

TERESA CRISTINA CASTILHO GORAYEB

**“AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CRÍTICAS PARA
O SURGIMENTO DE AFLATOXINA NA CADEIA DE
PROCESSAMENTO DE AMENDOIM
(*Arachis hypogaea L.*)”.**

São José do Rio Preto – SP

2007

TERESA CRISTINA CASTILHO GORAYEB

**“AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CRÍTICAS PARA O
SURGIMENTO DE AFLATOXINA NA CADEIA DE
PROCESSAMENTO DE AMENDOIM
(*Arachis hypogaea L.*)”.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de concentração: Engenharia de Alimentos)**.

Orientador: Profº Dr João Cláudio Thoméo

**Co-orientador: Profº Dr Vanildo Luiz Del
Bianchi**

São José do Rio Preto – SP

2007

Ficha catalográfica

Gorayeb, Teresa Cristina Castilho.

Avaliação das condições críticas para o surgimento de Aflatoxina na cadeia de processamento de amendoim (*Arachis Hypogaea* L.) / Teresa Cristina Castilho Gorayeb. - São José do Rio Preto : [s.n], 2007.

133 f. : il ; 30 cm.

Orientador: João Cláudio Thoméo
Co-orientador : Vanildo Luiz Del Bianchi
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Amendoim - Indústria. 2. Aflatoxina (Amendoim) 3. APPCC na industrialização do amendoim. 4. Isotermas de amendoim. I. Thoméo, João Cláudio. II. Del Bianchi, Vanildo Luiz. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 634.58

TERESA CRISTINA CASTILHO GORAYEB

**“AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CRÍTICAS PARA O SURGIMENTO DE
AFLATOXINA NA CADEIA DE PROCESSAMENTO DE AMENDOIM**

(*Arachis hypogaea L.*)”.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de São
José do Rio Preto, para a obtenção do título de
Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos,
área de Engenharia de Alimentos.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profº Dr. João Cláudio Thoméo
(Presidente/ Orientador – DETA/UNESP)

Profª Drª. Myrna Sabino
(2ª Examinadora - Instituto Adolfo Lutz - SP.)

Profº Dr. José Antônio Gomes Vieira
(3ª Examinadora – DETA/UNESP)

Profª Drª. Cecilia Cristina Marques dos Santos.
(4ª Examinadora – Instituto Adolfo Lutz/IAL).

Profª Drª. Eleni Gomes
(5ª Examinadora – Dep. de Biologia/UNESP).

São José do Rio Preto, 03 de dezembro de 2007.

DADOS CURRICULARES

TERESA CRISTINA CASTILHO GORAYEB

NASCIMENTO	23/03/1963 – PENÁPOLIS – SP.
FILIAÇÃO	João Castilho Simon Lúcia Passafaro Castilho
1982 a 1986	Curso de graduação em Engenharia de Alimentos – Faculdade de Ciências de Barretos – Barretos – SP.
1995 a 1997	Programa de Aperfeiçoamento para Profissionais de Nível Superior na área de Laboratório de Saúde Pública – Instituto Adolfo Lutz – São José do Rio Preto - SP

DEDICATÓRIA

A Deus que me proporcionou saúde e sabedoria para desenvolver este projeto.

Ao meu esposo Miguel, meus filhos Maurício e João Miguel pelo total amor, apoio e compreensão em cada instante de minha vida, e, especialmente durante a elaboração deste projeto.

Aos meus pais João e Lúcia, por toda a força, amor e carinho que me transmitiram em todos os momentos.

À minha irmã Luciana, pelo modelo de perseverança, em busca de conhecimentos científicos, incentivando-me a cada instante das conquistas de nossas vidas.

À minha prima Catarina pela força, carinho e atenção que sempre me proporcionou e em especial durante este projeto.

E a todos familiares e amigos, pelo estímulo em continuar, acreditando que com paciência e carinho tudo é possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr. João Cláudio Thoméo, grandioso mestre, pela acolhida, credibilidade, amizade, dedicação na orientação desse trabalho, e por tudo que me ensinou nesse período, principalmente a difícil arte de fazer ciência.

Ao Prof^o Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi pela atenção, orientação, compreensão, apoio e incentivo em meu trabalho.

À Prof^a Dr^a. Myrna Sabino, pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, pela acolhida, orientação, incentivo e a gentileza de aceitar fazer parte da comissão examinadora deste trabalho.

Ao Prof^o Dr. José Antônio Gomes Vieira, pela atenção e a gentileza de aceitar fazer parte da comissão examinadora deste trabalho.

À Prof^a Dr^a. Cecília Cristina Marques dos Santos, pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz - São José do Rio Preto, pelo apoio e incentivo.

À Prof^a Dr^a. Eleni Gomes pela atenção, apoio, ensinamentos e sugestões apresentadas durante a qualificação deste trabalho e por aceitar fazer parte da banca examinadora.

À Prof^a Dr^a. Maria Aparecida Mauro pelas sugestões apresentadas durante a qualificação e fazer parte da banca examinadora deste trabalho.

Aos professores, técnicos e funcionários do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos – DETA, da UNESP de São José do Rio Preto – SP, pela atenção e carinho que me receberam e apoiaram na parte experimental e principalmente pela amizade.

Aos alunos Fernanda Perpétua Casciatori, Sofia Martello Steck, Augusto Tsukuda Ichisato, e Carolina Rafaela C. Santos, pela amizade, dedicação e carinho em todos os momentos da elaboração dos trabalhos realizados.

Aos amigos de pós-graduação Ellen, César, Taís, Gisele, Crislaine, Fernanda, Raquel, Catarina e Carmem, pelo apoio, incentivo e especialmente pela amizade em todos os momentos deste trabalho.

Ao Sr. Antonio Fernandes Campos, Sr. Silvio de Aquino e Micheli, da Amenco Agroindústria Ltda. – Tupã, e pela oportunidade de acompanhar o processo de beneficiamento do amendoim de sua empresa.

Ao Sr. Arlindo Valêncio pelo apoio a esta pesquisa e por dar a oportunidade de acompanhar o processo de fabricação dos doces de amendoim na sua fábrica, Doces Valêncio – Rio Preto.

Ao Sr. Marcos José Furlaneto Garcia, proprietário da Cerealista Garcia Ltda., pelas amostras fornecidas para a parte experimental e pela oportunidade de acompanhar o processo de beneficiamento do amendoim.

À empresa Companhia Brasileira de Esterilização, de Jarinu – SP, pela irradiação das amostras.

Ao Departamento de Análises Clínicas, Micologia Clínica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP – Araraquara – SP, pela identificação da cepa.

À Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI, pela manutenção em depósito da cepa de *Aspergillus flavus*.

À Casa da Agricultura da cidade de Tupã pelo apoio nas informações do índice pluviométrico e temperatura.

Ao Laboratório Bio Net S/A, pelo apoio a esta pesquisa, com as orientações das análises do fluorímetro.

À CNPq pelo apoio financeiro de bolsa.

A TODOS, A MINHA ETERNA GRATIDÃO!

“Todos nós somos especiais, porque somos filhos de Deus e Dele recebemos os dons e talentos. E nós não podemos enterrá-los. Temos por obrigação multiplicá-los. É trabalhar, é lutar, é ter força de vontade para que esses talentos cresçam cada vez mais.”

(Drª Maria Helena – médica formada aos 65 anos).

RESUMO

Este trabalho visa fornecer às autoridades sanitárias e ao setor industrial elementos que possam contribuir para a prevenção do perigo químico aflatoxina em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e seus derivados. O estudo foi realizado em três partes:

A Parte A, compreendeu a elaboração dos planos APPCC (*Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle*) no processamento das indústrias de beneficiamento de grãos de amendoim (Empresa A) e de fabricação de doces de amendoim (Empresa B), identificando as etapas do processo que apresentam pontos críticos de controle (PCC) para o perigo químico aflatoxina. Observou-se que nos dois processos não há nenhum método que consiga destruir, ou mesmo reduzir os teores, da micotoxina. Assim, restam manter rigorosos controles e monitoramentos em cada PCC quanto aos índices de aflatoxina e de umidade dos grãos como medidas preventivas para prevenir e reduzir a possibilidade de infestação dos grãos por fungos e conseqüente produção de aflatoxina. As etapas de recepção dos grãos, secagem, armazenamento e transporte são as que requerem maior atenção na cadeia de beneficiamento. Para a indústria de doces, as etapas mais críticas são as de recepção e armazenamento de grãos e de doces e o transporte.

Na Parte B, foram obtidas as isotermas de sorção até o equilíbrio higroscópico de três variedades de amendoim (Runner IAC 886, Caiapó e Tatu Vermelho), para uma ampla faixa de umidade relativa e temperaturas controladas. Verificou-se que o equilíbrio higroscópico dos três amendoins é diretamente proporcional à umidade relativa do ar e decrescente com o aumento de temperatura, para uma mesma umidade relativa. A variedade Caiapó apresentou uma umidade de equilíbrio menor que as outras variedades, podendo-se dizer que a quantidade de lipídeos e carboidratos interfere na adsorção do grão. O modelo Halsey Modificado apresentou melhores indicadores estatísticos de ajuste aos dados experimentais.

Na Parte C, foram feitos ensaios microbiológicos de crescimento fúngico e de produção de aflatoxina amendoim Runner IAC 886, em grãos e vagens. Foram aplicadas suspensões de esporos de *Aspergillus flavus* em concentrações

10^4 e 10^6 esporos/mL, o crescimento foi avaliado em dois períodos de armazenamento 15 e 30 dias, as umidades relativas dos ensaios foram de cerca de 75 %, 84 % e 90 % e a temperatura foi controlada em 25, 30 e 35° C. As análises do crescimento foram realizadas pela contagem de esporos em câmara de Neubauer e por unidades formadoras de colônias. As análises de aflatoxina foram realizadas pelo método de Cromatografia de imunoafinidade monoclonal (Afla-Test – VICAM), sendo alguns resultados aferidos em Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Verificou-se, na terceira etapa, que as condições de umidade relativa de cerca de 90 % e de temperatura 25° C são as mais favoráveis à proliferação do fungo *Aspergillus flavus* e a produção de aflatoxina foram muito superiores ao limite previsto pela legislação brasileira (20 ppb) nos dois períodos adotados.

Palavras Chave: Amendoim (*Arachis hypogaea* L.); Aflatoxina; Crescimento fúngico; Isotermas de sorção, APPCC.

ABSTRACT

The purpose of this work is to provide technical information to the authorities and industries on aflatoxin production and prevention measures in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) and its products. The work was divided in three parts:

Part A: HACCP (Hazard Analysis and Control of Critical Points) plans elaboration in two industries, one of post-harvest treatment of peanuts (Industry A) and another of peanuts candy products (Industry B). Critical Control Points (CCP) for aflatoxin were indentified, and it was observed that no process measure is available to eliminate or even reduce the toxin. Thus, rigid monitoring and control on aflatoxin content must be carried on to avoid fungus infestation and hence toxin production. The process steps of raw peanuts reception, drying, storage and transportation are critical for Industry A. For Industry B, the most important steps are reception and storage of both raw peanuts and candies.

Part B: sorption isotherms for three peanuts varieties (Runner IAC 886, Caiapó e Tatu vermelho) were obtained, for wide relative humidity (RH) and temperature (T) ranges. Hygroscopic equilibrium is directly proportional to RH and conversely proportional to T. Caiapó variety presented the lowest equilibrium moisture content (EMC), confirming that lipids and carbohydrates quantities area correlated to EMC. The Modified Halsey model was the best on representing the experimental sorption data.

Part C: microbiological experiments were carried out to assess fungus growth and aflatoxin production in String bean and kernels of Runner IAC 886 peanuts. Two concentrations of *Aspergillus flavus* spores 10^4 e 10^6 spores/mL, were inoculated, two storage periods were used 15 and 30 days, three relative humidities were employed 75 %, 84 % and 90 %, and three temperature were applied 25, 30 and 35° C. Growth analysis was assessed by counting spores on a Neubauer chamber and by agreement colonies former. Aflatoxin production was verified through Imunoafinity Chromatography test (Afla Test – VICAM), and some results were confirmed through Thin Layer Chromatography. It was observed that RH 90 %

and T 25° C are the optimum condition to the fungus growth. Aflatoxin production was far beyond the critical limit fixed by Brazilian authorities (20 ppb).

Key Words: Peanut (*Arachis hypogaea L.*); Aflatoxin; Mold growth; Sorption isotherms; HACCP.

NOMENCLATURA

Å	Angström
a_w	Atividade de água
B	Perigo Biológico
b.s.	Base seca
b.u.	Base úmida
° C	Grau Celsius
cm	centímetro
F	Perigo Físico
F	Função Objeto (Equação)
g	Gramma
h	Hora
ha	Hectar
kg	Quilograma
kGy	Intensidade de irradiação dos raios gama
µg	Micrograma
L	Litro
mL	Mililitro
mg	Miligramas
Meq	Teor de umidade de equilíbrio
m ²	Metro quadrado
mm	Milímetro
nm	nanômetro
n	Número experimental
N°	Número
ppb	Parte por bilhão
%	Por cento
Q	Perigo Químico
R ²	Coeficiente de determinação
Sc	Sacas de 25 quilos de amendoim

S_e	Erro padrão
UR	Umidade Relativa
T	Temperatura
Ts	Temperatura absoluta
t_{cal}	Parâmetro calculado
$t_{student}$	Parâmetro estatístico
\emptyset_e	Parâmetro estimado

LISTA DE FIGURAS

PARTE A	PÁG.
Figura 2.1: Modelo Bidimensional de Classificação de Risco à Saúde (Extraído de CAC/WHO, 1997)	15
Figura 2.2: Diagrama decisório na identificação de Pontos Críticos de Controle. (BRASIL, 1998)	16
Figura 4.1: Fluxograma de processo de secagem e armazenamento do amendoim da Empresa A – Beneficiamento de grãos de amendoim	25
Figura 4.2: Arrancador de amendoim de garfos	26
Figura 4.3: Secador	29
Figura 4.4: Lotes recebidos pela Empresa A com contaminação por aflatoxina superiores a 10 ppb e distribuição mensal de chuvas (a - 2004; b - 2005; c - 2006)	39
Figura 4.5: Lotes beneficiados pela Empresa A com contaminação por aflatoxina superiores a 20 ppb e distribuição mensal de chuvas (a – 2004; b- 2005; c – 2006)	40
Figura 4.6: Índice pluviométrico dos três anos e os lotes contaminados no recebimento até 10 ppb	41
Figura 4.7: Variação da umidade dos grãos em função da umidade relativa do ar para o mês de fevereiro. Extraído de FERNANDEZ et al. (1997)	42
Figura 4.8: Quantidade de grãos recebidos até 10 ppb e acima de 10 ppb e índice de aflatoxinas	43
Figura 4.9: Fluxograma de processo da Empresa B - Fabricação de doces de Amendoim (paçoca caseira)	50

PARTE B	PÁG.
Figura 6.1: A planta Amendoim (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	61
Figura 6.2: Diferentes tipos de isotermas para materiais alimentícios. Extraído de Labuza (1975).....	64
Figura 7.1: Frascos em atmosfera controlada em Câmara de DBO	68
Figura 7.2: Frascos herméticos com as amostras na Câmara de DBO	68
Figura 8.1: Curva da relação da umidade de equilíbrio (% b.s.) com a umidade relativa a 25° C	74
Figura 8.2: Curva da relação da umidade de equilíbrio (% b.s.) com a umidade relativa a 30° C	75
Figura 8.3: Curva da relação da umidade de equilíbrio (% b.s.) com a umidade relativa a 35° C	75
Figura 8.4: Superfície de resposta fornecida pelo modelo de Halsey modificado para a variedade Runner IAC 886 ..	80
Figura 8.5: Superfície de resposta fornecida pelo modelo de Halsey modificado para a variedade Tatu vermelho	81
Figura 8.6: Superfície de resposta fornecida pelo modelo de Halsey modificado para a variedade Caiapó	81
Figura 8.7: Gráfico do resíduo da isoterma da variedade Runner IAC 886 calculada pelo modelo de Halsey modificado em função da UR	82
Figura 8.8: Gráfico do resíduo da isoterma da variedade Runner IAC 886 calculada pelo modelo de Halsey modificado em função da temperatura	82

PARTE C	PÁG.
Figura 10.1: <i>Aspergillus flavus</i>	88
Figura 10.2: Estruturas moleculares das principais aflatoxinas. Extraído de: (FDA/CFSAN, 2003)	90
Figura 11.1: Frascos para utilização na obtenção das isotermas de crescimento fúngico e de produção de aflatoxina	101
Figura 11.2: Frascos herméticos na câmara climática em temperatura constante.....	102
Figura 12.1: Amostra de amendoim no período P ₁ na umidade relativa de ± 90,3 % na isoterma de crescimento do <i>Aspergillus flavus</i> em amendoim Runner IAC 886.....	109

LISTA DE TABELAS

PARTE A	PÁG.
Tabela 2.1 Previsões e Estimativas das Safras Agrícolas por Região Administrativa (RA), Estado de São Paulo, Ano Agrícola 2005/06, 4º Levantamento, Abril de 2006	6
Tabela 2.2 Exemplos de padronização de julgamento da probabilidade de ocorrência (Risco).....	14
Tabela 2.3 Planos amostrais para lotes de 10 toneladas e limites aceitáveis	17
Tabela 4.1 Média mensal de precipitação chuvosa na cidade de Tupã nos anos de 2004, 2005 e 2006.....	35
Tabela 4.2 Índice de aflatoxina nos lotes de amendoim recebidos no ano de 2004.....	35
Tabela 4.3 Índice de aflatoxina nos lotes de amendoim recebidos ano de 2005.....	36
Tabela 4.4 Índice de aflatoxina nos lotes de amendoim recebidos ano de 2006.....	36
Tabela 4.5 Índice de aflatoxina nos lotes beneficiados em 2004	37
Tabela 4.6 Índice de aflatoxina nos lotes beneficiados em 2005.....	37
Tabela 4.7 Índice de aflatoxina nos lotes beneficiados em 2006.....	38
Tabela 4.8 Análises de Risco à Saúde e Significância dos Perigos na Empresa A – Beneficiamento de Grãos de Amendoim.	45
Tabela 4.9 Formulário N – Resumo do plano APPCC – Empresa A.	46
Tabela 4.10 Formulário N – Resumo do plano APPCC – Empresa A.	47
Tabela 4.11 Formulário N – Resumo do plano APPCC – Empresa A.	48

Tabela 4.12	Análises de Risco à Saúde e Significância dos Perigos na Empresa B – Fabricação de doces de amendoim.....	54
Tabela 4.13	Formulário N – Resumo do plano APPCC – Empresa B.....	55
Tabela 4.14	Formulário N – Resumo do plano APPCC – Empresa B.....	56
PARTE B		PÁG.
Tabela 6.1	Variedades de amendoim produzidas no Brasil.....	62
Tabela 6.2	Conteúdo de umidade de equilíbrio (% b.u.) no amendoim, a 25° C e várias UR.....	65
Tabela 6.3	Modelos matemáticos utilizados para prever o fenômeno de higroscopicidade dos produtos agrícolas nas isotermas de sorção.....	66
Tabela 7.1	Níveis de umidade relativa e temperatura empregada nos ensaios de umidade de equilíbrio higroscópico.....	70
Tabela 8.1	Composição centesimal de três variedades de Amendoim (em porcentagem).....	72
Tabela 8.2	Umidade de equilíbrio (% b.s.) no amendoim, em várias atividades de água a 25, 30 e 35° C.....	73
Tabela 8.3	Resultados estatísticos da estimativa quasi-newton para a variedade Runner IAC 886.....	77
Tabela 8.4	Resultados estatísticos da estimativa quasi-newton para a variedade Tatu Vermelho.....	78
Tabela 8.5	Resultados estatísticos da estimativa quasi-newton para a variedade Caiapó	79
Tabela 8.6	Valores estimados de umidade relativa, em função da variedade de amendoim, para temperatura de 25° C e umidade de equilíbrio 11,1 % (b.s.) ou 10% (b.u.)	84

PARTE C	PÁG.
Tabela 10.1 Condições para o crescimento de fungos em grãos para temperaturas de 25 a 27° C.....	88
Tabela 10.2 Doses de irradiações por raios gama aprovadas pela IDFA ...	95
Tabela 11.1 Níveis para a isoterma de crescimento fúngico do <i>Aspergillus flavus</i>	105
Tabela 11.2 Níveis para a isoterma de produção de aflatoxina pelo <i>Aspergillus flavus</i>	105
Tabela 12.1 Teste de esterilização com luz ultravioleta (Contagem de unidades formadoras de colônia/grama).....	108
Tabela 12.2 Contagem de <i>Aspergillus flavus</i> expressas em esporos/mL e UFC/grama de amostras a 25° C.....	110
Tabela 12.3 Contagem de <i>Aspergillus flavus</i> expressas em esporos/mL e UFC/grama de amostras a 30° C.....	111
Tabela 12.4 Contagem de <i>Aspergillus flavus</i> expressas em esporos/mL e UFC/grama de amostras a 35° C.....	112
Tabela 12.5 Testes de Tukey para as médias de número de esporos/mL em amendoim em grão.....	114
Tabela 12.6 Testes de Tukey para as médias de número de esporos/mL em amendoim em vagem.....	114
Tabela 12.7 Testes de Tukey para as médias de número de UFC/g em amendoim em grão.....	115
Tabela 12.8 Testes de Tukey para as médias de número de UFC/g em amendoim em vagem	115
Tabela 12.9 Isoterma de produção de Aflatoxina a 25°C (ND – Não detectado; CCD – Cromatografia em Damada Delgada).....	117
Tabela 12.10 Isoterma de produção de Aflatoxina a 30°C (ND – Não detectado; CCD – Cromatografia em Damada Delgada).....	118

Tabela 12.11	Teste de Tukey para as médias de teor de aflatoxina no amendoim em grãos (fluorimetria)	117
---------------------	---	-----

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
NOMENCLATURA.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
SUMÁRIO	xiv
Capítulo 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
PARTE A - Gestão do perigo químico aflatoxina na industrialização de amendoim (<i>Arachis hypogaea</i> L.).....	4
Capítulo 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – PARTE A	5
2.1 Importância econômica do Amendoim	5
2.2 O sistema APPCC	7
2.3 Implantação do plano APPCC	10
2.3.1 Formação da equipe de APPCC	11
2.3.2 Descrição do produto	11
2.3.3 Identificação do uso	11
2.3.4 Construção do diagrama de fluxo – fluxograma	11
2.3.5 Confirmação no local das etapas descritas no fluxograma	12
2.3.6 Princípio 1- Analisar os perigos, riscos (probabilidade de ocorrência) e a severidade, definir a significância e as medidas preventivas.....	12

2.3.7	Princípio 2 - Determinar os pontos críticos de controle (PCC).....	15
2.3.8	Princípio 3 - Estabelecer limites críticos para cada PCC.....	17
2.3.9	Princípio 4 - Estabelecer um sistema de monitoramento para cada PCC.....	18
2.3.10	Princípio 5 - Estabelecer ações corretivas.....	18
2.3.11	Princípio 6 - Estabelecer procedimento de verificação.....	19
2.3.12	Princípio 7 - Estabelecer documentação e manter registros.....	19
Capítulo 3	MATERIAIS E MÉTODOS – PARTE A	20
3.1	Materiais	20
3.2	Métodos	21
3.2.1	Princípio 1 - Análise dos perigos e medidas preventivas	21
3.2.2	Princípio 2 - Identificação dos pontos críticos de controle (PCC)	22
3.2.3	Princípio 3 - Estabelecimento dos limites críticos	22
3.2.4	Princípio 4 - Estabelecimento dos procedimentos de monitorização	22
3.2.5	Princípio 5 - Estabelecimento das ações corretivas	23
3.2.6	Princípio 6 - Estabelecimento dos procedimentos de verificação	23
3.2.7	Princípio 7 - Estabelecimento dos procedimentos de registros....	23
Capítulo 4	RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE A	24
4.1	Empresa A: Beneficiamento dos Grãos de Amendoim	24
4.1.1	Avaliações do processo da Empresa A e seus Pontos Críticos de Controles para o perigo químico aflatoxina (PCC – Q)	24
4.1.2	Análise de Risco à Saúde e Significância dos Perigos na Empresa A - Beneficiamento de Grãos de Amendoim	34
4.1.3	Resumo do plano APPCC da empresa A – Beneficiamento de grãos de amendoim para o perigo químico aflatoxina	45

4.2	Resultados e discussão da empresa B: Fabricação de doces de amendoim	49
4.2.1	Avaliações do processo da Empresa B e seus pontos críticos de controle para o perigo químico aflatoxina (PCC – Q)	49
4.2.2	Análise de Risco à Saúde e Significância dos Perigos na Empresa B - Fabricação de doces de amendoim	53
4.2.3	Resumo do plano APPCC da empresa B – Fabricação de doces de amendoim para o perigo químico aflatoxina	54
Capítulo 5	CONCLUSÕES – PARTE A	57
PARTE B	Isoterma de sorção para três variedades de amendoim (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	59
Capítulo 6	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – PARTE B	60
6.1	O amendoim (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	60
6.1.1	Origem e difusão da planta	60
6.1.2	A planta <i>Arachis hypogaea</i> L.	60
	a) Classificação Botânica	60
	b) Características dos principais constituintes da planta	61
	c) Cultivares de amendoim	62
6.2	Isotermas de sorção	63
Capítulo 7	MATERIAIS E MÉTODOS – PARTE B	67
7.1	Materiais	67
7.1.1	Obtenção e preparo das amostras de amendoim	67
7.1.2	Materiais para os ensaios higroscópicos	68
7.1.3	Análise Centesimal das amostras	69
7.2	Método experimental	69

7.2.1	Método estático de umidade relativa controlada – isoterma de adsorção	69
7.2.2	Procedimento de cálculo	70
Capítulo 8	RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE B	72
8.1	Análise centesimal	72
8.2	Isoterma de sorção das três variedades de amendoim	73
8.2.1	Umidades de equilíbrio das três variedades de amendoim	73
8.2.2	Estimativas de parâmetros	76
Capítulo 9	CONCLUSÕES - PARTE B	85
PARTE C	Influência da umidade e temperatura no crescimento e produção de aflatoxina pelo <i>Aspergillus flavus</i> em amendoim	86
Capítulo 10	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – PARTE C	87
10.1	O fungo <i>Aspergillus flavus</i>	87
10.2	A substância Aflatoxina e a doença Aflatoxinose	90
10.3	Métodos de esterilização	93
10.3.1	Esterilização por autoclavação	93
10.3.2	Esterilização por irradiação	94
Capítulo 11	MATERIAIS E MÉTODOS – PARTE C	96
11.1	Isolamento, manutenção, identificação da cepa e preparo da suspensão de esporos	96
	a) Isolamento da cepa	96
	b) Manutenção da cepa	97
	c) Identificação da cepa	98

	d) Preparo da suspensão de esporos e teste de produção de aflatoxina	98
11.2	Preparo das amostras de amendoim	99
11.2.1	Coleta das amostras	99
11.2.2	Esterilização das amostras por radiações gama e ultravioleta (UV)	100
11.3	Obtenção das isotermas de crescimento fúngico e de produção de aflatoxina	100
11.3.1	Preparo do conjunto da isoterma	100
11.3.2	Análise fúngica	102
11.3.3	Análise de aflatoxina	103
11.3.4	Delineamento experimental	104
Capítulo 12	RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE C	107
12.1	Identificação, capacidade de produção de aflatoxina e manutenção das Cepas	107
12.2	Teste de esterilização em ultra-violeta (UV) dos grãos de amendoim	107
12.3	Análise da contagem de esporos e unidades formadoras de colônias dos ensaios da isoterma de crescimento fúngico	108
12.4	Análise dos teores de Aflatoxinas nos ensaios da isoterma de produção de Aflatoxina	116
Capítulo 13	CONCLUSÕES – PARTE C	121
Capítulo 14	CONCLUSÕES E SUGESTÕES GERAIS	122
14.1	Conclusões gerais	122
14.2	Sugestões gerais	123
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os grãos de amendoim (*Arachis hypogaea L.*) são muito utilizados nas indústrias de óleos, confeitos, doces, salgadinhos e como ingredientes em pratos da culinária mundial. Possuem um sabor agradável e são ricos em carboidratos, proteínas e lipídeos.

No processo de beneficiamento das vagens em grãos (limpos, secos e selecionados), são realizadas várias etapas pelas quais se obtém um produto pronto para o uso nas indústrias, com uma qualidade e segurança alimentar definida, na maioria das vezes, pelo índice de contaminação por aflatoxinas, que é seu perigo químico mais significativo e altamente danoso à saúde dos consumidores. Em humanos, a ação tóxica é crônica, e tem sido correlacionada à incidência de câncer de fígado, a danos ao sistema nervoso central, a desordens cutâneas e hormonais e até a morte, dependendo da dose ingerida (SIMIONATO; ASTRAY; SYLOS, 2003; ELLIS, et al, 1994).

Para a prevenção das contaminações dos grãos de amendoim por fungos produtores de aflatoxina, em especial o *Aspergillus flavus* Link e *Aspergillus parasiticus* Speare, são realizados programas de gestão de segurança alimentar, desde o campo, com as Boas Práticas Agrícolas (BPA), até as indústrias, com as Boas Prática de Fabricação (BPF) e os Planos de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

As indústrias de beneficiamento e de doces de amendoim estão sendo avaliadas pelo Ministério da Saúde (MS) quanto aos índices de implantação das Resoluções RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002 (BRASIL, 2002) e Resolução RDC nº 172, de 04 de julho de 2003 (BRASIL, 2003), ambas elaboradas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e que regulamentam a aplicação das BPF e dos Planos APPCC. Em decorrência, os órgãos fiscalizadores e as associações de classes empresariais têm feito esforços para implantar as BPF e os planos APPCC em várias indústrias de doces do Estado de São Paulo, sendo que várias obtiveram sucesso e receberam a certificação de qualidade em

amendoim e derivados, “Selo ABICAB”, conferido pela Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (ABICAB) (PRÓ-AMENDOIM INFORMA, 2004).

As maiores dificuldades para atender às exigências destes regulamentos referem-se às adequações das edificações, instalações, equipamentos e controles de processos. Por outro lado, alguns controles foram previstos pela Resolução RDC nº 172, tais como os de umidade relativa e de temperatura dos depósitos de armazenamento, sem que, no entanto, a legislação indicasse os limites críticos destes controles, de modo a evitar infestação por fungos. Conseqüentemente, os monitoramentos solicitados pelas legislações não têm efeitos preventivos.

As etapas de armazenamento apresentam condições propícias ao desenvolvimento dos fungos aflatoxigênicos, uma vez que as vagens, grãos e derivados de amendoim são submetidos às condições de umidade relativa e temperaturas elevadas, níveis favoráveis ao desenvolvimento destes microrganismos. Neste sentido, torna-se fundamental o conhecimento do comportamento destes fungos e das condições higroscópicas dos grãos nas diferentes umidades relativas e temperaturas que ocorrem durante os períodos de armazenamento.

