas e irradiadas	59
Tabela 11 - Principais ácidos graxos presentes nas amostras de castanhas-do-Brasil irradiadas e não irradiadas.....	61
Tabela 12- Composição de óleo calculado pelo espectro de RMN ¹ H.....	65

LISTA DE GRÁFICOS E EQUAÇÕES

Gráfico 1 - Crescimento de <i>A. flavus</i> inoculados artificialmente em castanhas-do-Brasil granuladas e inteiras após o tratamento com radiação gama	45
Gráfico 2 - Redução de AFB1 em amostras de castanhas inteiras e granuladas após tratamento com radiação gama	48
Gráfico 3 - Redução de AFB2 em amostras de castanhas inteiras e granuladas após tratamento com radiação gama.....	48
Gráfico 4 - Redução de AFG1 em amostras de castanhas inteiras e granuladas após tratamento com radiação gama.....	48
Gráfico 5 - Redução de AFG2 em amostras de castanhas inteiras e granuladas após tratamento com radiação gama.....	48
Gráfico 6 - Redução de AFL total em amostras de castanhas inteiras e granuladas após tratamento com radiação gama.....	48
Gráfico 7 - Índice de Acidez (em mg KOH/g) das amostras de óleo das castanhas inteiras e granuladas após o tratamento com doses de radiação gama.....	55
Gráfico 8 - Índice de Peróxidos (em mEq/kg) das amostras de óleo das castanhas inteiras e granuladas após o tratamento com doses de radiação gama.....	57
Gráfico 9 - Ação da radiação gama nos Ácidos Graxos Insaturados de Castanha-do-Brasil inteira e granulada.....	60
Gráfico 10 - Ação da radiação gama nos Ácidos Graxos Saturados de Castanha-do-Brasil inteira e granulada.....	60
Gráfico 11 - Ácido linoleico em amostras de castanhas granuladas e inteiras, não irradiadas e irradiadas.....	62
Gráfico 12 -Ácido palmítico em amostras de castanhas granuladas e inteiras, não irradiadas e irradiadas.....	62
Gráfico 13 - Ácido oleico em amostras de castanhas granuladas e inteiras, não irradiadas e irradiadas.....	62
Gráfico 14- Ácido esteárico em amostras de castanhas granuladas e inteiras, não irradiadas e irradiadas.....	62
Gráfico 15 - Biplot da análise por PCA dos voláteis dos óleos de castanhas irradiadas e não irradiadas.....	63
Equação 1 – Índice de Acidez	41
Equação 2 – Índice de Peróxido	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Castanha-do-Brasil.....	13
2.2 Composição da Castanha-do-Brasil.....	14
2.3 Produção de castanha-do-Brasil.....	17
2.4 Micotoxinas	20
2.5 Aflatoxinas - AFLs	22
2.6 Aflatoxinas em Castanha-do-Brasil	25
2.7 Métodos de descontaminação	27
2.8 Radiação Ionizante.....	29
2.9 Radiação Gama	32
2.10 Efeito da Radiação Gama sobre Aflatoxinas	34
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Amostras	37
4.2 Inóculo de <i>Aspergillus flavus</i>	39
4.3 Contaminação Artificial com Aflatoxinas	39
4.4 Tratamento por Irradiação.....	39
4.5 Inibição do Crescimento Fúngico	40
4.6 Aflatoxinas.....	41
4.7 Extração do óleo de castanha-do-Brasil.....	42
4.7.1 Caracterização físico-química do óleo	42
4.7.2 Composição do óleo - Ácidos Graxos.....	43
4.8 Análise Estatística.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Inibição do Crescimento fúngico	46
5.2 Aflatoxinas.....	49
5.3 Índice de Acidez	56
5.4 Índice de Peróxido	58
5.5 Composição do óleo – Ácidos graxos.....	61
6. CONCLUSÃO.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8. ANEXOS	84
8.1 Análise de variância para o crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> em castanha-do-Brasil. 84	84
8.2 Análise de Variância para AFB1	84
8.3 Análise de Variância para AFG1	84
8.4 Análise de Variância para AFB2	84
8.5 Análise de Variância para AFG2	85
8.6 Análise de Variância para AFLtotal	85
8.7 Análise de Variância para índice de acidez	85
8.8 Análise de Variância para índice de peróxido	85
8.9 Análise de Variância para Ácidos Graxos Saturados	86

8.10 Análise de Variância para Ácidos Graxos Insaturados.....	86
8.11 Análise de Variância para Ácido Linoleico	86
8.12 Análise de Variância para Ácido Palmítico	86
8.13 Análise de Variância para Ácido Oleico.....	87
8.14 Análise de Variância para Ácido Esteárico	87

1. INTRODUÇÃO

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) é uma das mais importantes espécies de exploração extrativista da Amazônia. É considerada um alimento nutricionalmente rico, cuja composição é formada, principalmente, por ácidos graxos insaturados, proteínas de alto valor biológico, além de ser uma ótima fonte de vitaminas, fibras e minerais, com destaque para seu teor de selênio, que é um importante antioxidante estudado na prevenção de câncer e doenças cardiovasculares. Todas essas propriedades, aliadas ao seu sabor exótico, contribuem para a valorização deste alimento tanto no mercado nacional quanto no internacional (SILVA et. al., 2010; KLUCZKOVSKI e SCUSSEL, 2015).

Entretanto, as condições climáticas da floresta Amazônica, região onde a cadeia produtiva de castanha-do-Brasil está inserida, caracteriza-se por temperaturas elevadas e umidade alta, o que favorece a contaminação por fungos produtores de micotoxinas, como as aflatoxinas (AFLs), contaminantes que, quando ingeridos através dos alimentos podem afetar a saúde humana com ação carcinogênica e mutagênica, além de também favorece a rancidez do produto (ZAJDENWERG et al., 2011; ANDRADE et al., 2013; MASSI et al., 2014).

Devido ao elevado índice de contaminação por AFLs em lotes de castanha-do-Brasil, a União Européia passou a exigir condições especiais para a importação do produto, dentre elas a determinação dos teores de AFLs por laboratórios credenciados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2000). Já no Brasil, as exigências para o controle de AFLs são menos restritivas, o que faz com que os lotes rejeitados pelos países europeus sejam direcionados para o mercado nacional, representando um risco para a saúde da população, que consome a castanha-do-Brasil tanto inteira quanto granulada. Sendo assim, o controle da contaminação fúngica e micotoxigênica é importante tanto para evitar grandes perdas econômicas e impacto socioambiental na região amazônica, quanto por uma questão de saúde pública.

A legislação brasileira libera o uso do radioisótopo cobalto-60 para irradiar alimentos e o emprego desse tratamento pode ser um método válido para prevenir os riscos de contaminação por fungos aflatoxigênicos, além de representar uma alternativa viável para a descontaminação de castanha-do-Brasil. Porém, estudos sobre os efeitos da radiação gama na castanha-do-Brasil ainda são escassos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Castanha-do-Brasil

A Castanha (*Bertholletia excelsa* H.B.K) é uma árvore da família *Lecythidaceae*, nativa das matas de vários países da região Amazônica como Peru, Venezuela, Colômbia, Suriname, Guiana Francesa, Bolívia e Brasil, cobrindo uma superfície de aproximadamente 325 milhões de hectares, com suas formações mais densas estando no Brasil, nos estados do Acre, Rondônia, Pará, Amapá, Mato Grosso, Goiás e Amazonas (COSTA, 2009; SALOMÃO, 2009; JUNIOR *et al.*, 2017). Apresenta um bom desenvolvimento em regiões que apresentam clima quente e úmido, com tipos climáticos tropicais chuvosos predominantes e períodos de estiagem bem definidos (MULLER *et al.*, 1995).

A castanheira é uma árvore que pode atingir a altura de 50 m, com diâmetro entre 1 e 3 metros, apresenta tronco cilíndrico, reto e liso, que se ramifica apenas na porção superior da copa, que pode atingir cerca de 20 e 35 m de diâmetro (LORENZI, 2010; SCHÖNGART *et al.*, 2015). A queda dos seus frutos (ouriços) ocorre na estação chuvosa, durante os meses de novembro a abril. Com a queda desses ouriços alguns roedores, como as cutias, alimentam-se das sementes (amêndoas) de castanha, a partir da quebra dos ouriços, deixando o excedente no chão da floresta, que pode brotar e “perpetuar” a espécie. Por ser rústica, apresenta uma elevada sobrevivência e crescimento rápido em plantios heterogêneos em áreas degradadas pela mineração (BAQUIÃO, 2012).

O fruto da castanheira, o ouriço, é uma cápsula globosa, quase esférica, que mede cerca de 8 a 15 cm de diâmetro, possui casca espessa, lenhosa, dura e de cor castanha e pode chegar a pesar até 1,5 kg (RODRIGUES, 2016; SANTOS, 2012). Em seu interior pode conter, em média, 15-25 sementes, que apresentam uma casca dura e irregular (triangular) e, as quais envolvem a amêndoa, parte comestível do fruto, chamada de castanha-do-brasil (FREITAS-SILVA e VENÂNCIO, 2011).

As amêndoas da Castanha-do-Brasil são um dos principais produtos do extrativismo exportado pela região Norte. Segundo o IBGE (2018), a produção brasileira de castanha-do-Brasil no ano de 2017 foi de 26.191 toneladas, o Acre foi o estado com a maior participação com 36,3% da produção, seguido por Amazonas com 27%, Pará com 26,9%, Rondônia com 4,4%, Mato Grosso com 4%, Amapá com 1,1% e Roraima com 0,3%, além de ser uma atividade ligada à conservação da Floresta Amazônica, uma vez que a coleta das castanhas-

do-brasil não exige a derrubada da castanheira em si, sendo então, de baixo impacto ambiental (RODRIGUES, 2016).

2.2 Composição da Castanha-do-Brasil

A castanha-do-Brasil é bastante apreciada pelos seus consumidores, dotada de um sabor exótico, ela pode ser consumida tanto “*in natura*” como misturada em outros alimentos. Trata-se de uma matéria-prima com grande diversidade de produtos e subprodutos, inclusive extração de seu óleo, que pode ser usado em aplicações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias (FREITAS *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2010). O maior mercado da castanha-do-Brasil é devido ao grande uso na indústria alimentícia, que além de ser um alimento de alto valor nutricional, pode ser usado na produção de farinha desengordurada, panificação, confeitarias, mingaus, bolos, biscoitos, doces, suplementos proteicos, leites, bebidas dietéticas, sorvetes, entre outros (MARTINS *et al.*, 2008)

A castanha-do-Brasil é constituída principalmente por ácidos graxos insaturados e proteínas que apresentam alto valor biológico. Apresentando abundância em lipídeos, proteínas, carboidratos, fibras e é uma fonte de vitaminas e minerais, entre eles a tiamina, niacina, vitamina E, vitamina B6, selênio (Se), ferro (Fe), magnésio (Mg) e manganês (Mn) que são interessantes no ponto de vista nutricional, com destaque ao elevado percentual de selênio, que é um importante antioxidante e vem sendo vinculado a redução de alguns tipos de câncer e outras doenças (CHUNHIEG *et al.*, 2008; YANG, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2009; PENNACCHIO, 2012).

Estudos mostram que a castanha-do-Brasil apresenta cerca de 60 a 70% de lipídios e 15-20% de proteínas, cerca de cinco vezes do valor proteico apresentado pelo leite bovino “*in natura*”. Devido ao grande teor de lipídios presente na amêndoa da castanha, o valor energético (Kcal) é de cerca 670 Kcal (KLUCZKOVSKI E SCUSSEL, 2015; MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2018). A Tabela 1 apresenta a composição centesimal da castanha-do-Brasil.

Tabela 1: Composição química centesimal e valor energético da castanha-do-Brasil.

	Souza; Menezes (2004)	Venkatashalam; Sathe (2006)	USDA (2008)	Felberg <i>et al.</i> (2009)	Freitas (2010)	Cardoso (2017)
Valor energético (Kcal)	676,5	NI	NI	NI	655,9	693,0
Lipídios (g)	67,3	66,7	69	70,6	64,9	66,2
Proteínas (g)	14,3	19,9	18	14,3	14,1	15,2
Carboidratos (g)	3,4	0,7	13	11,6	6,3	12,4
Fibra total (g)	8,02	NI	NI	NI	8,0	7,7

NI: Não informado

A castanha-do-Brasil é conhecida como “carne vegetal”, devido ao seu teor de proteínas, que contem todos os aminoácidos essenciais, especialmente os sulfurados (metionina e cisteína), que geralmente é insuficiente em proteínas vegetais (KLUCZKOVSKI *et al.*, 2015). Os escores químicos apresentados por esses aminoácidos são superiores aos do padrão teórico recomendado pela Food and Agriculture Organization (FAO) (SOUZA e MENEZES, 2004).

Em relação à composição de lipídios, a castanha-do-Brasil é rica em ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados, que tem potencial de diminuir o colesterol ruim do sangue (LDL) e aumentar o colesterol bom (HDL), ajudando na prevenção de doenças cardiovasculares (CARDOSO, 2017). A relação entre os saturados, monoinsaturados e poli-insaturados é 25:41:34 (KLUCZKOVSKI e SCUSSEL, 2015), mostrando que o teor de gordura insaturada na castanha-do-Brasil é maior do que em qualquer outra noz (MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2018).

A fração lipídica da castanha-do-Brasil é composta majoritariamente por ácidos graxos insaturados, sendo 37,75% de ácido poliinsaturado linoleico e 37,42% de ácido monoinsaturado oléico, totalizando 75,17% dos ácidos graxos totais, enquanto que os outros 24,83% equivalem aos ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico e esteárico, cujo teor

desses ácidos presentes na castanha-do-Brasil está entre os mais altos em relação ao de outras nozes como macadâmia, amendoim, castanha de caju e pistache (COLPO *et al.*, 2014; SILVA, 2014). O elevado teor de ácidos graxos insaturados da castanha-do-Brasil pode auxiliar a redução da pressão arterial, redução de níveis de marcadores inflamatórios sistêmicos e a ingestão regular desses ácidos estão associados a redução da mortalidade por doenças cardiovasculares (MASSI *et al.*, 2014; VADIVEL; KUNYANGA; VADIVEL, 2012). A Tabela 2 apresenta os principais ácidos graxos presentes na castanha-do-Brasil de acordo com alguns autores.

Tabela 2: Principais ácidos graxos presentes na castanha-do-Brasil.

Componentes (ácidos)	Silva <i>et al.</i> (2010)	Santos <i>et al.</i> (2012)	Colpo <i>et al.</i> (2014)	Ozcan <i>et al.</i> (2017)	Sartori <i>et al.</i> (2018)
Palmítico (C16)	13,33	14,24	16,74	13,51	15,94
Estearico (C18)	10,78	11,19	9,97	8,91	11,30
Oléico (C18:1)	36,21	36,26	28,52	31,71	32,83
Linoléico (C18:2)	38,28	37,53	36,04	44,39	39,35
Linolênico (C18:3)	NI	0,076	0,11	0,11	NI

NI: Não informado

Devido ao elevado índice de ácidos graxos insaturados, a castanha-do-Brasil é um alimento altamente sensível aos processos oxidativos os quais os lipídios estão expostos (FENNEMA,2018). Essas reações de oxidação lipídica ocorrem em três fases: a iniciação, propagação e terminação, como mostrado na figura 1. Na fase de iniciação um radical livre $R\cdot$, é formado a partir de um triglicerídeo ou ácido graxo livre, quando há a interação com o oxigênio na presença de alguns iniciadores, como a luz, calor e radiação. Na fase da propagação, o radical livre $R\cdot$ pode reagir com o O_2 formando um radical peróxido que, por sua vez, reage com um triglicerídeo ou ácido graxo livre, produzindo hidroperóxidos e um novo radical livre, que continuará o processo de propagação. A fase final, de terminação, ocorrerá quando dois radicais livres reagirem entre si, levando à formação de um produto estável. Ao final dessa reação, podem ser detectados a presença de compostos carbonil,

aldeídos, hidrocarbonetos e produtos tóxicos, considerados como rancidez oxidativa (DIAS E ALVEZ, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2015).

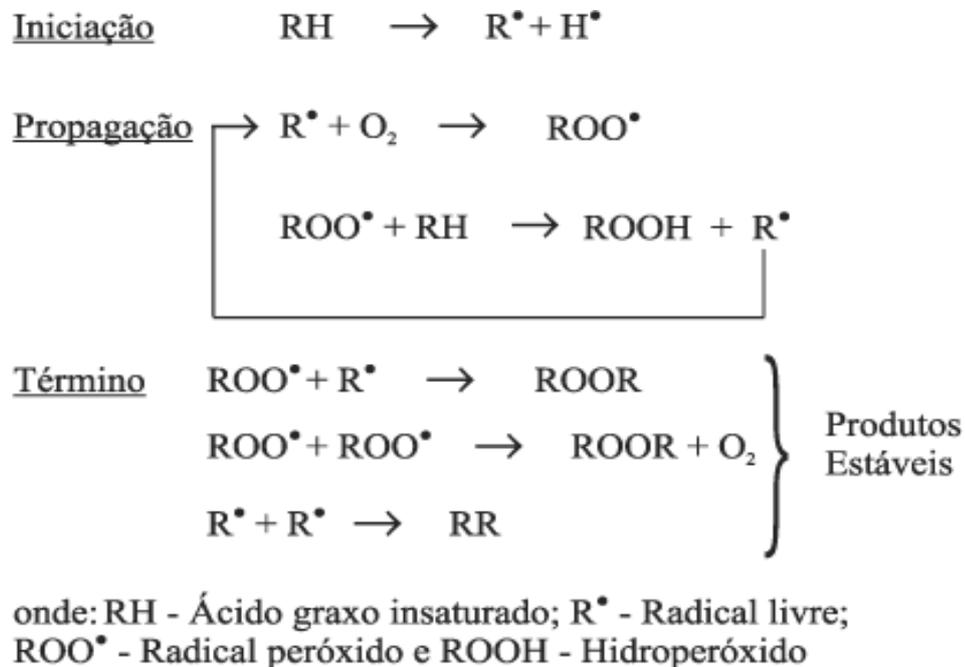


Figura 1: Esquema geral do processo de oxidação lipídica (ABREU, 2006).

Estes processos oxidativos além de diminuir a qualidade nutricional do alimento, são responsáveis pelo surgimento de cheiro e sabor rançoso, sendo uma importante causa de deterioração de alimentos e um sério problema econômico e tecnológico uma vez que a alteração na cor e formação de compostos tóxicos secundários à oxidação tornam estes alimentos menos aceitáveis ou inaceitáveis pelo consumidor. Sendo assim, a taxa de oxidação é um parâmetro de qualidade importante que deve ser monitorado (FUNASAKI *et al.*, 2013; COELHO, 2012; SILVA, 2014).

2.3 Produção de castanha-do-Brasil

O sistema de produção de castanha-do-Brasil é extrativista, e ainda é a principal atividade econômica de milhares de famílias da Amazônia. Consiste em uma atividade que ocorre desde o século XIX e envolve desde comunidades indígenas até mão-de-obra industrial, onde cada safra mobiliza em média 100.000 pessoas (ALVARES, 2012; KLUCZKOVSKI e SCUSSEL, 2015).

O processo inicia com a coleta da castanha na floresta, após a queda do ouriço da castanheira na época das chuvas (geralmente de dezembro a março), em que se utilizam poucos investimentos tecnológicos, usando uma técnica simples de coleta, quebra de ouriços, realizadas ainda dentro das florestas e em seguida, o transporte é feito até as indústrias de beneficiamento (CALDERARI, 2011; SANTOS, 2012). Esse extrativismo necessita de boas práticas de manejo, de forma a evitar a contaminação das castanhas, principalmente nas fases de lavagem, secagem e armazenamento (TONINI *et al.*, 2014).

A cadeia produtiva da castanha segue a legislação brasileira MPRCA “Medidas para prevenção e redução de contaminação por aflatoxinas” e as medidas de higiene e manejo (MHM) (BRASIL, 2011). Dentre as fases práticas iniciais da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil está a de enterrar ou depositar em locais distantes da área de coleta, os restos de safras anteriores, além disso, deve-se fazer a quebra dos ouriços em áreas limpas em cima de sacos brancos, de forma a facilitar a visualização das castanhas deterioradas e, após a quebra do ouriço, as castanhas devem ser retiradas da floresta no menor tempo possível e com um armazenamento adequado (NOGUEIRA *et al.*, 2010; BRASIL, 2011).

O transporte da área extrativista até as usinas de beneficiamento ocorre por via fluvial, na maioria das vezes, em embarcações de pequeno porte, no período de chuvas intensas, devido à elevação dos níveis das águas. Esse transporte deve conter atividades que previnam a contaminação fúngica, como a aeração dos ambientes, uma vez que esse risco aumenta com as condições ambientais da floresta Amazônica (KLUCZKOVSKI *et al.*, 2015; RODRIGUES, 2016).

O beneficiamento da castanha-do-Brasil consiste em preparar a matéria-prima para o consumo, seja ele com ou sem casca. Dentre as etapas de beneficiamento estão: recepção, armazenamento, lavagem, tratamento térmico, descasque, seleção, classificação, desidratação, polimento, pesagem, embalagem e armazenamento, a Figura 2 mostra um fluxograma resumido do beneficiamento da castanha-do-Brasil.

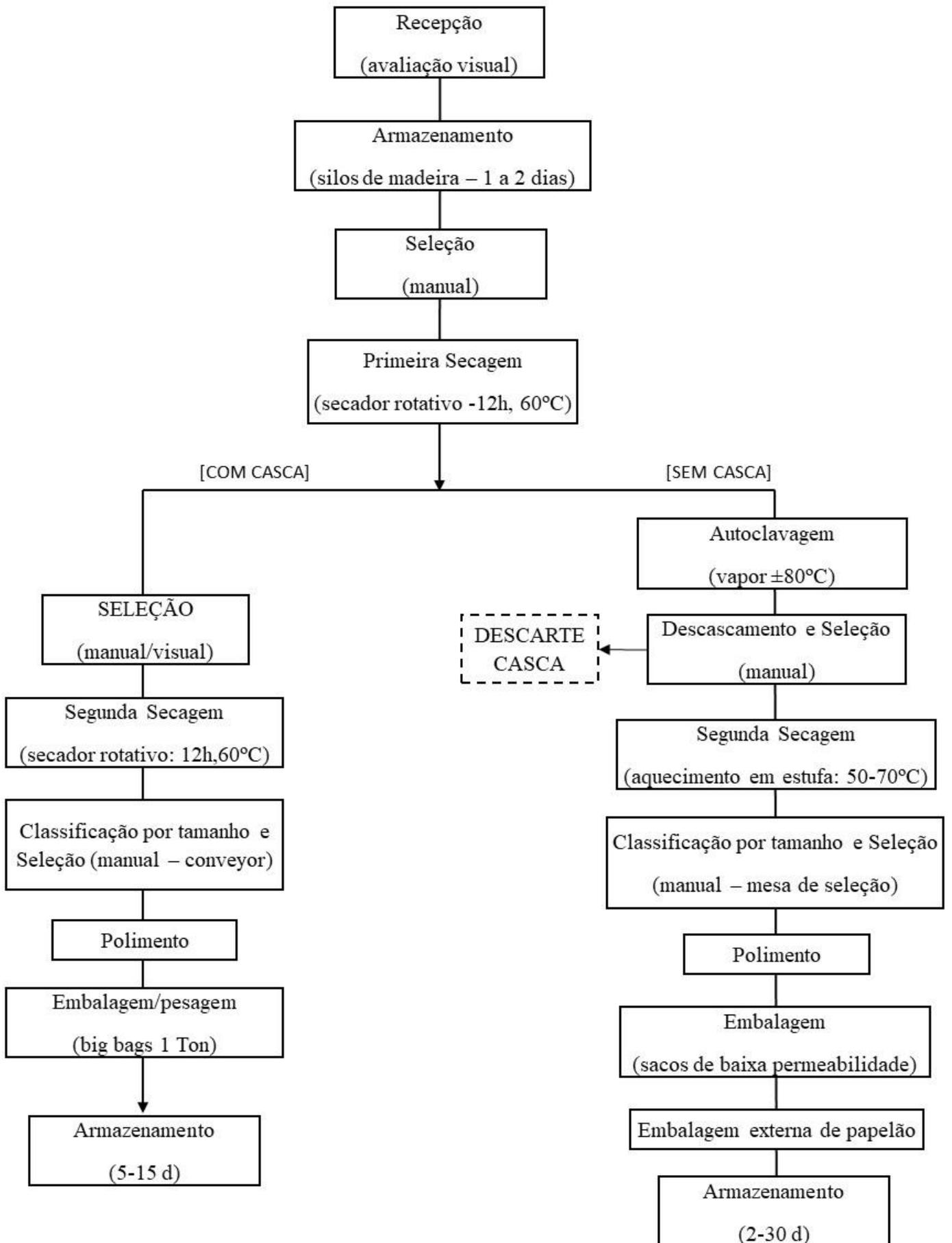


Figura 2: Fluxograma de beneficiamento da castanha-do-Brasil

O baixo nível tecnológico em algumas etapas da cadeia produtiva favorece a constituição de pontos de contaminação com consequentes riscos à saúde do consumidor e a perdas econômicas. A coleta, secagem, armazenamento e o transporte da castanha do Brasil são considerados etapas críticas, pois dependendo de como forem realizadas, há maior ou menor chance de contaminação por fungos e possíveis toxinas (VALOIS, 2003; ÁLVARES, 2012). Para evitar ao máximo essa contaminação, Boas Práticas de Manejo (BPM) na fase de pré-colheita até a pós-colheita dos ouriços devem ser incorporadas, pois além de evitar a proliferação fúngica e contaminação por micotoxinas, são um importante incentivo para apoiar ações de manejo florestal comunitário como uma estratégia de uso e conservação da floresta (SIMÕES, 2004; VIEIRA e TEIXEIRA, 2012).