O objetivo deste trabalho é o de avaliar a ocorrência do perigo químico aflatoxina nas etapas de processo da cadeia industrializadora de amendoim e estudar em laboratório quais são os limites críticos para a umidade e temperatura estarem controladas e, assim, prevenir a contaminação de amendoim e derivados, preservando a saúde dos consumidores. De forma mais específica, o trabalho foi realizado nas seguintes partes:

- Parte A: avaliar a probabilidade de ocorrência do perigo químico aflatoxina em uma indústria de beneficiamento de amendoim e uma indústria de doces e derivados e elaborar os planos APPCC. São propostos os Pontos Críticos de Controle para o perigo químico aflatoxina (PCC - Q) em cada etapa dos processos, bem como as medidas preventivas associadas, os limites críticos previstos pelas legislações pertinentes, os monitoramentos necessários, as ações corretivas em caso de desvio, os registros e as verificações;
- Parte B: obtenção das isotermas de sorção até o equilíbrio higroscópico das variedades Runner IAC 886, Tatu vermelho e Caiapó, para uma

ampla faixa de umidade relativa (UR) e temperaturas (T) moderadas. Modelos de previsão da umidade de equilíbrio em função de UR e T foram ajustados aos dados experimentais, de modo a contribuir na compreensão do comportamento higroscópico destes materiais e aprofundar o entendimento sobre o crescimento fúngico; e

- Parte C: avaliação das condições mais favoráveis ao crescimento do fungo *Aspergillus flavus* Link e de sua produção de aflatoxina, em condições de umidade relativa e temperatura controladas, tendo como substrato grãos de amendoim da variedade Runner IAC 886, em vagens e grãos, uma vez que esta variedade é a mais utilizada na fabricação de doces de amendoim na região noroeste do estado de São Paulo.

Com os resultados, espera-se fornecer às autoridades sanitárias e a profissionais do setor informações relevantes para que se possam estabelecer limites críticos seguros para evitar a produção de derivados de amendoim com risco potencial aos consumidores por ingestão de aflatoxina.

PARTE A

**Gestão do perigo químico aflatoxina na industrialização de amendoim
(*Arachis hypogaea* L.).**

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – PARTE A

2.1 Importância econômica do Amendoim

A importância econômica do amendoim está relacionada ao fato das sementes possuírem sabor agradável e serem ricas em óleo, o que o torna um produto destinado ao consumo “in natura”, como aperitivos salgados, torrado e preparado de diversas formas, e também à fabricação de doces, como grãos inteiros com diversas coberturas ou grãos moídos na forma de paçocas ou ainda, substituindo a castanha de caju em cobertura de sorvetes e em pratos sofisticados da culinária brasileira e internacional. Os grãos também podem ser utilizados para extração do óleo, empregado diretamente na alimentação humana e nas indústrias de produtos medicinais. É um alimento de alto valor calórico e protéico, o que o faz popular entre adultos e crianças (MORAES; ABRANTES; SANTOS, 2003).

A colheita de grãos - safra 2005/06 - deve somar 7.434,81 mil toneladas, o que representa acréscimo de 5,8% em relação ao ano anterior devido, principalmente, aos ganhos de volume produzido de **soja safrinha** (59,2%), feijão da seca (34,4%), feijão das águas (31,9%), **amendoim da seca** (16,9%) e **milho safrinha** (16,6%), onde a evolução da safra de amendoim esta apresentada na Tabela 2.1. A estimativa final para a cultura de amendoim das águas confirmou queda da área plantada (11,5%) e da produção (7,6%), devido à grande diminuição de área de renovação de cana-de-açúcar, apesar de maiores ganhos no rendimento (4,4%), em decorrência das melhores condições climáticas, comparativamente às safras anteriores. Para a cultura do amendoim da seca, registraram-se elevações na área (8,9%), na produção (16,9%) e na produtividade (7,3%) (IEA, 2006).

O estado de São Paulo destacou-se como o estado maior produtor do Brasil, seguido pelo Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Mato Grosso. Dentro do Estado de São Paulo, as maiores regiões produtoras são Ribeirão Preto, Marília e Presidente Prudente, sendo que, em Ribeirão Preto, o amendoim assume

uma especial importância, em função de estar entre as culturas de ciclo curto, que pode ser uma opção, juntamente com a soja, na ocupação das áreas de reforma dos canaviais, e por existirem na região empresas produtoras de sementes (IEA, 2006).

Estima-se que 80% das áreas de reforma dos canaviais sejam ocupadas pela cultura do amendoim. No entanto, as áreas plantadas com amendoim vêm diminuindo, perdendo terreno para a soja, pois as tecnologias agrícolas e industriais desenvolvidas para a soja colocaram ao alcance do consumidor um óleo de boa qualidade, restando como subproduto de sua extração o farelo de soja, também tão rico em proteína como o do amendoim, porém sem os riscos de utilização na alimentação animal por não conter aflatoxina. Além da importância da soja no mercado interno de óleo e farelo, este grão ocupa uma posição de destaque como produto de exportação (WIKIPÉDIA, 2006).

Tabela 2.1 - Previsões e Estimativas das Safras Agrícolas por Região Administrativa (RA), Estado de São Paulo, Ano Agrícola 2005/06, 4º Levantamento, Abril de 2006.

RA	Amendoim da seca		Amendoim das águas	
	Área (ha)	Produção (sc.25kg)	Área (ha)	Produção (sc.25kg)
Araçatuba	218	20.435	2.856	298.200
Barretos	-	-	2.348	323.000
Bauru	247	15.244	3.059	378.608
Campinas	62	6.120	-	-
Central	400	36.000	6.670	812.450
Franca	-	-	1.000	88.500
Marília	7.403	519.228	17.028	1.581.930
Presidente Prudente	3.617	307.710	9.716	1.178.495
Ribeirão Preto	-	-	16.116	2.096.252
São José do Rio Preto	662	45.820	6.631	492.038
Sorocaba	4	330	24	1.530
Estado	12.611	950.886	65.445	7.251.002

Fonte: (IEA, 2006).

Um elemento que deprecia significativamente esta *commodity* é a possibilidade de contaminação por aflatoxina, cuja ação no organismo humano pode provocar alterações no crescimento de crianças e jovens, distúrbios neurológicos, imunológico e hepático que, em casos extremos, pode progredir para o câncer do fígado (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; HUSSEIN; BRASEL, 2001).

O amendoim, assim como outras *comodities* agrícolas como milho, arroz, derivados de amendoim, está sujeito à infestação por mofos (fungos) aflatoxigênicos e conseqüentes contaminações com aflatoxina. Este fenômeno mundial afeta não só aos grãos de consumo direto, mas também aos seus derivados (SABINO et al, 1997; RUSTOM, 1997), além de alimentos provenientes de animais, inclusive seres humanos, que tiveram em sua dieta grãos ou derivados infestados, sendo o leite contaminado pela aflatoxina M1 um exemplo clássico (WILLIAMS et al., 2004; NAVAS; SABINO; RODRIGUES-AMAYA, 2005; SASSAHARA; NETO; YANAKA, 2005).

A aflatoxina em amendoins resulta da ação dos fungos *Aspergillus flavus* Link e *Aspergillus parasiticus* Speare, que já estão presentes no campo e contaminam irremediavelmente as vagens e sementes. Assim, a produção de aflatoxina é uma questão de oferecer as condições adequadas ao metabolismo dos fungos. Uma vez estabelecida a contaminação dos grãos por aflatoxina, não é possível descontaminar-se o material, de modo que medidas preventivas devem ser tomadas para evitar que ocorra. Uma forma eficiente de avaliar os riscos associados às etapas de processamento é a aplicação da metodologia de *Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle* (APPCC), que visa não só identificar os locais prováveis de ocorrência de fungos e toxinas, mas também propor limites seguros que garantam a inocuidade do alimento (UNTERMANN, 1998; GUIA PARA ELABORAÇÃO DO PLANO APPCC, 2000; ROPKINS; BECK, 2000).

2.2 O sistema APPCC

Este sistema foi utilizado pela primeira vez, nos anos 60, pela Pillsburg Company, junto com a NASA (National Aeronautics and Space Administration) e o U. S. Army Laboratories, com o objetivo de desenvolver um

programa de qualidade para fornecer alimentos aos astronautas (BENNET; STEED, 1999), sendo apresentado ao público pela primeira vez em 1971, em conferência nacional para a proteção de alimentos (ATHAYDE, 1999).

No início de 1970, os Estados Unidos da América (EUA) se depararam com vários problemas relacionados à segurança dos produtos que estavam sendo consumidos, originando o seguinte questionamento: “Como, em 1969, os EUA foram capazes de enviar o homem à lua e, em 1970, ainda temos incidentes que comprometem a segurança dos nossos produtos?” A resposta encontrada foi que seria necessário promover uma mudança na forma de desenvolver e produzir alimentos, tornando-a mais científica e controlada (BENNET; STEED, 1999).

No Brasil, a gestão da qualidade na indústria de alimentos modificou-se a partir dos anos 80, assumindo feição pró-ativa em vez de meramente reativa. Assim, ao sistema denominado Boas Práticas de Fabricação (BPF), que se complementava por programas de análises laboratoriais dos lotes produzidos, visando a garantir a qualidade, somou-se o de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), versão brasileira do internacionalmente conhecido Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP), constituindo-se dessa forma a moderna base de gestão da qualidade na indústria de alimentos, conforme vem sendo adotada em todo o mundo (GUIA PARA ELABORAÇÃO DO PLANO APPCC, 2000).

Em 26 de novembro de 1993, o Ministério da Saúde (MS) lançou a Portaria nº 1428, que fornece as diretrizes para o estabelecimento de Boas Práticas de Produção e Prestação de Serviços e do Sistema APPCC na área de alimentos, bem como relaciona os conhecimentos básicos necessários aos responsáveis técnicos. A higiene dos alimentos, foco principal do *Codex Alimentarius*, é melhor controlada na etapa de produção e processamento, de modo que o principal objetivo do *Codex* tem sido estabelecer as Práticas de Higiene ao invés de se limitar aos padrões microbiológicos para o produto acabado. Levando esta filosofia para uma etapa adiante, o Codex organizou um Manual para a aplicação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) nos Comitês de Higiene Alimentar. Ao fazer isto, reconhece que o APPCC tem sido uma ferramenta importante para identificar os perigos e estabelecer um sistema de controle que enfoca as medidas preventivas, ao invés de ter por base primária a análise do

produto final. A forma da norma Codex correspondente foi adotada em 1997 (GUIA PARA ELABORAÇÃO DO PLANO APPCC, 2000).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabeleceu a Portaria nº 46, de 10 de fevereiro de 1998 (BRASIL, 1998), devido à necessidade de atender aos compromissos internacionais assumidos no âmbito da Organização Mundial de Comércio (OMC) e conseqüente disposição do *Codex Alimentarius*. Nesta portaria, instituiu-se o Sistema APPCC para os produtos de origem animal, assim como diretrizes para elaboração do Manual Genérico de Procedimentos, para elaboração do plano de APPCC.

As Boas Práticas Agrícolas (BPA) e Boas Práticas de Fabricação (BPF) são procedimentos necessários para controlar as possíveis fontes de contaminação e para garantir que o produto atenda às especificações de qualidade. Elas incluem aspectos que vão desde as condições de produção até as instalações de beneficiamento e armazenamento, incluindo também a higiene pessoal. Esses aspectos, dentre outros, são pré-requisitos fundamentais, constituindo-se na base higiênico-sanitária para implantação do Sistema APPCC.

Mesmo que seja planejada a aplicação do plano APPCC a toda cadeia de manipulação e processamento do produto, da fazenda ao consumidor, a implantação no campo e dos pontos de distribuição em diante é impraticável. A presença de patógenos no campo é uma realidade impossível de ser erradicada, uma vez que não existem etapas de processamento que garantam a eliminação de microrganismos (PANISELLO; QUANTICKI, 2001; JOUANY, 2007). De acordo com Sperber (2005), alguns itens das Boas Práticas Agrícolas, como o controle da qualidade da água, tratamento do solo, defensivos agrícolas, maquinário adequado e cuidados pós-colheita, são ferramentas que devem ser empregadas para minimizar a infestação e a produção de metabólitos nocivos. Na produção de amendoim no campo, a presença dos fungos aflatoxigênicos é freqüente, podendo-se apenas minimizar o desenvolvimento do fungo e a produção da toxina através de calagem do solo, secagem adequada e armazenamento em locais secos e ventilados até o envio para as indústrias de beneficiamento (FERNANDEZ et al., 1997; ROSSETO et al., 2003).

Nas indústrias do segmento de amendoim, as adequações só deram início efetivo em 1998, devido a casos de contaminação por aflatoxina em doces de amendoim investigados pela ANVISA, que originou uma necessidade de definir

regras específicas para fiscalizar, normalizar e definir critérios para estas empresas (SANTOS; LOPES; KOSSEKI, 2001). Assim, em 2003, a resolução RDC Nº 172 da ANVISA dispôs sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Amendoins Processados e Derivados e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Amendoins Processados e Derivados.

Em trabalhos realizados, no ano de 2003/2004 nas indústrias de doces de amendoim da região de Implantação Orientada de Boas Práticas de Fabricação e APPCC, pelo Programa Alimentos Seguros – PAS, através da Escola SENAI “Antônio Devisate” – São José do Rio Preto, com parceria do Serviço de Apoio a Micro e Pequenas Empresas de São Paulo - SEBRAE e da Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados - ABICAB, verificou-se a necessidade de mais informações técnicas de como armazenar o amendoim e seus derivados, evitando a infecção por aflatoxinas devido ao aumento da umidade e temperatura dos armazéns (GORAYEB, 2004; PRÓ-AMENDOIM INFORMA, 2004).

2.3 Implantação do plano APPCC

O plano APPCC é um documento formal que reúne as informações-chave, contendo todos os detalhes do que é crítico para a produção de alimentos seguros. Para a elaboração dos planos, que envolvem a produção de alimentos seguros, utilizam-se as etapas do processo envolvido e através de informações, aplicam-se os princípios definidos na portaria nº 46 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e as normas do “Codex Alimentarius”, seguindo uma seqüência lógica para implementação do sistema de APPCC, descritas nos itens a seguir (CAC/WHO, 1997; ILSI, 1997):

2.3.1 Formação da equipe de APPCC

A equipe deve ter formação multidisciplinar. Os colaboradores da empresa devem estar familiarizados com os produtos e seus métodos de elaboração, além de terem o poder de convencimento, liderança e capacidade de multiplicação dos conceitos.

O líder da equipe deve ter treinamento e habilidade suficiente em APPCC. O escopo do estudo deve ser definido, sabendo-se quais etapas da cadeia produtiva devem ser envolvidas.

2.3.2 Descrição do produto

Uma detalhada descrição do produto deve ser feita, incluindo sua composição química e física, o tipo de embalagem, o transporte utilizado na distribuição, as condições de armazenagem e o tempo de vida útil.

2.3.3 Identificação do uso

Deve-se identificar qual o público-alvo do produto e saber se faz parte de um segmento particular da população (bebês, idosos, enfermos, adultos, etc.).

2.3.4 Construção do diagrama de fluxo - fluxograma

Deve-se resumir o fluxo de processo em um diagrama simplificado, que forneça um esboço do processo e realce a localização dos perigos potenciais

identificados. É importante não negligenciar nenhuma etapa que possa afetar a segurança do alimento (FIGUEIREDO; COSTA NETO, 2001).

2.3.5 Confirmação no local das etapas descritas no fluxograma

Uma vez estabelecido o diagrama operacional, deve-se efetuar a inspeção no local, verificando a concordância das operações descritas com o que foi representado. Esta etapa irá assegurar que os principais passos do processo terão sido identificados e possibilitarão os ajustes necessários.

Após o estabelecimento destas pré-condições básicas, aplicam-se os sete princípios dos planos APPCC em cada etapa do processo (PANISELLO; QUANTICK, 2001), quais sejam:

2.3.6 Princípio 1 - Analisar os perigos, riscos (probabilidade de ocorrência) e a severidade, definir a significância e as medidas preventivas

Todos os perigos em potencial, relacionados a cada etapa do processo, devem ser identificados com base na experiência dos membros da equipe e nas informações de saúde pública sobre o produto.

Os perigos têm a classificação:

- **Perigos biológicos (B)** – bactérias patogênicas e suas toxinas, vírus, parasitos patogênicos e protozoários.
- **Perigos químicos (Q)** – Toxinas naturais (ciguatoxinas, toxinas paralisantes, neurotóxicas, amnésicas e diarréicas, entre outras), toxinas fúngicas (micotoxinas), metabólitos tóxicos de origem microbiana (histaminas e tetrodotoxinas), pesticidas, herbicidas, contaminantes inorgânicos tóxicos, antibióticos, anabolizantes, aditivos e coadjuvantes alimentares tóxicos, lubrificantes e pinturas (tintas), desinfetantes, entre outros.

- **Perigos físicos (F)** - vidros, metais, madeira ou objetos que podem causar um dano ao consumidor (ferimentos de boca, quebra de dentes e outros que exijam intervenções cirúrgicas para sua retirada do organismo do consumidor).

Mais de uma medida de controle pode ser necessária para controlar um perigo e mais de um perigo pode ser controlado por uma mesma medida de controle (FIGUEIREDO; COSTA NETO, 2001).

A análise dos riscos deverá ser feita considerando os seguintes fatores:

- Probabilidade de ocorrência do perigo e sua severidade em relação aos efeitos adversos à saúde;
- Avaliação qualitativa e quantitativa da presença do perigo;
- Capacidade de multiplicação e sobrevivência dos microrganismos; e
- Produção ou permanência nos alimentos de toxinas, agentes químicos ou físicos.

É considerado um alimento seguro aquele que, ao longo da cadeia produtiva durante sua produção, foram aplicadas medidas preventivas sanitárias efetivas e eficazes e que, por isso, não representa riscos em níveis acima dos tolerados ao consumidor, sempre e quando o mesmo for usado nas condições e para fins a que se destina (ILSI, 1997).

Outra ferramenta que surgiu devido à necessidade de uniformização de gestão dos riscos associados com a segurança alimentar é a Análise de Risco. O Sistema APPCC e a Análise de Risco são duas ferramentas distintas (NETA; HOLLAND; DAMASCENO, 2004) e, de acordo com Oliveira; Franco (2003), a Análise de Risco é uma técnica na quais as informações são analisadas de forma objetiva, transparente e sistemática, a fim de se estimar o risco relacionado a um perigo em particular, em um determinado tipo de alimento, para um determinado tipo de consumidor, que consiste nas seguintes etapas: identificação do perigo, avaliação da exposição, caracterização do perigo, caracterização do risco. Portanto, é importante que esteja clara a diferença entre perigo e risco. De acordo com a Codex Alimentarius Commission (1999), perigo é um agente biológico, químico ou físico com potencial de causar um efeito adverso à saúde, e o risco é a probabilidade de ocorrência desse efeito, e sua severidade ou gravidade é dada como consequência de um perigo em um alimento (NETA; HOLLAND; DAMASCENO, 2004).

Para estabelecer a probabilidade de ocorrência de determinado risco é necessário conhecer detalhadamente o fluxo de produção, incluindo-se o recebimento de matérias-primas e insumos, fluxograma de processamento e condições operacionais e de manipulação, forma de distribuição e comercialização, como também o consumidor envolvido. Bertolini; Rizzi; Bevilacqua (2007) propuseram uma padronização de julgamento da ocorrência para “salada de polvo”, sugerindo um critério numérico associado à probabilidade de ocorrência e à periodicidade de acontecimento das contaminações, conforme pode ser visto na Tabela 2.2.

Ao avaliar a severidade dos perigos, é importante avaliar qual é o público que consome este alimento. Dependendo quem é este consumidor, a classificação de severidade mudará; por exemplo, quando os consumidores são crianças ou imunodepressivos, a severidade será alta, visto que as doenças transmitidas por alimentos podem ocorrer com maior frequência. Portanto, a severidade é classificada em alta, média e baixa, conforme os diferentes graus de severidade das patologias envolvidas (GUIA PARA ELABORAÇÃO DO PLANO APPCC , 2000).

Um método empregado para a análise de significância dos perigos é o Bidimensional de Classificação de Risco à Saúde, apresentado na Figura 2.1, que relaciona a probabilidade de ocorrência do perigo (risco) e a severidade (ou gravidade) da consequência, fornecendo como resposta a significância do perigo em termos da saúde do consumidor (CAC/WHO, 1997).

Tabela 2.2 - Exemplos de padronização de julgamento da probabilidade de ocorrência (Risco).

Probabilidade de ocorrência (Risco)	Quantificação
Desprezível	Ocorrência do perigo > 3 anos
Baixo	1 ano < Ocorrência do perigo < 3 anos
Médio	7 meses < Ocorrência do perigo < 1 anos
Regularmente Alto	4 meses < Ocorrência do perigo < 7 meses
Alto	4 meses < Ocorrência do perigo

Fonte: (BERTOLINI; RIZZI; BEVILACQUA, 2007).

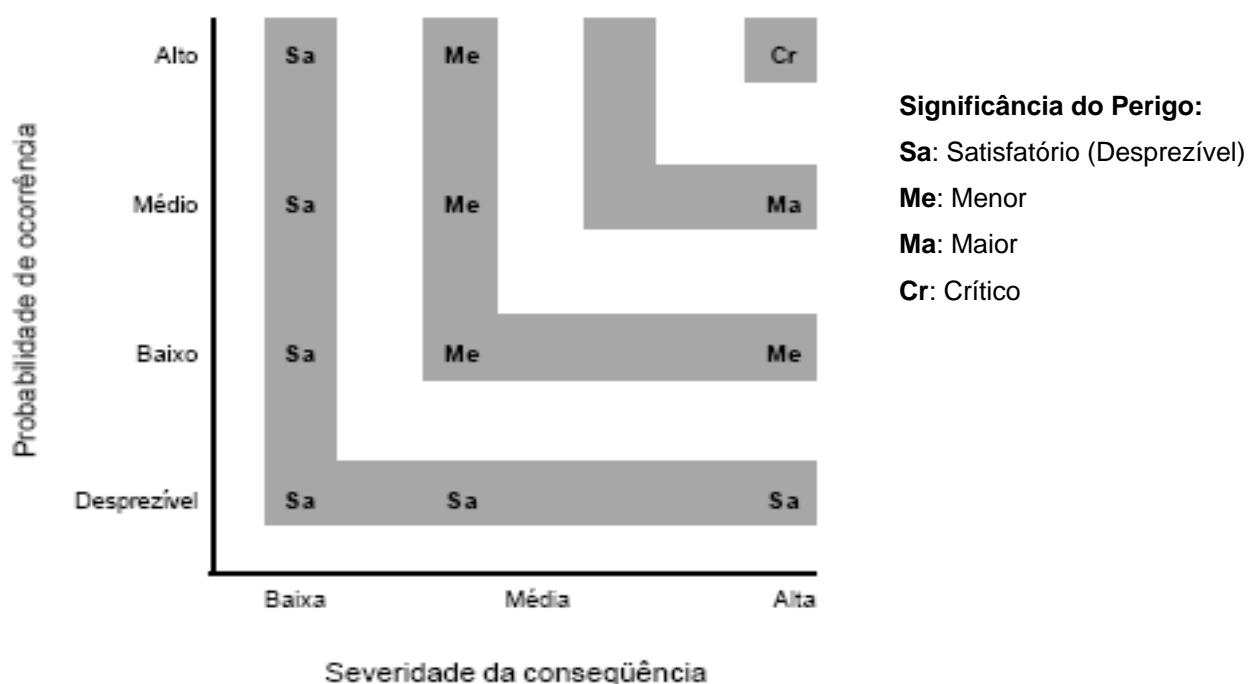


Figura 2.1 - Modelo Bidimensional de Classificação de Risco à Saúde (Extraído de CAC/WHO, 1997).

2.3.7 Princípio 2 - Determinar os pontos críticos de controle (PCC)

O PCC é qualquer ponto, etapa ou procedimento no qual se aplicam medidas preventivas para manter um perigo significativo sob controle, com objetivo de eliminar, prevenir ou reduzir os riscos à saúde do consumidor. Identificar os PCCs no estudo de APPCC pode ser facilitado utilizando-se uma árvore decisória, que consiste em se fazer uma série de perguntas para cada etapa de elaboração do produto, conforme apresentado na Figura 2.2.

Quando se analisa os PCCs de um processo, deve-se tomar cuidado para não se propor um número excessivo de PCCs, o que tornaria a rotina industrial lenta e burocrática. Por outro lado, um número reduzido de PCCs pode não controlar efetivamente todos os perigos envolvidos. Portanto, a etapa de identificação dos PCCs sugere uma análise cuidadosa dos perigos e suas medidas preventivas, definindo-se se é nesta etapa que o perigo é eliminado, reduzido ou prevenido.

Existem algumas partes do processo ou equipamento que a empresa quer ou deve monitorar, mas que não se constituem em PCCs. Estes pontos podem ser identificados como pontos de controle (PCs) da qualidade e são controlados para evitar um desvio nos PCCs (BENNET; STEED, 1999).

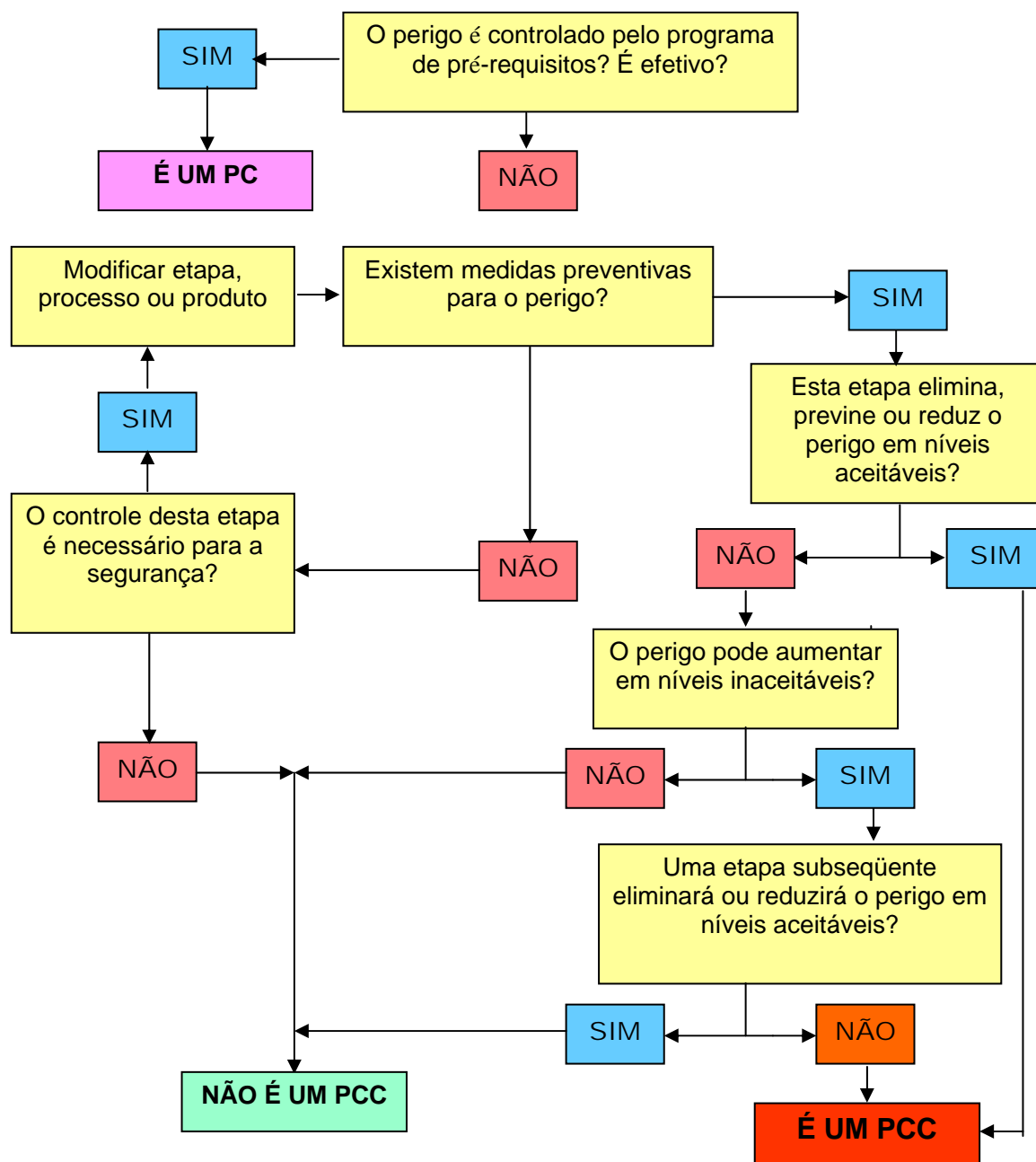


Figura 2.2 - Diagrama decisório na identificação de Pontos Críticos de Controle. (BRASIL, 1998).

2.3.8 Princípio 3 - Estabelecer limites críticos para cada PCC

Limite crítico é um valor máximo e/ou mínimo de parâmetros biológicos, químicos ou físicos que assegure o controle do perigo. Os limites críticos são estabelecidos para cada medida preventiva monitorada dos PCCs definidos. Os limites críticos são aqueles que separam os produtos aceitáveis dos inaceitáveis, podendo ser qualitativos ou quantitativos. Cada parâmetro deve ter o seu limite crítico estabelecido, de forma a manter a visão clara das medidas de controle dos PCCs. O estabelecimento desses limites deve estar baseado nos conhecimentos disponíveis em fontes como legislação, literatura científica, dados de pesquisas reconhecidas, e normas internas da empresa (FIGUEIREDO; COSTA NETO, 2001). Quanto aos limites aceitáveis de aflatoxina no amendoim, são apresentados, na Tabela 2.3, os planos amostrais e seus limites críticos exigidos em diversos países.

Tabela 2.3 - Planos amostrais para lotes de 10 toneladas e limites aceitáveis.

Plano amostral	Nº / Peso de incrementos amostrais	Peso (kg) da amostra retirada	Nº de amostra analisadas	Limite aceitável (µg/kg)
CODEX	60/334g	20,0	1	15
FONSECA / ANVISA (1996)	57/200g	11,3	2	20
USDA	45/225g	65	3	20
HOLANDA	100	40	4	3 B ₁ (10 total)
COMUNIDADE EUROPÉIA	80/300g	24	3	ND (*)

(*) ND – Não detectado

Extraído de (CALORI-DOMINGUES, 2005).

Para as empresas, os limites críticos não são só em função das contaminações e danos a saúde do consumidor, mas os limites visam aos valores agregados na comercialização do produto. Para o amendoim, quanto menor o teor de aflatoxina, de umidade dos grãos e de sujidades encontradas, maior será o valor do lote comercializado, sem falar que os grãos também são classificados pelo seu tamanho e características organolépticas (cor, manchas, quebra).