Ao final da produção, a castanha pode ser comercializada com ou sem casca, desidratadas ou semidesidratadas, moída (farinha), inteira ou granulada, e ainda a granel, ou seja, o beneficiamento pode ou não ser realizado (CALDERARI, 2013; KATO *et al.*, 2018). Além da importância para a exportação, esses produtos são muito utilizados na culinária regional e também como ingredientes de produtos industriais, com snacks saudáveis e produtos de panificação, como pães e bolos. Merecendo uma atenção especial quanto à presença de contaminantes que reduzam a sua qualidade e são perigosos para a saúde dos consumidores.

2.4 Micotoxinas

A palavra micotoxina tem sua origem do grego “mykes”, que significa fungo, e do latim “toxicum” que significa veneno ou toxina (GOLDBLATT, 1972; MOSS, 1998). Compreende um conjunto de substâncias tóxicas, produzidas por fungos filamentosos, conhecidos como bolores, e podem causar graves danos à saúde humana e animal, com ação cancerígena e hepatotóxica, dependendo da quantidade encontrada nos alimentos (COELHO, 2012). São comumente encontradas em uma grande variedade de alimentos, incluindo cereais, leguminosas, nozes e oleaginosas (SCUSSEL *et al.*, 2014; PIACENTINI *et al.*, 2015).

Existem hoje mais de 300 substâncias classificadas como micotoxinas. Elas são metabólitos secundários de fungos, termoestáveis, com baixo peso molecular, possuem uma alta estabilidade química, sendo resistentes a altas temperaturas, a tratamentos químicos e ação de enzimas digestivas e, por isso, podem permanecer nos alimentos mesmo após a remoção dos fungos durante a industrialização dos produtos (ASTROVIZA e SUAREZ,

2005; LOPES *et al.*, 2005; PEREIRA e SANTOS, 2011). A ausência aparente de sinais de contaminação fúngica, por outro lado, não significa que o alimento encontra-se livre de toxinas (FERREIRA *et al.*, 2014).

As principais micotoxinas são produzidas, principalmente, por fungos dos gêneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. e *Claviceps* spp. (RODRIGUES, 2016; XAVIER e SCUSSEL, 2008). A Agência Nacional para Pesquisa em Câncer (IARC), em 1993, avaliou o potencial cancerígeno de algumas micotoxinas consideradas de maior risco à saúde humana e classificou-as quanto ao risco (Tabela 3) (IARC, 2002).

Tabela 3: Classificação das principais micotoxinas.

Classificação	Micotoxinas
Carcinógenos do grupo 1	Aflatoxinas
Carcinógenos do grupo 2B	Fumonisina Ocratoxina
Carcinógenos do grupo 3	Tricoteceno Zearalenona Patulina

Fonte: IARC (2002)

Esses fungos toxigênicos podem crescer e produzir toxinas em produtos agrícolas, nas diversas etapas do desenvolvimento da planta, colheita ou estocagem de alimentos, durante o transporte, na indústria ou qualquer momento da fase de consumo do produto final, quando há a exposição às toxinas através da ingestão de alimentos contaminados (COELHO, 2012; DA SILVA, 2014).

A produção de micotoxinas vai depender de vários fatores intrínsecos aos alimentos como a susceptibilidade do substrato, a composição nutricional do alimento, teor de umidade e atividade de água, pH, e fatores extrínsecos como a temperatura do ambiente, umidade

relativa do ar, aeração, danos mecânicos, tempo de armazenamento do produto e até mesmo competição microbológica (KLUCZKOVSKI e SCUSSEL, 2015).

Essa contaminação de alimentos por micotoxinas pode levar a perdas econômicas de milhões de dólares para o comércio nacional e internacional, uma vez que muitos países estabeleceram limites máximos para micotoxinas em alimentos, juntamente com o impacto para a saúde humana e animal (MARIN *et al.*, 2013). Os principais alimentos suscetíveis a contaminação por micotoxinas incluem o amendoim, milho e castanhas, em especial a castanha-do-Brasil (IAMANAKA *et al.*, 2010; COELHO, 2012).

As doenças causadas pelo consumo de micotoxinas são as micotoxicoses e a gravidade dos sintomas depende diretamente do tipo e toxicidade da micotoxina, da quantidade que foi ingerida, do tempo de ingestão dos alimentos contaminados, além de fatores como sexo, idade e estado nutricional e de saúde da pessoa. Os sintomas podem ir desde lesões na pele, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, nefrotoxicidade, efeitos mutagênicos, teratogênicos e imunossupressores podendo chegar até a morte (BANDO, 2007; IAMANAKA *et al.*, 2013; SCUSSEL *et al.*, 2014).

Devido aos riscos à saúde relacionados ao consumo de alimentos contaminados com micotoxinas, assim como aos prejuízos que essa contaminação causa na economia, diversos países criaram legislações que estabelecem os limites máximos toleráveis (LMT) específicos para os diferentes tipos de micotoxinas em uma variedade de alimentos, baseados em aspectos científicos, hábitos alimentares, clima, com a finalidade de minimizar os efeitos negativos causados por essas toxinas (KLUCZKOVSKI e SCUSSEL, 2015; XAVIER, 2007; SAVI *et al.*, 2014). Os LMT estabelecidos para uma ou várias micotoxinas variam de acordo com cada país e com características de consumo do alimento, importação e exportação do mesmo. No Brasil a Resolução – RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), dispõe sobre os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos (BRASIL, 2013).

2.5 Aflatoxinas - AFLs

As AFLs são micotoxinas produzidas no metabolismo de fungos do gênero *Aspergillus*, entre eles *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. niger* e *A. fumigatus*. Esse grupo de micotoxinas são consideradas as mais tóxicas, destacando-se por serem

hepatotóxicas, teratogênicas e mutagênicas (PINHEIRO, 2004; FONSECA, 2006; ISMAIL *et al.*, 2016).

Este grupo de micotoxinas foi descoberto durante um estudo das causas de um acidente econômico ocorrido em 1960, na Inglaterra, que resultou na morte de cerca de 400.000 perus devido ao consumo de ração contaminada associada a lotes com farelo de amendoim exportados pelo Brasil e consumido por essas aves. Após um estudo detalhado, descobriu-se um composto altamente tóxico aos animais e, em 1961, foi identificado *A. flavus* como produtor da AFL, daí a origem desse nome (*A. flavus* - Afla) (BLOUNT, 1961; ZOLLNER, 2006; OGA, 2008; FERREIRA *et al.*, 2014). Desde então, as AFLs vem sendo muito estudadas.

Existem, atualmente, mais de 17 tipos de AFLs conhecidas, porém as mais tóxicas para a saúde humana são as Aflatoxinas B1 (AFB1), Aflatoxinas B2 (AFB2), Aflatoxinas G1 (AFG1) e Aflatoxinas G2 (AFG2), que são tipicamente relatadas em alimentos secos (cereais, especiarias, nozes). Além das aflatoxinas M1 (AFM1) e M2 (AFM2) que são produtos do metabolismo das AFB1 e AFB2, respectivamente e são detectadas em amostras de leite, urina e fezes de alguns mamíferos (TEIXEIRA, 2008; UDOMKUN *et al.*, 2017; AKHTAR *et al.*, 2017).

Quimicamente, as AFLs são compostos heterocíclicos oxigenados, onde as AFG1 e AFG2 se diferem quimicamente das AFB1 e AFB2 pela presença de um anel 3-lactona, no lugar do anel ciclopentanona, além da presença de uma dupla ligação entre o C8 e C9, encontrada na forma de um éter vinil no anel terminal furano nas AFB1 e AFG1, mas que não são encontrados em AFB2 e AFG2, como pode ser visto na Figura 3 (JAIMEZ *et al.*, 2000; SCUSSEL *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2018).

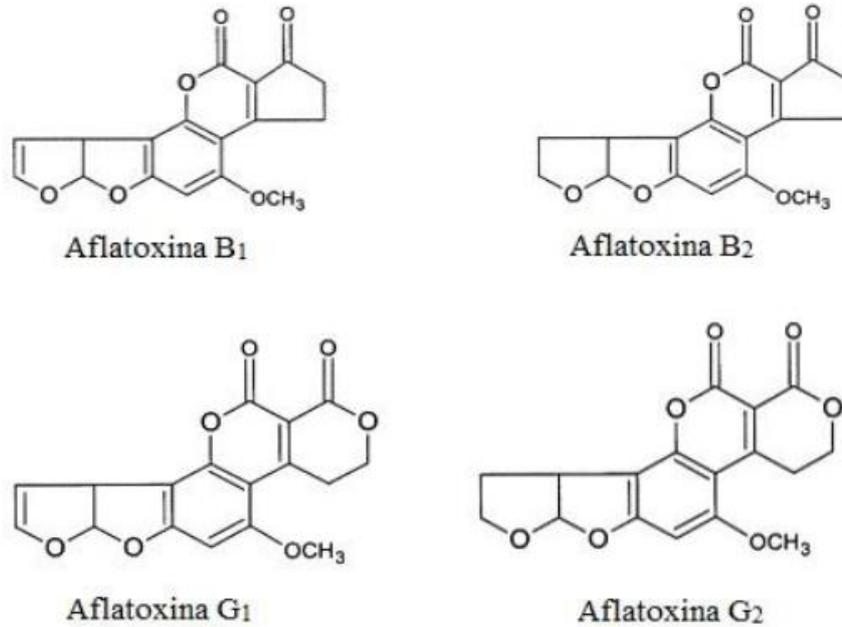


Figura 3: Estruturas químicas das Aflatoxinas.
 Fonte: ZAIN *et al.*, (2011).

As AFL são classificadas de acordo com a fluorescência emitida sob luz UV, onde as AFB1 e AFB2 emitem fluorescência azul (*blue*) e as AFG1 e AFG2, fluorescência verde (*green*). Esses compostos são ainda instáveis à luz e degradáveis em temperaturas acima de 100 °C. São substâncias apolares, solúveis em solventes como o clorofórmio, metanol e acetonitrila (GOWDA *et al.*, 2007; KLISCH, 2007; COSTA *et al.*, 2017).

As AFL apresentam diferentes graus de toxicidade, apesar das semelhanças estruturais. A AFB1 é a variante mais tóxica e mais abundante nos alimentos, conhecida por ser carcinogênica, teratogênica e mutagênica, causando principalmente danos no fígado. A AFG1 é consideravelmente mais tóxica que as AFB2 e AFG2 e, geralmente não são relatadas nos alimentos na ausência de AFB1 (JOHNSSON *et al.*, 2008; CALDERARI *et al.*, 2013; CAMPOS *et al.*, 2017). AFLs totais refere-se à soma dessas 4 aflatoxinas relacionadas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2).

As AFLs são absorvidas pela pele, pulmão e trato-gastrointestinal e sua biotransformação ocorre, primariamente, no fígado e pode então ser encontrada no sangue, tecidos e produtos de excreção (CAVALIERE e al., 2007).

Os impactos na saúde causados pelas AFLs dependem da quantidade ingerida e do tempo de exposição, podendo ser aguda ou crônica. O consumo crônico de alimentos com baixas doses de AFLs, chamado de aflatoxicose crônica, pode favorecer o surgimento do

carcinoma hepatocelular ou outras doenças hepáticas e, ainda, levar a imunossupressão. Porém, a ingestão de alimentos com alto grau de contaminação e em um curto período de tempo, chamado de aflatoxicose aguda, pode ter efeitos hepatotóxicos, como necrose e degeneração gordurosa. Além disso, estudos epidemiológicos demonstraram que o risco de câncer de fígado é aumentado por inúmeros fatores, como a presença do vírus da Hepatite B, sendo o potencial cancerígeno das AFLs aumentado em até 30 vezes para as pessoas com esse vírus (SCHNEIDER, 2007; OLIVEIRA e GERMANO, 1997; FREIRE *et al.*, 2007; CARÃO *et al.*, 2013; VERHEECKE *et al.*, 2016).

O gênero *Aspergillus* está entre os mais importantes na deterioração de alimentos e se caracterizam pelo desenvolvimento de colônias coloridas e brilhantes. É um gênero amplamente distribuído, ocorrendo frequentemente em regiões tropicais e subtropicais com umidade elevada e altas temperaturas. *A. flavus* destaca-se por ser uma importante espécie produtora de AFLs, produz predominantemente AFB1 e AFB2, enquanto que *A. parasiticus* também sintetiza AFG1 e AFG2 (PITT e HOCKING, 2009; CALDERARI *et al.*, 2013).

Os fungos toxigênicos são extremamente adaptáveis, capazes de produzir micotoxinas em condições favoráveis em uma variedade de substratos. *A. flavus* desenvolve-se bem em substratos oleaginosos, apresentando maior capacidade de produção de AFLs. A ocorrência dessas substâncias é comum também em milho, amendoim, algodão e nozes. Essas espécies de fungos são frequentes durante o armazenamento, apesar de também serem capazes de colonizar grãos e sementes ainda no campo (CASTRO *et al.*, 1995; FREIRE *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2018).

2.6 Aflatoxinas em Castanha-do-Brasil

Apesar de ser destaque pelo seu valor nutricional, a castanha-do-Brasil, por ser um ótimo substrato para fungos, está sujeita à contaminação por micotoxinas, principalmente as AFLs, podendo ocorrer à contaminação em qualquer etapa do desenvolvimento da planta, colheita ou armazenamento do produto (FREIRE *et al.*, 2007; MANFIO *et al.*, 2012; MARTINS, 2014).

A ocorrência de AFLs em castanha-do-Brasil constitui um entrave para a exportação deste produto, desde 1998, quando a União Européia (EU) restringiu limites para AFL total e AFB1 para 4 e 2 ng/g, respectivamente. Além disso, a devolução de lotes, em 2003, por países importadores devido ao elevado nível de contaminação por toxinas, levou a UE a

estabelecer condições especiais para a importação de castanha com casca (ARRUS *et al.*, 2005; ÁLVARES *et al.*, 2012), como o atendimento as boas práticas extrativistas e a determinação dos teores de AFLs por laboratórios credenciados junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que começou a elaborar programas de monitoramento da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil, com o objetivo de controlar a contaminação (BRASIL, 2000).

Desde 2010, a UE estabeleceu limites máximos de 5 e 10 µg/kg para AFB1 e AFLs totais em castanha-do-Brasil direcionada para consumo direto (EUROPEAN UNION, 2010), já nos Estados Unidos, o limite para AFLs totais em castanha-do-Brasil é 20 µg/kg (FDA, 2011). No Brasil, esse limite é definido a partir da Resolução (RDC N°07/2011) que dispõe sobre os LMTs para diversas micotoxinas em vários alimentos (BRASIL, 2011, 2013). No que se refere à castanha-do-Brasil aquelas comercializadas sem casca e para consumo direto tem limite máximo de AFL total (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) de 10 µg/kg, a castanha-do-Brasil com casca e para consumo direto, o limite máximo para AFL total é de 20 µg/kg, já aquelas amêndoas que ainda passarão por processamento posterior, o limite tolerado para AFL total é de 15 µg/kg (BRASIL, 2011).

Há estudos sobre a ocorrência de AFL em castanha-do-Brasil onde tanto a casca quanto a amêndoa demonstraram ser passíveis de contaminação e que o maior risco está nas frações defeituosas, como cascas e amêndoas deterioradas (VARGAS *et al.*, 2011). Devido às condições ambientais na região Norte, como temperatura entre 25 e 35° C e o clima úmido com UR > 60% e chegando a 97% no período da colheita, a castanha fica suscetível à contaminação, principalmente por fungos produtores de AFL (SOUZA *et al.*, 2004).

Alguns fatores intrínsecos dos alimentos, como o teor de umidade e a atividade de água (A_w) podem exercer influências para o crescimento de fungos toxigênicos. O teor de umidade, é usualmente expresso em termos de umidade absoluta do material, ou seja, o total de água (ligada e não ligada) contida no alimento (CALDERARI *et al.*, 2013). Pacheco e Scussel (2006) citam que a castanha-do-Brasil tem sua estabilidade assegurada quando o teor de umidade está na faixa de 3 a 6,5%, considerada eficiente para controlar a proliferação fúngica e produção da toxina.

A atividade de água (A_w) é o teor de água livre disponível nos alimentos que favorece o crescimento microbiológico. As condições ambientais da floresta Amazônica influenciam

para um aumento na Aw e umidade das castanhas-do-Brasil, favorecendo a produção de AFL (MANFIO *et al.*, 2012; MAZOKOPAKIS *et al.*, 2018). Para um armazenamento seguro quanto à produção de AFL, a Aw deve estar abaixo de 0,70 pois poucos fungos têm a capacidade de crescer em atividade de água abaixo deste valor. As espécies de *Aspergillus flavus*, requerem uma atividade de água mínima em torno de 0,78 a 33 °C e 0,84 a 25 °C para crescer e acima de 0,87 para a produção de aflatoxinas (PITT e HOCKING, 2009; BAQUIÃO, 2012). Com poucas exceções, é possível afirmar que alimentos desidratados serão estáveis, à deterioração por microorganismos, quando Aw <0,70 (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

Vale ressaltar que, apesar de condições de baixa Aw na castanha após seu processamento, é possível encontrar contaminação, pois quando expostas temporariamente a condições favoráveis ao desenvolvimento a contaminação ocorre, por isso a necessidade de monitoramento e boas práticas em todas as etapas de processamento da castanha-do-Brasil (SILVA, 2014).

Nos últimos anos, vários trabalhos vêm demonstrando a ocorrência de AFL em amêndoas de castanha-do-Brasil, Pacheco *et al.* (2010) detectou AFL em 7,5% das amostras coletadas em Manaus, com concentrações de AFL que iam de 8 a 686 µg/kg. Um estudo realizado por Calderari *et al.*, (2013), foram analisados amostras de castanha-do-Brasil provenientes da Floresta Amazônica, em diferentes fases da cadeia produtiva até a sua comercialização em supermercados de São Paulo, e demonstrou que *A. nomius* foi a espécie mais comum encontrada nas amostras (30%), seguida por *A. flavus* (29%). Iamanaka *et al.* (2013) avaliaram amostras vendidas em supermercado (n=21) e encontraram média de AFL total de 0,24 µg/kg e máximo de 0,98 µg/kg.

2.7 Métodos de descontaminação

Desde a descoberta das AFL, em 1960, vários procedimentos têm sido propostos com o objetivo de minimizar a ingestão de alimentos contaminados por AFL (OGUZ *et al.*, 2002). Os métodos convencionais para prevenção da contaminação por micotoxinas, muitas vezes, requer abordagens pré e pós-colheita. As abordagens pré-colheita lidam com o controle da contaminação fúngica no campo, enquanto os métodos pós-colheita lidam com a classificação e o armazenamento adequado (PANKAJ *et al.*, 2018). Por exemplo, segundo a Association of Official Analytical Chemists (AOAC), a retirada das cascas e amêndoas deterioradas pode

contribuir para a redução de AFL em castanha-do-Brasil, assim como os processos de secagem, que tem o objetivo de diminuir a Aw das amostras e controlar, assim, o crescimento fúngico e produção de AFL (AOAC, 2005; VARGAS *et al.*, 2011).

Fatores ambientais, bem como a falha na aplicação de boas práticas agrícolas favorecem a contaminação, levando a necessidade de métodos descontaminação dos produtos (BOVO *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2018). Muitas vezes, as abordagens pré e pós-colheita não são suficientes e exigem processamento adicional de descontaminação dos alimentos (JARD *et al.*, 2011).

As AFL apresentam grande resistência a tratamentos convencionais aplicados no processamento de alimentos, incluindo pasteurização, esterilização e outros tratamentos térmicos, devido a sua grande estabilidade ao calor. As temperaturas de decomposição de AFL variam de 237 a 306 °C e, quando aquecida à temperatura de decomposição a AFB1, por exemplo, emite uma fumaça acre (LEWIS, 2004; ISMAIL *et al.*, 2018). Para estratégias de descontaminação foram testadas diferentes abordagens para remover ou degradar AFL nos alimentos, onde os principais são classificados em métodos físicos, químicos e biológicos (LUO *et al.*, 2018; PANKAJ *et al.*, 2018). A Figura 4 mostra um esquema com os principais métodos de prevenção e descontaminação de micotoxinas.



Figura 4: Métodos de prevenção e descontaminação de micotoxinas.

Fonte: Adaptado de Pankaj *et al.*, (2018).

Exemplos de métodos incluem remoção de AFL por extração com solventes, degradação por altas temperaturas e também radiação gama ou ultravioleta (DI GREGORIO

et al., 2014). Os métodos químicos envolvem a degradação estrutural por compostos como aldeídos, agentes oxidantes, ácidos, bases e alguns gases. Os métodos biológicos incluem o uso de bactérias, leveduras ou suas respectivas enzimas e aparelho metabólico para degradar AFL e ainda, algumas espécies de bactérias e leveduras também são capazes de adsorver AFL (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Os métodos físicos mais estudados para degradação de AFL envolvem, além da inativação térmica (como aquecimento, extrusão e micro-ondas) a irradiação (gama e UV). A radiação ionizante vem sendo citada como um método promissor para conservação de alimentos, contribuindo no controle de perigos microbiológicos e toxicológicos (ASSUNÇÃO *et al.*, 2015; ISMAIL *et al.*, 2018).

2.8 Radiação Ionizante

A irradiação de alimentos nada mais é do que um método físico de conservação capaz de prolongar a vida útil dos alimentos sem apresentar risco de contaminação por radiação, independente do tempo em que o alimento é exposto, ou o quanto é absorvido de uma “dose” de energia, uma vez que os produtos não entram em contato direto com a fonte de irradiação. Pode impedir a divisão de microorganismos deterioradores de alimentos, como bactérias e fungos, através da alteração de sua estrutura molecular (VASCONCELOS e MELO FILHO, 2010; LEONARDI e AZEVEDO, 2018).

Porém, assim como todo processo de conservação, podem existir alterações de ordem nutricional e sensorial (POLIZEL, 2006). Essas alterações referem-se, principalmente à rancidez, desnaturação proteica, destruição de vitaminas, transformações moleculares nos carboidratos, além de mudanças organolépticas de odor, sabor, cor e consistência (MOURA *et al.*, 2014).

A irradiação é um processo no qual a radiação ionizante penetra no produto. A radiação ionizante refere-se à energia radiante que se move no espaço através de ondas eletromagnéticas e possui energia suficientemente alta para remover elétrons das órbitas dos átomos ou moléculas, produzindo partículas carregadas eletricamente, os íons (MUSTAPHA *et al.*, 2014; MASTRO, 2015). Essa radiação de alta energia causa ionização do meio em que é absorvida, diferente da radiação não-ionizante (microondas, infravermelho, raios visíveis) que não possuem energia suficiente para ionizar o meio (ASSUNÇÃO *et al.*, 2015)

Esse processo de irradiação envolve a exposição dos alimentos a um dos três tipos de energia ionizante, são elas: radiação gama, raios-x e feixe de elétrons (DE CAMARGO *et al.*, 2011). De acordo com o “padrão geral do Codex Alimentarius para alimentos irradiados” somente essas radiações ionizantes são permitidas para uso em alimentos (CODEX ALIMENTARIUS, 2003). Esse tipo de irradiação é permitido em 38 países para a conservação de alimentos através da destruição microbiana ou inibição de alterações bioquímicas. Nesses países, a rotulagem é regulamentada e exige que o fabricante identifique o alimento ou qualquer ingrediente da composição que tenha passado por irradiação. Esses alimentos irradiados podem ser transportados, armazenados ou mesmo consumidos logo após o tratamento (PINTO e MOREIRA, 2018).

A energia gasta na excitação e ionização de moléculas leva a reações químicas que podem modificar de forma permanente a estrutura físico-química do produto irradiado. A dose é a quantidade de energia absorvida por unidade de massa do produto irradiado, assim, quando é dissipada a energia de 1 J em 1 kg de qualquer produto, fala-se que o produto recebeu a dose de um gray (Gy) (CAMARGO e WALDER, 2012; LEONARDI e AZEVEDO, 2018).