2.3.9 Princípio 4 - Estabelecer um sistema de monitoramento para cada PCC

Para assegurar que as medidas de controle operem como planejado nos PCCs e detectem qualquer perda de controle, é necessário definir um sistema de monitoramento dos PCCs, no qual deve estar estabelecido qual o procedimento de controle que deve estar associado a cada PCC. Os métodos de controle devem ser rápidos, para serem efetivos. O sistema de monitoramento deve permitir, quando possível, que os ajustes sejam feitos antes que uma medida exceda aos limites críticos. Medidas físicas e químicas são, às vezes, preferíveis a testes microbiológicos, porque podem ser feitas rapidamente e, muitas vezes, indicam indiretamente a condição microbiológica do produto.

2.3.10 Princípio 5 - Estabelecer ações corretivas

Ações corretivas específicas devem ser definidas para cada PCC identificado no plano APPCC, a fim de que possa trazer o PCC sob controle, definir o que fazer com o produto que saiu enquanto o PCC estava fora de controle e descobrir porque o PCC estava fora de controle. Os desvios e procedimentos para disposição dos produtos devem estar documentados.

2.3.11 Princípio 6 - Estabelecer procedimento de verificação

Métodos de verificação e auditoria, procedimentos e testes, incluindo amostragem e análises aleatórias, podem ser utilizados para testar se o sistema APPCC está funcionando corretamente. De maneira regular ou não planejada, a informação disponível no sistema APPCC deve ser sistematicamente analisada.

2.3.12 Princípio 7 - Estabelecer documentação e manter registros

Os procedimentos do sistema APPCC devem estar documentados, assim como os registros das atividades de monitoramento dos PCCs, das ações corretivas relacionadas aos desvios e das modificações do sistema APPCC. Estas informações devem ser mantidas para acompanhamento e revisões subsequentes (CAC, 1993; FIGUEIREDO; COSTA NETO, 2001).

Para que se tenha a elaboração e implantação dos planos é importante o comprometimento da direção da empresa. Como pré-requisito é necessário a implantação do programa de Boas Práticas de Fabricação (BPF), pois é a base higiênico-sanitária para assegurar o processo. Nas pequenas indústrias, os problemas enfrentados na implantação dos sistemas de APPCC são: falta de suporte técnico e pessoal com formação técnica, concentração de funções e incapacidade dos colaboradores, disponibilidade financeira e dificuldades com o excesso de documentação e, principalmente, tempo disponível para a implementação do APPCC.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS – PARTE A.

3.1 Materiais

Para a elaboração dos planos APPCC, foram acompanhadas as etapas dos processos em duas indústrias de porte médio, desde o beneficiamento do amendoim até o transporte dos doces de amendoim. Foram realizadas visitas técnicas na UNIDADE DE ARMAZENAMENTO E SECAGEM DAS VAGENS e na UNIDADE DE BENEFICIAMENTO E ARMAZENAMENTO DOS GRÃOS e na FÁBRICA DE DOCES DE AMENDOIM, onde foram colhidos os dados para a elaboração dos planos APPCC através de análise subjetiva e levantamento dos controles já realizados para o perigo químico aflatoxina.

Nestas visitas, os coordenadores de qualidade das empresas descreveram com detalhes as etapas dos processos, e para cada etapa foram aplicados os sete princípios do APPCC, analisando o perigo químico Aflatoxina. Para tanto, foi adotada a metodologia do Programa Alimentos Seguros - PAS, apresentada no GUIA PARA ELABORAÇÃO DO PLANO APPCC (2000), que foi extraída da Portaria nº 46, de 10 de fevereiro de 1998, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Estes planos APPCC foram elaborados na Empresa A – Beneficiamento dos grãos de amendoim, da cidade de Tupã, e na Empresa B - Fabricação de doces de amendoim, da cidade de São José do Rio Preto, ambas com o programa de Boas Práticas de Fabricação implantados.

Antes da visita técnica nas empresas, foi feita uma visita numa fazenda na região noroeste do estado de São Paulo, onde se obtiveram as informações da origem do amendoim, da forma de colheita e transporte até a indústria de beneficiamento.

3.2 Métodos

Para a elaboração dos planos, foram aplicados os sete princípios do APPCC analisando-se o perigo químico Aflatoxina e suas medidas preventivas nas etapas dos fluxogramas e a descrição dos processos foi realizada através de relatos feitos pelos coordenadores de cada empresa e avaliações subjetivas no local.

3.2.1 Princípio 1 - Análise dos perigos e medidas preventivas

Foi conduzida a análise do perigo químico Aflatoxina e suas medidas preventivas identificando-se em cada etapa dos processos a sua probabilidade de ocorrência (risco) e a severidade, de modo a estabelecer a sua significância. Para a análise do perigo químico micotoxina de fungo (Aflatoxina), foram utilizados os apêndices (Apêndice A até F) apresentados nas páginas 73 a 84 do GUIA PARA ELABORAÇÃO DO PLANO APPCC – 2000. Foram realizadas as avaliações que evidenciavam se o perigo era prevenido, eliminado ou reduzido em níveis aceitáveis para garantir a produção de alimentos seguros e, assim, foram propostas as medidas preventivas específicas para cada etapa.

Na análise de risco, severidade e significância do perigo químico nos lotes recebidos e beneficiados pela Empresa A, foi realizada uma análise dos registros do monitoramento para os anos 2004, 2005 e 2006, além dos registros sobre a precipitação chuvosa na cidade de Tupã no mesmo período, fornecidos pela Casa da Agricultura do município.

Para a definição da significância do perigo, aplicou-se o Modelo Bidimensional de Classificação de Risco à Saúde, apresentado na Figura 2.1, que relaciona a probabilidade de ocorrência do perigo (risco) e a severidade (ou gravidade) da consequência, fornecendo como resposta a significância do perigo em termos da saúde do consumidor.

3.2.2 Princípio 2 - Identificação dos pontos críticos de controle (PCC)

Os PCCs foram caracterizados como sendo os pontos onde o perigo químico aflatoxina é realmente crítico à segurança do produto. Foram definidos seguindo a árvore decisória apresentada na Figura 2.2, onde, para cada etapa dos fluxogramas dos processos, foi aplicada a seqüência de questões que definem se este perigo é eliminado, reduzido ou prevenido nesta etapa. Assim, foram identificados os pontos críticos de controle (PCC) e, quando o controle já estava sendo realizado efetivamente pelas Boas Práticas de Fabricação (BPF), estes foram considerados como pontos de controle (PC).

3.2.3 Princípio 3 - Estabelecimento dos limites críticos

Estes valores foram obtidos de fontes diversas, tais como guias e padrões da legislação, literatura, experiência prática, levantamento prévio de dados e experimentos laboratoriais. Os limites críticos foram associados a medidas como temperatura, tempo, umidade, atividade de água e índice de aflatoxina.

Estabeleceu-se os limites críticos utilizando-se as legislações nacionais, resolução RDC nº 172 (BRASIL, 2003), Portaria nº 183 (BRASIL, 1996) e os limites exigido pelo exterior foram compilados do trabalho de Calori-Domingues (2005), apresentado na Tabela 2.3.

3.2.4 Princípio 4 - Estabelecimento dos procedimentos de monitoramento

Para definição do monitoramento, foi utilizada a seqüência planejada de observações ou mensurações para avaliar se um determinado PCC está sob controle e para produzir um registro fiel onde o limite a ser controlado está

prevenindo, eliminando ou reduzindo o perigo químico aflatoxina, e também para uso futuro na verificação da eficiência do plano.

Para definir o monitoramento, foram utilizadas as seguintes perguntas para cada PCC: “O quê? Como? Quem? e Quando?”, ou seja, o que será monitorado, quando ocorre o monitoramento, quem e quando se realiza o monitoramento.

3.2.5 Princípio 5 - Estabelecimento das ações corretivas

Ações corretivas foram definidas para serem aplicadas quando os desvios dos limites críticos estabelecidos ocorrerem. Toda ação foi uma resposta rápida diante da identificação no processo de controles que podem ficar fora do limite e provocar contaminação do produto. As ações corretivas foram adotadas para atuarem no momento ou imediatamente após a identificação dos desvios dos limites estabelecidos.

3.2.6 Princípio 6 - Estabelecimento dos procedimentos de verificação

A verificação foi feita por meio dos procedimentos em adição àqueles utilizados no monitoramento relatados pelos coordenadores de qualidade das empresas, onde se evidencia que o plano APPCC está funcionando corretamente. Foram também apresentadas as atividades que verificam a execução do monitoramento.

3.2.7 Princípio 7 - Estabelecimento dos procedimentos de registros

Os registros dos Planos APPCC foram realizados em documentos pertinentes a cada monitoramento ou verificação, conforme observado na visita

técnica. Os planos são documentos que reuniram todas as informações necessárias para evidenciar a inocuidade dos produtos de cada empresa.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE A

4.1 Empresa A: Beneficiamento dos Grãos de Amendoim.

4.1.1 Avaliações do processo da Empresa A e seus Pontos Críticos de Controle para o perigo químico aflatoxina (PCC – Q).

Na Figura 4.1, é apresentado o fluxograma de processo do beneficiamento de amendoim da Empresa A – Beneficiamento dos grãos de amendoim, onde já estão assinalados os Pontos Críticos de Controle - Químicos (PCC - Q) identificados no processo. A descrição detalhada do processo está apresentada a seguir, com a discussão e também a identificação dos sete PCCs neste processamento. Este número elevado de PCC torna o procedimento operacional trabalhoso devido ao monitoramento constante de diversos pontos e as várias ações de controle que devem ser tomadas quando os níveis verificados aproximam-se dos de segurança. De acordo com Panisello; Quantick (2001), processos que não incluem uma etapa terminal de eliminação de microrganismos ou de toxinas, como o que se observa na Empresa A, tendem a ser mais complexos quanto ao controle e monitoramento.

Para auxiliar na compreensão da incidência de aflatoxina nos lotes de amendoim recebidos pela Empresa A, foi acompanhada a colheita de um lote numa fazenda da região noroeste do estado de São Paulo, onde se observaram as condições em que as vagens são separadas dos galhos, terra e folhas. Durante a colheita, realizada mecanicamente, as plantas são arrancadas por um arrancador de garfos, apresentado na Figura 4.2, e mantidas no solo em fileiras, onde a secagem é realizada naturalmente com exposição ao sol por um dia.

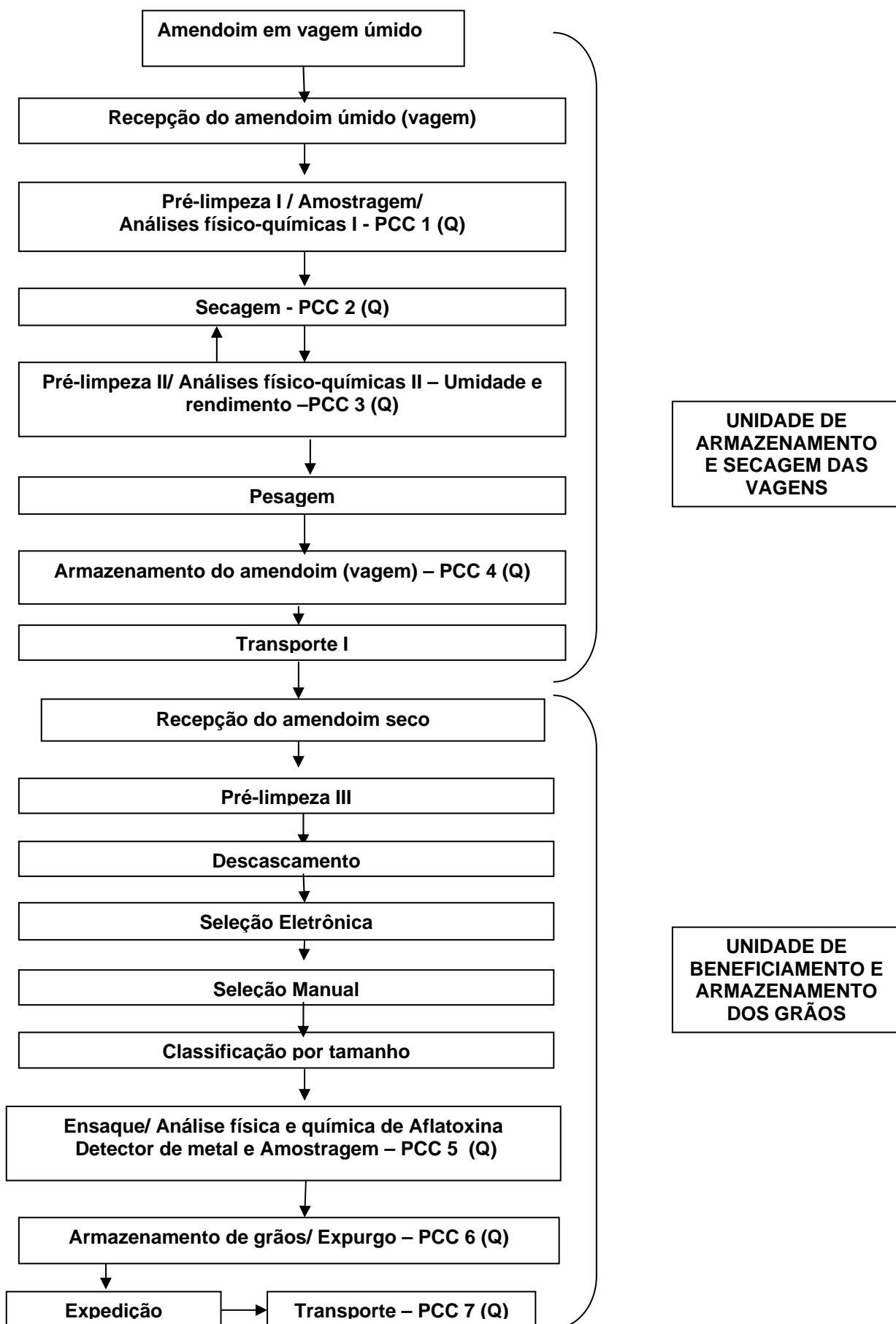


Figura 4.1 - Fluxograma de processo de secagem e armazenamento do amendoim da Empresa A – Beneficiamento de grãos de amendoim



Figura 4.2 – Arrancador de amendoim de garfos.

Após a colheita, são retirados mecanicamente os galhos e folhas das vagens e, em seguida, elas são transportadas por tratores com guindastes para os caminhões gaiolas a granel, com capacidade para 15 toneladas. Estes são cobertos com lonas para evitar que as vagens sejam molhadas em caso de chuvas, essas vagens são transportadas para a indústria de beneficiamento.

De acordo com Godoy; Marcos; Câmara (1983), a secagem das vagens de amendoim no campo é uma operação que exige cuidados, pois grande parte do valor e qualidade pode ser perdida nesta fase, se a umidade destas não abaixar de 35 - 40% (b.u.) até 10% (b.u.) ou menos o mais rápido possível para não ocorrer a infestação por fungos, embora a técnica adotada não permita qualquer controle da umidade final do produto e muito menos da taxa de secagem.

Outra provável fonte de contaminação das vagens por fungos é a de deixar as ramas sobre o solo após a colheita, o que propicia um contato íntimo do substrato com a fonte de contaminação. Segundo Fonseca (1983), uma alternativa mais adequada para este procedimento seria o de embandeiramento das ramas, que consiste em colocá-las sobre suportes acima do solo. No entanto, isto implicaria

no emprego de uma estrutura física mais elaborada e em uma maior utilização de mão-de-obra.

O amendoim em casca é recebido na plataforma de recepção da Empresa A, onde é feito uma análise de umidade dos grãos retirando-os das cascas e, num medidor de umidade do tipo capacitivo, a umidade dos grãos é determinada, devendo esta estar entre 10 e 30 % (b.u.). De acordo com Fonseca (1983), o teor de umidade não deve ser superior a 12 %, e, pela resolução RDC 172 (BRASIL, 2003), o limite é de 11 % para amendoim em casca na plataforma de recebimento, para o Codex o limite é de 10 % (CAC, 1995). Na indústria, quando este valor é excedido, há redução no valor pago ao produtor, uma vez que será necessário um maior período de secagem e conseqüente maior gasto de energia para reduzir o teor de umidade abaixo do limite e o peso do lote é maior. Adicionalmente, é realizada uma classificação dos grãos conforme o seu tamanho e teor de aflatoxina, de modo a definir o valor do lote.

As vagens de amendoim são descarregadas na moega e conduzidas a um elevador de canecas até um conjunto de peneiras vibratórias usadas para separação de sujidades mais grosseiras. Neste conjunto, é feita uma amostragem por um funcionário, que retira, em intervalos regulares, 100 alíquotas de amostras de 200 gramas para cada lote de 15 toneladas, em duplicata, para as análises físico-químicas e para avaliação das características organolépticas e de rendimento. No entanto, isto demandaria que o funcionário estivesse disponível para esta tarefa ao longo de toda a etapa de descarregamento, o que não ocorre, uma vez que o funcionário também tem outras tarefas no setor. Assim, apesar de coletar todas as amostras requeridas, os intervalos são irregulares, o que compromete o método de amostragem e aumenta a probabilidade de recepção de lotes contaminados.

O **PCC 1 (Q)**, ocorre na etapa Pré-limpeza I / Amostragem/ Análises Físico-Químicas I, onde o perigo químico aflatoxinas ocorre, e assim mostra a necessidade de qualificação dos fornecedores, um controle rígido na recepção e uma amostragem bem definida na pré-limpeza dos lotes com os devidos cuidados, já que o processo de beneficiamento de grãos não elimina a micotoxina (EMAN, 2007). A tarefa de qualificar os fornecedores é difícil, pois implica na implantação das Boas Práticas Agrícolas e conseqüente mudança de hábitos culturais e na aplicação de recursos nem sempre disponíveis para uma cultura que vem perdendo competitividade frente a outras mais rentáveis. Seria necessária uma melhor

regulagem das colheitadeiras para evitar o rompimento das vagens, o que expõe os grãos à ação dos fungos; embandeirar as ramas após a colheita; evitar que os grãos fossem armazenados no campo de forma inadequada, o que ocorre com frequência para que o produtor aguarde a época mais propícia para negociar a safra.

As amostras são encaminhadas ao Laboratório de Controle de Qualidade da empresa, onde são realizadas as análises de umidade, aflatoxina, quantidade de sujidades, rendimento e tamanho dos grãos. Os lotes são subdivididos, quanto aos teores de aflatoxina, da seguinte forma: grupo A: de 0 a 4 ppb; grupo B: de 4 a 10 ppb; grupo C: de 10 a 20 ppb; grupo D: acima de 20 ppb. Os lotes dos grupos A são destinados à exportação, os dos grupos A e B para a produção de doces e derivados, os do grupo C para a produção de sementes e óleo comestível e os do grupo D apenas para óleo. O preço pago ao fornecedor é calculado por meio de vários fatores, mas primordialmente em função do teor de aflatoxina; quanto mais alto o índice de aflatoxina do lote, menor o preço pago ao produtor.

A secagem das vagens é realizada em 16 secadores, cada um com capacidade para aproximadamente 17 toneladas; portanto, a carga de cada caminhão vai para um elevador individual. Os secadores são silos onde o ar quente da secagem é fornecido por um ventilador axial e aquecido através da queima de gás natural antes de entrar no secador, sendo arrastado por meio de uma turbina. A temperatura do ar é controlada em painel eletrônico e pode variar entre 36 e 38° C. Retira-se 3 amostras de amendoim no secador, apresentado na Figura 4.3, por uma das 4 janelas inferiores, que ficam na parte de baixo do secador, por uma das 4 janelas do meio, e pela parte superior, onde o amostrador deve subir e entrar por cima do secador e retirar amostras de vários pontos. Estas três amostragens e análises são repetidas em certos intervalos de tempo até que a média de umidade das três amostras seja inferior a 10,5 % e nenhuma das três seja superior a 11,5 %. O intervalo de tempo de amostragens depende da umidade das amostras; quando a umidade do amendoim está acima de 20%, pode-se demorar até 10 horas para se retirar outra amostra; de 17 a 20 %, o intervalo deve ser de 8 horas; de 14 a 17 %, 6 horas; de 12 a 14 %, 4 horas; e inferior a 12 % de 2 em 2 horas. Quando o amendoim estiver com a umidade abaixo de 10,5 %, deve ser enviado para a pré-limpeza antes da pesagem e armazenagem; durante a pré-limpeza, retira-se outra

amostra para análise de umidade. O amendoim só poderá ser armazenado se estiver com umidade máxima de 9%, caso contrário deve retornar ao secador.



Figura 4.3 – Secador

Observando-se o secador apresentado na Figura 4.3, foi possível verificar que a distribuição do ar seco não é uniforme. As camadas de grãos mais próximas da saída do ar secam mais rapidamente, e assim deve-se realizar uma amostragem em vários pontos para se ter a certeza de que todo o lote está com a umidade abaixo de 11 % que é o limite estabelecido na RDC 172 de 04/07/2003 do MS (BRASIL, 2003), para amendoim em vagem. De acordo com o European Mycotoxin Awareness Network - EMAN (2007), o controle na fase de pós-colheita é determinado por meio de um único parâmetro: o nível de umidade dos grãos. O objetivo da secagem é controlar a umidade e manter os grãos em um nível seguro, onde o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas são minimizados.

O *Aspergillus flavus* é um fungo que tem seu crescimento na umidade de equilíbrio higroscópico dos grãos relativamente baixa e realiza o seu metabolismo entre 13,5 e 18 %, b.u. (JOUANY, 2007). Logo, os teores finais de umidade após a etapa de secagem das vagens devem ser inferiores a 10 %, para se

permitir um tempo de estocagem mais longo. Assim, quando se atingir a média de três umidades abaixo de 9%, desde que nenhuma das medidas esteja com umidade superior a 11,5 % a secagem considerada completa e é finalizada.

Devido à alta vazão de ar requerida pela etapa de secagem, há um grande arraste de impurezas pelo vento, o que torna o ambiente insalubre devido ao arraste dos esporos dos fungos, o que provoca um aumento na contaminação dos lotes. A secagem é o **PCC 2 – Q** no processo de beneficiamento do amendoim, uma vez que a secagem incorreta e o armazenamento dos grãos com alto teor de umidade são considerados fatores de risco para o crescimento de fungos e conseqüente produção de micotoxinas (PRADO et al., 1991). Nesta etapa, os controles realizados são as medidas preventivas do perigo químico aflatoxina, pois, ao diminuir a umidade dos grãos, as condições de crescimento dos fungos são limitadas, e assim o perigo será minimizado. Portanto, as análises de umidade durante a secagem são o principal monitoramento deste ponto crítico de controle.

Após a secagem, as vagens são transportadas por correia até outra moega. Caindo na moega, as vagens são levadas por um elevador de canecas até uma outra pré-limpeza e amostragem, com a finalidade de retirar as impurezas por peneiras e por exaustão. Durante a passagem nas peneiras, são retirados em vários intervalos de tempo, aproximadamente 100 gramas de alíquotas para compor duas amostras de 30 kg, das quais uma é enviada para análise de umidade e a outra para análise física de rendimento. Na análise de umidade, a amostra é homogeneizada, debulhada e colocada no aparelho para determinação de umidade. Para o lote seguir e ser colocado no armazenamento, a umidade deve ser inferior a 9 %. Mesmo que a média do secador seja próxima a 10%, é considerado um nível insatisfatório, pois é notório que os grãos permanecem quentes até serem armazenados, tempo suficientes para reduzirem sua umidade para 9%. Na eventualidade do amendoim apresentar umidade superior a 9%, ele deverá retornar ao secador; do contrário, segue para pesagem. Assim, este controle define o **PCC 3 – Q**.

O armazenamento das vagens de amendoim é realizado em galpões com área de 1000 m² e altura de 6 metros, aproximadamente, onde as vagens são armazenadas a granel em pilhas piramidais. Conforme destacado anteriormente, amendoins com diferentes classificações quanto ao teor de aflatoxina (A, B, C ou D) são estocados em galpões distintos.

Houve certa dúvida em se classificar o armazenamento da Empresa A como o **PCC 4 - Q**, uma vez que não há controle efetivo das variáveis extrínsecas umidades relativas e temperatura no armazém. Entende-se o aspecto econômico da Empresa A ao não climatizar o armazém, uma vez que os custos envolvidos na refrigeração e desumidificação de um ambiente com tais dimensões são muito elevados, o que poderia inviabilizar o negócio. Alternativamente são realizadas análises de umidade dos grãos em amostras colhidas aleatoriamente nas pilhas dos armazéns nos períodos onde a umidade relativa do ambiente, monitorada no termohigrometro, atingem um limite acima de 70 %, nestes casos a única alternativa é secar novamente os lotes e conforme o índice de aflatoxina destina-los para óleo ou semente.

Ainda que esta ação configure-se como um controle, o mesmo não pode ser considerado como plenamente satisfatório, uma vez que não há uma metodologia adequada de amostragem, além do volume de grãos dentro do armazém ser muito grande. Portanto, não há garantia de que todos os grãos acima dos limites de segurança são removidos e reprocessados, podendo haver grãos remanescentes com umidade acima dos limites de segurança. Por outro lado, torna-se operacionalmente inviável reprocessar todos os grãos contidos no armazém se alguma das análises indicar umidade insatisfatória. Para que esta alternativa de controle seja efetiva, seria necessário elaborar um plano de amostragem sofisticado e laborioso, com reprocessamentos freqüentes de pequenas porções, o que tornaria o fluxo do processo bastante truncado.

Portanto, como há uma ação efetiva para minimizar a possibilidade de ocorrência do perigo químico, ainda que precária, considerou-se este ponto como um PCC, considerando que esta etapa é crítica. Como se verá no CAPÍTULO 12, para que as condições de armazenamento possam ser consideradas efetivamente controladas, a temperatura deve estar abaixo de 20°C e a umidade relativa do ar inferior a 68 %.

A seguir, os lotes de amendoim em vagens a serem beneficiados, são transportados a granel para a UBS (Unidade de Beneficiamento e Seleção), onde são recebidos na balança rodoviária para pesagem e, depois de conferida sua documentação, são encaminhados para a moega. O responsável pela descarga confere as condições do veículo transportador e do lote. Em seguida, inicia-se a

descarga pelos funcionários que com rodos empurram as vagens para o alçapão da gaiola.

O lote de amendoim, depois de descarregado na moega, é conduzido para a pré-limpeza por um elevador de canecas, onde passa pela pré-limpeza numa mesa de peneiras vibratórias para a retirada de paus e terra, após o que é armazenado até o momento de descascamento. Como o tempo de residência nas tulhas é reduzido, não é necessário considerar-se este um PCC. O lote de amendoim segue então para o descascador, onde as cascas são removidas e enviadas, por transporte pneumático, para um palheiro, e os grãos seguem para uma mesa dessimétrica, onde, por densidade, são separadas as impurezas mais finas. Posteriormente, o lote de amendoim segue para um conjunto de peneiras classificatórias, onde são separados grãos partidos de grãos inteiros, e estes últimos são separados em dois tamanhos. Antes de seguir para a seleção, os amendoins já separados em graúdos, miúdos e partidos, passam por mesas dessimétricas para retirada de possíveis impurezas.

Os grãos de amendoim são enviados por correias para as tulhas que alimentam as mesas de separação colorimétrica, nas quais raios de luz calibrados incidem sobre os grãos e, através de fotocélulas, consegue-se distinguir grãos saudáveis, de coloração característica, dos grãos indesejados, de coloração marrom escura, esverdeados e manchados. Por jatos de ar comprimido, os grãos inadequados são separados dos demais. O processo de separação das impurezas e classificação dos grãos é importante, pois, com a retirada dos grãos manchados, são eliminados também os que possuem uma contaminação maior por fungos e provável índice maior de aflatoxina.

Após a seleção eletrônica, os grãos ainda passaram por uma seleção manual, quando o amendoim, carregado por uma esteira rolante, é conferido por três colaboradores postados ao lado da esteira.

O amendoim é então ensacado em sacos de ráfia de 50 kg cada, sendo que de cada saco são coletadas amostras de 100 g para as análises finais de aflatoxina e outras análises. Cada saco recebe uma identificação com informações sobre data de preparo, número do lote, variedade do amendoim, cor, tipo, tamanho e validade, após o que é armazenado em pilhas de no máximo 100 sacos, colocadas sobre pallets, mantendo-se uma distância de 60 cm entre as pilhas e 1 metro de

distância das paredes. A análise de aflatoxina durante o ensaque constitui-se no **PCC 5 – Q**, e a etapa de armazenamento das sacas de grãos, no **PCC 6 - Q**.

Dependendo do teor de aflatoxina das amostras durante o ensaque, os grãos serão comercializados para a produção de doces e consumo direto (até 20 ppb), para a produção de sementes ou para a produção de óleo (acima de 20 ppb). Como o cronograma de beneficiamento já fornece a informação prévia de qual armazém provém o amendoim, e, portanto, qual o teor de aflatoxina do lote, é pouco provável que haja uma mudança imprevista da destinação do lote, mas, ainda assim, as análises de saída são necessárias.

O armazenamento dos grãos ensacados constitui-se num problema de solução onerosa, uma vez que não há controle das variáveis umidades relativas do ar e temperatura ambiente, apenas se faz o monitoramento através de termohigrômetro digital. O tempo de residência das sacas neste local é curto, uma vez que os amendoins são beneficiados a partir de pedidos de fornecedores e emprega-se o sistema PEPS (O Primeiro que Entra é o Primeiro que Sai), seguindo os pedidos e evitando-se o armazenamento prolongado do amendoim em grãos.

Após a liberação, os lotes foram embarcados em caminhões que foram vistoriados para que fosse verificado o estado da carroceria e das lonas do veículo transportador, no caso de venda para o mercado nacional, ou fossem verificadas as condições dos containeres, em caso de venda para o mercado externo. O transporte é um Ponto Crítico de Controle (**PCC 7 – Q**), uma vez que é fundamental garantir-se que, durante o transporte, a carga não seja molhada nem que as condições de temperatura e umidade relativa sejam favoráveis ao crescimento dos fungos e produção de aflatoxina.

Pelo apresentado neste item, observa-se que, apesar de o processo de beneficiamento ser bastante simples, a implantação de um plano APPCC é bastante complexa, uma vez que, para o controle estrito das variáveis interferentes no metabolismo dos fungos e na produção da micotoxina, seriam necessários investimentos elevados, fora da realidade média dos beneficiadores nacionais. Por outro lado, não é possível obter-se de modo absoluto a segurança alimentar, uma vez que, ao não controlar estas variáveis, as medidas adotadas são paliativas e sujeitas a erros não previstos, como os de amostragem, que podem comprometer a qualidade do produto.

4.1.2 Análise de Risco à Saúde e Significância dos Perigos na Empresa A - Beneficiamento de Grãos de Amendoim.

Para avaliar a significância do risco de infestação dos fungos e a ocorrência de aflatoxina nos grãos, procedeu-se a uma análise das possíveis fontes de contaminação. Como anteriormente destacado, as Boas Práticas Agrícolas deveriam constituir-se num dos pré-requisitos do plano APPCC da Empresa A, que deveria auditar seus fornecedores. Dentre os aspectos mais expressivos que deveriam ser avaliados, estão a calagem do solo, a maturação das plantas, a precipitação chuvosa na época da colheita, o emprego correto das colheitadeiras e as técnicas de secagem no campo (FERNANDEZ et al,1997; FONSECA, 1983; GODOY; MARCOS; CÂMARA, 1983). No entanto, estas variáveis não foram aferidas ao longo deste trabalho, assumindo-se que tenham sido devidamente monitoradas.

Como descrito pelo Instituto de Economia Agrícola (2006), no Brasil tem-se a colheita do amendoim das águas e da seca, conforme pode ser visto na Tabela 2.1, no Capítulo 2. Para correlacionar a ocorrência de aflatoxina com as condições ambientais, foram comparados o teor de aflatoxina nos lotes recebidos pela Empresa A e a precipitação chuvosa na cidade de Tupã ao longo dos anos de 2004 a 2006. Na Tabela 4.1, são apresentados dados de precipitação chuvosa fornecidos pela Casa da Agricultura de Tupã – CAT, e nas Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4, estão apresentados os levantamentos dos lotes recebidos com contaminação de aflatoxina de 0 a 4 ppb, de 4 a 10 ppb, de 10 a 20 ppb e acima de 20 ppb, classificação empregada pela Empresa A para definir o destino dos lotes, como foi apresentado na descrição do processo.

Tabela 4.1 – Média mensal de precipitação chuvosa na cidade de Tupã nos anos de 2004, 2005 e 2006.

Mês	Média mensal de índice pluviométrico (mm) no ano de 2004	Média mensal de índice pluviométrico (mm) no ano de 2005	Média mensal de índice pluviométrico (mm) no ano de 2006
Janeiro	8,38	10,18	4,69
Fevereiro	1,64	0,70	10,51
Março	3,21	6,11	5,11
Abril	5,56	2,37	1,32
Mai	5,26	0,93	0,81
Junho	1,76	0,96	0,25
Julho	1,69	0,24	1,08
Agosto	0	0,29	0,55
Setembro	0,19	3,30	3,02
Outubro	5,53	4,86	2,98
Novembro	8,61	2,44	1,51
Dezembro	4,80	3,87	10,01
Total	46,34	35,6	41,95

Tabela 4.2 - Índice de aflatoxina nos lotes de amendoim recebidos no ano de 2004.

Mês	Total de lotes	Até 4 ppb		De 4 a 10 ppb		De 10 a 20 ppb		Acima de 20 ppb	
		nº de lotes	%	nº de lotes	%	nº de lotes	%	nº de lotes	%
Janeiro	37	34	91,9	0	0,0	1	2,7	2	5,4
Fevereiro	105	88	83,8	7	6,7	1	1,0	9	8,6
Março	214	204	95,3	5	2,3	2	0,9	3	1,4
Abril	41	40	97,6	0	0,0	0	0,0	1	2,4
Mai	41	37	90,2	0	0,0	1	2,4	3	7,3
Junho	98	91	92,9	3	3,1	0	0,0	4	4,1
Julho	79	71	89,9	2	2,5	0	0,0	6	7,6
Agosto	21	14	66,7	3	14,3	1	4,8	3	14,3
Setembro	50	39	78,0	4	8,0	4	8,0	3	6,0
Outubro	34	27	79,4	2	5,9	3	8,8	2	5,9
Novembro	39	26	66,7	6	15,4	1	2,6	6	15,4
Dezembro	4	2	50,0	2	50,0	0	0,0	0	0,0
Total	763	673	88,2	34	4,5	14	1,8	42	5,5

Tabela 4.3 - Índice de aflatoxina nos lotes de amendoim recebidos ano de 2005.

Mês	Total de lotes	Até 4 ppb		De 4 a 10 ppb		De 10 a 20 ppb		Acima de 20 ppb	
		nº de lotes	%	nº de lotes	%	nº de lotes	%	nº de lotes	%
Janeiro	29	20	69,0	7	24,1	1	3,4	1	3,4
Fevereiro	220	211	95,9	1	0,5	3	1,4	5	2,3
Março	179	140	78,2	7	3,9	9	5,0	23	12,8
Abril	198	129	65,2	16	8,1	9	4,5	44	22,2
Maiο	63	44	69,8	4	6,3	2	3,2	13	20,6
Junho	68	47	69,1	10	14,7	3	4,4	8	11,8
Julho	34	25	73,5	2	5,9	1	2,9	6	17,6
Agosto	12	12	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Setembro	0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Outubro	40	34	85,0	2	5,0	1	2,5	3	7,5
Novembro	10	7	70,0	2	20,0	1	10,0	0	0,0
Dezembro	6	5	83,3	1	16,7	0	0,0	0	0,0
Total	859	674	78,5	52	6,1	30	3,5	103	12,0

Tabela 4.4 - Índice de aflatoxina nos lotes de amendoim recebidos ano de 2006.

Mês	Total de lotes	Até 4 ppb		De 4 a 10 ppb		De 10 a 20 ppb		Acima de 20 ppb	
		nº de lotes	%	nº de lotes	%	nº de lotes	%	nº de lotes	%
Janeiro	46	43	93,5	1	2,2	2	4,3	0	0,0
Fevereiro	220	196	89,1	12	5,5	7	3,2	5	2,3
Março	117	88	75,2	12	10,3	8	6,8	9	7,7
Abril	104	94	90,4	3	2,9	2	1,9	5	4,8
Maiο	47	41	87,2	3	6,4	1	2,1	2	4,3
Junho	43	20	46,5	10	23,3	5	11,6	8	18,6
Julho	28	10	35,7	6	21,4	4	14,3	8	28,6
Agosto	16	4	25,0	2	12,5	2	12,5	8	50,0
Setembro	0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Outubro	19	13	68,4	0	0,0	0	0,0	6	31,6
Novembro	0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Dezembro	0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Total	640	509	79,5	49	7,7	31	4,8	51	8,0

Tabela 4.5 - Índice de aflatoxina nos lotes beneficiados em 2004.

Mês	0 a 4 ppb (%)	4 a 10 ppb (%)	10 a 20 ppb (%)	Acima de 20 ppb (%)
Janeiro	100,0	0,00	0,0	0,0
Fevereiro	95,7	3,20	1,1	0,0
Março	95,6	2,80	1,6	0,0
Abril	97,6	2,40	0,0	0,0
Maio	94,0	3,80	1,8	0,4
Junho	93,4	5,20	1,0	0,4
Julho	89,0	2,40	0,8	7,8
Agosto	77,6	7,00	3,2	12,2
Setembro	90,7	3,50	3,0	2,8
Outubro	88,5	4,50	3,9	3,1
Novembro	92,0	5,10	1,6	1,3
Dezembro	87,8	7,90	1,7	2,6
Total	90,9	4,30	1,8	3,0

Tabela 4.6 - Índice de aflatoxina nos lotes beneficiados em 2005.

Mês	0 a 4 ppb (%)	4 a 10 ppb (%)	10 a 20 ppb (%)	Acima de 20 ppb (%)
Janeiro	97,0	2,8	0,0	0,2
Fevereiro	94,6	2,9	1,5	1,0
Março	93,0	4,8	1,1	1,1
Abril	89,9	5,7	1,2	3,2
Maio	84,4	4,9	2,3	8,4
Junho	72,4	13,8	6,5	7,3
Julho	68,6	12,4	7,0	12,0
Agosto	54,2	18,0	7,9	19,9
Setembro	24,1	15,8	21,5	38,5
Outubro	59,5	14,4	7,4	18,6
Novembro	27,8	10,2	15,3	46,7
Dezembro	36,1	6,0	11,1	46,7
Total	67,2	9,6	6,9	16,3

Tabela 4.7 - Índice de aflatoxina nos lotes beneficiados em 2006.

Mês	0 a 4 ppb (%)	4 a 10 ppb (%)	10 a 20 ppb (%)	Acima de 20 ppb (%)
Janeiro	74,7	2,2	3,5	19,6
Fevereiro	91,7	8,3	0,0	0,0
Março	78,7	13,7	6,7	1,0
Abril	83,5	10,9	2,0	3,5
Mai	93,8	5,4	0,8	0,0
Junho	58,3	18,9	19,6	3,2
Julho	43,0	26,2	15,2	15,6
Agosto	52,9	8,8	7,8	30,4
Setembro	18,3	9,8	13,0	58,9
Outubro	62,5	9,8	0,1	27,6
Novembro	0,0	0,0	0,0	0,0
Dezembro	0,0	0,0	0,0	0,0
Total	66,2	12,4	7,8	13,7

Ao representar graficamente o comportamento da precipitação chuvosa em função da quantidade de lotes recebidos com índices de contaminação acima de 10 ppb (Figura 4.4), observa-se, que no ano de 2004, houve uma distribuição mais uniforme das chuvas ao longo do ano, ao contrário dos anos de 2005 e 2006, anos em que as chuvas foram mais concentradas. Observou-se, ainda, que a porcentagem de lotes contaminados no recebimento em 2004 também foi mais uniformemente distribuída ao longo do ano, enquanto que, em 2005 e 2006, houve uma maior concentração no primeiro semestre. Desta forma, parece haver uma relação direta entre a precipitação chuvosa e a quantidade de lotes contaminados, embora seja difícil estabelecer um modelo de previsão a partir da quantidade reduzida de dados disponíveis.

Este tipo de informação é importante para empresas de beneficiamento para que aumentem o rigor no controle dos lotes recebidos na época das chuvas, além de preparar em cronogramas de armazenamento e processamento de lotes com altos índices de contaminação.

Na Figura 4.5, estão apresentados os lotes beneficiados com o índice de aflatoxina superior a 20 ppb, em comparação à porcentagem de chuva dos anos de 2004, 2005 e 2006.

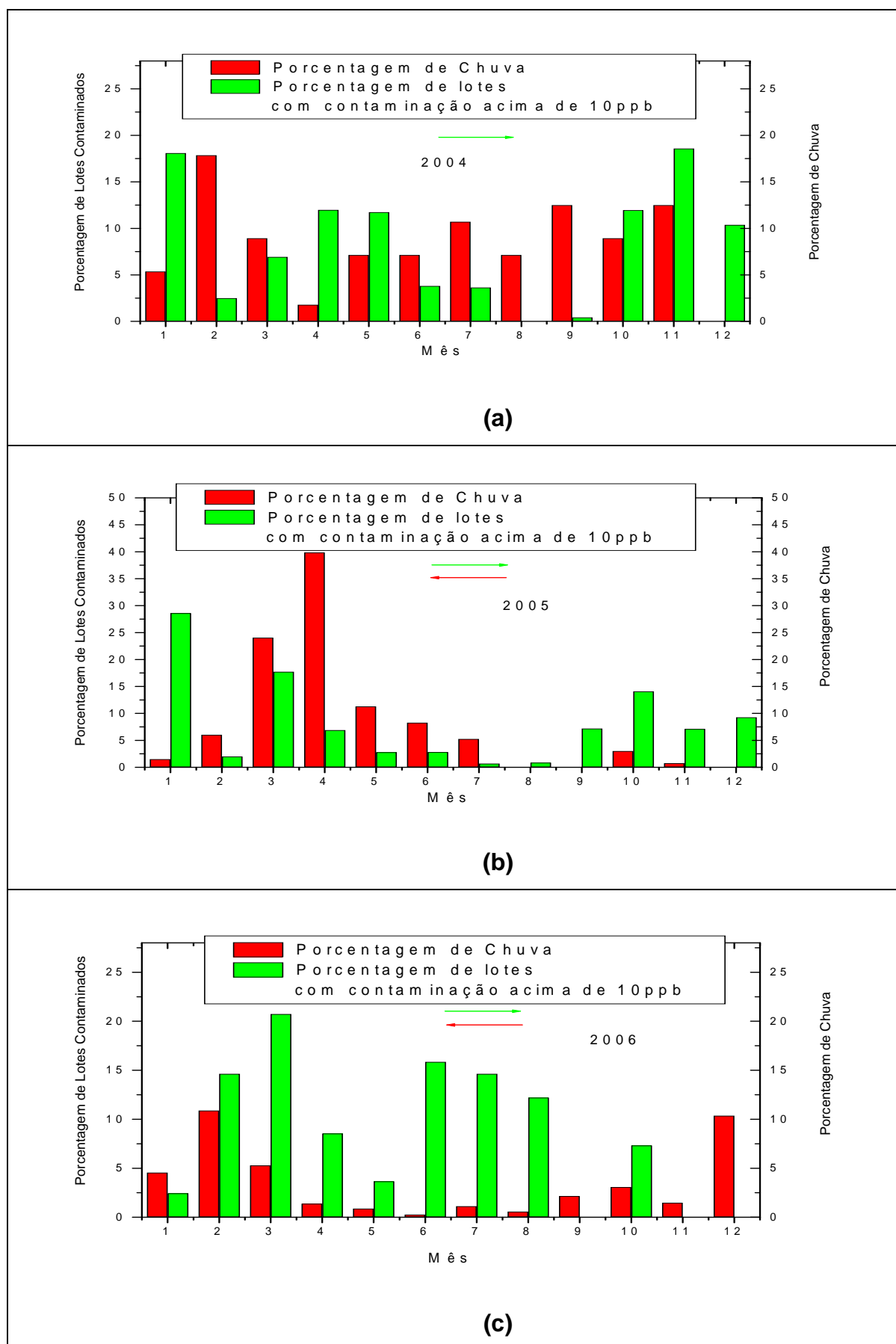


Figura 4.4 – Lotes recebidos pela Empresa A com contaminação por aflatoxina superiores a 10 ppb e distribuição mensal de chuvas (a - 2004; b - 2005; c - 2006).

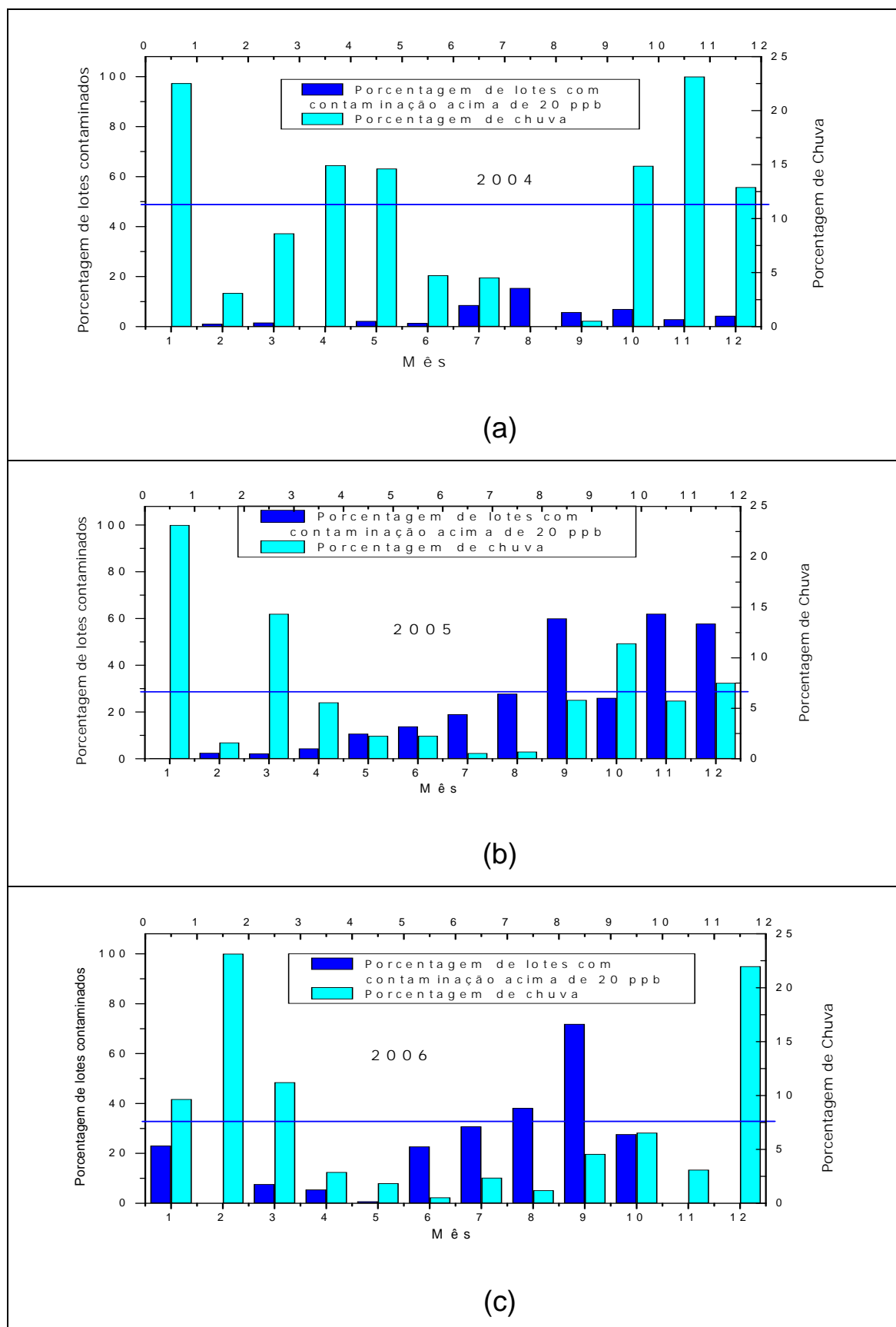


Figura 4.5: Lotes beneficiados pela Empresa A com contaminação por aflatoxina superiores a 20 ppb e distribuição mensal de chuvas (a – 2004; b - 2005; c – 2006)

Quando é comparada a precipitação chuvosa dos três anos e os lotes contaminados acima de 10 ppb após o beneficiamento, (Figura 4.6), observa-se que, no ano de 2005, embora o índice pluviométrico tenha sido mais baixo que nos outros anos, a contaminação dos lotes foi maior. Isto ocorreu em função do vazamento de água das chuvas para dentro de um dos galpões naquele ano, como relatou o Coordenador de Qualidade da Empresa A. Deste modo, reafirma-se a necessidade de rigor nos pré-requisitos do plano APPCC, uma vez que a manutenção preventiva das instalações é parte das Boas Práticas de Fabricação (BPF). De todo modo, não foi possível estabelecer uma correlação factível entre a precipitação anual de chuvas e a quantidade de lotes com elevado índice de contaminação, haja visto que, para o ano de 2004, a precipitação foi superior às dos demais anos e a quantidade de amendoim contaminado foi a menor.

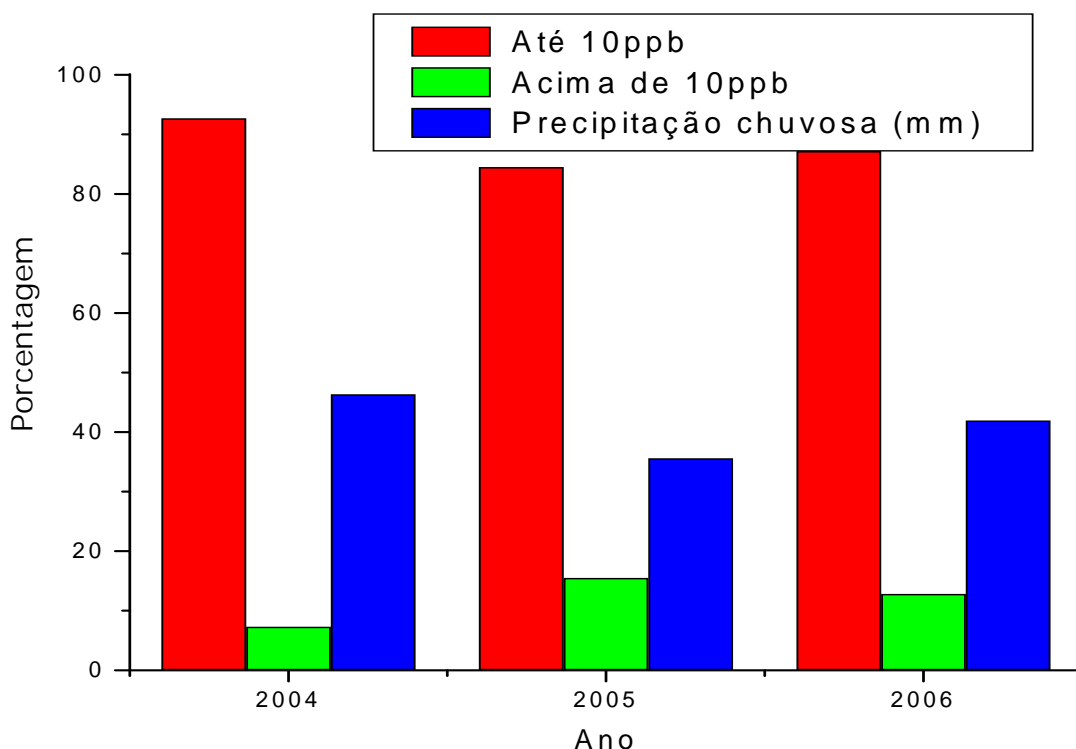


Figura 4.6 - Índice pluviométrico dos três anos e os lotes contaminados no recebimento até 10 ppb.

Um fator que talvez deva ser levado em consideração quando se relaciona a precipitação chuvosa e a intensidade de contaminação é a precipitação chuvosa diária durante o período. Na Figura 4.7, são apresentados dados fornecidos por Fernandez et al. (1997) acerca da umidade dos grãos em função da umidade relativa do ar no período da colheita, para culturas cultivadas em Botucatu – SP, com e sem a adição de cal no solo. Note-se que há uma tendência da umidade dos grãos diminuírem com a diminuição da umidade relativa do ar. Nesta situação, os grãos colhidos em dias muito úmidos apresentam umidades acima de 50 % (b.u.), o que representa um alto risco de infestação e conseqüente produção de aflatoxina. Dependendo das condições ambientais no momento da colheita, as vagens não poderão ser secas a céu aberto, o que representa um custo adicional de energia nas empresas de beneficiamento para a secagem até uma umidade de 9%. Ademais, esta secagem não poderá ser realizada de forma rápida, uma vez que taxas elevadas de secagem estão relacionadas à danificação das cascas, o que, por sua vez, leva a uma maior produção de aflatoxina (FERNANDEZ et al., 1997). Por outro lado, o agricultor não pode esperar indefinidamente para remover as vagens do solo, uma vez que estágios avançados de maturação da planta também são favoráveis à produção de aflatoxina.

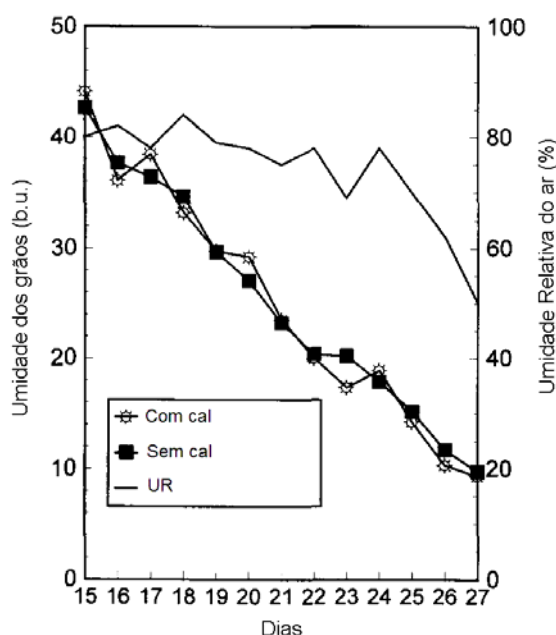


Figura 4.7 - Variação da umidade dos grãos em função da umidade relativa do ar para o mês de fevereiro. Extraído de FERNANDEZ et al. (1997).

É importante destacar que a dinâmica da empresa é de beneficiar primeiro os lotes com baixo índice de aflatoxina e vendê-los para o mercado de indústrias de doces e exportação, para depois beneficiar os lotes com teores maiores de contaminações, evitando assim as contaminações cruzadas durante o processo. Apesar da quantidade de amendoim com alto teor de contaminação ser muito inferior àquela com baixo teor de contaminação, o beneficiador deve prever os espaços necessários para o armazenamento dos grãos em todos os níveis de contaminação e programar a comercialização dos dois tipos, tanto para produtos derivados de amendoim, como doces e salgados, como para a produção de óleo e sementes. A Figura 4.8 fornece informações das quantidades a serem estocadas, as quais, para índices acima de 10 ppb, podem chegar a 2000 toneladas.

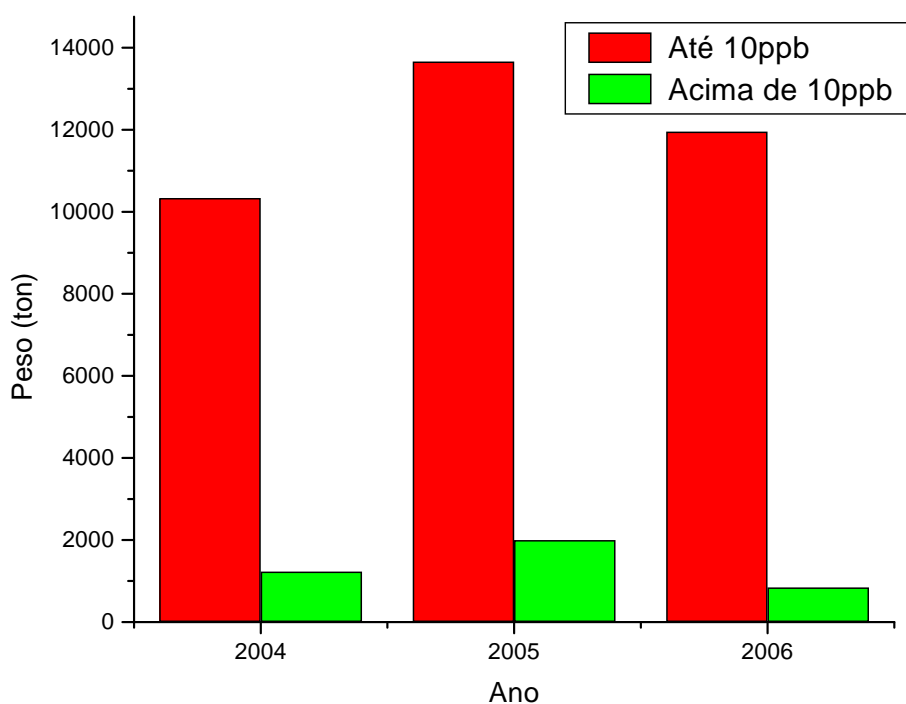


Figura 4.8 – Quantidade de grãos recebidos até 10 ppb e acima de 10ppb e índice de aflatoxinas.

Desta forma, o risco de ocorrência do perigo químico aflatoxina é sempre elevado no recebimento dos lotes, uma vez que os processos de beneficiamento e de fabricação de doces não serão capazes de reduzir os níveis de aflatoxina. Portanto, como as informações técnicas ainda não são conclusivas a respeito dos fatores que ocasionam a produção da toxina e os pré-requisitos de Boas Práticas Agrícolas ainda estão longe de serem satisfeitos no cenário local, sempre haverá risco para o beneficiador de recebimento de lotes contaminados. Do mesmo modo, como os pré-requisitos de Boas Práticas de Fabricação na Empresa A ainda são falhos, seja em termos de manutenção, seja em investimentos necessários à climatização dos armazéns dos grãos sadios, sempre haverá risco elevado de serem liberados grãos com altos teores de contaminação juntamente com grãos sadios. Portanto, a significância do perigo químico aflatoxina é crítica em vários pontos do processamento da Empresa A, como mostra a Tabela 4.8.

Pode-se dizer que o risco é médio nas etapas do processo onde os controles são efetivos, ou seja, naquelas etapas em que quando o limite crítico é detectado pelas análises, os lotes de amendoim são destinados, conforme as suas contaminações, para óleo e semente, não sendo liberados para o consumo humano. Neste contexto, a etapa de ensaque também é importante, uma vez que nela é definido qual realmente será o destino de cada lote, de acordo com o índice de aflatoxinas.

Tabela 4.8 - Análises de Risco à Saúde e Significância dos Perigos na Empresa

A – Beneficiamento de Grãos de Amendoim.

Empresa	Etapa	Perigo / PCC	Risco	Severidade	Significância do Perigo
Empresa A (Beneficiamento de Grãos de Amendoim)	Pré-limpeza I / Amostragem/ Análises físico-químicas I	Micotoxinas PCC 1 (Q)	Alto	Alta	Crítica
	Secagem	Micotoxinas PCC 2 (Q)	Médio	Alta	Maior
	Pré-limpeza II/ Análises físico-químicas II – Umidade e rendimento	Micotoxinas PCC 3 (Q)	Médio	Alta	Maior
	Armazenamento do amendoim (vagem)	Micotoxinas – PCC 4 (Q)	Alto	Alta	Crítica
	Ensaque/ Análise física e química de Aflatoxina / Detector de metal e Amostragem	Micotoxinas PCC 5 (Q)	Médio	Alta	Maior
	Armazenamento de grãos/ Expurgo	Micotoxinas PCC 6 (Q)	Alto	Alta	Crítica
	Transporte	Micotoxinas PCC 7 (Q)	Alto	Alta	Crítica

4.1.3 Resumo do plano APPCC da Empresa A – Beneficiamento de grãos de amendoim para o perigo químico Aflatoxina.

Para apresentar o resumo do plano APPCC para a avaliação do perigo químico aflatoxina na Empresa A, deve-se levar em consideração que os pontos de controle (PC) das etapas do processo são monitorados pelos procedimentos das Boas Práticas de Fabricação, e os pontos críticos de controle químicos para Aflatoxina (PCC - Q) são apresentados nas Tabelas 4.9, 4.10 e 4.11, juntamente com suas medidas preventivas, limites críticos, monitoramento, ações corretivas, registros e verificação.

Tabela 4.9 - Formulário N – Resumo do plano APPCC – Empresa A

Etapa	PC/ PCC	Perigo	Medidas Preventivas	Limite Crítico	Monitoramento	Ações Corretivas	Registros	Verificação
Pré-limpeza I / Amostragem/ Análises físico- químicas I	PCC 1 (B, Q)	Q: Micotoxinas de fungos (Aflatoxina)	Exigir qualificação dos fornecedores e realizar análise imediate de umidade em cada lote de amendoim. Solicitar a umidade abaixo de 30%(b.u.) e 11% (b.s.) (RDC 172 do MS). Exigir lotes com condições organolépticas adequadas	Umidade das vagens abaixo de 30% (b.u.) 11% (b.s.) (RDC 172 do MS). Baixo índice de sujidades e vagens sem manchas e íntegras.	O quê? Certificado de qualificação do fornecedor e observação visual do lote; laudo de análise de aflatoxina e umidade dos lotes. Como? Observação visual e análise de aflatoxina e umidade. Quando? A cada lote. Quem? O responsável pelo recebimento e o técnico de laboratório.	Enviar o lote para a produção de óleo ou sementes. Solicitar novamente a qualificação do fornecedor. Realizar novas amostragens e análises.	Planilha de recebimento de matéria- prima e análises de umidade, de aflatoxinas, laudos e registros dos fornecedo- res.	Observação visual das planilhas de controle de análises, dos laudos e registros dos fornecedores.
Secagem	PCC 2 (B, Q)	Q: Micotoxinas de fungos (Aflatoxina)	Realizar a secagem controlando o tempo, a temperatura e a umidade final das vagens para que os fungos não se multipliquem.	Temperatura entre 36 a 38º C em até 48 horas. Umidade das vagens abaixo de 11% (RDC 172 do MS). Limite de segurança é 9 % de umidade dos grãos.	O quê? Controlar o tempo, a temperatura de secagem e a umidade final dos grãos. Como? Observação visual do termopar e do relógio do secador e realização de análise de umidade durante a secagem. Quando? A cada lote. Quem? O responsável pela secagem e o técnico de laboratório	Ajustar a temperatura de secagem e realizar manutenção preventiva no secador.	Planilha de controle de tempo, temperatura e de umidade na secagem. Controle de manutenção do secador	Observação visual das planilhas. Análise de umidade após o período de secagem.