Os raios gama e raio X fazem parte do espectro eletromagnético (Figura 5), estando no comprimento de onda curto, região de alta energia do espectro. Ambos os raios, gama e raio X, podem penetrar nos alimentos a uma profundidade de dezenas de centímetros (ARVANITTOYANNIS, 2010).

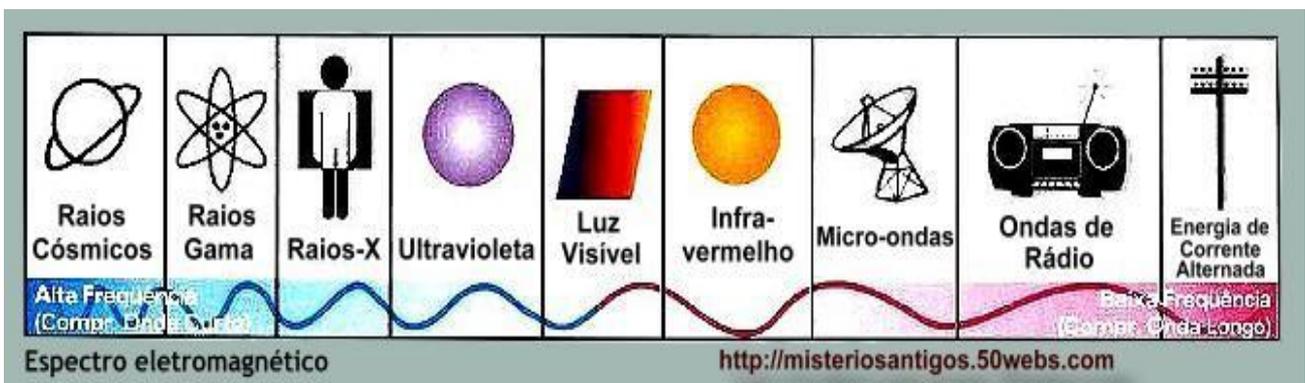


Figura 5: Espectro eletromagnético.

A capacidade de penetração das radiações ionizantes é inversamente proporcional à densidade do produto tratado, onde o poder de penetração do feixe de elétrons é menor que a da radiação gama. Alguns tipos de radiações ionizantes não possuem penetração suficiente,

sendo por isso, inadequados para a irradiação de alimentos, como por exemplo, as partículas alfa (Figura 6) (TSAI, 2006; FERREIRA-CASTRO, 2011).

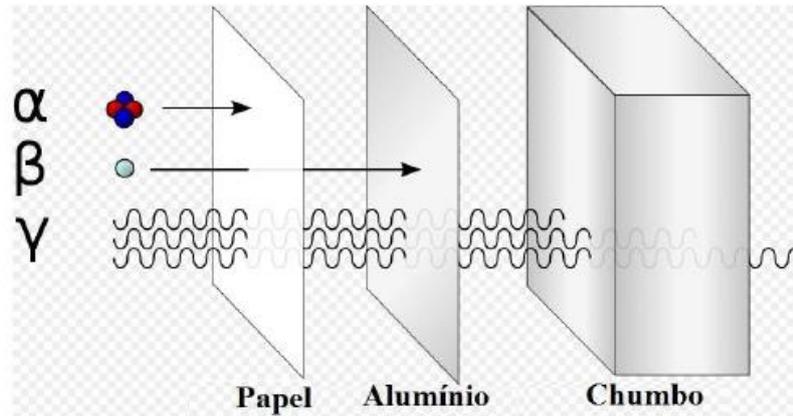


Figura 6: Penetrabilidade das radiações ionizantes.

Fonte: Assunção *et al.* (2015).

Segundo Assunção (2015), o uso por si só da irradiação como técnica de preservação não resolve todos os problemas de perdas nos alimentos pós-colheita, mas pode representar um papel importante na redução de tais perdas, ajudando também a diminuir a dependência de agentes químicos no controle de pragas em alimentos, e sua eficácia vai depender dos seguintes fatores:

- ✓ A dose de radiação a ser empregada;
- ✓ Número de microrganismos presentes inicialmente no alimento, bem como idade e presença de células vegetativas ou esporuladas que podem influenciar na sensibilidade do microrganismo;
- ✓ Tipo e espécie do microrganismo;
- ✓ Estado físico-químico do alimento (pH, presença de oxigênio, cor, odor, textura, sabor, umidade e temperatura);
- ✓ Composição do alimento (carboidratos, proteínas, lipídios);

O uso da radiação não evita a recontaminação ou a reinfestação e, vale ressaltar, que esse processo não substitui a manipulação adequada dos produtos, uma vez que não é capaz de melhorar a qualidade de um produto onde a qualidade inicial seja duvidosa. O procedimento também não devolve as características sensoriais normais do alimento, sendo assim, não elimina odores, sabores desagradáveis ou aspecto decomposto (MATSUDA, 2002; SILVA e ROSA, 2010; ASSUNÇÃO *et al.*, 2015). Sendo assim, o sucesso do processo de

irradiação depende da qualidade do produto original, devendo o alimento seguir as boas práticas de fabricação.

2.9 Radiação Gama

A irradiação gama foi estabelecida como um meio físico seguro e eficaz para a descontaminação e melhoria na qualidade de produtos agrícolas (CALADO *et al.*, 2014). De acordo com De Camargo *et al.* (2011) a radiação gama é o tipo de radiação ionizante mais utilizada no processamento de alimentos e, doses baixas e médias (8-10 KGy) poderia eliminar completamente bactérias e fungos em sementes oleaginosas, sem afetar sua composição e qualidade nutricional (YUN *et al.*, 2012; BHATTI *et al.*, 2013; ISMAIL *et al.*, 2018). Além disso, altas doses (10-30 KGy) poderia reduzir níveis de micotoxinas, como Aflatoxinas, desoxinivalenol, zearalenona e ocratoxina produzidas por cepas de fungos em culturas alimentares (JALILI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2018).

O tratamento com radiação gama baseia-se em ondas eletromagnéticas de alta frequência, liberada por radioisótopos como o Cobalto-60 e o Césio-137, sendo o Cobalto-60 o mais usado no tratamento de alimentos (MOURA *et al.*, 2014).

O Cobalto-60 é formado quando o Cobalto-59 estável absorve um nêutron adicional e se transforma no Cobalto-60 radioativo (Figura 7), que possui meia vida de 5,261 anos, tendo um decaimento radioativo de 12,34% ao ano, sendo necessário reabastecer as fontes anualmente com o isótopo para manter sua capacidade original (CALVO, 2005; ASSUNÇÃO *et al.*, 2015).

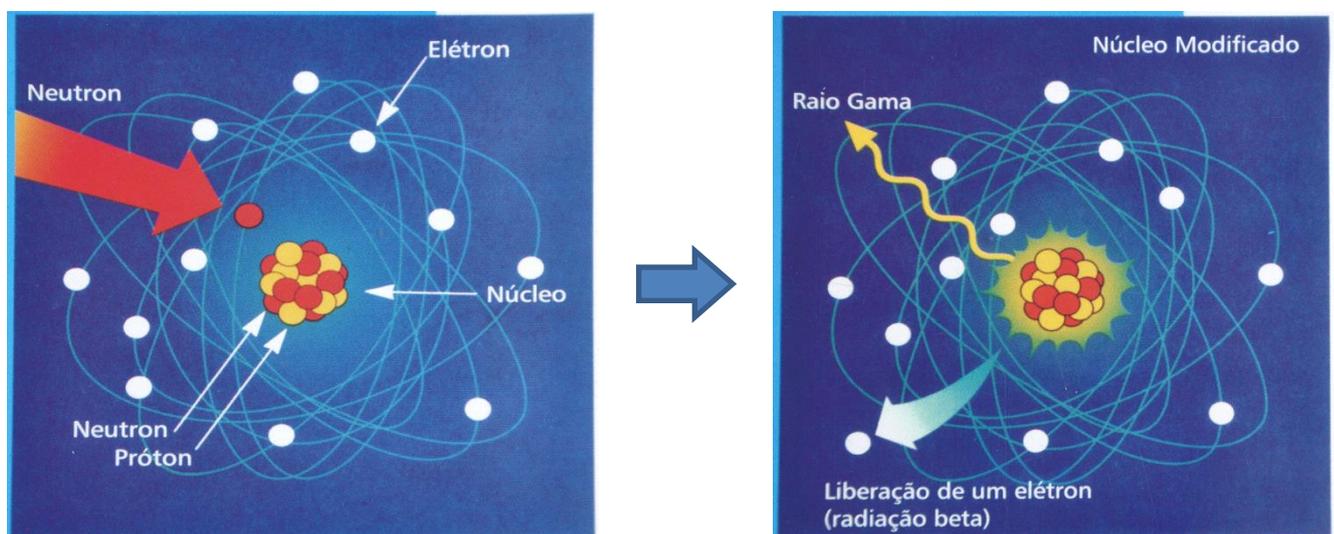


Figura 7: Formação do Isótopo radioativo Cobalto-60.

Fonte: CDTN (Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear).

O cobalto-60 tem como vantagem a produção de radiação gama com alta penetrabilidade e uniformidade de dose, o que permite que produtos de diferentes tamanhos, densidades e formatos sejam tratados, além disso, a facilidade na utilização da fonte e o baixo risco ambiental também favorecem o seu uso (MATSUDA, 2002; TSAI, 2006). Já a não utilização do Césio-137 para irradiação de alimentos é principalmente pela preocupação ambiental, uma vez que se trata de um sal solúvel e de fácil contaminação (SABATO, 2005).

A radiação pode causar uma série de efeitos físicos e bioquímicos nos microrganismos. No mecanismo de ação direta, a radiação gama danifica diretamente o material genético, provocando efeito direto em átomos da molécula do DNA ou em algum outro componente crítico para a sobrevivência da célula (NUCLEAR REGULATORY COMMISSION - NRC, 2012).

Já no mecanismo indireto, moléculas como a água são quebradas pela radiação e os produtos primários da radiólise da água, como o radical livre hidroxila ($\text{OH}\cdot$), íons de hidrogênio ($\text{H}\cdot$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são muito eficientes em produzir danos biológicos, além de que a água está presente em todos os alimentos, inclusive naqueles vegetais desidratados, como as castanhas, sendo, portanto, de extrema importância para irradiação de alimentos (CAER, 2011; ASSUNÇÃO *et al.*, 2015).

As células possuem sensibilidades diferentes aos efeitos da radiação ionizante, que vai depender do tipo e da fase da sua reprodução. As células em divisão, ou as metabolicamente ativas, ou ainda as que possuem reprodução rápida são mais sensíveis do que aquelas que possuem um alto grau de diferenciação. Sendo assim, geralmente os organismos mais simples resistem mais aos efeitos da radiação ionizante. Nesse caso, os vírus são mais resistentes que as bactérias, que são mais resistentes que as leveduras, que são mais resistentes que os fungos filamentosos que, por sua vez, são mais resistentes que os seres humanos. Essa diferença na resistência não se restringe ao gênero, mas também entre linhagens de uma mesma espécie ou mesmo idade da cultura, que quanto mais velha, mais sensível à radiação (FERREIRA-CASTRO *et al.*, 2007; HARRELL *et al.*, 2018).

As perdas de nutrientes nos alimentos irradiados são pequenas e muitas vezes menores quando comparadas a outros métodos de conservação. Os lipídios são um dos componentes mais sensíveis à radiação ionizante, que pode induzir reações hidrolíticas e auto-oxidantes gerando mudanças organolépticas indesejáveis e perdas de ácidos graxos essenciais, por isso

deve-se ter cuidado com a dose de radiação administrada em alimentos com alto teor de gordura, como a castanha-do-Brasil, pois pode causar rancidez no produto (ROBERT e WEESE, 2006; SILVA, 2008; GECGEL *et al.*, 2011).

O Joint Expert Committee on food Irradiation (JECFI), formado pela FAO, WHO e IAEA, outorgou, em 1980, uma segurança relacionada aos alimentos irradiados com doses de 10K Gy, indicando que um alimento irradiado até essa dose não provoca problemas toxicológicos e nem induz problemas nutricionais ou microbiológicos especiais. Já em 1997, o mesmo grupo concluiu que o alimento pode ser irradiado com qualquer dose apropriada, mesmo que acima de 10 K Gy, para alcançar o objetivo tecnológico pretendido, sendo seguro tanto para consumir quanto adequado nutricionalmente (FAO/IAEA, 1982; WHO, 1999; FAO, 2006; MASTRO, 2015).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a RDC nº 21/2001, que diz que um alimento pode ser tratado por radiação desde que a dose máxima absorvida seja inferior àquela dose que comprometeria as propriedades funcionais e sensoriais do alimento (BRASIL, 2001).

2.10 Efeito da Radiação Gama sobre Aflatoxinas

Em seu estudo Prado *et al.* (2005) avaliaram a influência da radiação gama na destruição de AFB1 em amendoins contaminados naturalmente, e observou que doses de 5 e 10 K Gy não reduziu o conteúdo de AFB1, no entanto, quando doses de 15 a 30 K Gy foram utilizadas, ocorreram níveis de redução que variaram de 49 a 72%. Já no estudo de Bhat *et al.* (2007) observaram que, com uma dose de 10 K Gy, a AFB1 presente em farinhas de amendoim foi eliminada completamente.

Aquino (2003), mostrou em seu estudo que doses de 2, 5 e 10 K Gy foram eficazes na redução de *Aspergillus flavus* em grãos de milho, sendo as doses de 5 e 10 K Gy as mais efetivas, e a dose de 10 K Gy conseguiu degradar totalmente as AFL presentes.

Silva *et al.* (2015) avaliaram a irradiação gama como um processo alternativo para o armazenamento de arroz e observaram que esse processo é eficiente no combate ao *Penicillium spp.* e *Aspergillus spp.*, contribuindo dessa forma para a redução de micotoxinas em grãos armazenados.

A degradação de AFLs por radiação gama resulta de mecanismos indiretos, como a reação de radicais livres resultantes da radiólise da água ou de outros componentes. Estes radicais atacam as AFLs no anel furânico terminal, como mostra a figura 8, gerando produtos com baixa atividade biológica (ISMAIL *et al.*, 2018; PANKAJ *et al.*, 2018).

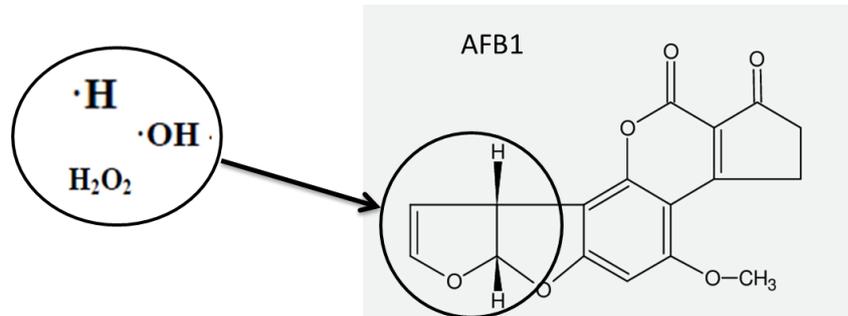


Figura 8: Ação de produtos da radiólise da água sobre AFL.

A melhor forma de evitar a contaminação por AFL é prevenindo sua formação, através de boas práticas de fabricação e medidas preventivas em todo o processamento de um alimento. No caso da castanha-do-Brasil, é elevado o índice de contaminação por AFL e o emprego de tratamento pelo processo de irradiação pode ser um método valioso para prevenir a contaminação fúngica, além de ser uma alternativa viável para a descontaminação (ASSUNÇÃO *et al.*, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da radiação gama em castanhas-do-Brasil contaminadas por aflatoxinas e inoculadas artificialmente com *Aspergillus flavus*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a melhor dose de radiação gama em amostras artificialmente inoculadas com *A. flavus*;
- Avaliar o efeito de diferentes doses de radiação gama em castanhas-do-Brasil contaminadas com Aflatoxinas;
- Diferenciar os efeitos da radiação gama nos diferentes cortes de castanha-do-Brasil (inteira e granulada).
- Analisar os efeitos da radiação gama na composição de ácidos graxos do óleo da castanha-do-Brasil.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram utilizados 8kgs de castanha-do-Brasil, adquiridas de uma usina de beneficiamento de castanha localizada no interior do Amazonas, sendo 4kg de castanha na forma granulada e 4kg em sua forma inteira, sem casca e de lotes diferentes.

As amostras chegaram em embalagem metalizada (protegendo da luz), fechadas a vácuo e foram subdivididas em pacotes de plásticos do tipo “zip-lock” contendo 50g (para análises de microbiota e aflatoxinas) e de 100g (para obtenção e análise do óleo), como mostra a Figura 9. Uma parte dos pacotes contendo 50g de castanha foi inoculada com uma cepa padrão de *Aspergillus flavus* toxigênica, outra parte foi inoculada com um mix de Aflatoxinas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) contendo 10 µg/kg e outra parte foi mantida sem qualquer inóculo, juntamente com os pacotes de 100g. Em seguida as amostras foram submetidas à Radiação Gama, divididas em 4 grupos de acordo com a dosagem de radiação recebida: controle (0 KGy), 1KGy, 10KGy e 20KGy. O fluxograma da Figura 10 mostra a divisão das amostras neste trabalho.



Figura 9: Amostras de castanha-do-Brasil granulada e inteira embaladas em pacotes de plástico.

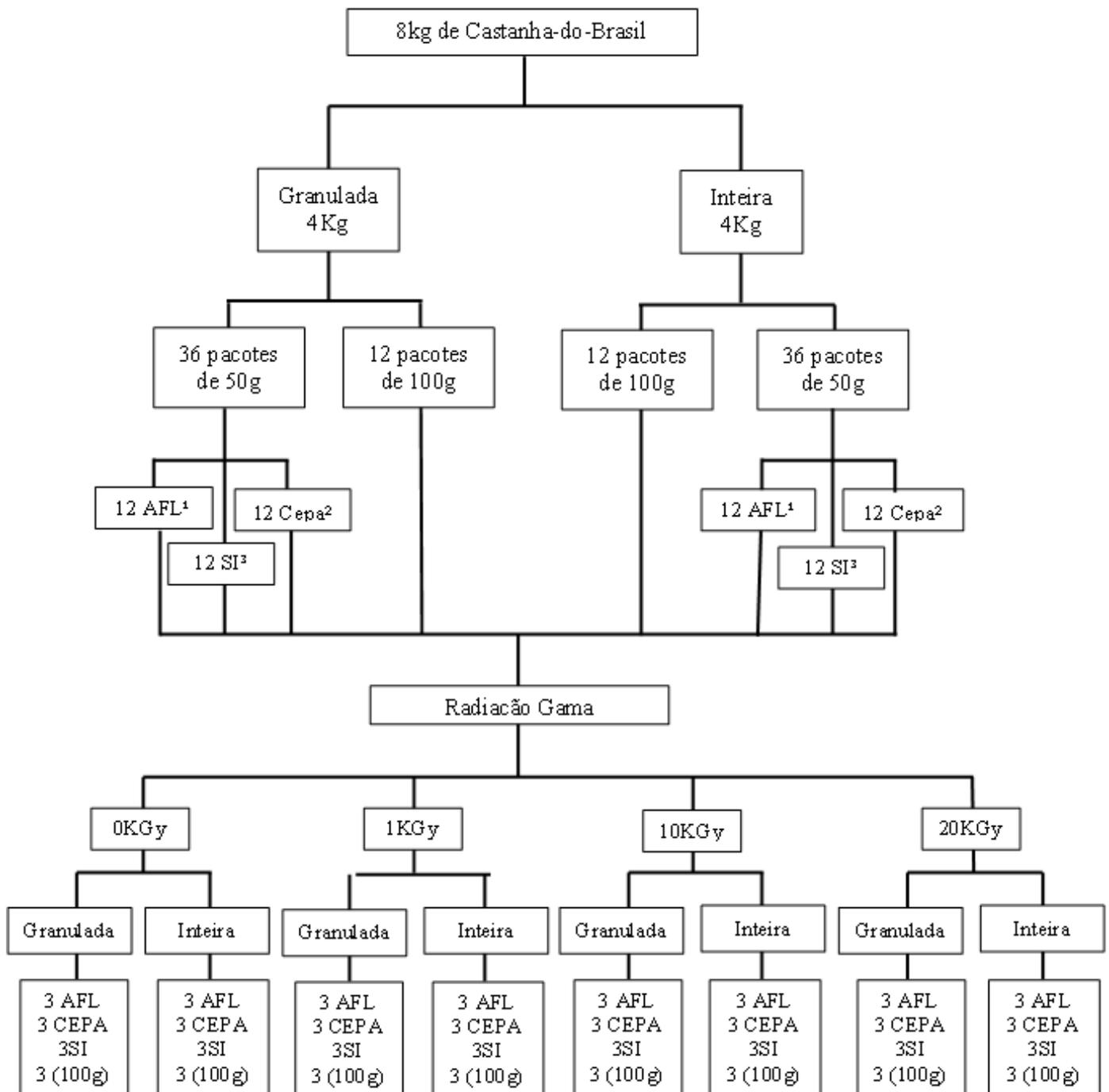


Figura 10: Fluxograma mostrando a divisão das amostras.

¹ AFL = Amostras inoculadas com mix de Aflatoxinas;

² Ceba = amostras inoculadas com uma cepa padrão de *Aspergillus flavus* toxigênica;

³ SI = Amostras sem nenhum inóculo.

4.2 Inóculo de *Aspergillus flavus*

As amostras foram inoculadas com uma cepa de *Aspergillus flavus* toxigênica, proveniente da Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) do Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia (ILMD/FIOCRUZ).

A partir do repique da cepa feito em BDA (ágar batata dextrose), o preparo da suspensão de *A. flavus* foi realizada através de uma metodologia descrita por Aquino *et al.* (2003), que consiste no preparo de uma suspensão de conídios em frascos contendo solução tampão fosfato salino (PBS), com pH 7,2 e adicionado de 0,1ml de tween 80. A contagem dos esporos foi efetuada em câmara de Neubauer e o número de esporos ajustados para 1×10^5 esporos/ml através da adição de mais solução tampão. O volume de 200 μ l da suspensão foi adicionado aos pacotes com 50g de castanha granulada e inteira e mantida a temperatura ambiente por 7 dias para posterior tratamento com radiação gama e análise de microbiota.

4.3 Contaminação Artificial com Aflatoxinas

Uma parte dos pacotes com 50g de castanha, tanto granulada quanto inteira, foram contaminadas artificialmente com uma concentração conhecida de padrão de Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) da Sigma Aldrich® (EUA).

A contaminação foi feita de acordo com a Instrução Normativa nº 9 (24 de março de 2000), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000) a partir da adição de 1ml do pool de padrão de AFL, diluídos em uma solução de Tolueno:Acetonitrila (9:1) para concentração de 10 μ g/kg, a cada 50g de amostra e mantidas em repouso a temperatura ambiente durante 7 dias, para posterior tratamento com radiação gama.

4.4 Tratamento por Irradiação

O tratamento com radiação gama foi realizado no Laboratório de Irradiação Gama (LIG) do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) localizado na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte. O equipamento é um Irradiador Panorâmico Multipropósito de Categoria II, fabricado pela MDS Nordion no Canadá, equipado com uma fonte de Cobalto-60 estocada a seco com atividade máxima de 2200 TBq ou 60000Ci.

As amostras foram divididas em 4 grupos e foram submetidas a diferentes níveis de radiação: 0 (controle), 1KGy, 10KGy e 20KGy. Para isso, as amostras foram colocadas na câmara de irradiação (Figura 11) a uma distância previamente calculada de acordo com a radiação a ser recebida proporcionando a irradiação simultânea dos produtos com diferentes doses. A Tabela 4 mostra a distância das amostras de acordo com a dose final.



Figura 11: Câmara de Irradiação do LIG, no CDTN.

Tabela 4: Distância das amostras para a fonte de radiação de acordo com a dosagem final desejada.

DOSE FINAL	Taxa de Dose (Gy/hora)	Distância (cm)
1 KGy	226,43	86,5
10 KGy	2261,8	18,8
20 KGy	4527,10	9

4.5 Inibição do Crescimento Fúngico

A pesquisa da inibição do crescimento fúngico foi realizada a partir da técnica da diluição seriada com semeadura em superfície (PITT; HOCKING, 2009). Utilizou-se 10g de cada amostra, triturada e homogeneizada, diluídos em 90ml de água destilada estéril (diluição 10^{-1}). A partir desta diluição, realizou-se diluições sucessivas até 10^{-3} , e foi inoculado 0,1ml de cada diluição em placas de petri contendo o meio BDA. Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C por até 7 dias. Passado os 7 dias, foi realizada a contagem de colônias e a

correção pelo fator de diluição, a fim de ser obtido o número de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) de substrato (ASSUNÇÃO *et al.*, 2015).

4.6 Aflatoxinas

As amostras de produtos de castanha-do-Brasil foram quantificadas para AFLs B1, B2, G1 e G2 (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) por cromatografia líquida pelo método AOAC – 994.08 (2005). O método consiste na extração de AFLs onde foram utilizadas 50 g de amostra e extraídas com 100 mL de acetonitrila:água (90:10 v/v) e agitados em alta velocidade durante 5 minutos em um liquidificador. O extrato foi filtrado e 3mL foram passados para um tubo de cultura de 10 ml. Em seguida foi aplicada à coluna de limpeza MYCOSEP 226 (Romer labs); foi coletado 0,5ml do extrato purificado e mantido em congelador até análise em HPLC (High performance liquid chromatography).

Para a derivatização desse extrato purificado foi utilizado uma solução derivatizante composta por água:ácido acético glacial:ácido trifluoracético (35:10:5 v/v), onde 0,2ml do extrato purificado foi passado para um *vial* de derivatização com 0,7ml de solução derivatizante com o auxílio de uma seringa de 1ml e um filtro para seringa de nylon com porosidade de 0,45µm, esse *vial* foi então fechado e aquecido a 65°C por 8,5 minutos em banho maria (tempo necessário para completar a derivatização das AFB1 e AFG1), esse procedimento foi repetido para todas amostras inoculadas com o pool de aflatoxinas (10µg/kg).

As soluções resultantes foram aplicadas e quantificadas no sistema de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com: fase móvel - acetonitrila, metanol e água ultra-pura (1:1:4), coluna: X-Terra da Waters, 150x4,6mm, fluxo de 1,0mL/minutos eluindo em modo isocrático, com detector de fluorescência: λ ex- 360 nm e λ em- 440 nm; volume de injeção 50µL; tempo de corrida de 20 minutos. Foram usados 6 pools de padrões de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 - Sigma Aldrich®, com diferentes concentrações de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, preparados a partir de um pool de solução estoque (ng/ml) contendo: AFB1=300; AFB2=50; AFG1=150 e AFG2=50. Os pools dos padrões também foram submetidos à derivatização e analisados em HPLC, com o objetivo de obter o cromatograma dos padrões nas diferentes concentrações. O cromatograma obtido das amostras de castanha foi então, comparado cada pico com o pico e tempo de retenção obtido por cada padrão (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2). A quantificação das amostras foi realizada a partir de uma curva de cada

padrão de Aflatoxina obtida a partir da leitura em HPLC de diferentes concentrações do pool de aflatoxinas.

4.7 Extração do óleo de castanha-do-Brasil

Para obtenção do óleo, foi utilizada a prensagem a frio, onde as castanhas seguiram para uma prensa mecânica (figura 12). O óleo obtido foi centrifugado, a 3000rpm/15min, pesado e armazenado sob refrigeração e ao abrigo da luz até análise.



Figura 12: Prensa mecânica utilizada para extração do óleo

4.7.1 Caracterização físico-química do óleo

As determinações realizadas em análise de óleos são geralmente denominadas de índices, que expressam as propriedades físico-químicas destes. No presente estudo, foi realizada a determinação do índice de peróxidos e de acidez titulável (ambos métodos volumétricos) de acordo com a metodologia padronizada pela AOAC (2016).

4.7.1.1 Índice de Acidez

Para a análise de índice de acidez foram pesados cerca de 2 g do óleo em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se então 25 mL de solução de éter-álcool (2:1) neutra, seguido de duas gotas de fenolftaleína, como indicador. A titulação foi realizada com solução de hidróxido de sódio 0,1 M previamente padronizada até o aparecimento da coloração rósea,

a qual deverá persistir por 30 segundos. Este teste foi feito em triplicata, de acordo com a metodologia da AOAC (2016). O cálculo foi realizado conforme Equação 1.

Equação 1- Índice de acidez

$$\text{Índice de Acidez} = \frac{V \times f \times 5,61}{P}, \text{ onde:}$$

v = nº de mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação

f = fator da solução de hidróxido de sódio

P = nº de g da amostra (AOAC, 2016).

4.7.1.2 Índice de Peróxido

Para análise de Índice de Peróxido foram pesados cerca de 5 g do óleo em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, onde se adicionaram 30 mL de solução ácido acético-clorofórmio 3:2, sendo em seguida agitados até dissolução da amostra. Em seguida, se adicionam 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio e se deixa em repouso ao abrigo da luz por 1 minuto. Foram então acrescentados 30mL de água e foi feita titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,01N previamente padronizada, com agitação constante. A titulação continuou até o quase desaparecimento da coloração amarela, quando foram adicionados 0,5 mL de solução de amido indicadora e a titulação continuou até completo desaparecimento da cor azul. Um branco foi preparado nas mesmas condições. Este teste foi feito em triplicata. O cálculo foi realizado de acordo com a Equação 2.

Equação 2- Índice de peróxidos

$$\text{Índice de peróxidos} = \frac{(A - B) \times N \times f \times 1000}{P}, \text{ onde:}$$

A = nº de mL da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra

B = nº de mL da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

P = nº de g da amostra (AOAC, 2016).

4.7.2 Composição do óleo - Ácidos Graxos

A metodologia utilizada para a extração de ácidos graxos envolve a esterificação de ácidos graxos conforme publicado por Hartman e Lago (1973) e modificado por Maia e Rodrigues-Amaya (1993). Os ácidos graxos do óleo foram transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos e foram analisados por cromatografia em fase gasosa modelo Shimadzu

(GC) para Cromatograma de Gás por Espectrômetro de Massa / GC- 2010 PLUS (Kyoto, Japão) equipado com um detector de ionização de chama. Os compostos foram separados em uma coluna de sílica fundida capilar RTxR-5 de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e com uma espessura de filme de 0,25 μm . As condições de operação foram às seguintes: temperatura da coluna programada, 80-220 ° C (5 ° C / min); temperatura do injetor, 230 ° C; temperatura do detector, 240 ° C; gás portador, hidrogênio; velocidade linear do gás, 40 cm / s; proporção da divisão da amostra, 1:50. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção dos padrões de éster metílico puro dos ácidos graxos e das amostras. A quantificação foi realizada por normalização da área.

4.7.2.1 Composição do óleo - Compostos voláteis

Os compostos voláteis foram extraídos pela técnica HSPME. O óleo (amostra, 1mL) foi transferida para um frasco de vidro de 10 mL (adequado para retenção volátil), que foi agitado continuamente a 40 ° C por 30 min. A fibra DVB / CAR / PDMS 50/30 μm (divinilbenzeno / carboxen / polidimetilsiloxano) foi usada para separar os compostos voláteis presentes na amostra. A fibra foi embalada a uma temperatura de 270 ° C por 1 h antes do uso. O tempo de condicionamento para as análises foi de 25 min. A fibra foi exposta ao espaço superior do frasco de vidro contendo a amostra. Após expor a fibra a 40 ° C por 5 min, a seringa foi imediatamente levada ao injetor CG-MS, em que os compostos voláteis foram dessorvidos a 250 ° C por 2 min, resultando em uma injeção sem divisão. Um espectrômetro, CGMS-2010 Plus (Shimadzu) Tóquio, Japão, com um detector de massa modelo QP2010 Plus foi usado para detectar os compostos voláteis. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida (30 m \times 0,25 mm e 0,25 μm de espessura) com 5% de polímero de difenil- / 95% de polidimetilsiloxano (DB5), atuando como uma fase estacionária. Para melhor separação, o gradiente de temperatura foi estabelecido na coluna a partir de 60 ° C, com um aumento de 3 ° C por minuto até que a temperatura máxima de 270 ° C fosse atingida. O gás portador era hélio e a vazão foi ajustada para 1,8 mL / min para injeção sem divisão com pressão inicial de 100 KPa na coluna. As condições ajustadas no espectrômetro de massa (MS) foram: detector seletivo de massa operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura de 1000 m / z / s; intervalo de varredura de 0,5 fragmentos / se filtro para a massa dos fragmentos detectados sendo 29 Da e 600 Da. Cada componente foi identificado comparando seus espectros de massa com as informações já existentes presentes nas bases de dados do espectrômetro (Willey229.lib e FFSC1.3.Lib) e o livro de identificação de

componentes de Adams (2007). Para comparar e calcular os índices, foram utilizados padrões dos alcanos saturados (C7-C30) (Sigma-Aldrich).

4.7.2.2 Análise por RMN ^1H dos óleos irradiados

Os óleos de castanha submetidos a tratamento foram pesados (aproximadamente 31 mg), solubilizados em 500 μL de CDCl_3 e submetidos a análise em Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear da Bruker® Avance IIIHD (11.74 T, BBFO Plus SmartProbe™) a 298 K, instalado no Laboratório NMRLab da UFAM. O software TopSpin™ 3.5 foi usado para processamento dos espectros obtidos. O conteúdo dos ácidos graxos insaturados (linoleico e oleico) e saturados foram estimados usando a integração dos sinais conforme Barison *et al.* (2010).

4.8 Análise Estatística

Para avaliar as diferenças significativas nos dados obtidos, será utilizada a Análise de Variância (ANOVA) e teste “t” de Student em nível de 5% utilizando-se Software Excel® e programa estatístico R®.

Os teores dos voláteis dos óleos de castanha irradiados foram exportados para o software The Unscrambler X 10.4. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada empregando-se o algoritmo SVD.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Inibição do Crescimento fúngico

Após o tratamento com radiação gama nas amostras inoculadas artificialmente com uma cepa toxigênica de *A. flavus*, observou-se que o tratamento se mostrou eficaz na inibição do crescimento fúngico. A Figura 13 mostra as placas contendo o crescimento fúngico da amostra controle e após o tratamento da castanha granulada. As colônias de *A. flavus* destacam-se pelas características de colônias pulverulentas e com coloração esverdeada.

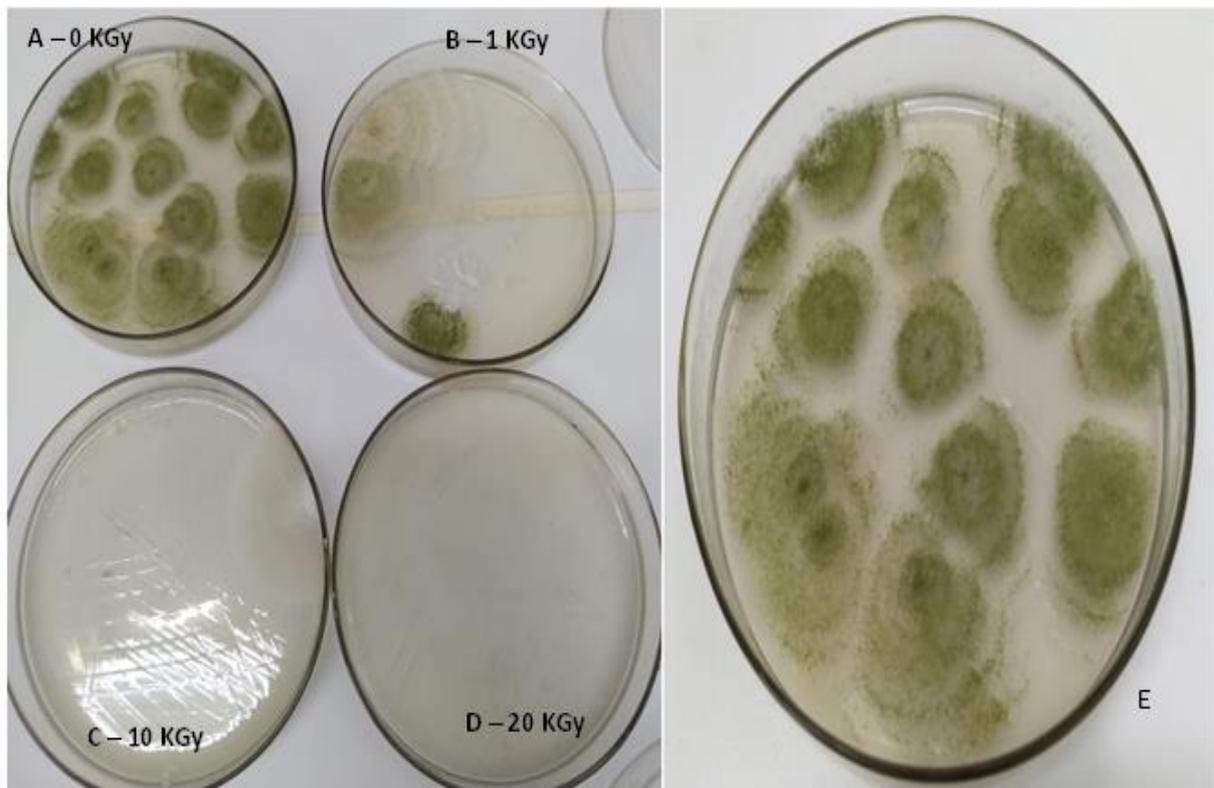


Figura 13: Placas para pesquisa de micobiota.

A: Amostra controle (0 KGy); B: Amostra irradiada com 1 KGy; C: Amostra irradiada com 10KGy; D: Amostra irradiada com 20KGy; E: Foto aumentada da amostra controle para visualização das colônias.

A Tabela 5 e o gráfico 1 mostram os valores obtidos, em número de UFC/g, na pesquisa da micobiota das amostras controles de castanha-do-Brasil granulada e inteira e após serem submetidas ao tratamento com radiação gama nas doses de 1, 10 e 20KGy.

Tabela 5: Número de UFC/g de *A. flavus* em amostras inoculadas artificialmente: Não irradiadas e irradiadas.

Dose de radiação aplicada (KGy)	Número de <i>A. flavus</i> (UFC/g)	
	Castanha Granulada Média ± DP	Castanha inteira Média ± DP
0 KGy (CONTROLE)	12,35 x 10 ² ± 0,45	8,83 x 10 ² ± 0,23
1 KGy	0,55 x 10 ² ± 0,11	0 ± 0,0
10 KGy	0 ± 0,0	0 ± 0,0
20 KGy	0 ± 0,0	0 ± 0,0

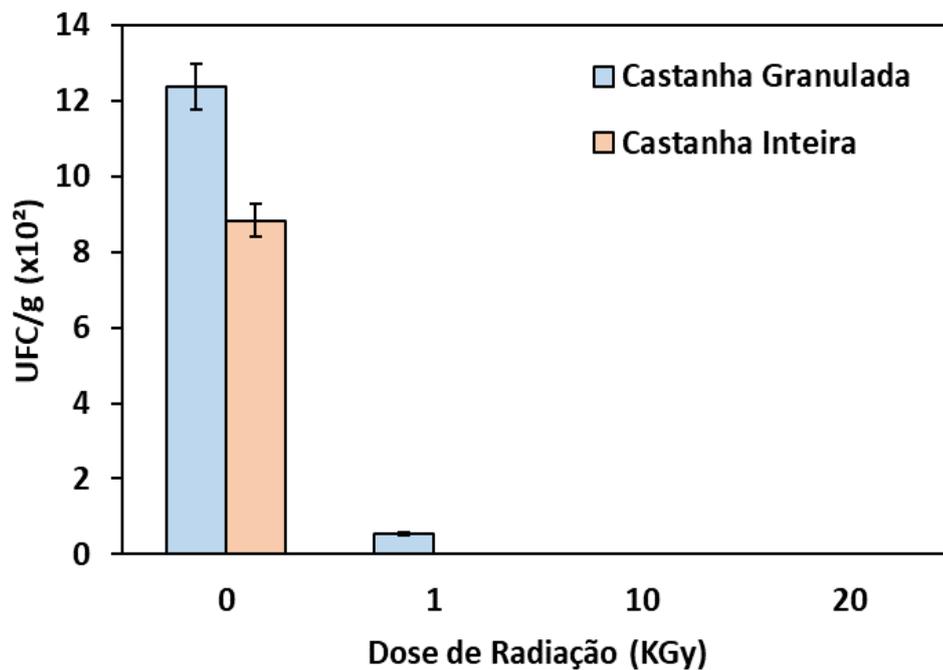


Gráfico 1: Crescimento de *A. flavus* inoculados artificialmente em castanhas-do-Brasil granuladas e inteiras após o tratamento com radiação gama

Pode-se observar, a partir destes resultados, que a radiação gama a uma dose de 1KGy já consegue inibir o crescimento fúngico em cerca de 91% na castanha granulada, que passou de 12,35 x 10² para 0,45 x 10² UFC/g, já as doses de 10 e 20KGy conseguiram inibir 100% desse crescimento. Na castanha inteira, o tratamento em todas as doses testadas inibiu 100% do crescimento fúngico. É observado também, que o nível de contaminação inicial influencia na eficiência da dose de radiação, uma vez que, como a castanha inteira tinha um menor grau de contaminação (observado na amostra controle) a dose de 1KGy já conseguiu inibir

completamente o crescimento, diferente da castanha granulada, que apresentou uma contaminação inicial maior e a dose de 1KGy, apesar de conseguir inibir bastante do crescimento fúngico, ainda não foi suficiente para eliminar completamente a contaminação.

As estratégias para o controle de AFL em castanhas-do-Brasil estão relacionadas, principalmente, ao controle dos fungos aflatoxigênicos, uma vez que, as AFL, uma vez produzidas, dificilmente serão eliminadas em condições normais de processamento das castanhas, tornando os resultados obtidos bastante promissores para evitar a contaminação de por AFL. (TANIWAKA *et al.*, 2016).

Alguns autores já discutiram a sensibilidade dos fungos à radiação gama, Aquino *et al.* (2005) citam que valores entre 4 e 10KGy é suficiente para a inibição da contaminação fúngica em alimentos. Assunção *et al.* (2015) estudaram a influencia da radiação gama para a inibição do crescimento de *A. flavus* contaminados artificialmente em castanha-do-Brasil, e observaram que a dose de 5KGy foi capaz de inibir 92% do crescimento fúngico, enquanto que a dose de 10KGy foi capaz de inibir totalmente.

Quanto ao formato da castanha-do-Brasil, é possível observar, com bases nesses resultados, que a castanha granulada apresentou um crescimento fúngico maior na amostra não irradiada quando comparada com a amostra inteira, isso pode estar relacionada com o fato de que as amostras granuladas possuem maior superfície em contato com o inóculo fúngico feito, diferente da castanha inteira. Portanto, na castanha granulada o fungo acaba tendo maior contato com o substrato oleaginoso, que é um espaço favorável tanto para o crescimento fúngico quanto para a produção de AFL (COELHO, 2012).

5.2 Aflatoxinas

Após o tratamento com radiação gama, houve uma redução na concentração de aflatoxinas nas amostras artificialmente contaminadas com os padrões. Esse resultado pode ser visualizado na tabela 6.

Tabela 6: Concentração de aflatoxinas em castanhas contaminadas artificialmente: Não irradiadas e irradiadas.

FORMA	DOSE (KGy)	AFG1 (µg/kg) Média ± DP	AFB1 (µg/kg) Média ± DP	AFG2 (µg/kg) Média ± DP	AFB2 (µg/kg) Média ± DP	AFLtotal (µg/kg) Média ± DP
GRANULADA	0	2,53 ± 0,00	2,43 ± 0,00	2,08 ± 0,00	1,90 ± 0,00	8,93 ± 0,01
	1	1,71 ± 0,00 (19%) ^a	1,82 ± 0,00 (14%) ^a	2,05 ± 0,00 (1%) ^a	1,75 ± 0,00 (4%)	7,34 ± 0,00 (10%) ^a
	10	1,48 ± 0,00 (26%) ^a	1,34 ± 0,00 (29%) ^a	1,95 ± 0,00 (3%) ^a	1,58 ± 0,00 (9%)	6,33 ± 0,00 (17%) ^a
	20	1,35 ± 0,00 (30%) ^a	1,26 ± 0,00 (32%) ^a	1,91 ± 0,00 (4%) ^a	1,38 ± 0,00 (16%)	5,90 ± 0,00 (20%) ^a
INTEIRA	0	2,70 ± 0,00	2,88 ± 0,00	2,0 ± 0,00	1,58 ± 0,00	9,16 ± 0,01
	1	2,48 ± 0,00 (4%) ^a	2,62 ± 0,01 (5%) ^a	1,94 ± 0,00 (2%) ^a	1,41 ± 0,00 (6%) ^a	8,44 ± 0,01 (4%) ^a
	10	2,44 ± 0,00 (5%) ^a	2,53 ± 0,00 (6%) ^a	1,91 ± 0,00 (2%) ^a	1,38 ± 0,00 (7%) ^a	8,27 ± 0,00 (5%) ^a
	20	2,43 ± 0,00 (5%) ^a	2,50 ± 0,00 (7%) ^a	1,88 ± 0,00 (3%) ^a	1,37 ± 0,00 (7%) ^a	8,19 ± 0,00 (6%) ^a

^a Percentual de redução de AFL nas amostras irradiadas em relação aos controles (0 KGy).

Pode-se observar que todas as amostras tiveram redução nos 4 tipos de aflatoxinas estudadas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) em todas as doses testadas, sendo a dosagem de 20 KGy a que mais causou diminuição dessas micotoxinas nas amostras de ambos os formatos estudados. Os gráficos de 2 a 6 abaixo demonstram um comparativo entre as doses de radiação usadas, a forma das castanhas e a redução da contaminação obtida para cada uma das AFL testadas.

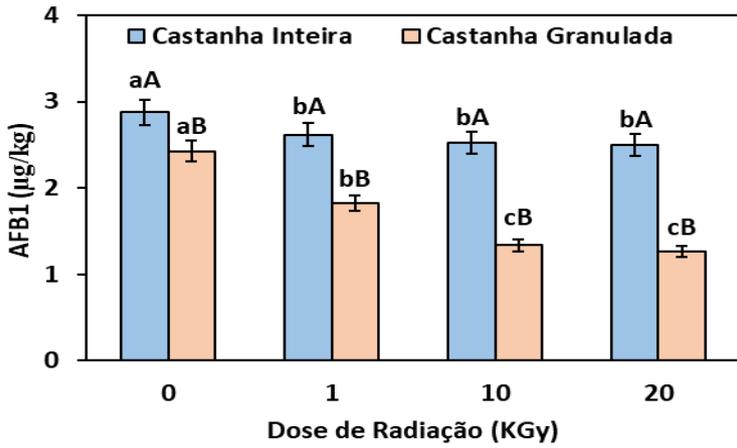


Gráfico 2: Redução de AFB1 em amostras de castanhas inteiras e granuladas após tratamento com radiação gama.*

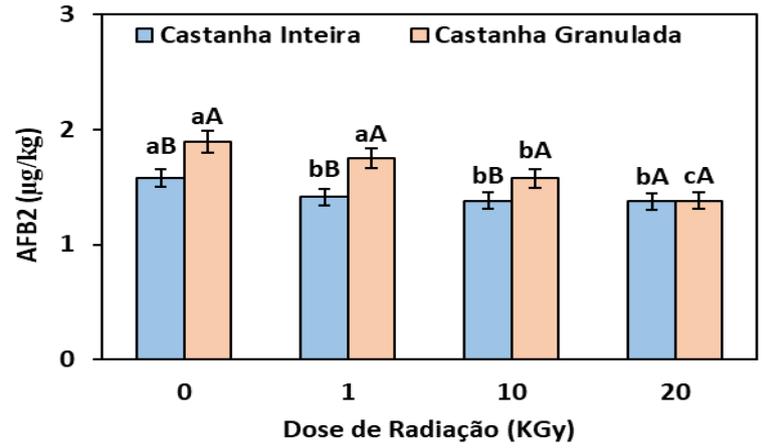


Gráfico 3: Redução de AFB2 em amostras de castanhas inteiras e granuladas após tratamento com radiação gama.*

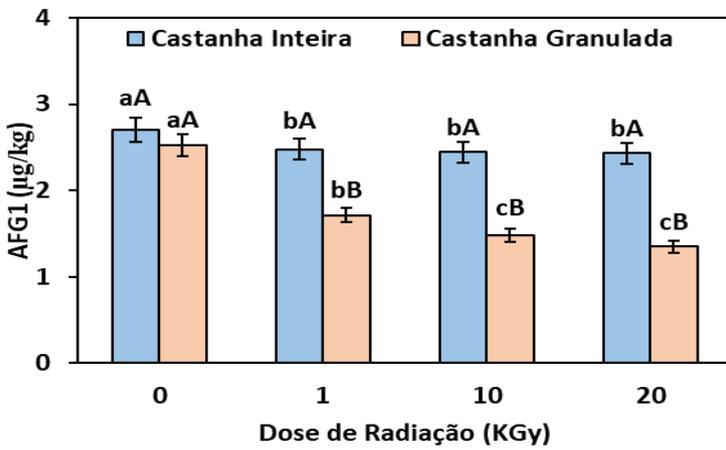


Gráfico 4: Redução de AFG1 em amostras de castanhas inteiras e granuladas após tratamento com radiação gama.*

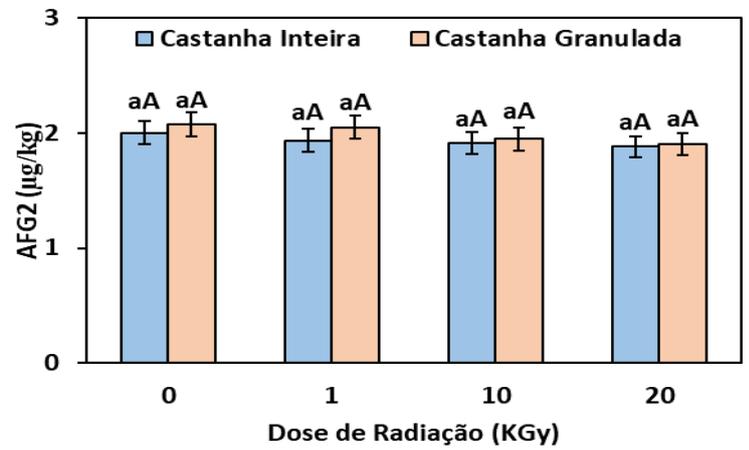


Gráfico 5: Redução de AFG2 em amostras de castanhas inteiras e granuladas após tratamento com radiação gama.*

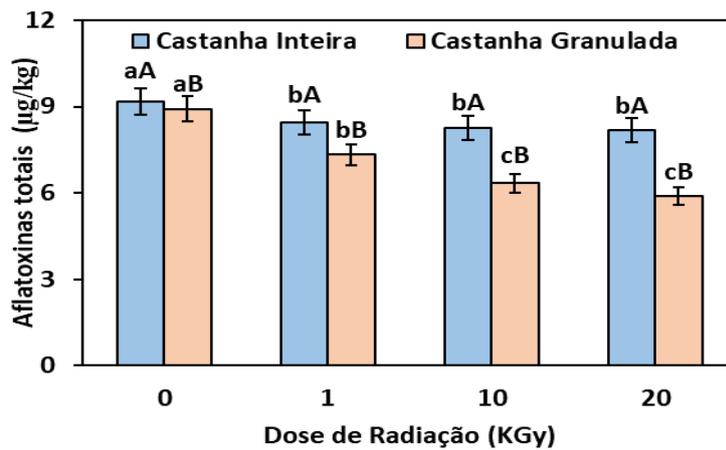


Gráfico 6: Redução de AFL totais em amostras de castanhas inteiras e granuladas após tratamento com radiação gama.*

*Letras minúsculas estão relacionadas a dose de radiação gama usada e as maiúsculas ao formato. Letras diferentes diferem significativamente ($p > 0,05$).