Tabela 4.10 - Formulário N – Resumo do plano APPCC – Empresa A.

Etapa	PC/ PCC	Perigo	Medidas Preventivas	Limite Crítico	Monitoramento	Ações Corretivas	Registros	Verificação
Pré-limpeza II/ Análises físico-químicas II – Umidade e rendimento	PCC 3 (Q)	Q: Micotoxinas de fungos (Aflatoxina).	Realizar controle de umidade dos grãos de amendoim em vagens para prevenir o crescimento de fungos.	Umidade abaixo de 11 % (RDC 172 do MS). Limite de segurança é 9%.	O quê? Controlar a umidade final dos grãos. Como? Realização de análise de umidade. Quando? A cada lote. Quem? O técnico de laboratório.	Realizar novas amostragens e análises. Secar novamente e passar novamente nas peneiras.	Planilha de análise de umidade e rendimento e sujidades na pré-limpeza.	Observação visual das planilhas. Análise de umidade e rendimento, quando necessária confirmação dos resultados.
Armazenamento do amendoim (vagem)	PCC 4 (Q)	Q: Micotoxinas de fungos (Aflatoxina).	Realizar controle de umidade dos grãos e monitorar a umidade relativa e a temperatura dos armazéns. Controlar as condições de armazenamento e o PEPS e separar os lotes por índice de aflatoxina inicial. Expurgar a cada 30 dias.	Umidade abaixo de 11 % (RDC 172 do MS). Limite de segurança é 9%. Temperatura do ar abaixo de 25° C e umidade relativa 68 %.	O quê? A temperatura e as condições de armazenamento e a umidade relativa e temperatura do ar e umidade dos grãos. Como? Por termohigrômetro e análise de umidade dos grãos e pelo PEPS. Quando? Diariamente. Quem? O responsável do armazém e o técnico de laboratório.	Secar novamente o lote e melhorar as condições de armazenamento com ventilação, mantendo a umidade relativa abaixo de 68%.	Planilha de controle de temperatura e umidade do termohigrômetro e de controle de umidade do grão, controle do PEPS.	Observação visual das planilhas. Análise de umidade durante o período de armazenamento.
Ensaque/ Análise física e química de Aflatoxina Detector de metal e Amostragem	PCC 5 (Q)	Q: Micotoxinas de fungos (Aflatoxina).	Analisar a aflatoxina e umidade para destinar o lote para doce; se estiver contaminado fora do limite, este lote será destinado para óleo ou sementes.	Para as aflatoxinas: B1 + B2 + G1 + G2 < 20 ppb (Mercosul GM / RES nº56/ (1994). Umidade dos grãos abaixo de 8% (RDC 172 do MS).	O quê? O índice de aflatoxina e umidade dos grãos. Como? Observação visual dos grãos em sacos aleatórios após o ensaqui. Análise de aflatoxina e umidade. Quando? A cada lote. Quem? O responsável pelo ensacamento.	Desviar os grãos para semente ou óleo.	Planilha de controle de sacos ensacados. Planilha de análises de lotes beneficiados.	Planilha de controle de ensaqui. Planilha de análises de lotes beneficiados.

Tabela 4.11 - Formulário N – Resumo do plano APPCC – Empresa A.

Etapa	PC/ PCC	Perigo	Medidas Preventivas	Limite Crítico	Monitoramento	Ações Corretivas	Registros	Verificação
Armazenamento de grãos/ Expurgo	PCC 6 (Q)	Q: Micotoxinas de fungos (Aflatoxina).	Realizar controle de umidade dos grãos e o monitoramento da umidade relativa e temperatura dos armazéns. Controlar as condições de armazenamento e o PEPS e separar por índice de aflatoxina inicial. Expurgar a cada 30 dias.	Umidade de armazenamento dos grãos é de 8% Umidade relativa e temperatura do ar abaixo de 68% e 25° C.	O quê? A temperatura e as condições de armazenamento e a umidade relativa do ar e do grão. Como? Por um termohigrômetro e análise de umidade dos grãos e por observação visual. Quando? Diariamente. Quem? O responsável do armazém e o técnico de laboratório.	Melhorar as condições de armazenamento. Destinar o lote para sementes ou óleo.	Planilha de controle de temperatura e umidade do termohigrômetro e de controle de umidade dos grãos e do controle do PEPS.	Observação visual das planilhas. Análise de umidade durante o período de armazenamento
Transporte	PCC 7 (Q)	Q: Micotoxinas de fungos (Aflatoxina).	Realizar a proteção da carga com lonas no piso e acima da carga. Tomar os devidos cuidados para evitar que a carga absorva umidade. Treinamento do motorista.	As lonas de proteção adequadas sem furos, e as condições do caminhão sem aberturas nas portas ou buracos na carroceria.	O quê? Avaliação das condições das lonas e do caminhão através de Checklist. Lista de presença do treinamento do motorista. Como? Aplicação do Checklist de avaliação do caminhão e lonas. Quando? A cada viagem. Quem? O Motorista do caminhão.	Não carregar e solicitar outra unidade de transporte.	Planilha de controle do transporte da carga.	Observação da Planilha de controle do transporte da carga.

4.2 Resultados e discussão da Empresa B: Fabricação de doces de amendoim.

4.2.1 Avaliações do processo da Empresa B e seus pontos críticos de controle para o perigo químico aflatoxina (PCC – Q).

Na Figura 4.9, é apresentado o fluxograma de processo da Empresa B - Fabricação de doces de amendoim, tomando-se como exemplo o processo da paçoca caseira, onde já estão assinalados os PCC Q sugeridos. A seguir fez-se a descrição das etapas do processo com base nas visitas técnicas realizadas na indústria, durante as quais se observaram todos os controles adotados e as necessidades de medidas preventivas.

Nesta indústria, nos últimos anos, são realizadas as adequações necessárias para atender ao programa do Pró-amendoim da ABICAB. A empresa passou pela implantação das Boas Práticas de Fabricação e dos planos APPCC e foi auditada pela certificadora e pelo Ministério da Saúde para atender aos requisitos de segurança dos produtos à base de amendoim, com avaliações feitas por meio da resolução RDC Nº 172, de 4 de julho de 2003, MS. (BRASIL, 2003).

Do mesmo modo que para a empresa A, observou-se que a etapa de recepção também representa o principal ponto crítico de controle para o perigo químico aflatoxina no amendoim em grãos, torrados ou sem torra, que são recebidos. A análise dos lotes no recebimento deve ser criteriosa para a integridade dos produtos produzidos, uma vez que o processo não possui métodos para a destruição das aflatoxinas. Baseados nos resultados obtidos da Empresa A, não é possível assegurar que haja lotes não contaminados em qualquer época do ano nem que é maior a probabilidade de lotes contaminados esta entre os meses de junho a dezembro.

As indústrias de doces de amendoim necessitam de um laboratório para realizarem as análises dos lotes de amendoim que recebem, mesmo que estas sejam feitas por kits. A amostragem dos lotes segue o plano amostral descrito por Fonseca, apresentado na Tabela 2.2 do Capítulo 2.

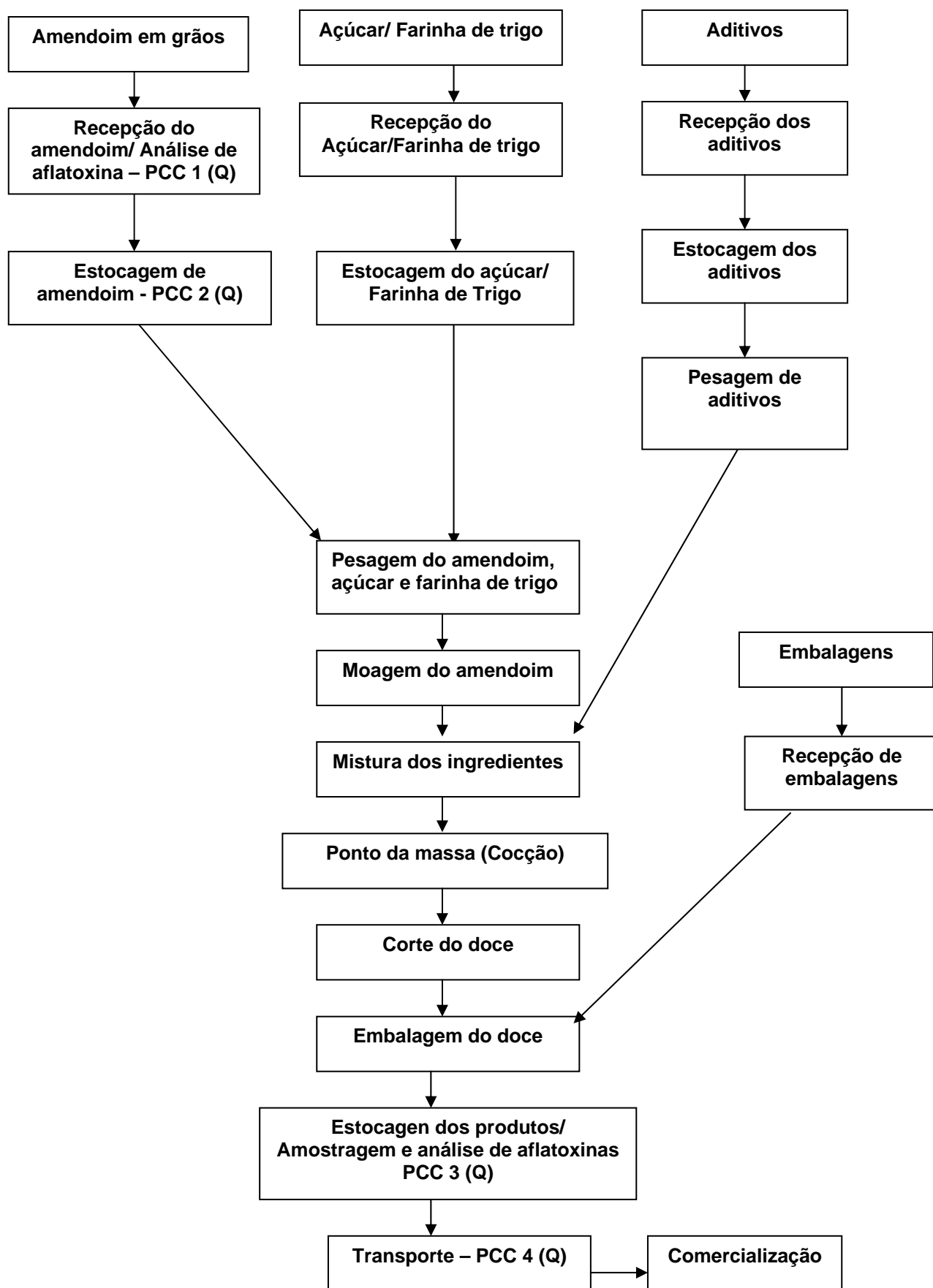


Figura 4.9 - Fluxograma de processo da Empresa B - Fabricação de doces de Amendoim (paçoca caseira).

Portanto, a recepção do amendoim é o **PCC 1 – Q**, sendo a qualificação dos fornecedores e os controles dos lotes no recebimento as medidas preventivas necessárias. É por meio das análises imediatas de aflatoxina e umidade em cada lote de amendoim que se previne a contaminação dos doces, mas mesmo assim não é possível garantir que os fungos não irão ter condições favoráveis de crescimento nos depósitos da indústria, podendo haver contaminação durante o processo. É importante aceitar apenas lotes com teor de aflatoxinas totais inferior a 20 ppb (BRASIL, 1996) e 8% de umidade do grão (BRASIL, 2003).

O amendoim é armazenado na fábrica em estoque exclusivo com capacidade para 30 toneladas. No armazém, conta-se com um termohigrômetro digital, que monitora a temperatura e a umidade relativa do ar, mas, do mesmo modo que na Empresa A, a etapa de armazenamento do amendoim em grãos também se reverte em um **PCC 2 – Q**, uma vez que o controle de temperatura e umidade relativa deve ser feito para que não haja proliferação dos fungos e conseqüente produção de aflatoxina. Como a empresa B também não conta com um sistema de desumidificação e refrigeração do armazém, o tempo de residência dos grãos neste ambiente deve ser mínimo.

Pelo que será exposto no Capítulo 12, dentro de um período de 15 dias com umidade relativa do ambiente acima de 85% e temperatura acima de 25° C, características próprias dos meses do início do ano, ocorreu a produção de aflatoxina, indicando que estas condições são ideais para que os índices de aflatoxina aumentem rapidamente e fiquem superiores aos da legislação, de modo que a rotação dos estoques deve ser realizada em, no máximo, 15 dias. Como medidas preventivas, devem-se manter a temperatura abaixo de 25 °C e a umidade relativa abaixo de 68 % no armazenamento (BAKKER ARKEMA, 1999), para limitar o desenvolvimento dos fungos e conseqüente produção de micotoxinas. Para a utilização das matérias-primas, é realizado na empresa um rígido controle de estoque dos lotes de amendoim (Primeiro que entra é o primeiro que sai – PEPS).

O amendoim pesado é transportado com o auxílio de carrinho manual até a sala de processamento, onde certa quantidade é transferida para o moedor e uma porção de amendoim (sem moer) é reservada para posterior utilização. Os grãos são moídos de modo a formar um composto com granulidade semelhante a uma farofa de amendoim, que é transportada, por meio de tachos, para um batedor.

Em tacho encamisado, misturaram-se açúcar, farinha de trigo, sal, ácido cítrico e água, e essa mistura foi aquecida até atingir 119 °C, quando se obtém uma calda esbranquiçada e bem líquida. A calda é então despejada em um tacho móvel e transportada até uma batedeira, para que seja misturada ao amendoim moído. Adiciona-se também o amendoim em grãos e o ácido sórbico à massa, que é batida até atingir o ponto (consistência ideal) a uma temperatura de 95 °C, verificada com um termopar, na qual são eliminados os fungos produtores de aflatoxina, mas não todos os esporos. Atingido o ponto, a massa de doce é despejada em tachos, pesada e transportada para as mesas de corte, com tampo de granito e pré-preparadas com uma camada de óleo comestível, o que facilita a retirada do doce depois de seco. O doce é despejado nas mesas, alisado e distribuído com o auxílio de espátulas. Para que o doce seja cortado, é necessário um tempo de repouso de aproximadamente 5 minutos, para que a massa seque uniformemente. A massa é então cortada em pedaços iguais, com o auxílio de facas e moldes, e o doce é então separado para formar grupos de pedaços que são destinados ao empacotamento.

Na embalagem manual, o doce recebe a embalagem plástica e rótulo, formando um pacote, que recebe a embalagem secundária (caixa de papelão ondulado). Os doces também podem ser embalados individualmente com filmes plásticos, por embaladeira mecânica.

As caixas de doces são empilhadas no estoque de produto acabado, umas sobre as outras, sobre pallets, evitando-se o contato da embalagem com o chão. O lote é amostrado para realização da análise de aflatoxina no produto final.

No armazenamento dos doces, é evidenciado um **PCC 3 – Q** para as toxinas fúngicas, cujos controles são manter a umidade relativa e temperatura abaixo dos índices que os fungos necessitam para realizarem o seu metabolismo. Nesta etapa, quando o doce já está pronto, é dificultado o crescimento do fungo devido às características do produto, que possui alta concentração de açúcar e baixa atividade de água. Mesmo assim, devem-se ter análises dos lotes que serão comercializados, a fim de assegurar que o índice de aflatoxina está dentro dos limites da legislação vigente.

A estocagem do produto é um ponto crítico de controle devido à possível presença de aflatoxinas. Novamente, é necessário realizar, no armazenamento, um monitoramento adequado dos parâmetros de umidade relativa, que deve ser inferior a 68 % (BAKKER ARKEMA, 1999), e de temperatura, que deve

ser menor que 25 °C, a fim de limitar o desenvolvimento dos fungos e a consequente produção de aflatoxinas. Além disso, deve-se realizar eficiente controle de PEPS.

O transporte do produto é realizado em caminhões vedados e adequados para o transporte dos doces, que é realizado em temperatura ambiente. Esta etapa é o **(PCC 4 – Q)**, uma vez que podem ser atingidas condições de temperatura e umidade relativa favoráveis ao desenvolvimento fúngico e à produção de aflatoxina durante as viagens. Por isso, o transporte deve ser realizado a pequenas ou médias distâncias e, preferencialmente, nos horários de temperatura ambiente mais baixa.

A comercialização dos produtos é realizada pelos distribuidores, que revendem para os pontos de venda como mercearias, bares, lanchonetes, supermercados e padarias, onde os produtos são mantidos à temperatura ambiente, devendo-se respeitar criteriosamente o prazo de validade indicado na embalagem do produto.

4.2.2 Análise de Risco à Saúde e Significância dos Perigos na Empresa B - Fabricação de doces de amendoim

Para se proceder a uma análise de risco na empresa B, apresentada na Tabela 4.12, seria necessário avaliar o histórico de ocorrências de lotes com toxinas ao longo das várias etapas do processo, o que não foi disponibilizado. Assim, a análise baseia-se nos dados do beneficiamento realizado pela empresa A e pelas condições apresentadas de implantação das Boas Práticas de Fabricação, com os controles sendo realizados em várias etapas do processo.

Avaliando-se os registros da empresa, observou-se que de acordo com as análises de aflatoxina na recepção do amendoim, foram rejeitados os lotes com o índice maior que 10 ppb e só foram aceitos lotes que se enquadraram nos limites. Nas avaliações do monitoramento realizado pela empresa, observou-se uma baixa probabilidade de produtos com contaminação por fungos e aflatoxina, o que provou a eficiência dos controles de umidade relativa e temperatura nas etapas de estocagem de grãos e produtos, logo o perigo químico aflatoxina é de risco baixo no doce pronto.

Tabela 4.12 - Análises de Risco à Saúde e Significância dos Perigos na Empresa B – Fabricação de doces de amendoim.

Empresa	Etapa	Perigo / PCC	Risco	Severidade	Significância do Perigo
Empresa B (Fabricação de Doce de Amendoim)	Recepção do Amendoim	Micotoxinas PCC 1 (Q)	Alto	Alta	Crítico
	Estocagem do Amendoim	Micotoxinas PCC 2 (Q)	Alto	Alta	Crítico
	Estocagem do Produto	Micotoxinas PCC 3 (Q)	Baixo	Alta	Menor
	Transporte	Micotoxinas PCC 4 (Q)	Baixo	Alta	Menor

4.2.3 Resumo do plano APPCC, da empresa B – Fabricação de doces de amendoim para o perigo químico Aflatoxina.

Para apresentar o resumo do plano APPCC para a avaliação do perigo químico Aflatoxina na empresa B, deve-se levar em consideração que os pontos de controle (PC) das etapas do processo são monitorados pelos procedimentos das Boas Práticas de Fabricação, e os pontos críticos de controle químicos para Aflatoxina (PCC - Q) são apresentados nas Tabelas 4.13 e 4.14, com suas medidas preventivas, limites críticos, monitoramento, ações corretivas, registros e verificação.

É importante dizer que nesta empresa as condições de Boas Práticas de Fabricação são realizadas pela equipe de qualidade, com a participação de todos os colaboradores fazendo os controles definidos pelo regulamento técnico das legislações atuais citadas.

Tabela 4.13 - Formulário N – Resumo do plano APPCC – Empresa B.

Etapa	PC/ PCC	Perigo	Medidas Preventivas	Limite Crítico	Monitoramento	Ações Corretivas	Registros	Verificação
Recepção do amendoim	PCC 1 (Q)	Q: Micotoxinas de fungos (Aflatoxina).	Exigir qualificação dos fornecedores, realizar análise imediata de aflatoxina e umidade em cada lote, exigir certificado de análise das empresas fornecedoras.	O limite é de B1 + B2 + G1 + G2 = 20 ppb, umidade abaixo de 8% (RDC 172). O limite de segurança é colocado em 10 ppb.	O quê? Certificado de qualificação do fornecedor, o laudo da análise do fornecedor e o resultado da análise imediata. Como? Observação visual do laudo e certificado e análise de aflatoxina do lote. Quando? A cada lote. Quem? O responsável pelo recebimento e o técnico de laboratório	Rejeitar o lote que apresentar o limite acima do limite de segurança.	Planilha de controle de recebimento e análises de aflatoxina.	Observação visual do certificado e laudo do fornecedor e das planilhas de controle de aflatoxina e umidade na recepção.
Estocagem de Amendoim	PCC 2 (Q)	Q : Micotoxinas de fungos (Aflatoxina).	Realizar o monitoramento da umidade relativa e da temperatura do depósito e o controle da umidade dos grãos. Controlar as condições de armazenamento e o PEPS.	Umidade dos grãos armazenados é de 8%. Umidade relativa do depósito até 68% e temperatura até 25° C.	O quê? A temperatura e a umidade relativa do ar, as condições de armazenamento e a umidade dos grãos. Como? Por um termohigrômetro e análise de umidade dos grãos e controle de PEPS. Quando? Semanalmente as análises de umidade dos grãos e diariamente as do depósito. Quem? O responsável do depósito e o técnico de laboratório	Colocar desumidificador no depósito e encaminhar para óleo os grãos com umidade fora do limite.	Planilha de controle de temperatura e umidade do termohigrômetro e de controle de umidade do grão. Planilha do PEPS.	Observação visual das planilhas. Análise de umidade durante o período de armazenamento

Tabela 4.14 - Formulário N – Resumo do plano APPCC – Empresa B

Etapa	PC/ PCC	Perigo	Medidas Preventivas	Limite Crítico	Monitoramento	Ações Corretivas	Registros	Verificação
Estocagem de produtos	PCC 3 (Q)	Micotoxinas de fungos (Aflatoxina).	Controle de umidade e temperatura do depósito. Controlar as condições de armazenamento e o PEPS. Analisar aflatoxina em amostras dos produtos.	Temperatura abaixo de 25º C e umidade relativa do ar abaixo de 68 % e de abaixo de 10 ppb de aflatoxina no produto.	O quê? A temperatura e umidade relativa do ar do depósito de produtos, as condições de armazenamento e o índice de aflatoxina do produto. Como? Por um termohigrometro e análise de aflatoxina. Quando? Diariamente e a cada lote para as análises. Quem? O responsável do depósito de produto e o técnico de laboratório.	Colocar desumidifi- cador no depósito e descartar o lote que estiver fora do limite de aflatoxina.	Planilha de controle de temperatura e umidade relativa do termohi- grômetro e de controle de análises de aflatoxina dos produtos.	Observação visual das planilhas. Análise de aflatoxina durante o período de armazena- mento.
Transporte	PCC 4 (Q)	Q: Micotoxinas de fungos (Aflatoxina).	Realizar a proteção da carga evitando furos no baú do caminhão. Tomar os devidos cuidados para evitar que a carga absorva umidade. Treinamento do motorista.	Condições do baú sem furos e boas condições do caminhão. Abaixo de 68% até 70%.	O quê? Avaliação das condições do baú do caminhão através de Chek-list. Lista de presença do treinamento. Como? Aplicação do Chek-list de avaliação do caminhão. Quando? A cada viagem. Quem? O Motorista do caminhão.	Não carregar e solicitar outra unidade de transporte.	Planilha de controle do transporte da carga.	Observação da Planilha de controle do transporte da carga.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES - PARTE A

1. Na análise do perigo químico Aflatoxina, observou-se, na Empresa A, que a probabilidade de ocorrência dos lotes com contaminação de aflatoxina acima de 20 ppb no recebimento foi maior nos meses do segundo semestre em todos os anos avaliados, e não no período das águas no início dos anos. Apesar das evidências de que há uma correlação causal entre a precipitação e a contaminação, não foi possível propor-se um modelo para esta correlação, devido à quantidade reduzida de dados disponíveis. Na avaliação da probabilidade de ocorrência dos lotes com contaminação acima de 20 ppb depois do beneficiamento, também ocorreu a presença de um número maior no segundo semestre. É importante destacar que a quantidade de grãos beneficiados com contaminação acima de 10 ppb foi de 1600, 2000 e 1500 toneladas nos três anos, e os contaminados com até 10 ppb foram de 10000, 14000 e 12000 toneladas, respectivamente, nos anos de 2004, 2005 e 2006.
2. Nas indústrias de beneficiamento e fabricação de doces de amendoim, o perigo químico aflatoxina possui a severidade alta em todas as etapas, pois a doença aflatoxinose é uma patologia grave aos seres humanos e animais. O risco (probabilidade de ocorrência) foi considerado alto quando a ocorrência deste foi alta, portanto a significância do perigo foi crítica nas etapas de recebimento, armazenamento e transporte em ambas as empresas.
3. Na Empresa A, os PCCs químicos pelo perigo aflatoxina foram identificados nas etapas de Pré-limpeza I/ Amostragem/ análises físico-químicas I, Secagem, Pré-limpeza II/ Amostragem/ Análises físico-químicas II, Armazenamento de amendoim em vagem, Ensaque/ Análise físico-química III/ Detector de metal, Armazenamento de grãos/ Expurgo e Transporte II. As medidas preventivas são o controle de umidade dos grãos na secagem e em quase todas as etapas do processo, tendo como limite de segurança 9 % de umidade dos grãos ainda na

vagem; as análises de aflatoxina, com separação e destinos definidos para os lotes; o monitoramento da umidade relativa e temperatura do ambiente durante o armazenamento.

4. Na Empresa B, os pontos críticos de controle (PCCs) causados pelo perigo químico aflatoxina localizaram-se nas etapas de recepção e armazenamento de grãos, estocagem e transporte dos produtos, sendo as medidas preventivas a qualificação dos fornecedores, os controles de índice de aflatoxina e umidade dos grãos e o monitoramento da umidade relativa do ambiente dos depósitos de armazenamento de grãos e produtos prontos, além do controle das condições durante o transporte.
5. Portanto, esta parte deste trabalho mostra a necessidade da realização de um rígido controle de qualidade em toda a cadeia produtiva pelos proprietários, fornecedores e órgãos fiscalizadores, visando à oferta de amendoim e produtos derivados seguros à população. Além disso, o consumidor deve ter cuidados com a procedência e a garantia de qualidade dos produtos à base de amendoim encontrados no mercado, a fim de evitar a exposição a perigos significativos à sua saúde.

PARTE B

Isoterma de sorção para três variedades de amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

CAPÍTULO 6

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – PARTE B

6.1 O amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

6.1.1 Origem e difusão da planta

O amendoim é originário da América do Sul, sendo que espécies selvagens foram encontradas pelos indígenas em abundância nas regiões compreendida desde o sul do Amazonas, no Brasil, até o norte da Argentina. A difusão do amendoim iniciou-se pelos indígenas para as diversas regiões da América Latina, América Central e México e, no século XVIII, foi introduzido na Europa. No século XIX, difundiu-se do Brasil para a África e do Peru para as Filipinas, China, Japão e Índia (GILLIER; SILVESTRE, 1970).

6.1.2 A planta *Arachis hypogaea* L.

a) Classificação Botânica

O amendoim é a semente comestível da planta, *Arachis hypogaea* L. da família Fabaceae. É um membro da família da ervilha Fabaceae e seu fruto não é uma noz, mas um legume ou vagem. A planta do amendoim tem caule pequeno e folhas tri-folioladas, com abundante indumento, raiz aprumada, medindo entre 30 - 50 cm de altura. As flores são pequenas, amareladas e, depois de fecundadas, inclinam-se para o solo e o fruto desenvolve-se subterraneamente. A Figura 6.1 apresenta uma planta de amendoim.



Figura 6.1 - A planta Amendoim (*Arachis hypogaea* L.).

b) Características dos principais constituintes da planta

De acordo com Godoy; Marcos; Câmara (1983) as características são:

- **Ramas:** Ricas em minerais e extratos não nitrogenados, são fonte de proteínas, além da celulose ser um valioso alimento para o gado.

- **Frutos:**

Cascas – correspondem a aproximadamente 25 a 35% do peso dos frutos secos, sendo que o principal constituinte, a celulose, representa de 60 a 65% do total dos componentes; seu teor de proteína é em torno de 6 a 7 %, e contêm poucos minerais.

Sementes – apresentam, normalmente, até 30% de umidade, 22 a 30% de proteína, 43 a 54% de matérias graxas, 10 a 16% de carboidratos, 3 a 4% de fibras, 1 a 3% de minerais e contêm vitaminas B₁, B₂, Niacina e vitamina E.

- **Tegumento seminal:** Película que envolve os cotilédones, representa 3% em peso da semente, sendo que os seus constituintes em maior quantidade são as proteínas, que correspondem a 45 a 50% do seu conteúdo

c) Cultivares de amendoim

Nos últimos anos, os especialistas têm se dedicado a estabelecer critérios para classificar os tipos de amendoim, baseando-se nas características hereditárias fenotípicas, considerando o porte das plantas, a duração do ciclo vegetativo, o tamanho dos frutos, o número de sementes, o tipo de ramificação quanto à disposição das gemas reprodutivas e vegetativas (GILLIER; SILVESTRE, 1970). Os tipos de amendoim plantados no estado de São Paulo são, principalmente, Tatu ST, Tatu Vermelho, Caiapó e Runner IAC 886, cujas características podem ser observadas na Tabela 6.1 (IAC, 2006).

O resgate do amendoim como um alimento de alta qualidade proporcionou um aumento na safra devido ao desenvolvimento das variedades novas, como o Runner IAC 886 e o Caiapó, que possuem um aspecto físico melhor e uma qualidade dos grãos apreciada pelas indústrias de doces e de óleo, respectivamente. Com todas as melhorias, as indústrias de doces e salgados de amendoim aumentaram a sua produtividade e a qualidade dos produtos.

Tabela 6.1 - Variedades de amendoim produzidas no Brasil.

Propriedades	VARIEDADES	
	Tatu ST, Tatu	Caiapó, Runner IAC 886
Porte	Ereto	Rasteiro
Colheita	Ciclo precoce, entre 100 e 110 dias	Ciclo mais longo, entre 125 a 140 dias
Características	Vagem alongada, com 3 a 4 grãos pequenos, de pele vermelha	Vagem curta, com 2 grãos de tamanho médio e pele clara
Potencial produtivo	4500 quilos/hectare	6500 quilos/hectare
Produtividade média	2000 quilos/hectare	3000 quilos/hectare
Mercado preferencial	Interno	Externo

Fonte: Instituto Agrônomo de Campinas – IAC (2006).

6.2 Isotermas de sorção

Durante o armazenamento do amendoim, podem ocorrer mudanças físicas, químicas e microbiológicas que, dependendo da interação entre estes fatores e o ambiente, podem ocasionar perdas na sua qualidade. Assim, faz-se necessário o conhecimento das relações existentes entre o produto, a temperatura e a umidade relativa do ar, objetivando iniciativas e estudos com a finalidade de amenizar estas possíveis alterações (RESENDE et al, 2006).

Todos os produtos agrícolas têm a capacidade de ceder ou absorver água do ambiente, convergindo, constantemente, para uma relação de equilíbrio entre o teor de água e as condições do ar ambiente. Portanto o teor de água do equilíbrio é alcançado quando a pressão parcial de vapor de água no produto iguala-se a do ar que o envolve. A relação entre o teor de água de um determinado produto e a umidade de relativa de equilíbrio para uma temperatura específica pode ser expressa por meio de equações matemáticas que representam as curvas de equilíbrio higroscópico (RESENDE et al., 2006).

O comportamento higroscópico de diversos produtos agrícolas tem sido estudado por vários pesquisadores, que apresentaram diversos modelos para expressar o teor de água de equilíbrio em função da temperatura e umidade relativa do ar. A grande maioria dos modelos utilizados são empíricos, uma vez que os modelos teóricos não foram capazes de prever com precisão o teor de água de equilíbrio para uma ampla faixa de temperatura e umidade relativa do ar (RESENDE et al., 2006).

Em uma mistura de ar seco e vapor d'água, cada um dos componentes exerce uma certa pressão sobre o outro, denominada de pressão parcial. A diferença entre as pressões parciais de vapor d'água no ar e no produto é a força motriz para o processo de secagem. Assim, um sólido exposto a uma corrente contínua de ar não saturado, à temperatura constante, perde umidade até que a pressão de vapor no interior do sólido equipare-se à pressão parcial do vapor no gás. Nestas condições, estabelece-se o equilíbrio de concentrações de água presente no sólido e o gás, e o conteúdo de umidade do sólido neste ponto é denominado de **teor de umidade de equilíbrio (M_{eq})**. A partir deste ponto, por maior que seja o tempo de exposição do sólido ao ar de secagem, não ocorrerá mais

nenhuma modificação no seu teor de umidade. À correspondente pressão de vapor do meio na mesma temperatura denomina-se pressão de vapor de equilíbrio, e a razão entre a pressão de vapor de equilíbrio e a pressão de vapor de saturação é conhecida como umidade relativa de equilíbrio ou atividade de água (a_w) (GEANKOPLIS, 1993; MUJUMDAR, 1995; BARBOSA-CÁNOVAS; VEJA-MERCADO, 1996; HELDMAN; HARTEL, 2000).

Para determinar o teor de umidade de equilíbrio de um alimento, pode-se colocar uma amostra deste alimento em um ambiente de umidade e temperatura controladas; esta amostra irá entrar em equilíbrio higroscópico com o ambiente, e o teor final de água receberá o nome de umidade de equilíbrio, pois tem relação direta com a umidade do ambiente em que está. Como estes ensaios são realizados em temperaturas fixas, recebem o nome genérico de isothermas de sorção (JARDIM, 1987; VITALI, 1987; BAUCOUR; DAUDIN, 2000).

A determinação das isothermas de sorção para grãos é muito importante para o processo de armazenamento, pois, através da relação de umidade e atividade de água, em uma dada temperatura, podem-se obter parâmetros de armazenamento e prevenir a deterioração durante este processo (BIANCO et al., 2001). Um conjunto de resultados bastante difundido na literatura são as isothermas de Labuza (1975), apresentadas na Figura 6.2, que auxiliam em vários padrões de reações em relação à atividade de água dos alimentos.

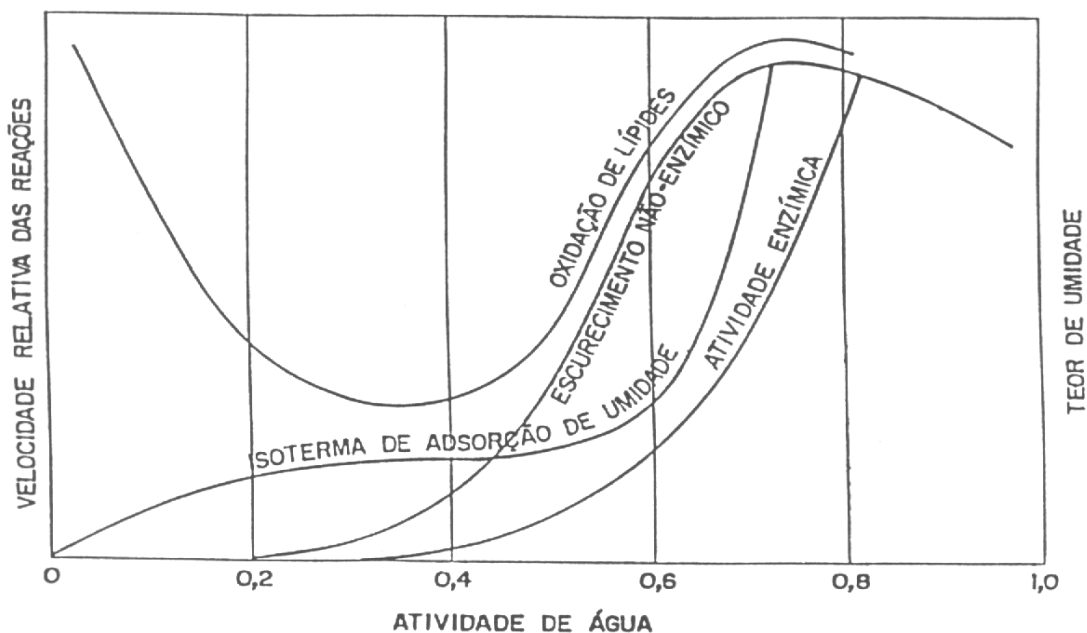


Figura 6.2 - Diferentes tipos de isothermas para materiais alimentícios. Extraído de LABUZA (1975).

Um dos métodos mais simples e baratos para obtenção das isotermas de sorção é o método estático gravimétrico, que consiste em colocar o material seco ou “in natura” em contato com ambientes em diversas umidades relativas até que se atinja o equilíbrio, para depois medir a umidade da amostra. Para isso, utilizam-se frascos herméticos com umidades relativas controladas por diferentes tipos de soluções de sais, ácidos ou outras substâncias. Através de soluções salinas, é mais fácil controlar a umidade relativa, pois mesmo que se altere o volume de água da solução, a umidade relativa não se altera se a solução permanecer saturada (TEIXEIRA NETO, 1987; BARROZO et al. 2000; CHEN, 2003).

Na década de 80, um grupo de laboratórios europeus desenvolveu um projeto para padronizar as técnicas de medidas de propriedades físicas de alimentos, o Projeto COST 90. Para a determinação das isotermas de sorção, a metodologia recomendava o uso de frascos de vidro com volume de 1L, submetidos a diferentes temperaturas, um recipiente para pesagem, contendo 1g de amostra, uma placa de Petri apoiada em um tripé e, no fundo do frasco, a presença de uma solução saturada de sal de UR conhecida. O tempo médio de equilíbrio da amostra utilizada com as condições operacionais empregadas foi de 14 dias (WOLF; SPIESS; JUNG, 1985; SPIESS; WOLF, 1987).

Fonseca (1983) reuniu os resultados dos trabalhos de Blatchford; Hall (1963) e Davey; Elcoate (1965), descrevendo, assim, a umidade de equilíbrio à 25° C de vários produtos de amendoim, conforme é apresentado na Tabela 6. 2.

Tabela 6.2 - Conteúdo de umidade de equilíbrio (% b.u.) no amendoim a 25° C e várias UR.

Constituinte	Umidade relativa (%)								
	45	50	60	70	75	80	85	90	95
Amendoim em casca	6,0	6,8	7,4	8,2	9,0	-	12,8	18,0	22,0
Amêndoa (grão)	4,8	5,4	6,2	7,2	8,0	9,3	11,3	14,3	20,0
Casca	0,1	11,0	11,8	13,0	14,4	-	16,0	20,0	24,0
Torta	-	-	-	12,3	14,0	16,3	19,0	23,5	-

Fonte: FONSECA (1983).

Trujillo; Yeow; Pham, (2003) utilizaram o método gravimétrico indicado pelo Projeto COST 90 com algumas modificações para acelerar o processo, e obtiveram sucesso na determinação de isotermas de sorção de carne bovina. As modificações introduzidas por estes autores foram reduzir o volume do pote hermético para 200mL, substituir a placa de Petri por uma tela de aço inox e diminuir a massa da amostra para 3mg. Com essas modificações, obtiveram umidades de equilíbrio em apenas 48 horas. Kimura; Maeda (1993) também utilizaram o método gravimétrico indicado pelo Projeto COST 90 para determinar isotermas de adsorção e obter informações importantes com relação à influência da concentração da solução e da variação no volume do recipiente utilizado.

Na Tabela 6.3, são apresentadas algumas das equações de previsão do comportamento higroscópico de materiais alimentícios, onde Meq é o teor de umidade de equilíbrio (% b.s.); UR é a umidade relativa; T_s é a temperatura absoluta; a , b , c e d são coeficientes que dependem do produto.

Tabela 6.3 - Modelos matemáticos utilizados para prever o fenômeno de higroscopicidade dos produtos agrícolas nas isotermas de sorção

Designação do modelo	Modelo	Equação
Chung-Pfost (**)	$Meq = \frac{-1}{b} \ln \left(\frac{(Ts + c) \ln(UR)}{-a} \right)$	(1)
Henderson (***)	$Meq = \ln \left(\frac{\ln(1 - UR)}{-aTs} \right)^{\frac{1}{b}}$	(2)
Henderson-Thompson (*)	$Meq = \ln \left(\frac{\ln(1 - UR)}{-aTs} \right)^{\frac{1}{b}}$	(3)
Chen-Clayton (****)	$Meq = \frac{-1}{cT_s^d} \ln \left(\frac{\ln(UR)}{-aT_s^b} \right)$	(4)
Halsey modificada (*)	$Meq = \left[\frac{-\exp(aTs + c)}{\ln(UR)} \right]^{\frac{1}{b}}$	(5)
Sabbah (*)	$Meq = a.(UR^b / T^c)$	(6)
Copace (*)	$Meq = \exp[a - (b.T) + (c.UR)]$	(7)
Sigma Copace (*)	$Meq = \exp\{a - (b.T) + \{c.\exp(UR)\}\}$	(8)
Oswin (*****)	$Meq = (a + b.T) / [(1 - UR) / UR]^{1/c}$	(9)

Extraído de: (*) RESENDE et al. (2006); (**) CHUNG; PFOST (1967); (***) HENDERSON (1952); (****) CHEN; CLAYTON (1971); (*****) OSWIN (1946).

CAPÍTULO 7

MATERIAIS E MÉTODOS – PARTE B

As amostras de amendoim foram fornecidas pelas empresas de beneficiamento de amendoim, e os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Medidas Físicas II, nas dependências do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA), do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP/São José do Rio Preto.

7.1 Materiais

7.1.1 Obtenção e preparo das amostras de amendoim

As amostras do amendoim de variedade Runner IAC 886 e Tatu-Vermelho em grãos foram coletadas na empresa *Cerealista Garcia Ltda.*, do município de Neves Paulista, e a amostra de Caiapó foi fornecida pela empresa *Amendopan - Produtos Alimentícios Ltda.*, da cidade de Tupã, ambas no Estado de São Paulo. Cerca de 25 kg de amostras de cada variedade foram acondicionadas em sacos de polietileno de parede espessa e foram transportadas até as dependências do DETA. Posteriormente, as amostras foram subdivididas em alíquotas de 10 g cada, acondicionadas em sacos de polietileno de parede espessa e foram, então, encaminhadas para a Companhia Brasileira de Esterilização, de Jarinu – SP, onde foram esterilizadas com radiação gama proveniente de fontes de Cobalto-60 e Césio-137, com intensidade de 6,8 kGy.

Após a esterilização, as amostras foram mantidas em câmara refrigerada a 2^o C durante o período de execução do projeto e, a cada ensaio, os sacos de amostras eram triturados manualmente com auxílio do macerador, e os grãos moídos eram pesados e colocados nos potes para os ensaios da isoterma.

7.1.2 Materiais para os ensaios higroscópicos

Na Figura 7.1, são apresentados os frascos empregados nos ensaios higroscópicos, que eram compostos de frascos de vidro de cerca de 0,2 L, com tampas de metal. Ao fundo do frasco foram colocadas as soluções salinas saturadas, que foram feitas com os sais de K_2CO_3 , NaBr, NaCl, KCl e $BaCl_2$. Sobre a solução salina foram colocados suportes de plástico que sustentavam telas de plástico e sobre estas, cestas plásticas contendo a amostra. Os frascos com as amostras foram colocados em câmara climática do tipo DBO, como pode ser visto na Figura 7.2, nas temperaturas previstas no planejamento experimental.

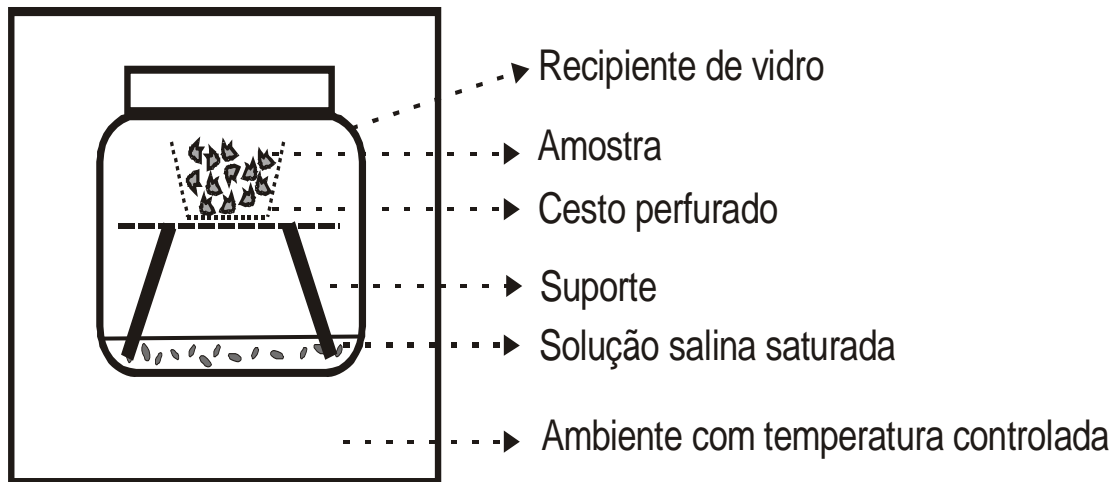


Figura 7.1: Frascos em atmosfera controlada em câmara de DBO.



Figura 7.2 – Frascos herméticos com as amostras na câmara de DBO.

7.1.3 Análise Centesimal das amostras

Devido ao fato de as variedades de amendoim terem suas composições diferentes, o que influencia na reprodutibilidade dos resultados, foram realizadas análises da composição centesimal das três variedades de amostras, por meio das técnicas recomendadas pela AOAC (1984) para determinação de lipídeos, proteínas, cinzas e umidade. Assim, a análise de proteína foi feita pelo método de Kjeldahl; para o teor de cinzas da amostra, adotou-se o método de incineração duplo; a extração de lipídeos da amostra foi por Bligh; Dyer (1959); e o método termogravimétrico foi utilizado para determinação de umidade. Todas as análises foram feitas em triplicata.

7.2 Método experimental

7.2.1 Método estático de umidade relativa controlada – isoterma de adsorção.

As amostras para os ensaios higroscópicos foram trituradas, e cerca de 1g de amostra foi pesada e colocada nas cestas de inox. Para evitar contaminação do amendoim, tomou-se a precaução de manipulá-las em câmara de fluxo laminar e ao redor de chama proveniente de bico de Bunsen quando fora da câmara. Os frascos de vidro foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 min, e os demais materiais foram banhados em solução de álcool 70% preparadas no momento do uso.

Para a determinação das isotermas de sorção, foram usadas as temperaturas de 25, 30 e 35°C, o que proporcionou as umidades relativas apresentadas na Tabela 7.1. As amostras foram inicialmente pesadas em balança analítica com exatidão de 1 mg, e o equilíbrio higroscópico foi admitido quando duas pesagens consecutivas diferiram apenas na 4ª casa decimal. Após ser atingido o equilíbrio higroscópico, as amostras foram colocadas em estufa de convecção forçada a 105 °C por 24h, de modo a se obter a umidade final das amostras.

Tabela 7.1: Níveis de umidade relativa e temperaturas empregadas nos ensaios de umidade de equilíbrio higroscópico.

Tratamentos do experimento			
Sal	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	25 (° C)	30 (° C)	35 (° C)
	UR (%)	UR (%)	UR (%)
K ₂ CO ₃ (*)	UR ₁ = 43,16	UR ₄ = 43,16	UR ₉ = 43,17
NaBr (*)	UR ₂ = 57,70	UR ₅ = 56,03	UR ₁₀ = 56,03
NaCl (*)	UR ₃ = 75,32	UR ₆ = 75,09	UR ₁₁ = 74,87
KCl (*)	UR ₄ = 84,34	UR ₇ = 83,62	UR ₁₂ = 82,95
BaCl ₂ (**)	UR ₅ = 90,30	UR ₈ = 89,90	UR ₁₃ = 89,50

Extraído de (*) (RESNIK; CHERIFE, 1988) e (**) (GREENSPAN, 1977).

7.2.2 Procedimento de cálculo

Os modelos matemáticos apresentados na Tabela 6.3 foram ajustados aos dados experimentais de umidade de equilíbrio higroscópico através do método de mínimos quadrados não-linear, que pode ser representado pela seguinte função objetivo (F):

$$F = \sum_{i=1}^n (Y_{\text{exp}} - Y_{\text{calc}})_i^2 \quad (10)$$

sendo:

Y_{exp} = variável de resposta experimental

Y_{calc} = valor estimado pelo modelo

n = número de pontos experimentais

Para otimizar a busca dos valores mínimos, foi empregado o algoritmo Quasi-Newton do programa estatístico STATISTICA 6.0®. Foram testados

vários valores iniciais dos parâmetros para certificação da obtenção de mínimos globais. Os modelos foram discriminados quanto ao coeficiente de determinação (R^2), e a estatística t_{student} de cada parâmetro calculado, foi obtida da seguinte forma:

$$t_{\text{calc}} = \hat{\phi}_e / s_e \quad (11)$$

Sendo:

$\hat{\phi}_e$ = Parâmetro estimado

s_e = Erro padrão

O valor de t_{calc} , foi comparado à estatística t_{student} bicaudal com níveis de significância de 95% e 99%. Outro critério empregado na discriminação dos modelos foi o da análise de resíduos.

CAPÍTULO 8

RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE B

8.1 Análise centesimal

Os resultados das análises da composição centesimal das três variedades de amendoim são apresentados na Tabela 8.1. Observa-se, por estes resultados, que a composição do amendoim Caiapó apresenta teores mais elevados de lípideos, o que confirma o potencial de utilização dessa variedade para a fabricação de óleo, enquanto que a variedade Tatu Vermelho apresentou uma quantidade maior de proteína, favorecendo a sua aplicação para produtos derivados de amendoim, como doces e salgados.

Ao relacionar estas composições com o metabolismo dos fungos, observa-se que a quantidade elevada de carboidratos, proteínas e lipídeos são favoráveis como substrato, sendo principalmente as fontes de nitrogênio e carbono que a maioria dos fungos e bactérias necessitam (FONSECA, 1983).

Tabela 8.1 - Composição centesimal de três variedades de Amendoim (em porcentagem).

Variedade	Umidade (% b.u.)	Cinzas	Lípideos	Proteínas (n = 5,46)	Carboidratos e Fibras
Caiapó	5,96	1,90	47,4	17,3	27,3
Runner IAC 886	7,42	1,73	40,6	24,6	25,5
Tatu-Vermelho	8,40	2,03	42,0	28,7	18,7

8.2 Isotermas de sorção das três variedades de amendoim

8.2.1 Umidades de equilíbrio das três variedades de amendoim

Na Tabela 8.2, estão apresentadas as médias das umidades de equilíbrio das três variedades de amendoins nas três temperaturas, respectivamente.

Tabela 8.2 – Umidade de equilíbrio (% b.s.) no amendoim, em várias atividades de água a 25, 30 e 35° C.

Variedade	T = 25° C				
	UR ₁ = 43,16	UR ₂ = 57,70	UR ₃ = 75,32	UR ₄ = 84,34	UR ₅ = 90,30
Runner IAC 886	5,0945	7,4894	8,8914	10,7040	13,8712
Tatu vermelho	6,0077	8,7758	9,8342	12,3420	15,5169
Caiapó	5,4404	7,3091	7,7314	9,37457	12,7959
Variedade	T = 30° C				
	UR ₄ = 43,16	UR ₅ = 56,03	UR ₆ = 75,09	UR ₇ = 83,62	UR ₈ = 89,90
Runner IAC 886	5,2727	5,5703	8,6485	13,0896	14,9431
Tatu vermelho	6,1933	7,0204	9,8407	15,2765	18,4307
Caiapó	4,8752	5,2096	7,5991	10,8529	11,4769
Variedade	T = 35° C				
	UR ₉ = 43,17	UR ₁₀ = 56,03	UR ₁₁ = 74,87	UR ₁₂ = 82,95	UR ₁₃ = 89,50
Runner IAC 886	5,1847	4,8404	11,3526	17,4191	12,7254
Tatu vermelho	5,8978	5,4185	10,1178	16,8971	14,0830
Caiapó	5,1072	4,6013	8,5204	14,0809	11,4440

Os resultados das umidades de equilíbrio nas três temperaturas são apresentados nas Figuras 8.1, 8.2 e 8.3. Note-se que os grãos da variedade Caiapó foram os que apresentaram os menores valores de umidade de equilíbrio para uma dada umidade relativa, o que indica que o óleo, em maior quantidade, ocupa o lugar da água em várias ligações, tornando-a mais disponível para ser removida. No entanto, o mesmo não se observa para as variedades Runner IAC886 e Tatu Vermelho, pois os grãos de maior conteúdo de lipídeos (Tatu Vermelho) apresentaram umidades de equilíbrio inferiores aos da variedade com menor quantidade de lipídeos (Runner IAC 886), o que pode estar relacionado aos próprios erros experimentais inerentes ao método, incapaz de representar adequadamente o comportamento higroscópico quando a diferença do conteúdo lipídico entre as duas variedades é pequena (40,6 e 42%).

Bianco et al. (2001) avaliou o conteúdo de óleo de variedades de amendoins da Argentina, e obteve 47,2%, 43,2%, 47,6% e 50,9% para o Flour Runner, Tobaldo, Colorado e Roata, respectivamente. A partir destes dados, estes autores concluíram também que, no amendoim Roata, a umidade de equilíbrio é menor o que mostra que a água livre para reações tem menor volume quando o conteúdo de óleo é maior, mas o equilíbrio higroscópico na umidade relativa de 84% foi na faixa de 12,6 (% b.s.), maior que a da variedade Caiapó apresentada neste trabalho.

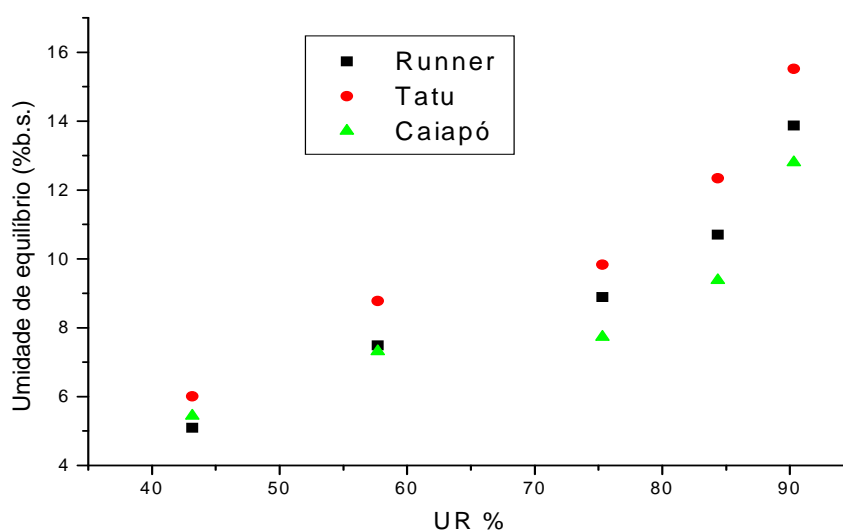


Figura 8.1 – Curva da relação da umidade de equilíbrio (% b.s.) com a umidade relativa a 25° C.

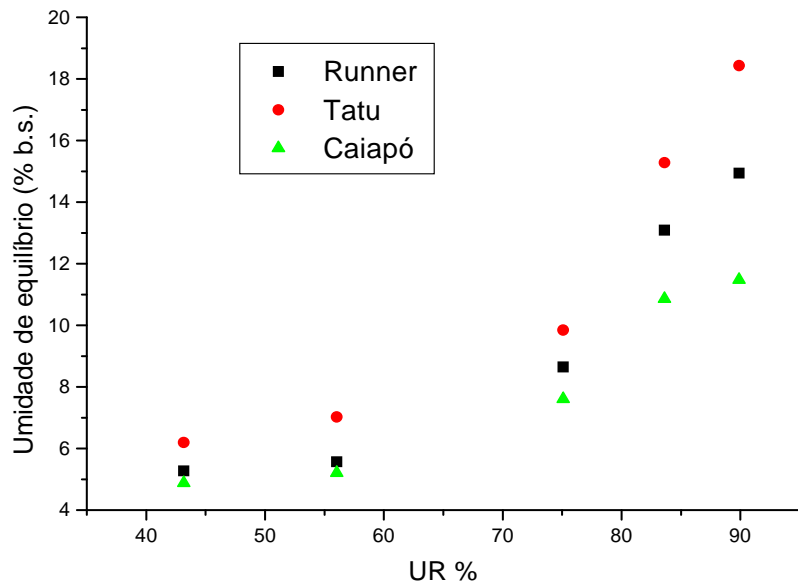


Figura 8.2 – Curva da relação da umidade de equilíbrio (% b.s.) com a umidade relativa a 30° C.

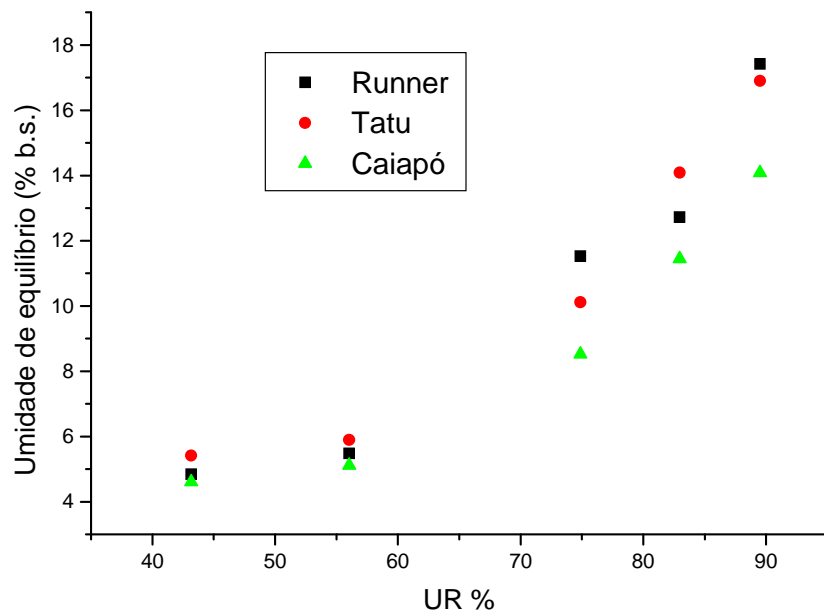


Figura 8.3 – Curva da relação da umidade de equilíbrio (% b.s.) com a umidade relativa a 35° C.

8.2.2 Estimativas de parâmetros.

Nas Tabelas 8.3, 8.4 e 8.5, estão apresentados os parâmetros dos modelos de equilíbrio higroscópico para as variedades Runner IAC 886, Tatu Vermelho e Caiapó, respectivamente. Note-se que, para alguns modelos, não são apresentados os erros calculados para os modelos estimados. Isto se deve à acentuada não-linearidade destes modelos, que, durante o procedimento de ajuste, resultaram em erros muito elevados, acima dos critérios satisfatórios adotados pelo algoritmo Quasi-Newton. Dos modelos que forneceram os erros dos parâmetros, o de Copace deve ser descartado, pois os valores calculados da estatística t-student foram inferiores aos valores tabelados.

Assim, restaram os modelos de Henderson, Halsey Modificado e Sigma Copace. Destes, o que apresentou maior coeficiente de determinação foi o de Halsey Modificado, que foi selecionado para os demais testes. De acordo com o critério de seleção de modelos proposto por Mohapatra; Rao (2005), os modelos que não se ajustam satisfatoriamente aos dados do experimento são aqueles que apresentam o erro médio relativo superior a 10%, indicando serem inadequados para a descrição do fenômeno estudado.

O modelo de Halsey Modificado também forneceu bons resultados para ensaios com feijão (RESENDE et al., 2006). Resultados semelhantes foram observados por Chen (2000) e por Chen; Morey (1989), que recomendaram o modelo de Halsey Modificado para estimar o equilíbrio higroscópico dos grãos de amendoim.

Tabela 8.3 - Resultados estatísticos da estimativa de quasi-newton para a variedade Runner IAC 886.

Equação	Parâmetro	Valor Estimado	R ²	Erro estimado	t _{cal} (42)	t (5%)	t (1%)	
Chung-Pfost (1)	a	547356,81	0,972					
	b	0,21						
	c	273584,44						
Henderson (2)	a	0,0025	0,906	0,0008	3,08	2,42	1,68	
	b	1,32		0,1333				9,87
Henderson-Thompson (3)	a	0,00097	0,965					
	b	1,09						
	c	99,64						
Chen-Clayton (4)	a	32,6	0,979					
	b	-0,81						
	c	2,09						
	d	-0,67						
Halsey modificado (5)	a	0,017	0,989	0,0046	3,75	2,42	1,68	
	b	1,93		0,1349				14,31
	c	2,34		0,3411				6,85
Sabbah (6)	a	5,14	0,948					
	b	1,89						
	c	-0,35						
Copace (7)	a	-0,19	0,97	0,1698	-1,14	2,42	1,68	
	b	-0,01		0,0039				-2,97
	c	2,76		0,1312				21,02
Sigma Copace (8)	a	-0,98	0,981	0,1575	-6,24	2,42	1,68	
	b	-0,01		0,0032				-3,59
	c	1,34		0,0498				26,87
Oswin (9)	a	3,73	0,989					
	b	0,05						
	c	2,19						

Tabela 8.4 - Resultados estatísticos da estimativa quasi-newton para a variedade Tatu Vermelho.