Ao analisar os gráficos e a tabela 6 pode-se observar que houve redução de todas as AFL testadas e nas 3 doses de radiação gama com as quais as amostras foram tratadas. De forma geral, o maior percentual de redução é observado nas amostras de castanhas granuladas tratadas com uma dose de 20 KGy, cuja redução de AFL total (gráfico 6) chegou a 20%. Já nas castanhas inteiras a dose de 20 KGy reduziu apenas 6% de AFL total, embora essa redução ainda seja maior que o obtido com as doses de 1 e 10 KGy, não houve diferença significativa na redução de AFL total entre as três doses testadas, essa redução é significativa apenas quando comparada as amostras sem tratamento (0 KGy).

Em relação ao efeito do tratamento sobre cada uma das aflatoxinas (gráficos de 2 a 5) percebe-se que as aflatoxinas AFB1 e AFG1 foram as mais suscetíveis a ação da radiação gama em ambos os formatos e que as 3 doses testadas foram capazes de reduzir de forma significativa ($p > 0,05$) os níveis de todas as AFL em relação as amostras controles. Embora todas as doses testadas tenham causado redução dessas micotoxinas, a dose de 20 KGy foi a que teve os maiores índices de redução para todas as AFL, nos dois formatos, como pode ser visualizado na tabela 6.

Como se sabe, as AFL apresentam toxicidade diferentes, sendo a AFB1 a variante com maior toxicidade e também a mais frequentemente encontrada nos alimentos. A AFG1 é consideravelmente mais tóxica que as AFB2 e AFG2 (CAMPOS *et al.*, 2017). No Brasil, a ANVISA estipula um LMT para AFB1 de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em Castanha-do-Brasil, além dos 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ estipulados para AFL total (BRASIL, 2011). Além disso, países como a UE também estipulam limites para AFB1 especificamente, frente a sua toxicidade e prevalência. Diante disso, esta é a AFL mais estudada. Assunção *et al.* (2015) analisou a ação da radiação gama sobre AFB1 em castanhas-do-Brasil e obteve uma redução de 70,6% usando uma dose de 5 KGy e 84,15% a uma dose de 10 KGy, redução bem mais acentuada do que o encontrado em nosso estudo para o mesmo tipo de AFL. Outros estudos também avaliaram a ação da radiação gama em AFL presentes em diferentes substratos, como pode ser observado na tabela 7.

Tabela 7: Estudos sobre redução de AFL em alimentos tratados com radiação gama.

Substrato	Dose (KGy)	Resultado	Referência
Castanha-do-Brasil	5	Redução de 70,6% AFB1	(Assunção <i>et al.</i> , 2015)
Amendoim	10	Redução de 74,3% AFB1	(Jablónska e Mankowska, 2014)
	15 -30	Redução de 55 – 74% AFB1	(Prado <i>et al.</i> , 2003)
	10	Redução de 58, 6% AFB1	(Ghanem, Orfi e Shamma, 2008)
Amêndoa	10	Redução > 60% AFB1	(Jablónska e Mankowska, 2014)
Nozes	10	Redução > 60% AFB1	(Jablónska e Mankowska, 2014)
Milho	10	Degradação completa de AFB1 e AFB2	(Aquino <i>et al.</i> , 2005)
	8	Redução de 60,3% AFB1	(Mohamed <i>et al.</i> , 2015)
	25	Redução de 69% AFB1	(Shahbazi <i>et al.</i> , 2010)
Pistache	10	Redução de 68,8% AFB1	(Ghanem <i>et al.</i> , 2008)
Arroz	10	Redução de 87,8 % AFB1	(Ghanem <i>et al.</i> , 2008)
	8	Redução de 64,7% de AFB1	(Mohamed <i>et al.</i> , 2015)
Pimenta Preta	60	Redução de 43% AFB1, 24% AFB2, 40% AFG1 e 36% AFG2	(Jalili, Jinap e Noranizan, 2010)
	30	Redução de 47% AFB1, 39% AFB2, 47% AFG1 e 40% AFG2	(Jalili, Jinap e Noranizan, 2012)
Pimenta Branca	30	Redução de 51% AFB1, 35% AFB2, 48% AFG1 e 43% AFG2	(Jalili <i>et al.</i> , 2012)

O uso da irradiação gama como método para descontaminação de alimentos com AFL é algo que já vem sendo estudado há algum tempo, como pode ser visto na tabela 7, principalmente em relação a AFB1 que é a mais tóxicas dentre as AFL. Observa-se que em todos os estudos listados houve redução de AFB1 em mais de 40% em doses que variam de 5 a 60 KGy em diferentes substratos. Além dos estudos listados na tabela 7, Temcharoen e Thilly (1982) analisaram amostras de alimentos a base de amendoim previamente inoculados com AFB1, observando uma redução de 75% e 100% após tratamento com radiação gama nas doses de 1 e 10 KGy respectivamente. Demonstrando que esse método de descontaminação tem um bom resultado em alimentos com AFL.

Segundo Pankaj *et al.*, (2018), as AFL são resistentes a ação direta da radiação gama, sendo assim a redução das AFL observados nesse estudo, e nos demais listados na tabela 7, são resultados de efeitos indiretos da radiação gama como a reação aos radicais livres devido a radiólise da água ou outros componentes. Sendo assim, a presença de água tem um papel de grande importância na degradação dessas AFL (RUSTOM *et al.*, 1997). Tendo em vista a radiólise da água, torna-se importante saber o teor de água presente nos alimentos, que explica a variação nos resultados de degradação de AFL pela radiação gama.

Conforme visualizado na tabela 6, as AFB1 e AFG1 foram as mais susceptíveis a ação da radiação gama seja nas castanhas granuladas ou nas castanhas inteiras. O mesmo foi percebido por Jabili *et al.* (2012) ao analisar os efeitos da radiação gama em doses de 30 KGy em pimentas preta e branca contaminadas com AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 obtiveram, nas pimentas pretas, uma redução de 47% de AFB1 e AFG1 enquanto que as AFB2 e AFG2 tiveram reduções de 39 e 40% respectivamente. Já nas pimentas brancas a redução foi de 51% AFB1, 48% AFG1, 35% AFB2 e 43% AFG2.

Essa maior sensibilidade à radiação gama das AFB1 e AFG1 pode estar relacionada à dupla ligação presente nos carbonos 8,9 do anel furânico terminal, que não consta nas AFB2 e AFG2, tornando-as mais resistentes (JABILI *et al.*, 2016; ISMAIL *et al.*, 2018). Sendo assim, os radicais livres formados devido à radiólise da água podem atacar mais facilmente as AFB1 (figura 8) e AFG1, gerando produtos de menor atividade biológica (RUSTOM, 1997; PANKAJ *et al.*, 2018).

Outro tipo de radiação ionizante é usado no tratamento de alimentos, o feixe de elétrons, que se utiliza de elétrons gerados por aceleradores lineares e apresenta efeitos semelhantes à radiação gama nos alimentos, com diferenças em relação à penetração no produto (onde a radiação gama tem maior penetrabilidade) (GHANBARI *et al.*, 2012). Da mesma forma como ocorre com a radiação gama, o feixe de elétrons tem sua ação de forma indireta, onde a água tem papel importante uma vez que os radicais livres formados a partir da radiólise da água atacam o anel furano terminal das AFL (RUSTOM 1997, ASSUNÇÃO *et al.*, 2015).

Um estudo sobre a degradação de AFB1 por feixe de elétrons foi realizado por Liu *et al.*, (2016) utilizando o método UPLC-Q-TOF/MS para identificação de produtos de degradação da AFB1 após irradiação com feixe de elétrons e uma possível via de degradação foi proposta por ele. A figura 14 mostra os produtos de degradação de AFB1 em meio aquoso,

após tratamento com feixe de elétrons, obtidos por Liu *et al.*, (2016) uma vez que, como age de forma semelhante a radiação gama, pode-se considerar que, provavelmente, esses produtos obtidos da AFB1 também ocorram quando utilizada a irradiação gama.

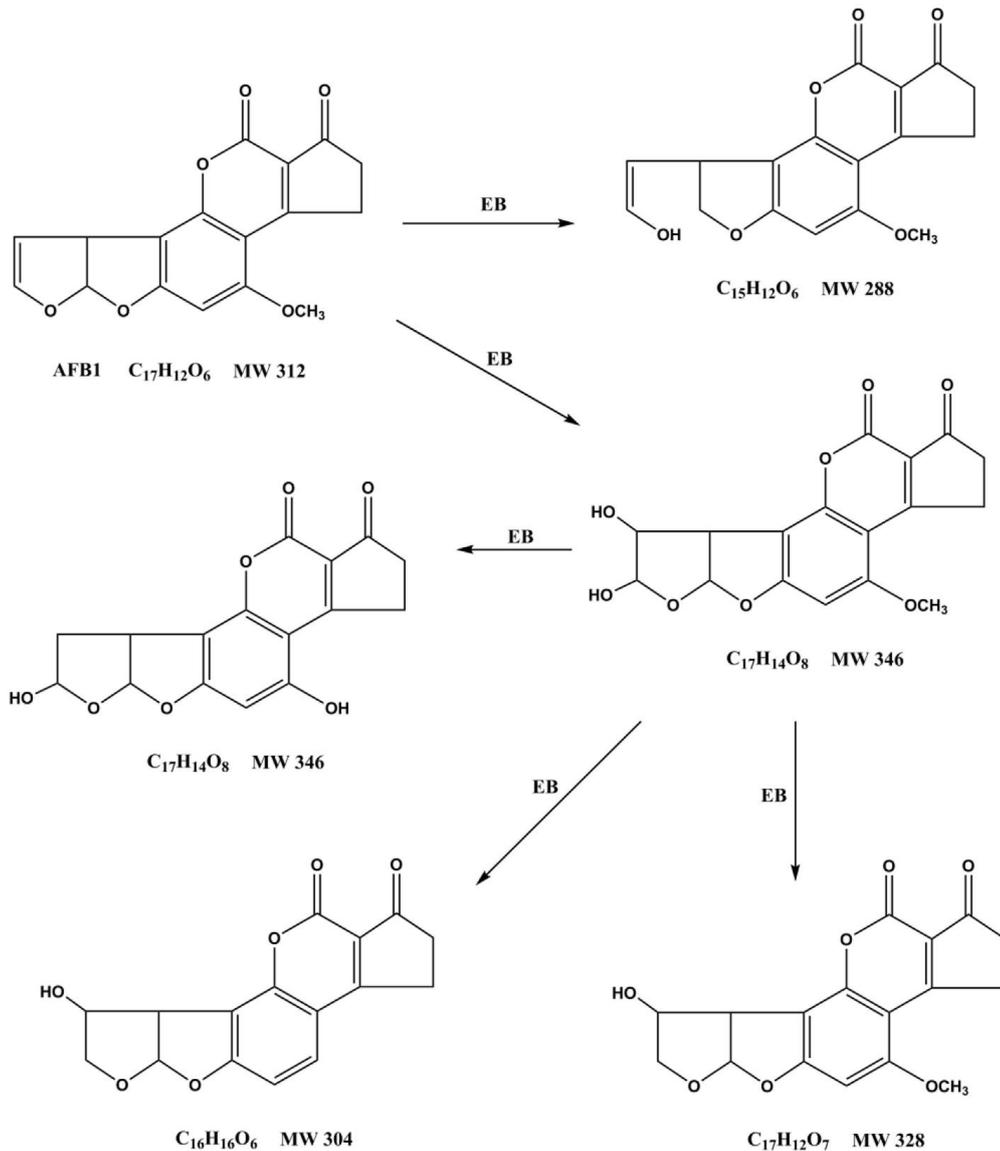


Figura 14: Degradação de AFB1 por irradiação com feixe de elétrons (LIU *et al.*, 2016).
EB = Feixe de Elétrons; MW = Peso molecular.

Vale ressaltar que, apesar da dita semelhança na ação da irradiação gama com a irradiação por feixe de elétrons, não se pode dizer com certeza que esses produtos de degradação de AFB1 mostrados na figura 14 também ocorreriam se fosse usada a irradiação gama. Seria interessante um estudo detalhado sobre a ação da irradiação gama em AFL usando UPLC-Q-TOF/MS, que é uma técnica que utiliza separação cromatográfica de alto

desempenho e sensibilidade juntamente com a elucidação de estruturas e identificação de padrões de fragmentação de compostos, o que permitiria propor os produtos de degradação de cada AFL após a irradiação com radiação gama.

Quanto a forma das amostras de castanhas analisadas, pode-se observar que as amostras de castanhas granuladas apresentaram maior sensibilidade a ação da radiação gama, uma vez que as maiores reduções das AFLs ocorreram nessas amostras (tabela 6). Essa maior sensibilidade da castanha granulada foi confirmada pela análise de variância (ANOVA), que demonstrou que há diferença significativa entre as amostras controle e as irradiadas com diferentes doses para ambos os formatos testados e para todas as variantes de AFL (ANEXO 8.2 a 8.6).

Esse resultado não condiz com o relatado na literatura sobre a penetrabilidade da radiação gama, que apresenta alta poder de penetração e uniformidade de dose, onde o tamanho e o formato do produto não interferem no processo (TSAI, 2006; ASSUNÇÃO *et al.*, 2015). Uma vez que a castanhas inteiras tiveram taxas de redução de AFLs significativamente menores que as das castanhas granuladas. Essa maior redução de AFLs das castanhas granuladas podem estar ligadas ao fato de apresentarem uma maior superfície de contato livre para a ação da radiação, expondo mais facilmente moléculas que compõem a matriz das castanhas a ação dos produtos da radiólise da água. No entanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados para confirmar se diferentes formas de apresentação da castanha-do-brasil possuem respostas variadas à radiação gama.

Foi observado que, de forma geral, a irradiação gama teve ação para redução da contaminação de AFL dessas amostras. Porém, deve-se levar em consideração o nível de contaminação inicial da amostra a ser irradiada, de forma que o resultado final fique dentro do limite permitido pela legislação, no caso do Brasil, esse limite é de 10 µg/kg para AFL total em amostras de castanha sem casca pronta para consumo e 2 µg/kg para AFB1 (BRASIL, 2011).

Outro ponto importante a ser levado em consideração é que as amostras analisadas neste trabalho foram contaminadas artificialmente com um padrão de AFL com concentração conhecida, dessa forma pode ser que as interações entre os radicais livres, produzidos durante a irradiação, com as moléculas de AFL ocorra com maior facilidade, uma vez que essas AFL estariam “livres” nas amostras. Seria interessante comparar os resultados deste estudo com

amostras contaminadas naturalmente com AFL para avaliar a efetividade da radiação gama quando as AFL estão mais fortemente ligadas aos componentes da castanha, como as proteínas, que por serem moléculas maiores, pode ser que confirmem uma certa proteção aos efeitos da radiação nas AFL.

5.3 Índice de Acidez

O índice de acidez é um indicativo de processo de decomposição e aponta para a presença e quantidade de ácidos graxos livres presentes no óleo. Esse índice é um dos dados utilizados para avaliar o estado de conservação de um óleo vegetal, atestando sua qualidade e segurança alimentar (SANTOS *et al.*, 2015). Os valores de índice de acidez obtidos nas amostras de óleo das castanhas inteira e granulada após o tratamento com radiação gama são visualizados na tabela (Tabela 8) e gráfico abaixo (Gráfico 7).

Tabela 8: Valores de índice de Acidez (em mg KOH/g) obtidos das amostras de óleo de Castanha-do-Brasil, irradiadas e não irradiadas.

Dose de Radiação (KGy)	Índice de Acidez (mg KOH/g)	
	Castanha Inteira Média ± DP	Castanha Granulada Média ± DP
Controle (0 KGy)	0,83 ± 0,01	1,29 ± 0,15
1 KGy	1,36 ± 0,00	1,09 ± 0,00
10 KGy	1,09 ± 0,00	1,09 ± 0,00
20 KGy	1,10 ± 0,01	1,10 ± 0,01

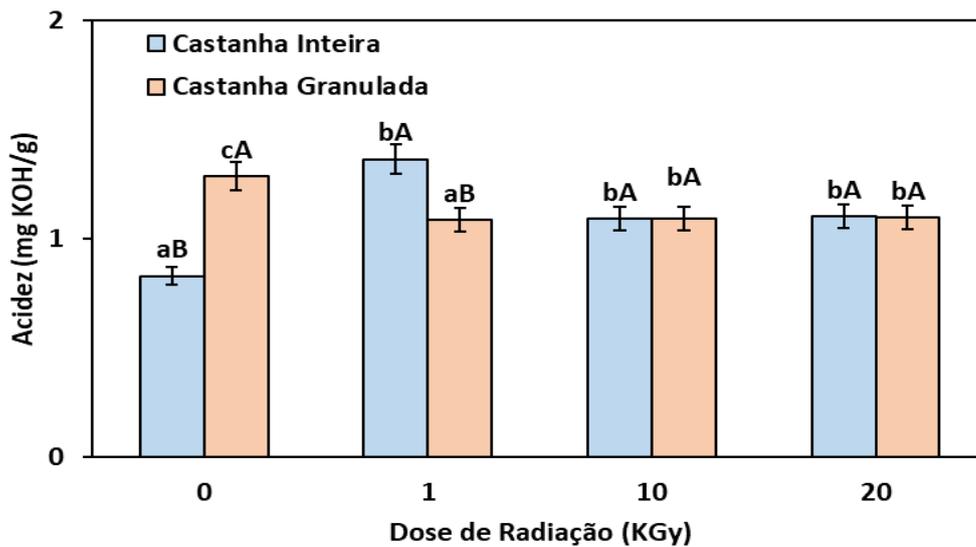


Gráfico 7: Índice de Acidez (em mg KOH/g) das amostras de óleo das castanhas inteiras e granuladas após o tratamento com doses de radiação gama.

Podemos observar que as amostras controle (0 KGy) apresentaram valores distintos de índice de acidez, onde o óleo da castanha inteira teve um índice de acidez de 0,83 mg KOH/g e o óleo da castanha granulada apresentou um índice de 1,29 mg KOH/g, essa diferença pode estar associada ao fato de serem amostras de lotes diferentes, além do fato de a castanha granulada ter a maior superfície de contato tornando-a mais susceptível a alterações durante o processo de beneficiamento e transporte. Os valores encontrados neste trabalho se aproximam do índice de acidez encontrado por Vilhena, Schwartz, Bezerra e Brasil (2020) em seu estudo com óleo de castanha, onde encontraram um valor de 1,55 mg KOH/g. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estipula um valor máximo de 4,0 mg KOH/g para o índice de acidez de óleos e gorduras vegetais (BRASIL, 2005), sendo assim, os valores obtidos para as amostras controle estão dentro da faixa estabelecida, atestando a qualidade do óleo.

O óleo entra em processo de decomposição através de hidrólise, fermentação ou oxidação, alterando a concentração de íons hidrogênicos presentes. Essa decomposição quebra as ligações entre o glicerol e os ácidos graxos, que formam então os ácidos graxos livres que são detectados pelo teste (LUTZ, 2008). Na irradiação, espécies reativas são formadas e iniciam reações químicas que resultam na degradação dos óleos e gorduras (ZEB; TAUFIQ 2004), podendo levar a um aumento nesse índice de acidez.

Com o tratamento em diferentes doses de radiação gama, observa-se que o óleo da castanha inteira teve um aumento de 24 % (de 0,83 a 1,36 mg KOH/g) a uma dose de 1 KGy e, após esse aumento as doses mais altas testadas, de 10 e 20 KGy, causaram um aumento

menor no índice de acidez (14%) quando comparadas a amostra controle. Já em relação ao óleo obtido da castanha granulada pode-se observar que houve uma diminuição do índice de acidez do óleo em todas as doses de radiação gama testadas, sendo uma diminuição de 8,4 % nas doses de 1 e 10 KGy e 8 % na dose de 20 KGy.

Apesar das diferenças entre os tipos de corte das amostras de castanha, a sua forma não causou diferença significativa estatisticamente de acordo como teste ANOVA realizado ($p > 0,05$). Já quanto a dose de radiação aplicada o teste ANOVA (Anexo 8.7) indicou resultado significativo ($p < 0,05$).

Pode-se observar ainda que, mesmo as doses de radiação gama causando um leve aumento no índice de acidez, como ocorreu no óleo da castanha inteira, todos os resultados ficaram dentro do limite estabelecido pela ANVISA (4 mg KOH/g), indicando que a radiação gama não prejudicou a qualidade dos óleos obtidos das castanhas inteira e granulada após o tratamento.

5.4 Índice de Peróxido

Para detectar o nível de rancidez dos óleos analisados, o grau de oxidação é refletido através do índice de peróxido, que é outro parâmetro usado para auxiliar na avaliação da qualidade de óleos vegetais (DE FREITAS, 2016). Os resultados de índice de peróxidos obtidos nas amostras foram organizados na tabela 9 e gráfico 8.

Tabela 9: Valores de índice de peróxido (em mEq/kg) obtidos das amostras de óleo de Castanha-do-Brasil, irradiadas e não irradiadas.

Índice de Peróxido (mEq/kg)		
Dose de Radiação (KGy)	Castanha Inteira Média ± DP	Castanha Granulada Média ± DP
Controle (0 KGy)	2,77 ± 0,00	2,77 ± 0,00
1 KGy	4,36 ± 0,00	3,83 ± 0,46
10 KGy	5,85 ± 0,25	8,86 ± 0,46
20 KGy	3,70 ± 0,23	5,15 ± 0,00

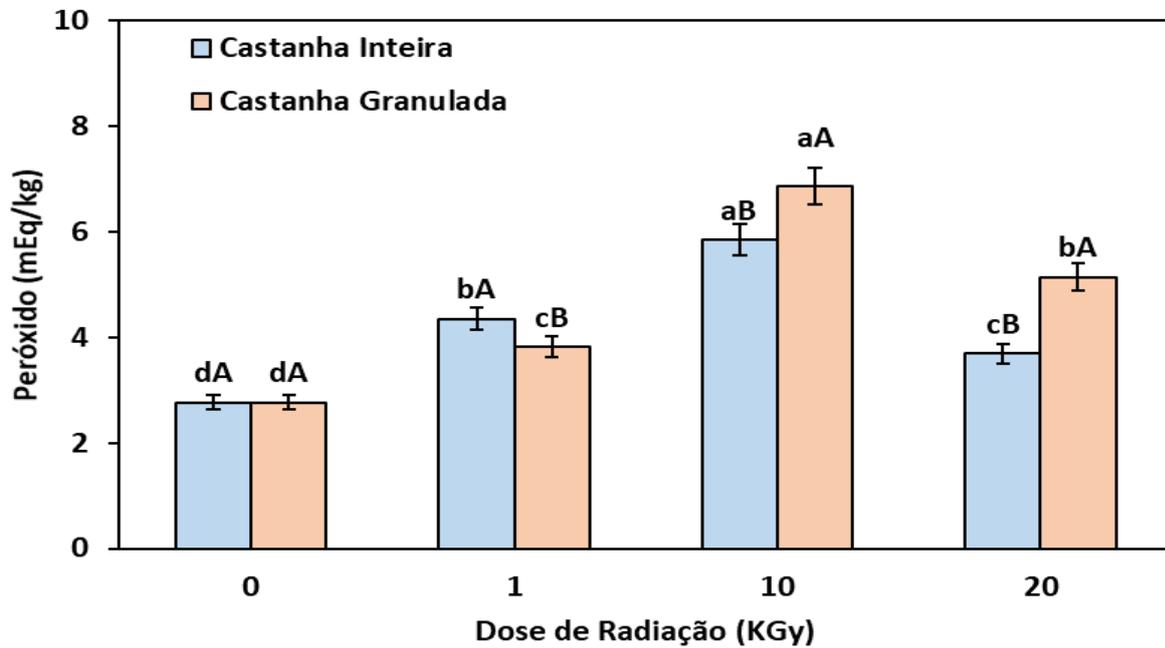


Gráfico 8: Índice de Peróxidos (em mEq/kg) das amostras de óleo das castanhas inteiras e granuladas após o tratamento com doses de radiação gama.