Equação	Parâmetro	Valor Estimado	R ²	Erro estimado	t _{cal} (42)	t (5%)	t (1%)		
Chung-Pfost (1)	a	2811373,28	0,975						
	b	0,20							
	c	1227122,33							
Henderson (2)	a	0,003	0,924	0,1425	0,02	2,42	1,68		
	b	1,17						17,7024	0,07
Henderson-Thompson (3)	a	0,0011	0,971						
	b	1,16							
	c	54,59							
Chen-Clayton (4)	a	5,75E-05	0	2,7032E-05	2,12	2,42	1,68		
	b	1,47						0,5241	2,81
	c	-0,0027						0,00052	-5,36
	d	1,38						0,1426	9,72
Halsey modificado (5)	a	-0,0038	0,985	0,0051	-0,75	2,42	1,68		
	b	2,02						0,1818	11,11
	c	3,42						0,5102	6,71
Sabbah (6)	a	13,47	0,946						
	b	1,77							
	c	-0,09							
Copace (7)	a	0,34	0,967	0,1486	2,29	2,42	1,68		
	b	-0,0019						0,0036	-0,53
	c	2,60						0,1249	20,82
Sigma Copace (8)	a	-0,39	0,978	0,143	-2,78	2,42	1,68		
	b	-0,0013						0,0029	-0,44
	c	1,26						0,046	27,46
Oswin (9)	a	6,26	0,985						
	b	-0,0078							
	c	2,29							

Tabela 8.5 - Resultados estatísticos da estimativa quasi-newton para a variedade Caiapó.

Equação	Parâmetro	Valor Estimado	R ²	Erro estimado	t _{cal} (42)	t (95%)	t (99%)
Chung-Pfost (1)	a	20169258,9	0,972				
	b	0,26					
	c	8179305,92					
Henderson (2)	a	0,00019	0,828	6,0392E-05	3,27	2,41	1,68
	b	2,5		0,1471	17,01		
Henderson-Thompson (3)	a	0,00098	0,964	0,0006	1,77	2,41	1,68
	b	1,23		0,0929	13,29		
	c	76,09		46,5863	1,63		
Chen-Clayton (4)	a	18,93	0,975				
	b	-0,59					
	c	1,02					
	d	-0,40					
Halsey modificado (5)	a	0,006	0,985	0,005	1,21	2,41	1,68
	b	2,13		0,115	18,56		
	c	2,91		0,2948	9,89		
Sabbah (6)	a	6,73	0,939				
	b	1,62					
	c	-0,21					
Copace (7)	a	0,34	0,968	0,1486	2,29	2,41	1,68
	b	-0,002		0,0036	-0,53		
	c	2,60		0,1249	20,81		
Sigma Copace (8)	a	-0,58	0,976	0,1407	-4,16	2,41	1,68
	b	-0,006		0,0029	-2,04		
	c	1,18		0,0452	26,12		
Oswin (9)	a	4,46	0,984	0,4037	11,04	2,41	1,68
	b	0,017		0,012	1,45		
	c	2,43		0,1039	23,43		

Na Figuras 8.4, 8.5 e 8.6, estão os resultados dos ajustes do modelo de Halsey Modificado aos dados experimentais, onde pode-se observar que, para uma atividade de água constante, os valores das umidades de equilíbrio diminuíram com o aumento da temperatura, seguindo a mesma tendência da maioria dos produtos agrícolas (RESENDE et al., 2006).

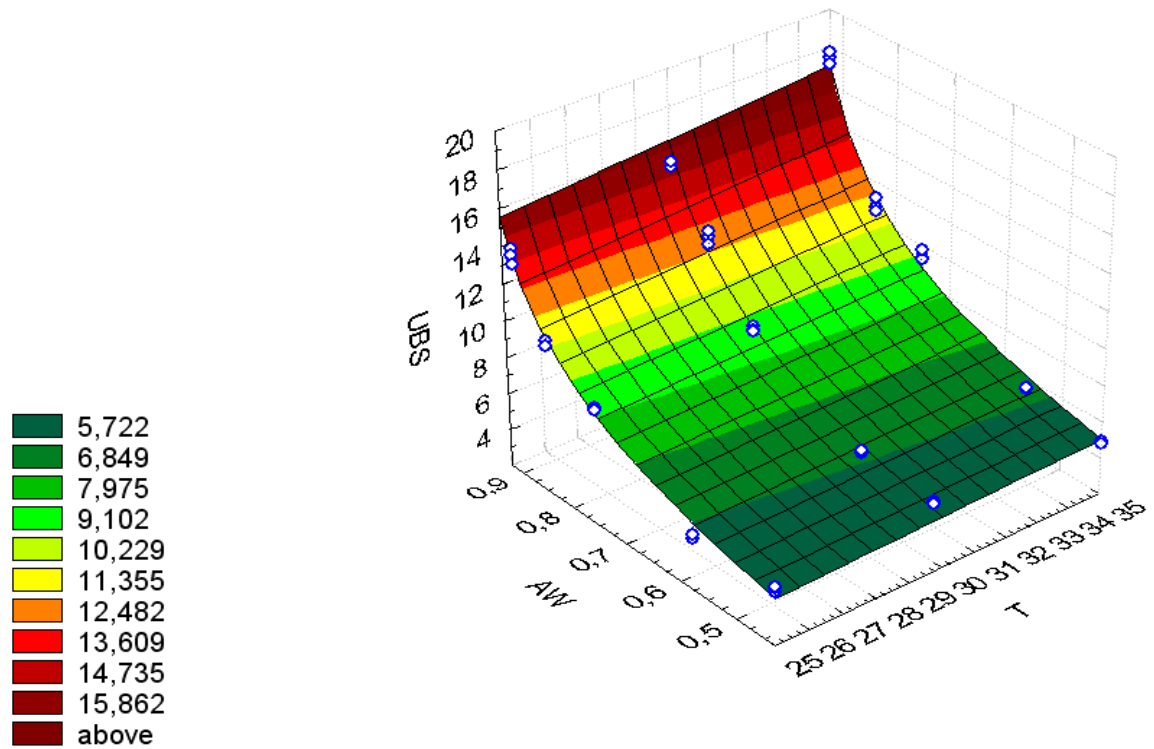


Figura 8.4 – Superfície de resposta fornecida pelo modelo de Halsey modificado para a variedade Runner IAC 886.

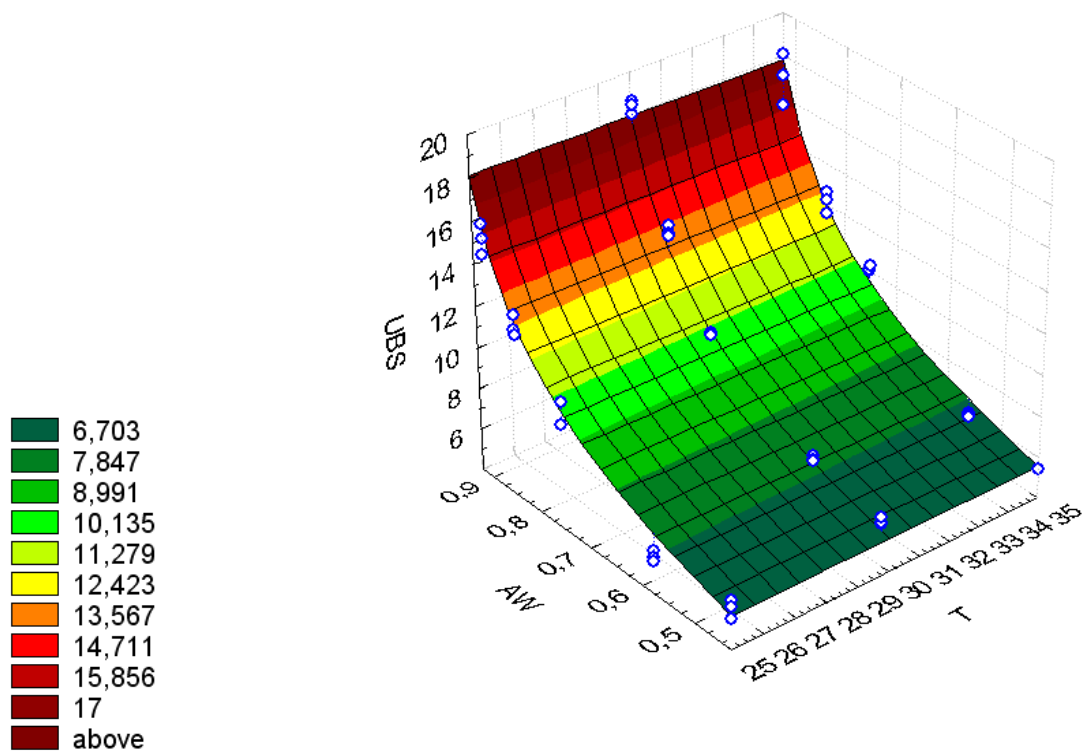


Figura 8.5 – Superfície de resposta fornecida pelo modelo de Halsey modificado para a variedade Tatu vermelho.

continua...

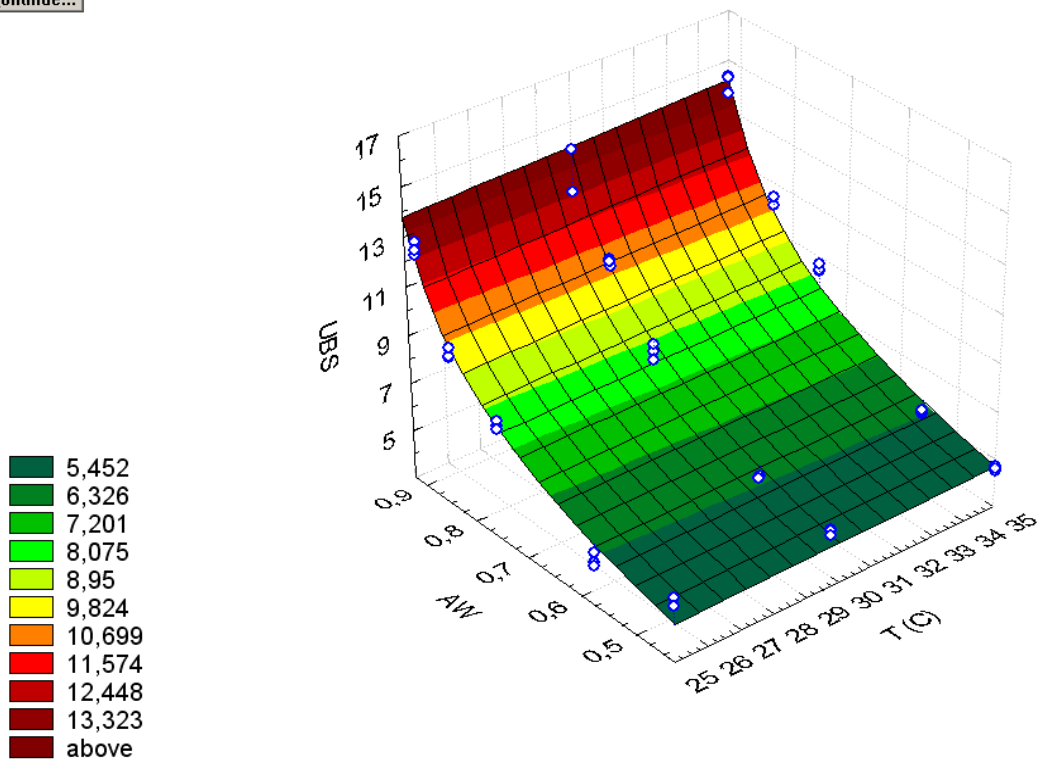


Figura 8. 6 – Superfície de resposta fornecida pelo modelo de Halsey modificado para a variedade Caiapó.

Nas Figuras 8.7 e 8.8, estão apresentados os resíduos encontrados nos cálculos da umidade de equilíbrio pelo modelo de Halsey Modificado para a variedade Runner, onde se observa que os mesmos são aleatórios, uma característica necessária para se admitir que não haja vício no ajuste. Para as demais variedades, os resultados foram similares.

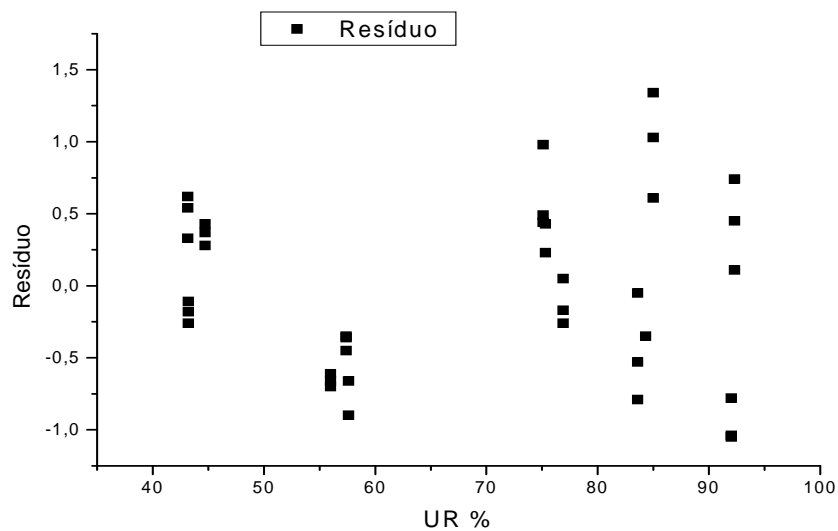


Figura 8.7 – Gráfico do resíduo da isoterma da variedade Runner IAC 886, calculada pelo modelo de Halsey modificado, em função da UR.

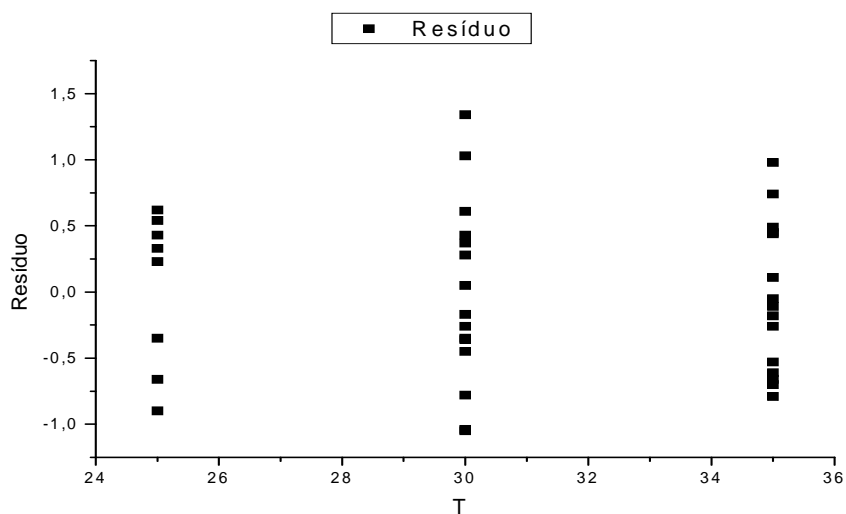


Figura 8.8 – Gráfico do resíduo da isoterma da variedade Runner IAC 886, calculada pelo modelo de Halsey modificado, em função da temperatura.

Para se ilustrar a importância destas propriedades físicas dos materiais como fonte de informações para o armazenamento de grãos de amendoim, empregou-se os parâmetros estimados do modelo de Halsey Modificado para simular qual seria a atividade de água dos grãos caso a temperatura fosse 25°C e a umidade de equilíbrio dos grãos fosse 10% (b.u.), umidade adotada na Empresa A como critério de parada do procedimento de secagem, medida por meio de do medidor capacitivo de umidade. Para tanto, é necessário converter a umidade em base úmida (U_{bu}) em umidade em base seca (U_{bs}), o que é feito por meio da relação:

$$U_{bs} = U_{bu} / 1 - U_{bu} \quad (12)$$

Aplicando a Equação (12) para a umidade 10 % (b.u.) obtém-se a umidade de equilíbrio 11,1 % (b.s.) e a Tabela 8.6 apresenta os resultados destas simulações.

Como se verá na Parte C desta dissertação e também de informações da literatura (BAKKER-ARKEMA, 1999; FONSECA, 1983), atividades de água acima de 84% já são potencialmente propícias à proliferação dos fungos aflatoxigênicos para a variedade Runner IAC 886. O medidor de umidade capacitivo empregado pela Empresa A, e da maioria dos beneficiadores de amendoim, não tem escalas distintas para diferentes variedades de amendoim, de modo que a leitura de umidade pode ter um desvio expressivo se a variedade testada for diferente daquela utilizada na calibração do instrumento. Ainda assim, mesmo que a leitura de 10%(b.u.) esteja correta, os grãos da variedade Runner IAC 886 estariam sendo armazenados em condições inadequadas de atividade de água (85,8%). O mesmo se aplica à variedade Caiapó, sendo que há a agravante de que não são disponíveis na literatura informações acerca das cinéticas de crescimento microbiano e de produção de aflatoxina para esta variedade.

Tabela 8.6 – Valores estimados de umidade relativa, em função da variedade de amendoim, para temperatura de 25° C e umidade de equilíbrio 11,1 % (b.s.) ou 10% (b.u.).

	Variedade		
	Caipó	Runner IAC 886	Tatu Vermelho
% de Lipídios	47,4	40,6	42,0
UR (%)	88,0	85,8	81,9

Deste modo, evidencia-se a necessidade dos beneficiadores empregarem escalas próprias para cada variedade de amendoim e também que hajam estudos publicados na literatura acerca do comportamento higroscópico destas variedades para que um armazenamento mais seguro seja possível.

CAPÍTULO 9

CONCLUSÕES - PARTE B

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- Os teores de umidade de equilíbrio higroscópico das variedades de amendoim estudadas são diretamente proporcionais à umidade relativa do ar e decrescentes com o aumento de temperatura, para uma mesma umidade relativa do meio, seguindo a tendência da maioria dos produtos agrícolas já estudados.
- Baseando-se em indicadores estatísticos, o modelo de Halsey Modificado é o que melhor se ajusta aos dados experimentais, quando comparado aos modelos tradicionalmente utilizados para descrição deste fenômeno.
- A variedade Caiapó apresentou uma umidade de equilíbrio menor que as outras variedades, provavelmente devido à maior quantidade de lipídeos e carboidratos.
- Os beneficiadores têm que tomar precauções quando da medida de umidade dos grãos para evitar que a atividade de água dos grãos armazenados não exceda os limites de segurança que permitam a proliferação dos fungos aflatoxigênicos.

Por meio dos resultados apresentados nesta parte do trabalho, conclui-se que o conhecimento das propriedades higroscópicas das diferentes variedades de amendoim é fundamental para que as indústrias adéqüem seus procedimentos de secagem, armazenamento e transporte de grãos, uma vez que o uso de informações genéricas para amendoim pode submeter os grãos a situações críticas.

PARTE C

**Influência da umidade e temperatura no crescimento e produção de
aflatoxina pelo *Aspergillus flavus* em amendoim.**

CAPÍTULO 10

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – PARTE C

10.1 O fungo *Aspergillus flavus*

O *Aspergillus flavus* L. pertence ao grupo dos Ascomicetos, que são fungos da subdivisão Ascomycotina. São assim chamados porque no processo de reprodução sexuada, formam sacos conhecidos no meio científico como asco, que depois se transformam em esporos (REY, 2006). O gênero *Aspergillus* pertence ao grupo dos Ascomicetos, mas também pode ser considerado um Deuteromycetes, porque se caracteriza pela formação de conidióforos, ou seja, hifas especializadas e produtoras de conídios com formas e arquitetura variáveis (PELCZAR JUNIOR, 1996; PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002).

O *Aspergillus flavus*, durante o seu crescimento produz filamentos ramificados, as hifas (hyphae). Uma rede de hifas forma os micélios, que secretam as enzimas que quebram as fontes complexas dos alimentos. As estruturas moleculares pequenas resultantes são absorvidas pelo micélio para abastecer o crescimento fúngico adicional. Uma unidade de fungo não pode ser observada sem auxílio de microscópio, bem como as hifas individuais, mas as esteiras densas do micélio com os conídios freqüentemente podem ser vistas a olho nú (PAYNE; MARROM, 1998; ARRUS, K. et al., 2005).

A Figura 10.1 mostra o *Aspergillus flavus* isolado de um amendoim contaminado, após serem colocados em condições ideais de crescimento. Quando as colônias estão jovens, os conídios do *A. flavus* têm tonalidade verde e amarela na colônia, mas quando o fungo envelhece os esporos ficam com tonalidade verde mais escuro. As sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) são substratos favoráveis ao crescimento de *Aspergillus flavus* Link e *Aspergillus parasiticus* Speare e, conseqüentemente, à produção de aflatoxina por algumas estirpes desses fungos (FERNANDEZ et al., 1997).

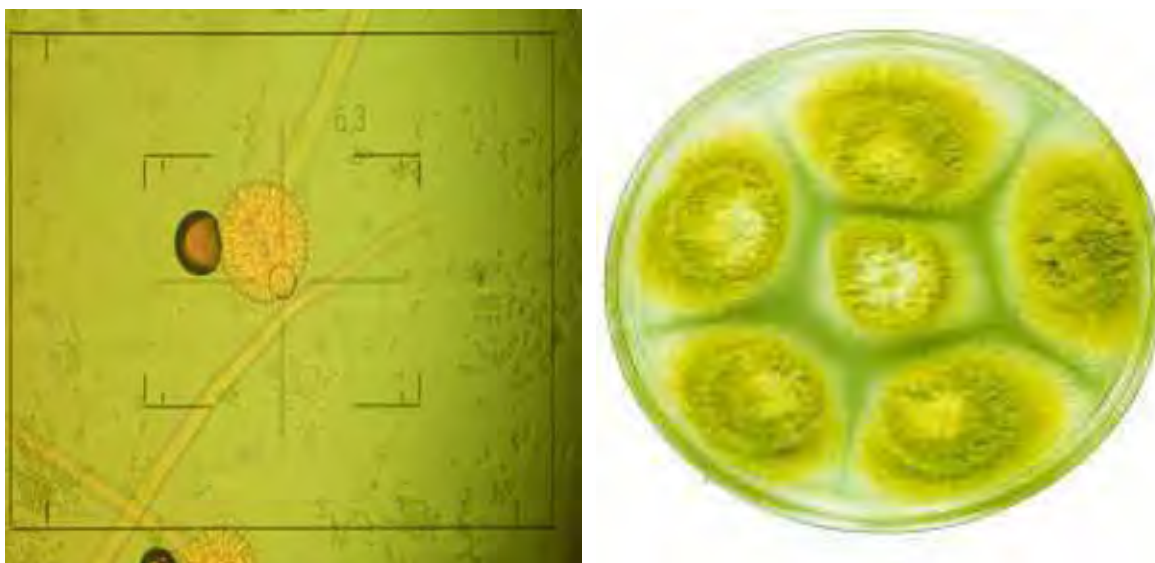


Figura 10. 1 - *Aspergillus flavus*.

Muitas espécies de fungos podem se desenvolver utilizando grãos como substrato. No entanto, as espécies *Aspergillus spp*, *Penicillium spp.* e *Fusarium spp.* são as mais encontradas em amendoim (em especial o *Aspergillus spp.*). Na Tabela 10.1, são descritas as condições de umidade dos grãos e umidade relativa ideal para o crescimento de alguns fungos.

Tabela 10.1 - Condições para o crescimento de fungos em grãos para temperaturas de 25 a 27°C.

Teor de umidade dos grãos - % (b.u.)	Espécie	Umidade relativa do ar (intergranular) - %
12-14	<i>Aspergillus halophilieus</i>	68
13-15	<i>Aspergillus restrictus</i>	70
13-15	<i>Aspergillus glaucus</i>	73
14-16	<i>A. candidus</i> , <i>A. ochraeus</i>	80
15-18	<i>A. flavus</i> , <i>parasiticus</i>	82
15-18	<i>Penicillium spp.</i>	80-90

Fonte: BAKKER-ARKEMA (1999).

O teor de umidade dos grãos, a umidade relativa do ambiente e a temperatura são fatores fundamentais para o crescimento dos fungos e produção de aflatoxina. De acordo com Diener et al. (1987), o teor mínimo de atividade de água para grãos está entre 83 e 88%, dependendo do material, sendo que o máximo de produção ocorre na temperatura de 30° C e 25% de umidade do grão. Para a infestação do *Aspergillus flavus*, a atividade de água deve estar entre 80 e 99%, com valor ótimo em 98%, mas a produção de aflatoxina ocorrerá entre 82 e 99%, com produção ótima entre 95 e 99% (ICMSF, 1996).

Prado et al. (1991) avaliaram a influência da atividade de água em amendoim da variedade "Tatu Vermelho" quanto ao crescimento de fungos e à produção de aflatoxina. Estes autores trabalharam com atividades de água variando entre 0,75 e 0,97, e observaram que, nos primeiros 15 dias, o crescimento do fungo foi lento em atividade de água de 0,75 a 0,86, sendo mantido o mesmo nível durante 60 dias, em todas as atividades de água testadas. A produção ótima de aflatoxina ocorreu em atividade de água de 0,93, e não houve formação de aflatoxina por 120 dias para atividade de água igual a em 0,86.

Existem linhagens que não produzem aflatoxinas, outras que só produzem as do grupo B e outras que só produzem as do grupo G. Além disso, *A. parasiticus* é geralmente maior produtor de aflatoxina do que o *A. Flavus*, e parece que todas as linhagens de *A. parasiticus* conhecidas são produtoras das quatro aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂), enquanto que as linhagens de *A. flavus*, na maioria das vezes, produzem somente duas aflatoxinas, B₁ e B₂ (LIN, 1980).

A atividade metabólica dos fungos cresce com o aumento de umidade dos grãos. A partir de um determinado valor limite, denominado "umidade crítica", esta atividade é muito acelerada, promovendo a degradação de proteínas, de carboidratos, de fosfolipídios e outros compostos, originando substâncias lipossolúveis que contaminam o óleo, afetando a cor, o aroma e o sabor. Ademais, as enzimas lipolíticas próprias da amêndoa e também dos fungos (que se desenvolvem no amendoim) provocam a hidrólise dos triglicerídeos. No amendoim, esta umidade crítica é em torno de 8 a 9% (b.u.) (FONSECA, 1983).

A ocorrência das aflatoxinas é maior no amendoim porque este é o substrato preferido pelos fungos e, muitas vezes, há uma demora de colheita, devido ao período das chuvas prolongado, dificultando a secagem após o arranquio. Entretanto, sua maior incidência se dá quando o amendoim é batido, ensacado e

armazenado com umidade elevada e quando reumedece depois de ter sido seco. Além do amendoim, a aflatoxina pode ser encontrada em muitos outros produtos, tais como milho, centeio, cevada e outros cereais, sementes oleaginosas, nozes, castanha-do-brasil e produtos curados, entre outros.

10.2 A substância Aflatoxina e a doença Aflatoxicose

O nome aflatoxina tem origem da letra A (*Aspergillus*), FLA (*flavus*) e Toxina (toxinas). De acordo com Diener et al. (1987), existem mais de 20 compostos denominados aflatoxinas, sendo os principais: B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂. Em relação ao grau de toxicidade, tem-se em ordem decrescente: B₁, G₁, B₂, G₂. Na Figura 10.2, são apresentadas as estruturas moleculares das principais aflatoxinas.

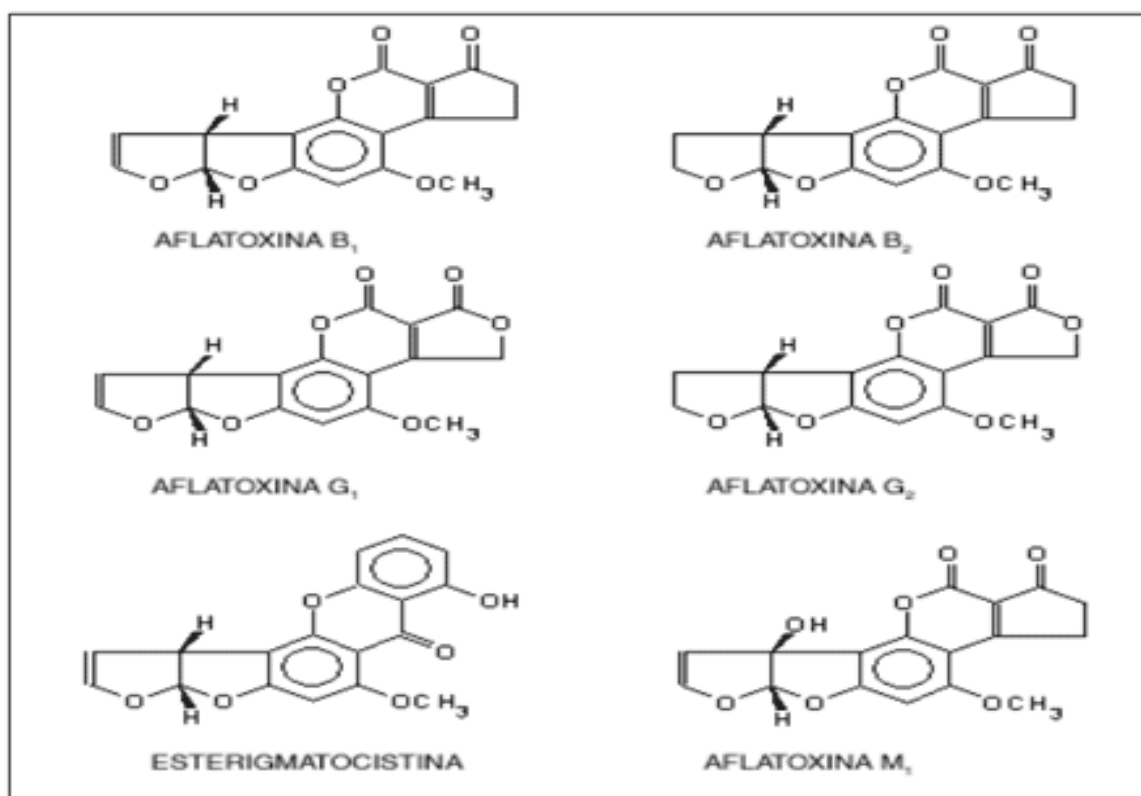


Figura 10.2 - Estruturas moleculares das principais aflatoxinas.

Extraído de FDA/CFSAN, 2003.

Os quatro principais metabólitos são identificados como B₁ e B₂ (por apresentarem fluorescência violeta quando observadas sob luz ultravioleta em 365 nm) e G₁ e G₂. Duas outras substâncias denominadas M₁ e M₂ foram detectadas no leite, urina e fezes de mamíferos, resultantes do metabolismo desses animais por terem consumido alimentos contaminados com aflatoxina B₁ e B₂ (SILVA, 2006).

A Aflatoxicose é uma intoxicação resultante da ingestão da aflatoxina em alimentos e rações contaminadas. A aflatoxina causa necrose aguda, cirrose e carcinoma de fígado em diversas espécies animais. Nenhuma espécie animal é resistente aos efeitos tóxicos da aflatoxina. O homem apresenta reações diferentes quanto à susceptibilidade à toxicidade, desde crônica até aguda. A toxicidade pode ser influenciada por fatores ambientais, quantidade e duração de exposição, idade, estado nutricional e a saúde. A aflatoxina B₁ é potencialmente carcinogênica em muitas espécies, incluindo primatas, pássaros, peixes e roedores. Em cada espécie, o fígado é o primeiro órgão atacado (DDTHA, 2003).