O índice de peróxido, assim como o índice de acidez, é um parâmetro referencial que atesta a segurança e qualidade alimentar do óleo. Trata-se de um método que determina substâncias que oxidam o iodeto de potássio nas condições do teste, essas substâncias são produtos provenientes da oxidação das gorduras (DE FREITAS, 2016).

É possível observar que os óleos controles obtidos das castanhas inteiras e granuladas apresentaram o mesmo resultado para este parâmetro, independente da forma. A ANVISA preconiza níveis máximos para índice de peróxidos em óleos vegetais de 15 mEq/kg (BRASIL, 2005). Valores superiores para índice de peróxidos foram encontrados por Vilhena, Schwartz, Bezerra e Brasil (2020) em um estudo com óleo de castanha (8,1 e 9,2 mEq/kg), mas ainda sim esses resultados apresentaram-se abaixo do que preconiza a legislação. Sendo assim, os valores encontrados nas amostras controles indicam um bom estado de conservação das sementes de castanha tanto inteira quanto granulada e, portanto, do óleo extraído. Além disso esses valores, juntamente com os resultados obtidos para índice de acidez das amostras controle, demonstram que o processo de extração realizado não causou danos oxidativos ao óleo.

Para as doses de radiação gama testadas, pode-se observar que todas elas causaram um aumento no índice de peróxido, tanto para o óleo da castanha inteira quanto para o da castanha granulada. Os óleos de ambas as castanhas tiveram um aumento maior de peróxidos, quando comparadas aos controles, na dose de 10 KGy, sendo de 35,7% para o óleo da castanha inteira e 42,5% para o da castanha granulada. Um estudo realizado por Byun *et al.* (1996) analisou óleo extraído de grãos de soja irradiados com até 10 KGy e nenhuma alteração no índice de peróxidos foi observada. Já um estudo realizado por Zeb e Taufiq (2004) as doses acima de 10 KGy, aplicadas em soja e girassol afetaram a qualidade dos óleos extraídos elevando o índice de peróxido. O menor aumento do índice de peróxido observado nas doses de 20 KGy (em ambos os formatos) em comparação com as doses de 10 KGy pode ter ocorrido, possivelmente, pela formação e destruição simultânea de hidroperóxidos, uma vez que estes compostos se degradam com maior facilidade.

Em um estudo realizado por Mexis e Kontominas (2009), ao analisarem o efeito da irradiação gama em castanhas de caju em doses que variaram de 0,5 KGy à 7,5 KGy, os autores observaram que, com o aumento das doses de radiação houve um aumento da oxidação lipídica, gerando hidroperóxidos e levando a um aumento significativo nos valores de índice de peróxido.

A ANOVA feita para este teste indicou que existe uma diferença estatisticamente significativa entre os tipos de corte analisados ($p < 0,05$), onde pode-se observar que o óleo da castanha granulada apresentou um aumento maior no índice de peróxido do que o óleo da castanha inteira quando submetidas ao tratamento com radiação gama. As doses testadas também apresentaram diferença significativas ($p < 0,05$), indicando que essas doses causaram um aumento relevante no índice de peróxido (Anexo 8.8).

Vale ressaltar que, apesar das doses testadas terem causado um aumento de até 42,5% no índice de peróxido dos óleos das castanhas testadas neste trabalho, ainda sim os valores ficaram dentro do limite permitido pela ANVISA para óleos vegetais de 15 mEq/kg, indicando que uma boa qualidade do óleo extraído mesmo após o tratamento das castanhas. Deve-se frisar, no entanto, que é importante atestar a qualidade de conservação inicial das amostras antes do tratamento.

5.5 Composição do óleo – Ácidos graxos

De acordo com os resultados obtidos por CG, observou-se que as amostras de óleo de castanha obtidos a partir da prensagem das amostras controle, tanto de castanha granulada quanto da castanha inteira, tiveram a predominância de ácidos graxos insaturados (73% e 77%). Esses resultados estão de acordo com o comumente encontrado em óleos de castanha-do-Brasil que vão de 73 a 85% de ácidos graxos insaturados e 17 a 25% de ácidos graxos saturados, em média (NELSON; COX, 2015; SARTORI *et al.*, 2018). A tabela 10 e os gráficos 9 e 10 mostram os resultados de ácidos graxos saturados e insaturados obtidos nas amostras após o tratamento com diferentes doses de radiação gama.

Tabela 10: Composição por CG de Ácidos graxos Saturados e Insaturados presentes nas amostras não irradiadas e irradiadas.

FORMA	DOSE (KGy)	AS* Média ± DP	AI* Média ± DP
GRANULADA	0	26,84 ± 0,00	73,17 ± 0,00
	1	27,31 ± 0,00	72,69 ± 0,00
	10	25,04 ± 0,00	74,96 ± 0,00
	20	28,62 ± 0,06	72,03 ± 0,56
INTEIRA	0	22,18 ± 0,06	77,47 ± 0,56
	1	32,61 ± 0,00	67,39 ± 0,00
	10	24,61 ± 0,00	75,39 ± 0,00
	20	25,22 ± 0,00	74,78 ± 0,00

AS = Ácidos graxos Saturados; AI = Ácidos graxos Insaturados. Resultados expressos em g/100g de óleo

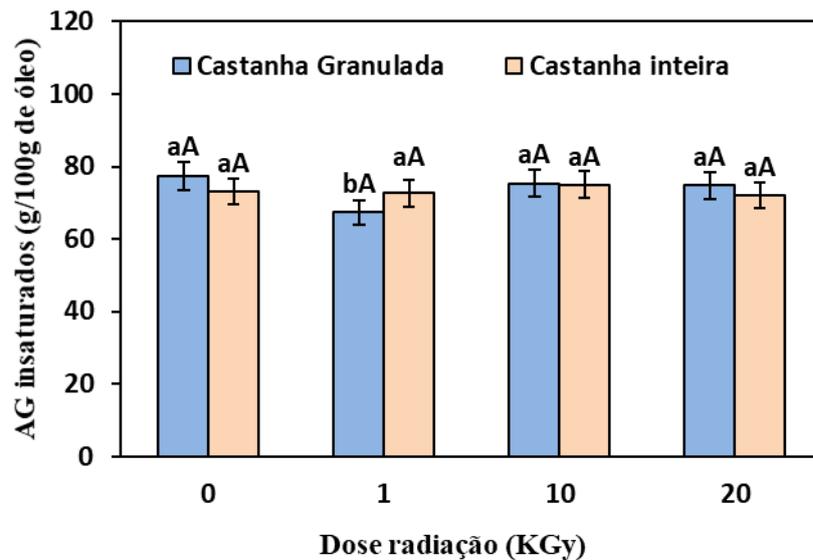


Gráfico 9: Ação da radiação gama nos Ácidos Graxos Insaturados de Castanha-do-Brasil inteira e granulada.

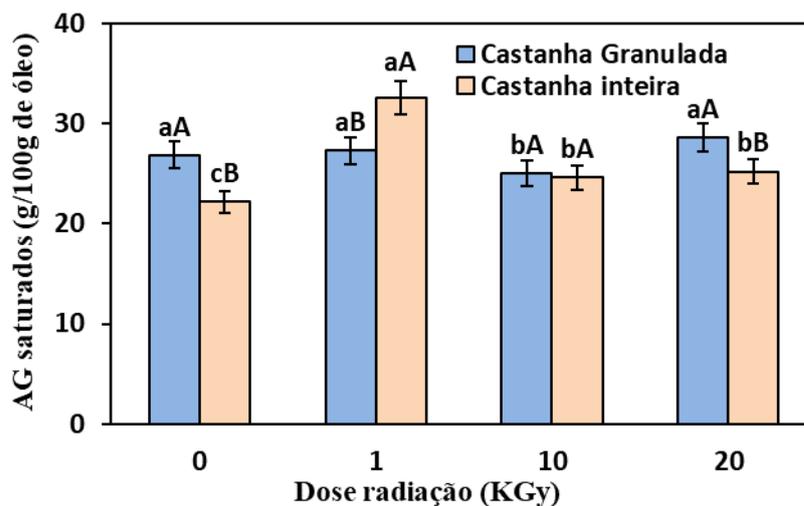


Gráfico 10: Ação da radiação gama nos Ácidos Graxos Saturados de Castanha-do-Brasil inteira e granulada.

De forma geral observa-se que todas as doses testadas causaram variação na proporção de ácidos graxos saturados e insaturados das amostras em ambos os formatos. As amostras não irradiadas apresentaram 26,84% de ácidos graxos saturados e 73,17% de insaturados nas castanhas granuladas e as castanhas inteiras apresentaram 22,18% de ácidos graxos saturados e 77,47% de insaturados. As nozes, como a castanha-do-Brasil, contêm altos níveis de ácidos graxos insaturados que são propensos à peroxidação lipídica quando irradiadas (GECGEL *et al.*, 2011). Percebe-se que a castanha inteira foi a que teve maior variação, principalmente na dose de 1 KGy, que causou um aumento de cerca de 19% de ácidos graxos saturados e reduziu cerca de 7% do conteúdo de ácidos graxos insaturados. Já as castanhas granuladas

apresentaram uma variação menor, sendo a dose de 1 KGy a que menos influenciou no conteúdo de ácidos graxos totais.

A análise de variância realizada para esta análise apontou que há diferença significativa tanto entre as doses testadas como no formato das castanhas ($p < 0,05$) (Anexos 8.9 e 8.10). Embora tenha sido encontrado variações significativas no teor de ácidos graxos totais das amostras analisadas, essa variação pouco se distanciou do comumente encontrado para ácidos graxos saturados e insaturados em castanhas-do-Brasil.

A cromatografia gasosa permitiu uma análise detalhada dos principais ácidos graxos presentes nas amostras de castanha-do-Brasil granuladas e inteiras, não irradiadas e irradiadas. A tabela 11 mostra os resultados obtidos com os principais ácidos graxos predominantes nas amostras. Sendo os mais prevalentes os ácidos oleico, linoleico, palmítico e esteárico. Outros estudos também descrevem esses 4 ácidos como os mais prevalentes em castanhas-do-Brasil, como já visualizado na tabela 2 (QUEIROGA *et al.*, 2009; SARTORI *et al.*, 2018). Já os gráficos de 11 a 14 nos permitem visualizar melhor as diferenças entre as amostras irradiadas e não irradiadas para cada ácido graxo.

Tabela 11: Principais ácidos graxos presentes nas amostras de castanhas-do-Brasil irradiadas e não irradiadas.

FORMA	DOSE (KGy)	Ácido Oleico (C18:1)	Ácido Linoleico (C18:2)	Ácido Palmítico (C16:0)	Ácido Esteárico (C18:0)
GRANULADA	0	49,77 ± 0,00	23,40 ± 0,00	18,45 ± 0,00	8,39 ± 0,00
	1	47,69 ± 0,00	25,00 ± 0,00	19,22 ± 0,00	8,09 ± 0,00
	10	50,02 ± 0,00	24,94 ± 0,00	17,85 ± 0,00	7,19 ± 0,00
	20	48,64 ± 0,56	23,39 ± 0,27	16,70 ± 0,06	11,91 ± 0,13
INTEIRA	0	57,27 ± 0,56	20,20 ± 0,27	14,87 ± 0,06	7,31 ± 0,13
	1	46,83 ± 0,00	20,56 ± 0,00	24,37 ± 0,00	8,24 ± 0,00
	10	61,99 ± 0,00	13,40 ± 0,00	16,97 ± 0,00	7,64 ± 0,00
	20	58,89 ± 0,00	15,89 ± 0,00	18,47 ± 0,00	6,75 ± 0,00

Resultados expressos em g/100g de óleo. Média ± DP

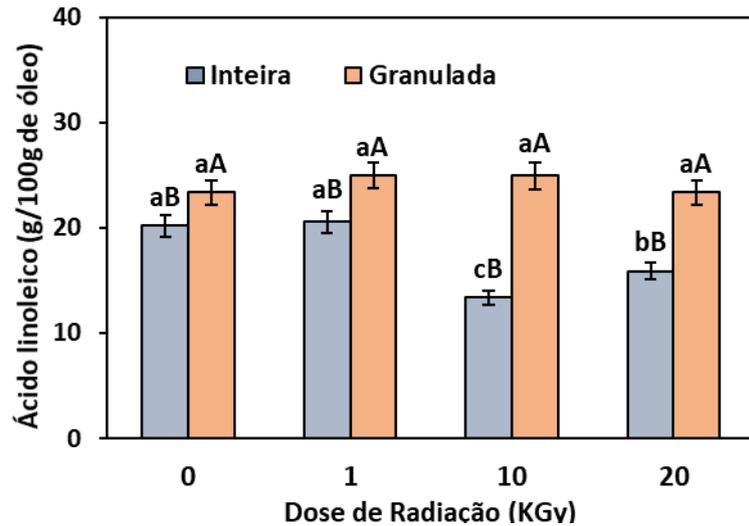


Gráfico 11: Ácido linoleico em amostras de castanhas granuladas e inteiras, não irradiadas e irradiadas.

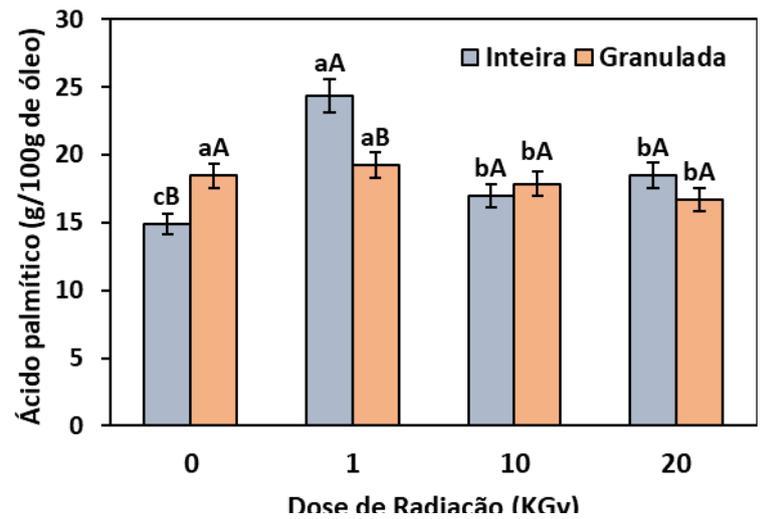


Gráfico 12: Ácido palmítico em amostras de castanhas granuladas e inteiras, não irradiadas e irradiadas.

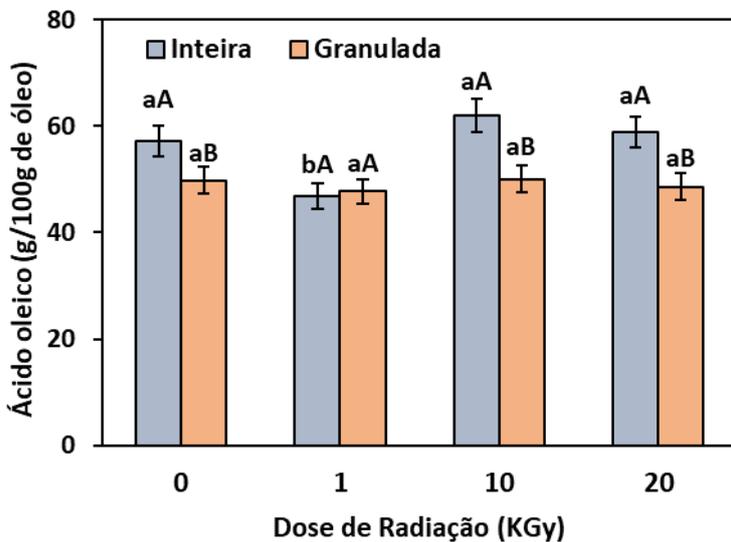


Gráfico 13: Ácido oleico em amostras de castanhas granuladas e inteiras, não irradiadas e irradiadas.

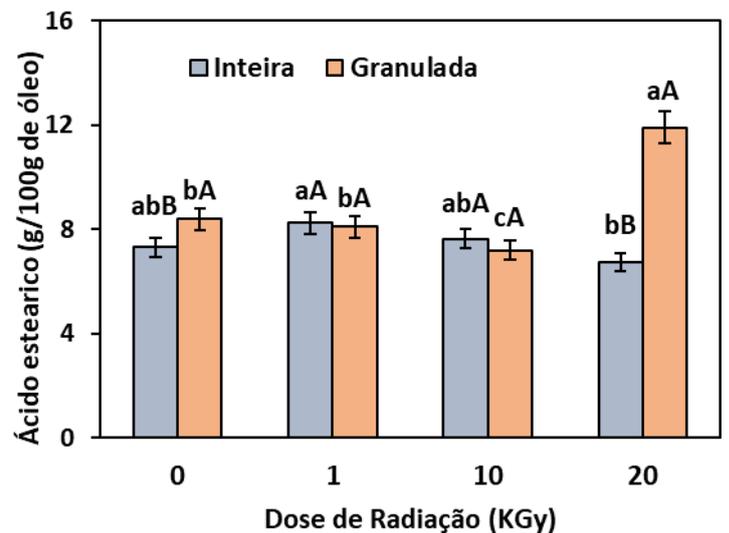


Gráfico 14: Ácido esteárico em amostras de castanhas granuladas e inteiras, não irradiadas e irradiadas.

As castanhas granuladas não apresentaram tanta diferença na composição de ácidos graxos das amostras irradiadas para as não irradiadas, como é possível visualizar nos gráficos de 11 a 14. Os ácidos insaturados oleico e linoleico pouco variaram, ficando próximos do observado nas amostras não irradiadas. Já os ácidos graxos saturados, em especial o ácido esteárico, observou-se um aumento mais acentuado na dose de 20 KGy (gráfico 14). Ao analisar as tabelas 10 e 11 percebe-se que houve uma diminuição nos ácidos insaturados na dose de 20 KGy. Sendo assim, pode-se sugerir que esses ácidos insaturados, oleico (C18:1) e linoleico (C18:2), tenham tido uma tendência a se converter em ácidos graxos saturados a partir da quebra dessas insaturações, que são mais instáveis, levando a formação, principalmente, do ácido esteárico (C18:0) que também tem uma cadeia composta por 18 carbonos.

Já nas castanhas inteiras observou-se que as amostras irradiadas com a dose de 1 KGy apresentaram um aumento evidente de ácido palmítico (gráfico 12) enquanto que as irradiadas com as demais doses tiveram um aumento de ácido oleico (gráfico c) e diminuição do ácido linoleico (gráfico 11), indicando que pode ter havido quebra de uma das insaturações do ácido linoleico (C18:2) formando ácido oleico (C18:1). Ao analisar a tabela 10 percebe-se que há um aumento dos ácidos graxos saturados e diminuição do insaturados ao longo das doses de radiação testadas. Frente a isso, pode-se sugerir que, além de converter os ácidos graxos insaturados em saturados a partir da quebra dessa insaturações, pode ter havido também uma quebra nas cadeias carbônicas, evidenciando o aumento do ácido palmítico observado principalmente nas amostras irradiadas com 1 KGy, uma vez que esse ácido graxo saturado apresenta uma cadeia composta por 16 carbonos.

A análise dos teores de voláteis dos óleos de castanha (ésteres dos ácidos graxos) a partir do Biplot (PC1 *versus* PC2) evidenciou a formação basicamente de 3 agrupamentos: das amostras de castanhas inteiras que apresentam semelhanças no teor de oleato de metila (“methyl ole”); das amostras granuladas com relação ao teor de linoleato de metila (“methyl lin”) e estearato de metila (“methyl ste”); e da amostra inteira submetida ao tratamento com dose de 1 KGy que foi a mais diferente por causa do teor de palmitato de metila (“methyl pal”) (Gráfico 15).

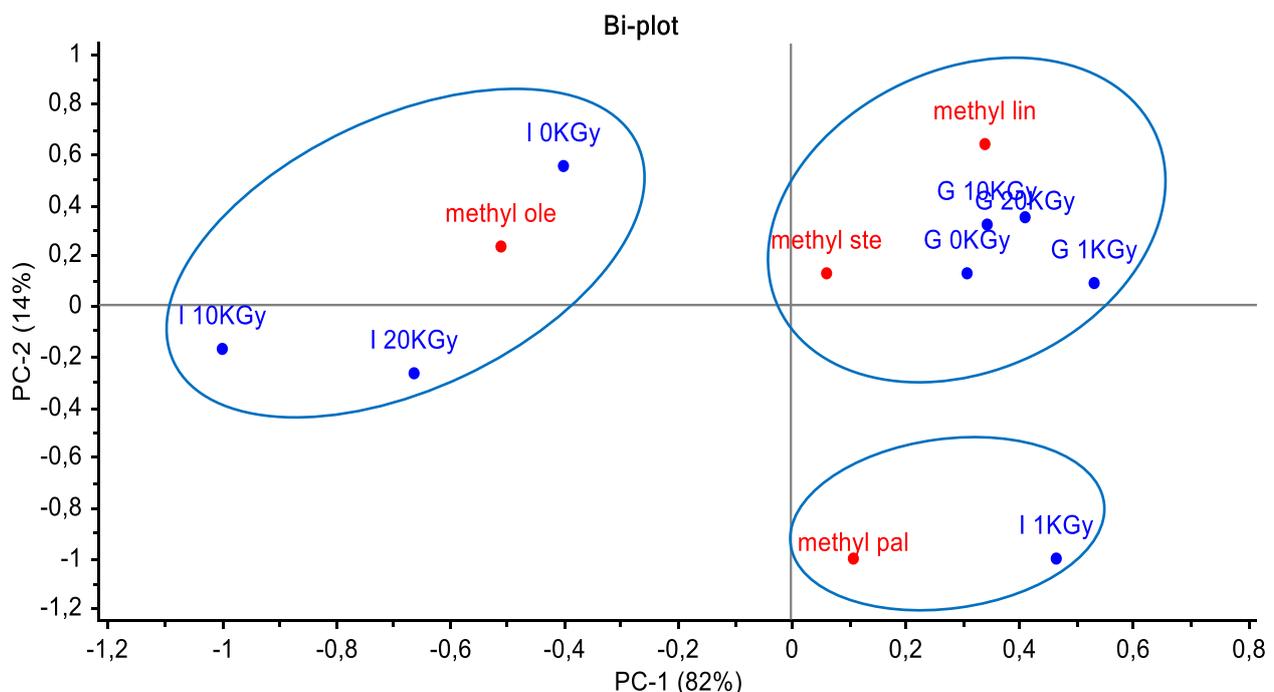


Gráfico 15. Biplot da análise por PCA dos voláteis dos óleos de castanhas irradiadas e não irradiadas. I = inteira; G = granulada; 0, 1, 10 e 20 KGy são os valores da dose de radiação.

A estatística (gráfico 15) mostra um panorama maior da influência das doses de radiação gama testadas e dos formatos das castanhas analisadas. Podemos observar que, de forma geral as castanhas granuladas ficaram com uma composição bem semelhante entre as irradiadas e as não irradiadas, apresentando um teor maior de linoleato de metila (ácido linoleico) e estearato de metila (ácido esteárico) que também foram visualizados nos gráficos 11 e 14. Já nas castanhas inteiras as amostras tratadas com as doses de 10 KGy e 20 KGy ficaram bem semelhantes às amostras não irradiadas (0 KGy), diferente daquelas que receberam a dose de 1 KGy que apresentaram um teor maior do palmitato de metila (ácido palmítico), confirmando o que observado no gráfico 12, ficando diferente das demais.

Já a análise de RMN ^1H dos óleos de castanha irradiados mostrou o perfil químico com sinais característicos de triglicerídeos com predominância dos ácidos graxos oleico e linoleico (Figura 15). Os multipletos (m) em δ_H 0,88 ppm e δ_H 1,28 ppm são referentes aos hidrogênios metílicos e hidrogênios metilênicos das cadeias alifáticas, em δ_H 1,61 (m) ppm é atribuído aos hidrogênios metilênicos do carbono- γ do éster. O sinal em δ_H 2,03 ppm (m) é atribuído aos hidrogênios dos carbonos- β da dupla ligação entre os carbonos. O sinal em δ_H 2,31 ppm (m) é referente aos hidrogênios de carbonos- β do éster, em δ_H 2,77 ppm (t, $J = 6,6$ Hz) referente aos hidrogênios metilênicos entre os carbonos olefínicos. Os duplos dubletos em δ_H 4,14 ppm (dd, $J = 11,9:6,0$ Hz) e em δ_H 4,29 ppm (dd, $J = 11,9:4,4$ Hz) são referentes aos hidrogênios- α do glicerol. Os multipletos em δ_H 5,26 ppm e δ_H 5,35 ppm são referentes ao hidrogênio- β do glicerol e aos hidrogênios olefínicos, respectivamente.

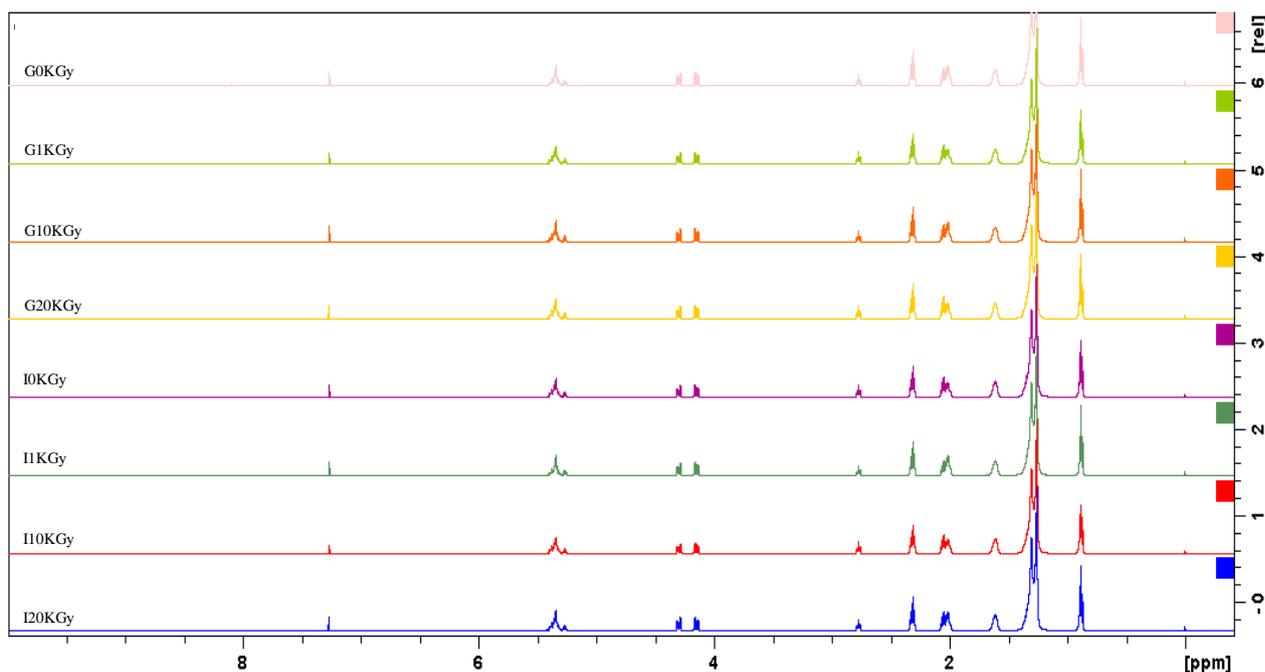


Figura 15: Espectro de RMN ^1H (11.74 T, CDCl_3) dos óleos de castanha irradiados. I = inteira; G = granulada; 0, 1, 10 e 20 KGy são os valores de radiação.

A partir dos espectros de RMN ^1H dos óleos de castanha foram integrados os sinais em δ_H 2,77 ppm, δ_H 2,03 ppm e δ_H 2,31 ppm referentes aos ácidos linoleico, oleico e saturados respectivamente, relativos ao sinal em δ_H 4,29 ppm, conforme Barison *et al.* (2010). Os valores estimados dos ácidos graxos estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Composição do óleo calculado pelo espectro de RMN ^1H .

FORMA	DOSE	Ácidos graxos (g/100g)			
		linoleico	oleico	saturados	insaturados*
INTEIRA	0 KGy	31,3	44,2	24,5	75,5
	1 KGy	27,9	47,6	24,4	75,5
	10 KGy	24,5	50,5	24,9	75,0
	20 KGy	26,8	48,0	25,2	74,8
GRANULADA	0 KGy	36,2	37,8	25,9	74,0
	1 KGy	35,4	38,8	25,8	74,2
	10 KGy	35,7	37,5	26,8	73,2
	20 KGy	35	38,1	26,8	73,1

*Calculado a partir da soma dos resultados obtidos para os ácidos linoleico e oleico

Os perfis químicos obtidos dos óleos irradiados coincidem com os resultados da CG e dos voláteis, apontando a predominância dos ácidos graxos insaturados oleico e linoleico nas amostras. Percebe-se que os espectros de todas as amostras de castanhas granuladas e inteiras, irradiadas e não irradiadas, são bem parecidos, indicando que a radiação gama pouco

influenciou nos perfis químicos dessas amostras. Nota-se que há pouca variação no total de ácidos graxos insaturados observados em ambos os formatos, porém os teores de ácido oleico e linoleico variam conforme as doses, com diminuição do ácido linoleico e aumento do oleico, indicando que possivelmente há uma conversão de ácido linoleico em oleico, o que também foi pontuado nos resultados da CG.

De forma semelhante ao relatado em nosso estudo, Al-Bachir (2014) avaliou as propriedades físico-químicas de óleos extraídos de amêndoas (*Pronus amygdalus L.*) irradiadas com doses de até 3KGy e observaram que os ácidos graxos saturados e insaturados não foram afetados pela radiação gama, havendo apenas diferenças moderadas entre as doses testadas. Em outro estudo que analisou o impacto da radiação gama no perfil de ácidos graxos de Pistaches, Fallah *et al.* (2018) observou um aumento de ácidos graxos saturados e diminuição do insaturados em doses de até 9 KGy. Em seu estudo com castanha de caju, Mexis e Kontominas (2009) observaram uma diminuição do ácido oleico em doses de 7,5 KGy e aumento do ácido esteárico, o que levou a um aumento no total de ácidos graxos saturados e diminuição dos insaturados. Essa baixa influência da irradiação gama em nozes em geral pode estar relacionada a baixa quantidade de água desses alimentos.

A irradiação gama em alimento com alto teor de umidade resulta em radicais livres provenientes da radiólise da água e desencadeiam a oxidação de gorduras, levando a alterações na composição de ácidos graxos em alimentos com grande quantidade de lipídeos. Espera-se que essas reações sejam mais lentas em alimentos secos, como as castanhas-do-Brasil (BRITO, VILLAVICENZIO e MANCINI-FILHO, 2002; MAXIS E KONTAMINAS, 2009).

Ressalta-se que as diferenças encontradas entre os valores da tabela 11 e 12 estão relacionadas a metodologia, uma vez que a análise por cromatografia gasosa passa por uma etapa de derivatização das amostras antes de analisa-las e o RMN analisa o óleo inteiro, sem tratamento prévio. De forma geral pode-se concluir que os tratamentos com radiação gama pouco interferiram na composição do óleo da castanha-do-Brasil, a diferença maior observada neste trabalho foi em relação ao formato das amostras, que foi evidenciado na análise de biblot (gráfico 15). Embora as ANOVAs (anexo 8.11 a 8.14) realizadas para os resultados da CG tenha indicado que existe significância estatística tanto para as formas quanto para as doses testada, nota-se que essas variações não foram tão drásticas a ponto de rancificar os óleos.

As diferenças observadas nas composições dos óleos das amostras não irradiadas granuladas e inteiras observadas nas tabelas 11 e 12 não interferem no resultado, uma vez que as amostras foram pegas de lotes diferentes. E o objetivo do trabalho não era analisar a composição de ácidos graxos da castanha-do-Brasil, mas sim a influência do tratamento com radiação gama nessas amostras. Sendo assim, torna-se interessante estudos que avaliem a ação da radiação gama na composição da castanha-do-Brasil em formatos diferentes, mas provenientes de um mesmo lote, de forma a confirmar as variações observadas neste estudo.

Essas baixas variações visualizadas na composição de ácidos graxos corroboram com os valores de índice de acidez e de peróxidos encontrados nas amostras irradiadas, uma vez que houve pouca variação nesses valores, embora significativos, não ocasionaram aumentos muito elevados que ficassem acima do permitido pela legislação de óleos vegetais.

6. CONCLUSÃO

O tratamento com radiação gama foi eficiente para eliminar completamente *Aspergillus flavus* nas amostras de castanha-do-Brasil inteiras e 90% nas granuladas além de reduzir a quantidade de AFL nessas amostras, sendo as AFB1 e AFG1 as que apresentaram maior susceptibilidade à radiação gama. Além disso, as doses testadas pouco alteraram a composição de ácidos graxos nessas amostras e mantiveram os índices de acidez e peróxidos dentro do permitido para óleos vegetais, garantindo a qualidade do produto. A composição de ácidos graxos variou entre as castanhas granuladas e inteiras não irradiadas e irradiadas, com aumento do ácido esteárico nas castanhas granuladas e do ácido palmítico nas inteiras.

Foi observado que o formato da castanha influenciou bastante nos resultados. De forma geral a castanha granulada apresentou melhores resultados, com redução quase total dos fungos e redução de AFL, com as doses mais baixas testadas. Deve-se levar em conta também o nível de contaminação inicial do produto não podendo abrir mão das boas práticas durante o beneficiamento da castanha, visto que as doses testadas não conseguiram eliminar completamente as AFL.

Sugere-se estudos futuros que analisem a ação da radiação gama em castanhas de vários formatos (granuladas e farinha de castanha, por exemplo) porém provenientes do mesmo lote, de forma a garantir as mesmas características iniciais, para confirmar se o tipo de corte realmente influencia na ação da radiação gama conforme observado neste estudo.

Sendo assim, a irradiação gama é um tratamento promissor para agir na diminuição de AFL e, principalmente, na redução de contaminação fúngica em castanhas-do-Brasil, que se torna importante pois ao diminuir a contaminação por fungos micotoxigênicos, menor a chance de o produto final apresentar AFL.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTAR, S., SHAHZAD, M. A., YOO, S., & ISMAIL, A. Determination of aflatoxi M1 and heavy metals in infant formula milk brands available in Pakistani markets. **Korean Journal of Food Science of Animal Resources**, 37, p. 79– 86, 2017.
- AL-BACHIR, M. 2014. Microbiological, Sensorial and Chemical Quality of Gamma Irradiated Pistachio Nut (*Pistacia vera* L.). **Journal Food Tech.**, 32(2), p. 57-68, 2014
- ALVARES, V. S.; CASTRO, I. M.; COSTA, D. A.; LIMA, A. C.; MADRUGA, A. L. S. **Quality of Brazil nuts marketed in Rio Branco, Acre**. 42(2),269 – 274, 2012.
- ANDRADE, P.D.; HOMEM DE MELLO, M.; FRANÇA,J.A.; CALDAS, E.D.. Aflatoxins in food products consumed in Brazil: a preliminary dietary risk assessment. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 1, p.127-136, jan. 2013.
- AOAC International. Association of Official Analytical Chemists International. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Edited by CUNNIFF. 994.08 – Derivatization of Standards for aflatoxin. Chapter 49, p. 25. 2005.
- AQUINO, S. **Efeitos da radiação gama no crescimento de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxinas e no emprego da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) em amostras de grãos de milho inoculadas artificialmente**. 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- AQUINO, S.; FERREIRA, F.; RIBEIRO, D. H. B.; CORREA, B.; GREINER, R.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Evaluation of viability of *Aspergillus flavus* and aflatoxinas degradation in irradiated samples of maize. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 352-356, 2005.
- ARRUS, K.; BLANK, G.; ABRAMSONB, D.; CLEARC, R.; HOLLEYA, R. A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, v.41, p.513-527, 2005.
- ASSUNÇÃO, E., REIS, T. A., BAQUIÃO, A. C., & CORRÊA, B. Effects of gamma and electron beam radiation on Brazil nuts artificially inoculated with *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Protection**, v. 78, p. 1397–1401. 2015.
- ASTROVIZA, M. B.; SUAREZ, M. S. Micotoxinas y cáncer. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v. 24, n. 1, p. 54-59, 2005.
- BANDO, E.; GONÇALES, L.N.; TAMURA, N.K.; JUNIOR, M.M. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **J Bras Patol Med Lab**, Maringá, v. 43, n. 3, p.175-180, jun. 2007.
- BAQUIÃO, A.C.; ZORZETE, P.; REIS, T.A.; ASSUNÇÃO, E.; VERGUEIRO, S.; CORREA, B. Mycoflora and mycotoxins in field samples of Brazil nuts. **Food Control**, v.28, p.224-229, 2012.
- BARISON, ANDERSSON; SILVA, CAROLINE WERNER PEREIRA DA; CAMPOS, FRANCINETE RAMOS; SIMONELLI, FABIO; LENZ, CESAR ANTONIO; FERREIRA,

ANTONIO GILBERTO. A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ¹H NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance In Chemistry**, [S.L.], p. 642-650, 29 jun. 2010.

BELLAVER, C.; ZANOTTO, D.L. **Parâmetros de qualidade em gorduras e subprodutos protéicos de origem animal**. Conferencia APINCO, Santos, SP, 2004. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/parametros_qualidade_gorduras_e_subprodutos_proteicos_de_origem_animal_000fyrf0t6n02wx5ok0pvo4k33hlhtkv.pdf>. Acesso em: 12 de julho de 2020.

BHATTI, I.A., IQBAL, M., ANWAR, F., SHAHID, S.A., SHAHID, M., Quality characteristics and microbiological safety evaluation of oils extracted from gamma irradiated almond (*Prunus dulcis Mill.*) seeds. **Grasas y Aceites**. V. 64, p. 68-76. 2013.

BLOUNT, W.P. Turkey X disease. **Turkeys**, v.9, n.2, p. 52-67, 1961.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária –ANVISA. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Resolução – RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Disponível em:<<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>>. Acesso em 10 Julho. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 268, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o "regulamento técnico para produtos proteicos de origem vegetal". Diário Oficial de Brasília, de 23 de setembro de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial de Brasília. Seção 1, p. 66-67, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Prevenção de Aflatoxinas em castanha-do-Brasil**: cartilha do produtor. Brasília. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ ACS, 2009. 399p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise_sementes.pdf>. Acesso em: 13 Julho. 2019.

BRITO, M., VILLAVICENCIO, A. L. C. H., & MANCINI-FILHO, J. **Effects of irradiation on trans fatty acids formation in ground beef**. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 63, p. 337–340, 2002.

BYUN, M. W.; KANG, IL-JUN; KNOW, JOONG-HO, HAYASHI, Y.; MORI, T. **Physicochemical properties of soybean oil extracted from γ -irradiated soybeans** **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 301-304, 1996.

CAC - Codex Alimentarius Commission. **Proposed draft maximum level for total aflatoxins in brazil nuts**. ALINORM 10/33/41 Joint FAO/WHO Food Standards Program, FAO, Rome, Appendix V, p.47. 2010.

CALDERARI, T. O. **Biodiversidade de fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas em Castanha-do-brasil**. UNICAMP, 2011. Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos). Campinas, São Paulo, 2011.

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, n. 3, p. 267-272, 2013.

CALVO, W. A.P. **Desenvolvimento do Sistema de irradiação em um irradiador multipropósito de cobalto-60 tipo compacto**. 2005. 119 f. Dissertação (Doutorado em CAN – Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CAMARGO, A.C.; WALDER, J.M.M. **Princípios da Irradiação**. Divulgação da tecnologia de irradiação de alimentos e outros materiais. CENA/PLCQ. Disponível em: <<http://www.cena.usp.br/irradiacao/principior.htm>> Acesso em: 2 de Julho de 2019.

CAMPOS, WILLISON E.O.; ROSAS, LARISSA B.; P. NETO, ANTÔNIO; MELLO, RICARDO A.; VASCONCELOS, ARTHUR A.. Extended validation of a sensitive and robust method for simultaneous quantification of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Brazil nuts by HPLC-FLD. **Journal Of Food Composition And Analysis**, [S.L.], v. 60, p. 90-96, jul. 2017

CARÃO, Á. C. P.. Métodos físicos e químicos de detoxificação de aflatoxinas e redução da contaminação fúngica na cadeia produtiva avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 4, p.699-705, abr. 2013.

CARDOSO, Bárbara R. *et al.* Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. **Food Research International**, [s.l.], v. 100, p.9-18, out. 2017

CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUARINO, C.; MOTTO, M.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R.; LAGANA, A.; BERARDO, N. Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 105, p. 700-710, 2007.

CHUNHIENG, T.; HAFIDI, A.; PIOCH, D.; BROCHIER, J.; DIDIER, M. Detailed study of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil micro-compounds: phospholipids, tocopherols and sterols. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, n.7, p.1374-1380, 2008.

COELHO, Ednei Assunção Antunes. **Efeito da Radiação Gama e Feixe de Elétrons sobre amostras de Castanhas-do-Brasil inoculadas artificialmente com *Aspergillus flavus***. 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

COLPO, E., VILANOVA, C. D. D. A., REETZ, L. G. B., DUARTE, M. M. M. F., FARIAS, I. L. G., MEINERZ, D. F., DA ROCHA, J. B. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**, v. 30(4), p. 459-465, 2014.

COSTA, A. K. F. Fungos associados à castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará)1. **Rev. Ciênc. Agron**, Fortaleza, v. 40, n. 3, p.455-460, set. 2009.

COSTA, D. A., ALVARES, V.S., KUSDRA, J.F., NOGUEIRA, R.M., Maciel, V.T. and MIQUELONI, D.P., 2017. Quality of in-shell Brazil nuts after drying using a pilot natural convection oven in the state of Acre, Brazil. **Braz. J. Food Technology**, 2017.

DE CAMARGO, A. C., CANNIATTI-BRAZACA, S. G., MANSI, D. N., DOMINGUES, M. A. C., & Arthur, V. Gamma radiation effects at color, antioxidant capacity and fatty acid profile in peanut (*Arachis hypogaea* L). **Food Science and Technology**, v. 31, p. 11–15, 2011.

DE FREITAS, R. A. Análise qualitativa do óleo de castanha-do-Brasil. Jornada Científica UNESC, n. 1, 2016. DI GREGORIO, M. C., DE NEEFF, D. V., JAGER, A. V., CORASSIN, C. H., DE CARÃO, Á. C. P., DE ALBUQUERQUE, R., OLIVEIRA, C. A. F. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. **Toxin Reviews**, v. 33, p. 125–135, 2014.

DIAS, P.C.M; ALVES, J.M. Avaliação da estabilidade oxidativa de cápsulas de concentrado de óleo de peixe. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 2(1), 2013. Disponível em: <<http://revistaadmmade.estacio.br/index.php/saudesantacatarina/article/view/502/328>>. Acesso em: 12 de julho de 2020.

EUROPEAN UNION. Commission Regulation (EC) n° 165/10 of 26, February 2010. Amending Regulation (EC) no 1881/06 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. **Official Journal of the European Communities**, United Kingdom, L. 50, p. 8-12, 2010.

FALLAH, H. *et al.*, Impact of Gamma Irradiation on Fatty Acid Profile of Different Types of Pistachios in Kerman Province. **J. Agr. Sci. Tech.**, Kerman, v. 20, n. 7, p. 1407-1416, ago. 2018.

FDA. **FDA Mycotoxin Regulatory Guidance: A Guide for Grain Elevators, Feed Manufacturers, Grain Processors and Exporters**. Aug. 2011. Disponível em: <<https://www.ngfa.org/wp-content/uploads/NGFAComplianceGuide-FDARegulatoryGuidanceforMycotoxins8-2011.pdf>> Acesso em: 20 de Julho de 2019.

FELBERG, I.; ANTONIASSI, R.; DELIZA, R.; FREITAS, S.C., MODESTA, R.C.D. **Soy and Brazil nut beverage, composition, sensory, and calor evaluation**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29: 609 – 617, 2009.

FERREIRA, M.C. *et al.*, Identificação de aflatoxinas em paçocas de amendoim comercializadas na cidade de Lavras-MG. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, v. 4, n. 35, p.717-722, nov. 2014.

FERREIRA-CASTRO, F.L. **Interação entre fungos toxigênicos (*Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*) e carunchos (*Sitophilus zeamais*) em amostras de grãos de milho**. 11f.Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FONSECA, H. **Os fungos e a deterioração de alimentos**. 2009. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>>. Acesso em: 15 Agosto de 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, World Health Organization. **Food Safety Risk Analysis**. An Overview and Framework Manual. PART I. Provisional Edition. Rome: FAO, 2006.

FREIRE, F. C. O; VIEIRA, I.C.P; GUEDES, M.I.F; MENDES, F.N.P. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza. Documentos 110, 1.ed. 2007.

FREITAS-SILVA, O.; VENÂNCIO, A. Brazil nuts: benefits and risks associated with contamination by fungi and mycotoxins. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1434-1440, 2011.

FUNASAKI, M.; MENEZES, I.S.; BARROSO, H.S.; ZANOTTO, S.P.; CARIOCA, C.R.F. Tocopherol profile of Brazil nut oil from different geographic áreas of the Amazon region. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 43, n.4, p. 505-510, 2013.

GECGEL, Umit *et al.* Determination of fatty acid composition of γ -irradiated hazelnuts, walnuts, almonds, and pistachios. **Radiation Physics And Chemistry**, [s.l.], v. 80, n. 4, p.578-581, abr. 2011.

GECGEL, UMIT; GUMUS, TUNCAY; TASAN, MURAT; DAGLIOGLU, ORHAN; ARICI, MUHAMMET. Determination of fatty acid composition of γ -irradiated hazelnuts, walnuts, almonds, and pistachios. **Radiation Physics And Chemistry**, [S.L.], v. 80, n. 4, p. 578-581, abr. 2011.

GHANBARI, F., GHOORCHI, T., SHAWRANG, P., MANSOURI, H., & TORBATI-NEJAD, N. M. Comparison of electron beam and gamma ray irradiations effects on ruminal crude protein and amino acid degradation kinetics, and in vitro digestibility of cottonseed meal. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, p. 672–678, 2012.

GHANEM, I., ORFI, M., & SHAMMA, M. Effect of gamma radiation on the inactivation of aflatoxin B1 in food and feed crops. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 787–791, 2008.

GHANEM, I., ORFI, M., & SHAMMA, M. Effect of gamma radiation on the inactivation of aflatoxin B1 in food and feed crops. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 787–791, 2008.

GOLDBLATT, L.A. Implications of mycotoxins. **Clin. Toxicolo.**, v. 5, p.453-458, 1972.

GOWDA N.K.S. *et al.* Efficacy of heat treatment and sun drying of aflatoxin-contaminated feed for reducing the harmful biological effects in sheep. **Anim. Feed Sci. and Technology**, v.133, p. 167-175, 2007.

HARRELL, C. Randall *et al.* Risks of Using Sterilization by Gamma Radiation: The Other Side of the Coin. **International Journal Of Medical Sciences**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.274-279, 2018.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, Londres, v. 22, p. 475-477, 1973.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em Alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 138-161, 2010.

IAMANAKA, Beatriz Thie *et al.* Aflatoxin evaluation in ready-to-eat brazil nuts using reversed-phase liquid chromatography and post-column derivatisation. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [s.l.], v. 31, n. 5, p. 917-923, 2013.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. **Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene**. v. 82, p.169–345. 2002.

ZENEBON O.; PASCUET N.S.; TIGLEA P.; **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). **Facts about food irradiation**, 1999. Disponível em: <http://www.iaea.org/Publications/Booklets/foodirradiation.pdf> Acesso em: 12 de julho de 2019.

ISMAIL, AMIR *et al.* Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. **Food Research International**, [s.l.], v. 113, p.74-85, nov. 2018.

ISMAIL, AMIR *et al.* Aflatoxins in Plant-Based Foods. **Plant And Human Health, Volume 2**, [s.l.], p.313-325, 2019.

ISMAIL, AMIR *et al.*, Aflatoxin M1: prevalence and decontamination strategies in milk and milk products. **Crit Rev Microbiol**, v. 42(3), p. 418–427, 2016.

JABŁOŃSKA, J., & MAŃKOWSKA, D. The influence of UV, X and microwave radiation on the aflatoxin B1 concentration in nuts. **Biotechnology and Food Science**, p.78, 2014.

JAIMEZ, J.*et al.* Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p.1-10, 2000.

JALILI, M. A review on aflatoxins reduction in food. **Iranian Journal of Health, Safety and Environment**, v. 3, p. 445–459, 2016.

JALILI, M., JINAP, S., & NORANIZAN, A. Effect of gamma radiation on reduction of mycotoxins in black pepper. **Food Control**, v. 21, p. 1388–1393, 2010.

JALILI, M., JINAP, S., & NORANIZAN, M. A. Aflatoxins and ochratoxin a reduction in black and white pepper by gamma radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, p. 1786–1788.

JALILI, M., JINAP, S., NORANIZAN, M.A., Aflatoxins and ochratoxin a reduction in black and white pepper by gamma radiation. **Radiat. Phys. Chem.** 81, 1786-1788. 2012.

JARDA, G., LIBOZ, T., MATHIEUA, F., GUYONVARC'H, A., & LEBRIHI, A. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, p. 1590-1009, 2011.

JOHNSSON, P.; LINDBLAD, M.; THIM, A.M.; JONSSON, N.; VARGAS, E.A.; MEDEIROS, N.L.; BRABET, C.; QUARESMA DEARAÚJO, M.; OLSEN, M., Growth of aflatoxigenic moulds and aflatoxin formation in Brazil nuts. **World Mycotoxin Journal**. 1, p. 127-137, 2008.

KATO, C.B. *et al.* Caracterização físico-química da torta de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) obtido pelo método de prensagem para o aproveitamento tecnológico. **Revista uningá review**, [S.l.], v. 25, n. 2, jan. 2018.

KLISCH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycoscience**, v. 48, p.71-80, 2007.

KLUCZKOVSKI A.M.; MARTINS M.; MUNDIM, S.M.; SIMÕES, R.H.; NASCIMENTO K.S.; MARINHO H.A.; KLUCZKOVSKI-JUNIOR A. (2015) Properties of Brazil nuts: A review. **African Journal of Biotechnology**. v.14, p. 642-648, 2015.

KLUCZKOVSKI, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Gerenciamento de Risco da Castanha-do-Brasil**. Manaus: Nova Letra, p. 238, 2015.

LEONARDI, J. G.; AZEVEDO, B. M. Métodos de conservação de alimentos. **Revista Saúde em Foco**, Amparo-SP, v. 10, n. 1, 2018.

LEWIS, R. J. S. **Sax's dangerous properties of industrial materials**. Hoboken, NJ: Wiley & Sons Inc. v. 11, 2004.

LIU, RUIJIE; WANG, RUIQI; LU, JIAN; CHANG, MING; JIN, QINGZHE; DU, ZUBO; WANG, SHANSHAN; LI, QIU; WANG, Xingguo. Degradation of AFB1 in aqueous medium by electron beam irradiation: kinetics, pathway and toxicology. **Food Control**, [S.L.], v. 66, p. 151-157, ago. 2016.

LOPES, P. R. S.; NETO, J. R.; MALLMANN, C. A.; LAZZARI, R.; PEDRON, F. A.; VEIVERBERG, C. A. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.10, out. 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Instituto Plantarium Ltda, p. 384, 2010.

LUO, YING; LIU, XIAOJIAO; LI, JIANKE. Updating techniques on controlling mycotoxins - A review. **Food Control**, [s.l.], v. 89, p.123-132, jul. 2018.

MARIN, S.; RAMOS, A.J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food Chem. Toxicol.** v. 60, p. 218–23, 2013.

MARTINS, L.; SILVA, Z.P.G.; SILVEIRA, B.C. Produção e comercialização da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) no Estado do Acre – Brasil, 1998-2006. In: **Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**, n. 45, 2008, Rio Branco. **Anais...** Rio Branco: UFAC, p.14, 2008.

MASSI, F.P.; VIEIRA, M.L.C.; SARTORI, D.; PENHA, R.E.S., FREITAS MUNHOZ, C.; FERREIRA, J.M.; FUNGARO, M.H. P. Brazil nuts are subject to infection with B and G

aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. **International journal of food microbiology**, v.186, p.14-21, 2014.

MASSI, F.P; VIEIRA, M. L. C; SARTORI, D; PENHA, R.E.S; MUNHOZ, C.F; FERREIRA,J.M; IAMANAKA, B,T; TANIWAKI,M.H; FRISVAD, J.C; FUNGARO, M.L.P Brazil nuts are subject to infection with B and G aflotoxin producing fungus *Aspergillus*. **International Journal of Food Microbiology**. v 186, p. 14-21, 2014.

MASTRO, N. L. A radiação ionizante na promoção da alimentação adequada e saudável. **Vigil. sanit. Debate**, v. 3, n. 2, p. 114-121, 2015.

MATSUDA, A. H. **Aplicação da técnica de irradiação gama para preservação de própolis**. 2002. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MAZOKOPAKIS, Elias E.; LIONTIRIS, Michael I.. Commentary: Health Concerns of Brazil Nut Consumption. **The Journal Of Alternative And Complementary Medicine**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.3-6, jan. 2018.

MEXIS,S.F.,KONTOMINAS,M.G. Effect of gamma irradiation on the physico- chemical and sensory properties of raw shelled peanuts(*Arachis hypogaea* L.) and pistachio nuts (*Pistacia vera* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 89, p. 867–875, 2009.

MEXIS,S.F.,KONTOMINAS,M.G. Effect of g-irradiation on the physicochemical and sensory properties of cashew nuts (*Anacardium occidentale* L.). **LWT-Food Science and Technology**. v. 42, p. 1501–1507, 2009.

MOHAMED, N. F., EL-DINE, R. S. S., KOTB, M. A. M., & SABER, A. Assessing the possible effect of gamma irradiation on the reduction of aflatoxin B1, and on the moisture content in some cereal grains. **American Journal of Biomedical and Life Sciences**, v. 7, p. 33–39, 2015.

MOREDA-PIÑEIRO J., SÁNCHEZ-PIÑERO J., MAÑANA-LÓPEZ A., TURNES-CAROU I., ALONSO-RODRÍGUEZ E., LÓPEZ-MAHÍA P., MUNIATEGUI-LORENZO S., 2018, Selenium species determination in foods harvested in Seleniferous soils by HPLC-ICP-MS after enzymatic hydrolysis assisted by pressurization and microwave energy. **Food Research International**, v. 111, p. 621-630, 2018.

MOREDA-PIÑEIRO J., SÁNCHEZ-PIÑERO J., MAÑANA-LÓPEZ A., TURNES-CAROU I., ALONSO-RODRÍGUEZ E., LÓPEZ-MAHÍA P., MUNIATEGUI-LORENZO S. Selenium species determination in foods harvested in Seleniferous soils by HPLC-ICP-MS after enzymatic hydrolysis assisted by pressurization and microwave energy, **Food Research International**, v. 111, p. 621-630, 2018.

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **J.Appl.Microbiol.**, v. 84, n.27, p.62S-76S, 1998.

MOURA, N. C.; SOUZA, I. S.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; ARTHUR, V.; DIAS, C. T. S. Fatty acid profile in bread with flaxseed and exposed ionizing radiation with 60CO. **Bioenergia em revista: diálogos**, ano 4, n. 2, p. 9-19, jul./dez. 2014.

MÜLLER, C. H.; FIGUEIREDO, F. J. C.; KATO, A. K.; CARVALHO, J. E. U. de. **A cultura da castanha-do-Brasil**. Brasília: **EMBRAPA**. Coleção Plantar, v. 23, 65 p. 1995.

MUSTAPHA, M., BOUSSELMI, M., JERBI, T., BETTAÏEB, N., & FATTOUCH, S. Gamma radiation effects on microbiological, physico-chemical and antioxidant properties of Tunisian millet (*Pennisetum Glaucum* L.R.Br.). **Food Chemistry**, v. 154, p. 230–237, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2015.

NOGUEIRA, R. M.; RUFFATO, S.; SILVA, J. de S. E.; ALVARES, V. de S.; RAMIREZ, K. de L. A. S. **Pós-colheita da Castanha do Brasil**, 2010. UFMT, UFV; EMBRAPA Acre, SEBRAE; Pós-colheita.com.br. Disponível em: <<http://www.norteempreendedor.com.br/download2.php?cod=8>>. Acesso em 22 de julho de 2019.

OGA, SEIZI. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu; 2008. 474 p.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P.M.L. Aflatoxinas: Conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p.417-424, 1997.

ÖZCAN, Mehmet Musa *et al.* The effect of heat treatment on phenolic compounds and fatty acid composition of Brazilian nut and hazelnut. **Journal Of Food Science And Technology**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.376-380, 8 nov. 2017.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Castanha-do-brasil: da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis: Ediograf, 2006.

PACHECO, A.M.; LUCAS,A.; PARENTE, R.; PACHECO, N. Association between aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciência Tecnol. Alimentos**, v. 30, p.330-334, 2010.

PACHECO, A.M; MARTINS,M. Brazil nut sorting for aflatoxin prevention: a comparison between automatic and manual shelling methods. **Food Sci. Technol.** v. 33, p. 369-375, 2013.

PANKAJ, S.k.; SHI, Hu; KEENER, Kevin M.. A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 71, p.73-83, jan. 2018.

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

PINHEIRO, M. Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* como base para o desenvolvimento de PCR multiplex para a detecção de fungos produtores de aflotoxinas em castanha-do-brasil e castanha-de-caju. **Brasília, Brasil: Universidade Católica de Brasília**, 2004.

PINTO, S.M.; MOREIRA, I. S. Formas de uso da radiação para conservação dos alimentos: uma abordagem bibliográfica. **Journal Of Biology & Pharmacy And Agricultural Management**, v. 14, n. 2, p.131-137, jun. 2018.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. *Aspergillus* and related teleomorphs. **Fungi and food spoilage**. New York: Springer.p. 275-337, 2009.

POLIZEL, G.G., **O uso da radiação ionizante 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. Universidade Castelo Branco, São Paulo, nov. 2006.

PRADO, G., CARVALHO, E., OLIVEIRA, P. D., MADEIRA, M. S., MORAIS, J. G. C., CORREA, V. D., *ET AL*. Effect of gamma irradiation on the inactivation of aflatoxin B1 and fungal flora in peanut. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 138–140, 2003.

QUEIROGA, V. *et al*. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K) seed kernel oil: characterization and thermal stability. **Revista de biologia e farmácia**, v. 3, n. 1, p. 33-42, 2009.

RODRIGUES, K. S. **Ocorrência de fungos com potencial toxígeno em castanha-do-brasil no estado de Roraima**. 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agroecologia, Universidade Estadual de Roraima, Boa Vista, 2016.

RODRIGUES, P.; VENÂNCIO, A.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section Flavi isolated from Portuguese almonds.**Int. J. Food Microbiol.** 129, 187-193,2009.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, p. 57–67, 1997.

SALOMÃO, R.P. Densidade, estrutura e distribuição espacial da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. & B.) em dois platôs de floresta ombrófila densa na Amazônia setentrional. **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi Ciências Naturais**, v.4, n.1, p.11-25, 2009.

SANTOS, A. L. *et al*. Avaliação físico-química do óleo residual da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* HBK) e sua conversão em biodiesel. **Rev. Enciclopédia Brasil**, v. 11, n. 22, p. 3550-3561, 2015.

SANTOS, O.V. dos. **Estudos das potencialidades da castanha-do-brasil: produtos e subprodutos**. 2011. 2014 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SARTORI, A.G.O., SAMPAIO, G.R., BASTOS, D.H.M., SPOTO, M.H.F., SKIBSTED LH, REGITANO-D'ARCE MAB. Tendency of lipid radical formation and volatiles in lose or vacuum-packed Brazil nuts stored at room temperature or under refrigeration. **Grasas Aceites** v. 69, 2018.

SAVI,G.D.; PIACENTINI, K.C.; TIBOLA, C.S.; SCUSSEL, V.M. Mycoflora and deoxynivalenolin whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from Southern Brazil. **Food Add. Contam. Part B**. v. 7, p. 232-237, 2014.

SCHNEIDER, E. M. AFLATOXINAS EM AMENDOIM E TOXICIDADE NO ORGANISMO HUMANO. **Revista Contexto e Saúde**, v. 7, n. 13, p.45-52, dez. 2007.

SCUSSEL, V.M.; GIORDANO, B.N.E.; SIMÃO, V.; MANFIO, D.; GALVÃO, S.; RODRIGUES, M. de N.F. Effect of oxygen-reducing Atmospheres on the safety of Packaged Shelled Brazil Nuts during Storage. **International Journal of Analytical Chemistr.** p. 1-9, 2011.

SCUSSEL, V.M.; MANFIO, D.; SAVI, G.D.; MOECKE, E.H.S. Stereoscopy and scanning eléctron microscopy of Brazil nut (*Bertholletia excels* H.B.K.) shell, brown skin, and edible part: part one- Healthy Nut. **Journal of Food Science.** v. 79, 2014.

SHAHBAZI, H., SHAWRANG, P., & SADEGHI, A. Effects of gamma and electron-beam irradiation on aflatoxin B1 content of corn grain. **Pajouhesh And Sazandegi**, v. 3, p. 56–61, 2010.

SILVA, A. L. S.; ROSA, C. R. Uso da Irradiação em alimentos. **Boletim Ceppa**, Curitiba, v. 28, n. 8, p.49-56, jun. 2010.

SILVA, Adriana Figueiredo da. **Efeitos das etapas de processamento sobre a qualidade de castanhas-do-Brasil(*Bertholletia excelsa*, H.B.K.): avaliação da fração lipídica e contaminação por aflatoxinas.** 2014. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Ciência de Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

SILVA, M. V., JANEIRO, V., BANDO, E., & MACHINSKI, M. Occurrence and estimative of aflatoxin M1 intake in UHT cow milk in Parana state, **Brazil. Food Control**, v. 53, p. 222–225, 2015.

SILVA, R.F.; ASCHERI, J.L.R.; SOUZA, J.M.L. Influence of Brazil nut processing on the quality of nuts. **Science and agro-technology**, v. 34, n.2, p. 445-450, 2010.

SOUZA, M.L.; & MENEZES, H.C. Processing of Brazil nut and meal and cassava flour: quality parameters. **Brazilian Journal of Science and Food Technology**, v. 24, n. 1, p. 120-128, 2004.

TANIWAKI, M.H; FRISVAD,J.C; FERRANTI,L.S; FERRANTI,L.S; LOPES,A.S; LARSEN,T.O; FUNGARO, M.H.F; IAMANKA,B.T., Biodiversity of mycobiota throughout the Brazil nut supply chain: From rainforest to consumer. **Food Microbiology.** v. 61, p. 14-22, 2016.

TEIXEIRA, A.S. **Adequação e apresentação de parâmetros de validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de aflatoxinas em Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsea* H.B.K) através de cromatografia líquida de alta eficiência.** Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, p.57,2008.

TEMCHAROEN, P., THILLY, W.G., 1982.Removal of aflatoxin B1 toxicity but not mutagenicity by 1mrad gamma radiation of peanut meal. **Journal of Food Safety.** v. 4, p. 199–205, 1982.

TONINI, H.; LOPES, C. E. V.; BORGES, R. A.; KAMINSKI, P. E.; ALVES, M. S.; FAGUNDES, P. R. O. Fenologia, estrutura e produção de sementes em castanhais nativos de Roraima e características socioeconômicas dos extrativistas. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais.** v. 9, p. 399-414, 2014.

TSAI, D. **Aplicação da radiação por feixe de elétrons como agente esterilizante de microrganismos em substrato turfoso**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

UDOMKUN P, WIREDU AN, NAGLE M, MÜLLER J, VANLAUWE B, BANDYOPADHYAY R. Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application – a review. **Food Control**. v.76, p.127–138, 2017.

USDA (2008). **USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Food Group:12 Nut and Seed Products** (Publication. Retrieved 15th November, 2010, from USDA.

VALOIS, A. C. C. **Benefícios e estratégias de utilização sustentável da Amazônia**. Brasília, Distrito Federal, Embrapa Informação Tecnológica, 2003. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/92421/1/sea-texto-18.pdf>>. Acesso em: 13 agosto de 2019.

VARGAS, E.A.; SANTOS, E.A.; WHITAKER, T.B.; SLATE, A.B. Determination of aflatoxin risk components for in-shell Brazil nuts. **Food Additives Contaminants Part A**. v. 28, p. 1242-1260, 2011.

VASCONCELOS, M. A. S.; MELO FILHO, A. B. **Conservação de alimentos**. Recife: EDUFRRPE, 2010.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S.K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 4705-4714, 2006.

VERHEECKE C, LIBOZ T, MATHIEU F. Microbial degradation of aflatoxin B1: current status and future advances. **International Journal of Food Microbiology**. v. 237, p. 1–9, 2016.

VIEIRA, J.L.F.; TEIXEIRA, F.M. Critical points of Brazil nuts: a beginning for food safety, quality control and Amazon sustainability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 93, p. 735-740, 2012.

VILHENA, ADRIA EVELLIN GODINHO; SEHWARTZ, RODRIGO LUIZ DA CRUZ; BEZERRA, PAMELA TAIS DA SILVA; BRASIL, DAVI DO SOCORRO BARROS. Caracterização físico-química do óleo de castanha do Pará extraído por prensagem hidráulica. **Brazilian Applied Science Review**, [s.l.], v. 4, n. 3, p. 859-865, 2020.

World Health Organization (WHO). WHO Technical Report Series. Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-ninth report of the joint FAO/WHO **Expert Committee on Food Additives** (JECFA). Geneva (Switzerland): WHO, 1999.

XAVIER, J. J. M. **Desenvolvimento de métodos para multi-toxinas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrômetro de massa/massa**. Santa Catarina. UFSC. 2007. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos.

XAVIER, J. J. M.; SCUSSEL, V. M. Development of an LC-MS/MS method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in Brazil nut. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.88, n.6, p. 425-433, 2008.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: a review. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 10, p. 1573—1580, 2009.

YUN, J., LI, X., FAN, X., TANG, Y., XIAO, Y., WAN, S., Effect of gamma irradiation on microbial load, physicochemical and sensory characteristics of soybeans (*Glycine max L. Merrill*). **Radiation Physics and Chemistry**.v. 81, p. 1198-1202, 2012.

ZEB, A.; TAUFIQ, A. The high dose irradiation affect the quality parameters of edible oils. Pakistan. **Journal of Biological Sciences**, v.7, n.6, p. 943-946, 2004.

ZHANG, Z.S.; XIE,Q.F.; CHE, L.M.. Effects of gamma irradiation on aflatoxin B 1 levels in soybean and on the properties of soybean and soybean oil. **Applied Radiation And Isotopes**, v. 139, p.224-230, set. 2018.

ZOLLNER, P.; MAYER-HELM B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography.atmospheric pressure ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p. 123-169, 2006

8. ANEXOS

8.1 Análise de variância para o crescimento de *Aspergillus flavus* em castanha-do-Brasil.

ANOVA Crescimento Fúngico					
Efeito	SS	GL	MS	F	Valor- p
Intercepto	177,4528	1	177,4528	5295,123	0,000000
Forma	6,2628	1	6,2628	186,880	0,000000
Dose_Radiação	497,1665	3	165,7222	4945,085	0,000000
Forma * Dose_radiação	12,9231	3	4,3077	128,540	0,000000
Erro	0,5362	16	0,0335		

8.2 Análise de Variância para AFB1

ANOVA AFB1					
Efeito	SS	GL	MS	F	Valor- p
Intercepto	113,1438	1	113,1438	6185540	0,0000
Forma	5,0637	1	5,0637	276830	0,0000
Dose_Radiação	2,2498	3	0,7499	40998	0,0000
Forma * Dose_radiação	0,6208	3	0,2069	11313	0,0000
Erro	0,0003	16	0,0000		

8.3 Análise de Variância para AFG1

ANOVA AFG1					
Efeito	SS	GL	MS	F	Valor- p
Intercepto	109,9703	1	109,9703	47130141	0,00000
Forma	3,3540	1	3,3540	1437443	0,00000
Dose_Radiação	1,9352	3	0,6451	276454	0,00000
Forma * Dose_radiação	0,7329	3	0,2443	104703	0,00000
Erro	0,0000	16	0,0000		

8.4 Análise de Variância para AFB2

ANOVA AFB2					
Efeito	SS	GL	MS	F	Valor- p
Intercepto	57,20211	1	57,20211	11733767	0,000000
Forma	0,27435	1	0,27435	56277	0,00000
Dose_Radiação	0,42348	3	0,14116	28956	0,000000
Forma * Dose_radiação	0,10229	3	0,03410	6994	0,000000
Erro	0,00008	16	0,00000		

8.5 Análise de Variância para AFG2

AFG2					
Efeito	SS	GL	MS	F	Valor- p
Intercepto	92,47693	1	92,47693	5125742	0,000000
Forma	0,02313	1	0,02313	1282	0,000000
Dose_Radiação	0,07442	3	0,02481	1375	0,000000
Forma * Dose_radiação	0,00771	3	0,00257	142	0,000000
Erro	0,00029	16	0,00002		

8.6 Análise de Variância para AFLtotal

AFL total					
Efeito	SS	GL	MS	F	Valor- p
Intercepto	1467,142	1	1467,142	25664283	0,000000
Forma	11,600	1	11,600	202908	0,000000
Dose_Radiação	14,236	3	4,745	83007	0,000000
Forma * Dose_radiação	3,786	3	1,262	22075	0,000000
Erro	0,001	16	0,000		

8.7 Análise de Variância para índice de acidez

ANOVA Índice de Acidez					
Efeito	SS	GL	MS	F	Valor- p
Intercepto	30,04515	1	30,0452	10129,286	0,00000
Forma	0,01175	1	0,0117	3,961	0,06394
Dose_Radiação	0,09788	3	0,0326	10,999	0,00000
Forma * Dose_radiação	0,41793	3	0,1393	46,967	0,00000
Erro	0,04746	16	0,0030		

8.8 Análise de Variância para índice de peróxido

ANOVA Índice de Peróxido					
Efeito	SS	GL	MS	F	Valor- p
Intercepto	466,8426	1	466,8426	6981,068	0,000000
Forma	1,4123	1	1,4123	21,120	0,000298
Dose_Radiação	39,4196	3	13,1399	196,491	0,000000
Forma * Dose_radiação	3,7187	3	1,2396	18,536	0,000019
Erro	1,0700	16	0,0669		

8.9 Análise de Variância para Ácidos Graxos Saturados

ANOVA Ácidos Graxos Saturados					
Efeito	SS	GL	MS	F	Valor- p
Intercepto	11281,10	1	11281,10	359485,2	0,000000
Forma	2,54	1	2,54	80,8	0,000019
Dose_Radiação	75,60	3	25,20	803,0	0,000000
Forma * Dose_radiação	58,98	3	19,66	626,5	0,000000
Erro	0,25	8	0,0,		

8.10 Análise de Variância para Ácidos Graxos Insaturados

ANOVA Ácidos Graxos Insaturados					
Efeito	SS	GL	MS	F	Valor- p
Intercepto	86400,72	1	86400,72	992826,5	0,000000
Forma	1,19	1	1,19	13,7	0,006087
Dose_Radiação	72,39	3	24,13	277,3	0,000000
Forma * Dose_radiação	53,14	3	17,71	203,5	0,000000
Erro	0,70	8	0,09		

8.11 Análise de Variância para Ácido Linoleico

ANOVA Ácido Linoleico					
Efeito	SS	GL	MS	F	Valor- p
Intercepto	6953,892	1	6953,892	770514,4	0,000000
Forma	177,956	1	177,956	19718,1	0,000000
Dose_Radiação	35,655	3	11,885	1316,9	0,000000
Forma * Dose_radiação	41,420	3	13,807	1529,8	0,000000
Erro	0,072	8	0,009		

8.12 Análise de Variância para Ácido Palmítico

ANOVA Ácido Palmítico					
Efeito	SS	GL	MS	F	Valor- p
Intercepto	5394,903	1	5394,903	13487256	0,000000
Forma	1,513	1	1,513	3782	0,000000
Dose_Radiação	64,769	3	21,590	53974	0,000000
Forma * Dose_radiação	41,733	3	13,911	34778	0,000000
Erro	0,003	8	0,000		

8.13 Análise de Variância para Ácido Oleico

ANOVA Ácido Oleico					
Efeito	SS	GL	MS	F	Valor- p
Intercepto	44331,30	1	44331,30	1108283	0,0000
Forma	208,22	1	208,22	5206	0,0000
Dose_Radiação	169,23	3	56,41	1410	0,0000
Forma * Dose_radiação	97,11	3	32,37	809	0,0000
Erro	0,32	8	0,04		

8.14 Análise de Variância para Ácido Esteárico

Ácido Esteárico					
Efeito	SS	GL	MS	F	Valor- p
Intercepto	1073,381	1	1073,381	32644,18	0,000000
Forma	7,967	1	7,967	242,28	0,000000
Dose_Radiação	8,089	3	2,696	82,00	0,000002
Forma * Dose_radiação	20,102	3	6,701	203,79	0,000000
Erro	0,263	8	0,033		