Para ilustrar as aflatoxicoses em países desenvolvidos e subdesenvolvidos, segue o trecho abaixo:

Em países desenvolvidos, a contaminação por aflatoxina raramente ocorre em alimentos, a ponto de causar aflatoxicose aguda em humanos. Em vista disso, estudos em humanos para se conhecer a toxicidade a partir da ingestão de aflatoxina baseiam-se em seu potencial carcinogênico. A susceptibilidade relativa de humanos às aflatoxinas não é conhecida; entretanto, estudos epidemiológicos na África e sudeste da Ásia, onde há grande incidência de hepatocarcinomas, mostram uma associação entre a incidência de câncer e a aflatoxina contida na dieta. Estes estudos, contudo, não provam, ainda, uma relação de causa/efeito, mas sugerem a associação. Além de sua associação com doença do fígado, as aflatoxinas podem afetar o rim, o baço e o pâncreas (DDTHA, 2003).

As micotoxinas são resistentes ao calor, irradiação e a tratamento químico, como já citado, e representam um grande perigo químico, quando presentes no alimento. Efeitos agudos de gastroenterites podem ser identificados; contudo, os efeitos crônicos resultam de ingestão moderada e ao longo do tempo, dificultando o reconhecimento da associação entre a toxina e a doença (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1995).

A frequência relativa de aflatoxicose em humanos é desconhecida. Casos esporádicos têm sido relatados em animais. Um dos mais importantes

registros de aflatoxicose em humanos ocorreu em mais de 150 aldeias, no noroeste da Índia, em 1974, quando 397 pessoas foram afetadas e 108 pessoas morreram. Neste surto, o milho, principal constituinte da dieta, apresentou índices de aflatoxina de 0,25 a 15 mg/kg. A dose diária de aflatoxina B₁ ingerida foi estimada em pelo menos 55 µg/kg do peso corpóreo, para um número indeterminado de dias. Os pacientes apresentaram febre alta, icterícia progressiva e rápida, edema em membros, dor, vômitos e fígado aumentado. O aparecimento de sinais da doença na população de uma aldeia foi precedido por uma doença similar em cães domésticos, que normalmente era fatal. Dez anos após o surto na Índia, foram encontrados sobreviventes que se recuperaram e não apresentaram nenhum efeito da doença (DDTHA, 2003).

São escassas as informações sobre surtos de aflatoxicose em humanos, devido, principalmente, às dificuldades da assistência médica e sistemas de vigilância nas áreas onde os níveis de contaminação por aflatoxina são ainda altos nos alimentos. Assim, muitos casos não são diagnosticados ou notificados. No Brasil, não há dados sobre surtos ou casos dessas intoxicações por aflatoxinas e outras micotoxinas (DDTHA, 2003).

Na prática, as aflatoxinas têm sido detectadas por técnicas físico-químicas e biológicas. Dentre as técnicas físico-químicas, estão as cromatográficas (camada delgada, líquida de alta eficiência e gasosa) e instrumentais (fluorodensitometria e espectrofotometria). As técnicas biológicas incluem os bioensaios (cultura de tecidos, animais e microrganismos) e imunoenaios (radioimunoensaio, cromatografia de afinidade e "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" - ELISA), as cromatografias líquidas acoplada a espectros de massas - MS/MS vem se tornando popular nas determinações de várias micotoxinas ao mesmo tempo. Muitas destas técnicas são dispendiosas, demoradas, de execução complexa e requerem instrumentação sofisticada, nem sempre disponível na maioria dos laboratórios brasileiros (RANDALLS ROAD, 2006)

A utilização de kits comerciais, como o ELISA, é adequada para a determinação de Aflatoxina B₁ pela facilidade de operação, rapidez, uso de poucas vidrarias e de pequenos volumes de solventes orgânicos. Este método é muito utilizado no campo, armazéns e indústrias para aceitar ou rejeitar os lotes de grãos, fazendo-se necessários testes confirmatórios com outras técnicas (SABINO et al. 1997).

A análise por coluna de imunoafinidade e em fluorimetria contém anticorpos policlonais específicos fixados a uma superfície sólida. Estes anticorpos podem se ligar à aflatoxina presente na mistura extraída de grãos e nozes. Uma amostra de grãos é extraída utilizando um solvente orgânico e depois é filtrada. Uma porção do extrato é diluída, filtrada e injetada na coluna. Após o processo de lavagem para a remoção de partículas não ligadas, toda aflatoxina ligada é eluída com metanol e estará pronta para análise em fluorímetro.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, conforme a Portaria nº 183 de 25 de março de 1996, considera o somatório das aflatoxinas $B_1 + B_2 + G_1 + G_2 = 20$ ppb como o limite máximo em amendoim, milho e seus derivados (BRASIL, 1996). Já o Ministério da Saúde por meio da ANVISA e MERCOSUL, regulamentou na RDC nº 274 de 15 de outubro de 2002, os mesmos limites para amendoim (BRASIL, 2002).

10.3 Métodos de esterilização

Para a utilização de amostras sem a contaminação de origem em um experimento, estas devem ser submetidas a processos de esterilização que, idealmente, não devem alterar as propriedades iniciais da amostra, principalmente a sua composição. Os principais processos empregados são:

10.3.1 Esterilização por autoclavação

Este tratamento térmico é realizado em autoclave, recipiente fechado onde o produto é aquecido, geralmente, pelo uso de vapor em pressão controlada, sendo o vapor o meio de transferência de calor usado na maioria das autoclaves. Na autoclavação das amostras, há desvantagens como a desnaturação de proteínas, a gelatinização do amido, o aumento de umidade pelo vapor utilizado no método, dentre outros efeitos indesejáveis (GAVA, 1984; PELCZAR JUNIOR, 1996).

10.3.2 Esterilização por irradiação

A esterilização por irradiação baseia-se na aplicação de radiação ionizante sobre as amostras. Os comprimentos de onda dessas radiações, em aplicações práticas, compreendem parte do ultra-violeta, raios X, raios gama e elétrons acelerados. O processo de irradiação é um método de conservação e descontaminação de alimentos, fitoterápicos e ervas em geral, oferecendo aos consumidores produtos com uma carga microbiana praticamente nula. (AQUINO et al., 2005).

As irradiações na faixa do ultravioleta, especialmente aquelas compreendidas entre 200 e 280 nm (2000 a 2800 Å), são empregadas para inativar microrganismos na camada superficial dos alimentos devido ao seu baixo poder de penetração. São muito empregadas nas indústrias de alimentos, na purificação do ar, na esterilização de embalagens e de superfícies de equipamentos (GAVA, 1984).

As radiações gama e de feixes de elétrons, em diversos produtos alimentares, têm sido empregadas comercialmente para a redução dos níveis de esporos e prevenção da produção de micotoxinas por fungos toxigênicos (SILVA et al., 2005). Os raios gama são obtidos principalmente a partir de fontes de cobalto-60 e céσιο-137, materiais radioativos (GAVA, 1984).

As doses, que são permitidas de acordo com os tipos de alimentos e suas ações em níveis de tratamentos recomendados pela International Dairy Foods Association (IDFA), são apresentadas na Tabela 10.2.

As doses máximas de aplicação são de 10 kGy, consideradas adequadas para a maioria das aplicações em alimentos. Atualmente, 41 países aprovam esta aplicação em mais de 60 alimentos e produtos alimentícios. A World Health Organization (WHO), a Food and Agriculture Organization (FAO), a International Atomic Energy Agency (IAEA) e o Codex Alimentarium recomendam o processo com os limites específicos a cada tipo de alimento e sua finalidade (IFST, 1999).

Tabela 10.2 - Doses de irradiações por raios gama aprovadas pela IDFA.

Nível de dose	Tipo de produto	Dose de irradiação permitida
Baixo	<ul style="list-style-type: none"> - Controle de insetos em grãos; - Inibição do broto da batata; - Controle de teníase em carne de porco; - Inibição e controle de insetos que deterioram as frutas e vegetais. 	1 kGy
Médio	<ul style="list-style-type: none"> - Controle de <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>, <i>Campylobacter</i> e <i>Yersinia</i> em carne, aves domésticas e peixes; - Atrasar o crescimento das mudas de morangos e outras frutas; - Inativação de vários microrganismos. 	1 a 10 kGy
Alto	<ul style="list-style-type: none"> - Morte dos microrganismos e insetos em espécies; - Esterilização comercial de alimentos, destruindo os microrganismos de interesse da saúde pública; - Em esterilização comercial de alimentos, com exceção aos alimentos utilizados para a alimentação em hospitais e em pacientes imunodepressivos. 	Acima de 10 kGy

Fonte: INSTITUTE OF FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY (1999).

CAPÍTULO 11

MATERIAIS E MÉTODOS – PARTE C

As amostras de amendoim Runner IAC 886 foram coletadas na Cerealista Garcia Ltda., na cidade de Neves Paulista – SP, e a cepa de *Aspergillus flavus* empregada foi isolada a partir de amostras de grãos contaminados coletados separadamente de um lote com alta contaminação que não foi beneficiado.

Os ensaios experimentais foram realizados nos laboratórios de Medidas Físicas II e Bioprocessos do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da UNESP/São José do Rio Preto - SP.

As análises de aflatoxinas foram realizadas na empresa Amenco Agroindústria Ltda., na cidade de Tupã - SP.

11.1 Isolamento, manutenção, identificação da cepa e preparo da suspensão de esporos.

Para a realização dos experimentos, foi necessário isolar uma cepa de *Aspergillus flavus*, produtora de aflatoxina. Para tanto, se realizou o isolamento, a manutenção, a identificação, o teste de produção de aflatoxina e o preparo da suspensão de esporos, como descrito a seguir.

a) Isolamento da cepa

Para o isolamento da cepa, utilizou-se uma amostra de amendoim contaminado, colhida pela Cerealista Garcia Ltda. Após realizar a retirada da casca

de algumas vagens manualmente, com proteção de luvas e dentro de uma câmara de fluxo laminar, colocou-se aproximadamente 25 gramas de vagem e de grãos em dois frascos de erlenmeyer, acrescentando água até umedecer. Nestas condições, os amendoins foram deixados por 15 dias em temperatura ambiente.

Após este período, para realização do isolamento dos fungos de origem, foi utilizado o método descrito por Swanson et al. (1984), no qual as amostras foram colocadas, com o auxílio de uma pinça flambada, em solução salina tampão de fosfato (PBS) estéril. A partir da diluição 10^{-1} , foram feitas as diluições seriadas (decimais) até 10^{-6} , empregando-se o mesmo diluente. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram misturadas em 15 mL de meio de cultura Ágar batata dextrose (BDA) acidificada (pH 5,6), fundido a 45 ° C, seguido de homogeneização. Após a solidificação do meio de cultura, as placas foram incubadas a 25° C. Após 7 dias, as colônias com características do *Aspergillus flavus* foram retiradas com alça de platina e individualmente estriadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA solidificado, sendo em seguida incubadas por 7 dias, e assim sucessivamente até caracterizar o completo isolamento do fungo *Aspergillus flavus*.

b) Manutenção da cepa

Após isolar o fungo, foram retiradas algumas colônias e inoculadas em tubos de ensaio com meio BDA solidificado e inclinado e incubados novamente por 7 dias. Depois desse período, em alguns tubos foram colocados óleo mineral estéril e outros mantidos sob refrigeração, sendo quinzenalmente, repicados novamente seguindo o mesmo método.

Alguns destes tubos foram encaminhados para a Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI, em Campinas – SP.

c) Identificação da cepa

As cepas colhidas das vagens e dos grãos foram encaminhadas para a identificação no Departamento de Análises Clínicas, Micologia Clínica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP – Araraquara – SP, que forneceu a identificação positiva.

O método utilizado para identificação foi por exame direto da colônia com corante lactofenol azul algodão e também pela morfologia macroscópica (BOTHAST; FENNELL, 1974).

d) Preparo da suspensão de esporos e teste de produção de aflatoxina

A cepa isolada foi inoculada em placa de Petri contendo meio BDA e incubada por 7 dias a 25° C. Após a esporulação, uma alçada de esporos foi transferida para um tubo de Eppendorf contendo aproximadamente 1,5 mL de Tween 0,1% , com posterior agitação por 1 minuto para dispersão dos esporos. Com o auxílio de pipeta, foram transferidos 0,2 mL desta suspensão para um frasco de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 25 mL de meio BDA solidificado e seguindo-se para incubação a 25° C por 7 dias para esporulação. Após esse período, foram adicionados 20 mL de Tween 0,1% no frasco e 10 pérolas de vidro, agitando-se lentamente e transferindo-se o sobrenadante para um outro frasco de Erlenmeyer. Foram retirados 2 mL deste sobrenadante, e estes foram colocados em outro Erlenmeyer de 250 mL(C₁), contendo 198 mL de Tween 0,1 %. Após agitar, retirou-se deste segundo Erlenmeyer novamente 2 mL desta suspensão e colocou-se em outro Erlenmeyer de 250mL (C₂), contendo 198 mL de Tween. Após estas duas diluições, foi realizada a contagem de esporos existentes (número de esporos/mL) da suspensão através de Câmara de Neubauer, ajustando-se as suspensões para as concentrações C₁ e C₂, conforme descrito no delineamento experimental a seguir. Todas as vidrarias utilizadas foram esterilizadas previamente em autoclave a 121° C por 20 minutos e estufa a 105° C por 24 horas.

Com esta suspensão, foi feito o teste de produção de aflatoxina da cepa injetando-se 5 mL da primeira diluição em dois sacos com 25 gramas de amendoim autoclavados, que foram incubados a 25° C durante 14 dias. Realizou-se uma análise de aflatoxina em coluna de imunoafinidade com detecção por fluorimetria em cada amostra da duplicata.

11.2 Preparo das amostras de amendoim

11.2.1 Coleta das amostras

As amostras do amendoim Runner IAC 886 (rasteiro), em vagem e grão, que foram coletadas, eram provenientes da colheita mecânica realizada em abril de 2006. A coleta das vagens e grãos de amendoim foi feita em diversas sacas depositadas nos armazéns da Cerealista Garcia Ltda., da cidade de Neves Paulista – SP, com coletor de alumínio e espátulas devidamente higienizado. Foram coletados, aproximadamente, 60 kg de amostras de vagens e de grãos para os testes de crescimento fúngico e de produção de aflatoxina. Tomou-se o cuidado para coletar amostras de amendoim com índice de aflatoxina não detectado e com as melhores características organolépticas.

As amostras foram porcionadas em sacos de polietileno de parede espessas, com 25 gramas de amostra, e seladas, para serem utilizadas nas isotermas de crescimento fúngico e de produção de aflatoxina, e encaminhadas para a esterilização.

Após a esterilização, as amostras foram mantidas em sacos de polietileno de parede espessa em alíquotas de aproximadamente 10 kg cada, com os saquinhos separados e já selados com a quantidade necessária para aplicar as suspensões, e em câmara refrigerada a $2 \pm 1^\circ \text{C}$, durante o período de execução do projeto.

11.2.2 Esterilização das amostras por radiações gama e ultravioleta (UV)

As amostras devidamente porcionadas e fechadas foram encaminhadas para a Companhia Brasileira de Esterilização de Jarinu – SP, onde receberam radiação ionizante proveniente de fontes de Cobalto-60 e Césio-137, com intensidade de 6,8 kGy.

Alternativamente, para avaliar a eficiência de outro método não agressivo de esterilização, foi realizado um teste de irradiação com luz ultravioleta. Foi colocada uma quantidade de 60 gramas de grãos, aproximadamente, dentro de uma caixa de acrílico, incidindo-se sobre os grãos a luz ultravioleta. Esta caixa foi levada à agitação em “shaker” durante 24 horas. A cada seis horas, foram retiradas 10 gramas para realização de contagem de unidade formadoras de colônias (UFC) de fungos, através do método descrito por Swanson et al. (1984). Após a incubação durante 3 e 5 dias, foram realizadas a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) com o auxílio de um contador de colônias com lupa.

11.3 Obtenção das isotermas de crescimento fúngico e de produção de aflatoxina.

11.3.1 Preparo do conjunto da isoterma

Os ensaios de isotermas de crescimento fúngico e de produção de aflatoxina foram feitos pelo método estático de umidade relativa controlada do ambiente, onde o amendoim inoculado com o fungo *Aspergillus flavus* permanecia armazenado.

Nas amostras de 25 gramas de amendoim Runner IAC 886, em vagem e grãos, já esterilizadas, foram injetados, com o auxílio de uma seringa estéril, 2 mL da suspensão de esporos preparada previamente com as concentrações (C_1 e C_2), definidas pelo delineamento experimental. É importante

ressaltar que o volume de solução inoculante empregado pouco alterou a umidade inicial dos grãos, que era de 7,42 % (b.u.).

As amostras de amendoim, já com o inóculo, foram então colocadas nos cestos perfurados de aço-inoxidável, estes apoiados nos suportes de PVC (necessários para evitar que a amostra entrasse em contato direto com a solução salina) colocados nos frascos com as soluções saturadas, preparadas com água destilada estéril e sais. Na preparação deste conjunto, apresentado na Figura 11.1, seguiu-se o delineamento experimental descrito a seguir. Para a realização de todos estes experimentos, utilizou-se o ambiente estéril da câmara de fluxo laminar e todos os componentes e vidrarias foram devidamente esterilizados.

Os conjuntos experimentais, apresentados na Figura 11.2, para a avaliação do crescimento fúngico e de produção de aflatoxina foram colocados em câmaras climáticas, mantidas nas temperaturas e nos períodos descritos no delineamento experimental.

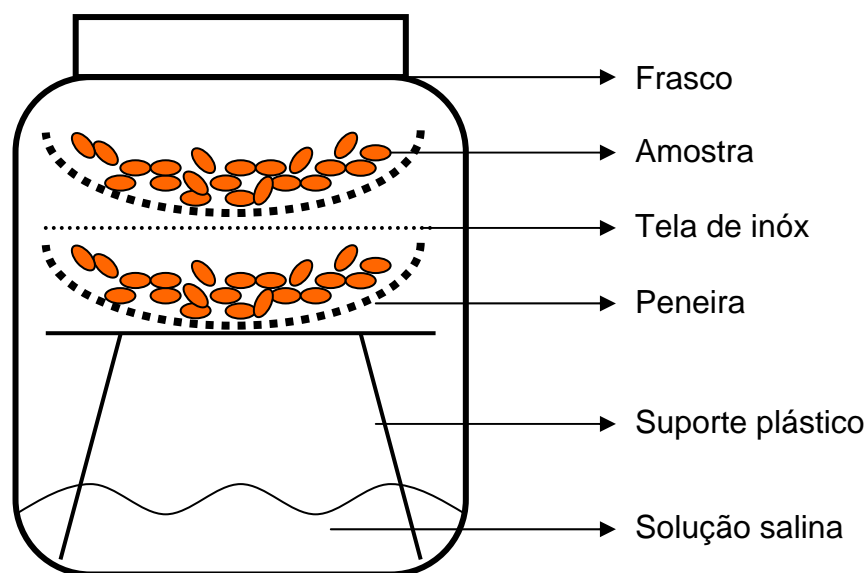


Figura 11.1: Frascos utilizados na obtenção das isotermas de crescimento fúngico e de produção de aflatoxina.



Figura 11.2: Frascos herméticos na câmara climática em temperatura constante.

11.3.2 Análise fúngica

As análises de crescimento fúngico foram realizadas por meio do método descrito por Swanson et al. (1984), pelo quais 25 gramas de amostra de grãos foram colocadas, com o auxílio de uma pinça flambada, em 225mL de solução Tween 0,1%. Procedeu-se às diluições decimais seriadas até 10^{-6} , empregando-se 1 mL de suspensão em 9mL do mesmo diluente. Aliquotas de 0,1 mL de cada diluição foram misturadas em 15 mL de meio de cultura de BDA acidificado (pH 5,6), fundido a 45°C , seguido de homogeneização. Após a solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 25, 30 e 35°C , durante três e cinco dias sendo realizada a contagem de unidades formadoras de colônia, com o auxílio de um contador de colônias com lupa.

Para quantidades elevadas de UFC (acima de 100 UFC/cm^2), consideraram-se como valor estimado de UFC $6,5 \times 10^6\text{ UFC}$ (Est), sendo a maior diluição, uma vez que as placas de vidro empregadas na incubação tinham área de 65 cm^2 (PELCZAR JUNIOR, 1996; ALVES; MORAES, 1998). Também foram feitas contagens de esporos em câmara de Neubauer, no microscópio óptico da marca

MLW – Junior Lab Germany, da suspensão obtida da primeira diluição de cada amostra, no momento de coleta para a inoculação.

11.3.3 Análise de aflatoxina

Para as análises de aflatoxina, foi empregado o equipamento “Afla-Test” da VICAM, que utiliza a coluna de imunoafinidade e sendo a leitura feita no fluorímetro, este método de fluorimetria é aprovado pela AOAC (2000). As amostras foram retiradas da câmara climática (BOD) nos períodos de 15 e 30 dias, conforme planejamento experimental.

Na preparação das amostras, trituraram-se e homogeneizaram-se as amostras de 25 gramas; preparou-se o solvente de extração, misturando 7 partes de metanol com 3 partes de água destilada; colocou-se a amostra e adicionou-se 5,0 g de NaCl e 125 mL de metanol 70% em um copo do liqüidificador limpo; bateu-se por 1 minuto em alta velocidade; filtrou-se, no mínimo, 20 mL utilizando-se papel de filtro qualitativo; diluiu-se 20 mL do extrato com 40 mL de água destilada e misturou-se com cuidado.

Para a cromatografia em coluna de imunoafinidade, adicionou-se 15 mL do extrato diluído na colunas, mantendo-se um fluxo de uma a duas gotas por segundo; as colunas foram lavadas com 2 mL de água, mantendo um fluxo de uma a duas gotas por segundo; eluiu-se a coluna com 1 mL de metanol, mantendo-se um fluxo de uma a duas gotas por segundo, e recolheu-se em uma cubeta limpa; adicionou-se 1 mL do revelador diluído (1:10) na cubeta e agitou-se o conteúdo. Colocou-se num fluorímetro, previamente calibrado, e fez-se a leitura após 60 segundos.

O fluorímetro foi calibrado, previamente, para a leitura de equivalente em grama de amostra = 1.0 ppb. Para confirmar a exatidão da leitura do equipamento, foram empregadas amostras padrões de aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂ em concentrações conhecidas. Procedimento para análise de amendoins crus e descascados (equivalente em grama da amostra passada na coluna é igual a 1,0 g).

Para confirmar os resultados das análises feitas por fluorimetria, foram realizadas análises em cromatografia em camada delgada (CCD), seguindo o

método descrito por Soares; Rodriguez Amaya (1989). Utilizou-se 50 gramas de amostra, que foram homogeneizadas em liquidificador com 270 mL de metanol e 30 mL de solução aquosa de KCl a 4%, durante 5 min. A mistura foi filtrada em papel de filtro comum. Transferiu-se 150 mL para um béquer, onde foram adicionados 150 mL de solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 30% e 50 mL de celite; misturou-se e deixou-se descansar durante 5 min. A mistura foi filtrada em papel de filtro comum. Transferiu-se 150 mL do filtrado para um funil de separação, e foram adicionados 150 mL de água. Essa mistura foi particionada duas vezes com 10 mL de clorofórmio, 5 mL da primeira e da segunda partições de clorofórmio foram combinados e evaporados à segurança em banho de água a 80° C. O resíduo obtido foi dissolvido numa solução de 200 μL de benzeno:acetonitrila (98:2).

Para a triagem, foram aplicados 5 μL do extrato na cromatoplaça (Alugram®Sil G – sílicagel 60G, Macherey-Nagel, Germany), a 2 cm da base. Os padrões de aflatoxina foram aplicados separadamente. A placa foi colocada em uma cuba não saturada, contendo uma mistura de tolueno: acetato de etila: clorofórmio: ácido fórmico (70:50:50:20, v/v/v/v) até atingir 10 cm da base, seguindo Gimeno (1979). As concentrações de aflatoxina foram visualizadas por incidência da luz UV de 365nm. Para a quantificação, foram aplicados volumes conhecidos de amostras e padrões nas cromatoplaças, e os cálculos foram realizados de acordo com o manual de métodos oficiais de Análises da AOAC (1995).

11.3.4 Delineamento experimental

Nos ensaios realizados para a isoterma de crescimento fúngico e de produção de aflatoxina, foram utilizados os planejamentos estatísticos fatoriais de blocos inteiramente casualizados, com desdobramento dos graus de liberdade. Para os testes de crescimento fúngico e de produção de aflatoxina, os níveis de umidade relativa do ambiente (UR), temperatura (T), concentração de esporos (C) e de período de armazenamento (P) são os apresentados nas Tabelas 11.1 e 11.2. As médias foram comparadas por meio do teste de Tukey para o nível de significância de 95%.

Tabela 11.1 – Níveis para a isoterma de crescimento fúngico do *Aspergillus flavus*.

	T ₁ =Temperatura 25 (° C)	T ₂ =Temperatura 30 (° C)	T ₃ =Temperatura 35 (° C)
Sal	Umidade relativa (%)*		
NaCl	UR ₁ = 75,32	UR ₁ = 75,09	UR ₁ = 74,87
KCl	UR ₂ = 84,34	UR ₂ = 83,62	UR ₂ = 82,95
BaCl₂	UR ₃ = 90,30	UR ₃ = 89,90	UR ₃ = 89,50
Períodos de armazenamento			
P ₁ = 15 dias		P ₂ = 30 dias	
Concentração da suspensão de esporos/ mL			
C ₁ = 10 ⁴ esporos/mL		C ₂ = 10 ⁶ esporos/mL	

Fonte*: RESNIK; CHERIFE (1988); GREENSPAN (1977).

Tabela 11.2 – Níveis para a isoterma de produção de aflatoxina pelo *Aspergillus flavus*.

Temperaturas de armazenamento (T₁, T₂)		
	Temperatura T ₁ = 25 (° C)	Temperatura T ₂ = 30 (° C)
Sal	Umidade relativa (%)*	
NaCl	UR ₁ = 75,32	UR ₁ = 75,09
KCl	UR ₂ = 84,34	UR ₂ = 83,62
BaCl₂	UR ₃ = 90,30	UR ₃ = 89,90
Períodos de armazenamento		
P ₁ = 15 dias		P ₂ = 30 dias
Concentração da suspensão de esporos/ mL		
C ₂ = 10 ⁶ esporos/mL		

Fonte *: RESNIK; CHERIFE (1988); GREENSPAN (1977).

Para os ensaios de crescimento fúngico, foram realizados 72 experimentos com as duas repetições, contemplando as combinações possíveis de UR, T, C e P, para atender às necessidades do delineamento, perfazendo o total de 36 experimentos para o crescimento fúngico. Os níveis de temperatura e umidade escolhidos são os mais favoráveis ao metabolismo dos fungos.

Para os ensaios da produção de aflatoxina, foram realizados 24 experimentos com as duas repetições, contemplando as combinações do delineamento experimental citado acima.

CAPÍTULO 12

RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE C

12.1 Identificação, capacidade de produção de aflatoxina e manutenção das Cepas.

A cepa foi identificada pelo método direto da colônia com corante lactofenol azul de algodão, e observou-se no microscópio eletrônico que o fungo é o *Aspergillus flavus*, com morfologia característica comparada aos dados de toxicologias microbiológicas (PELCZAR JUNIOR, 1996), sem necessidade de realização de microcultivo para a prova de esporulação.

A capacidade de produção de aflatoxina foi realizada colocando em uma amostra uma suspensão de 10^6 esporos/mL em 25 gramas e incubando-se a 25° C por 5 dias. Por análise de fluorimetria com o método de fluorimetria, com coluna de imunoafinidade ("Afla test"), observou-se que 25 gramas de grãos produziram 31 e 26 ppb de aflatoxinas nas cepas, codificadas por **C12** e **G106**, respectivamente.

A manutenção das cepas **C12** e **G106** do fungo *Aspergillus flavus* está sendo realizada pela Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI, Brazilian Collection of Environmental and Industrial Microorganisms - CBMAI - DRM-CPQBA/UNICAMP - Paulínia – SP.

12.2 Teste de esterilização em ultra-violeta (UV) dos grãos de amendoim.

Para a realização dos testes de esterilização com a luz UV, foi realizada a aplicação em duas amostras de amendoim contaminado coletado em amostras rejeitadas pela Cerealista Garcia Ltda. Os resultados estão apresentados na Tabela 12.1.

Tabela 12.1 - Teste de esterilização com luz ultravioleta (Contagem de unidades formadoras de colônia/ gramas)

Tempo de irradiação da UV (horas)	Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/g)	
	Amostra 1	Amostra 2
0	2×10^5	6×10^6
6	14×10^3	14×10^5
12	8×10^2	1×10^3
18	50	200
24	0	0

Observou-se que, devido à necessidade de manter os grãos em movimento para que toda a superfície ficasse exposta à radiação UV ao longo do tempo, necessário para que houvesse efetiva esterilização, e à pequena quantidade de amostras usadas nos ensaios, considera-se esta técnica pouco prática, embora efetiva.

Testes realizados com as amostras submetidas à radiação gama deram resultados negativos quanto às unidades formadoras de colônia, demonstrando a eficiência do método.

12.3 Análise da contagem de esporos e unidade formadora de colônias dos ensaios da isoterma de crescimento fúngico.

Os resultados para as isotermas de crescimento fúngico são apresentados nas Tabelas 12.2, 12.3 e 12.4. Note-se que, para as condições de armazenamento com menor UR (cerca de $\pm 75\%$, com solução de NaCl), há pouco crescimento, o qual cresce expressivamente para as condições de maior UR. Na Figura 12.1, é apresentado o crescimento do *Aspergillus flavus*, num ensaio após 15 dias em UR em cerca de $\pm 90\%$.

Prado et al. (1991) realizaram ensaios de isoterma de crescimento e produção de aflatoxina para a variedade Tatu Vermelho, com contaminação de origem (- sem injetar suspensão), a 25°C , no período de 120 dias e UR variando de

75 a 97 %, e concluíram que o crescimento foi lento em até 60 dias de armazenamento, mas a contagem de fungos e leveduras em 15 dias foi de $\pm 10^3$ UFC/g e $\pm 10^5$ UFC/g na UR de 97 %. Entretanto, em 90 dias, em todas as umidades o crescimento foi na faixa de $\pm 10^6$ UFC/g.

Ao se considerar a produção de esporos, observa-se nos resultados do presente trabalho, que houve mínima produção para as duas UR mais baixas. No entanto, quando se analisam os resultados de UFC, houve produção mesmo na UR intermediária (solução de KCl), o que mostra que, em umidades baixas, os esporos permaneceram como inicialmente injetados, sem ocorrer a infestação nos grãos.

Embora os resultados para as vagens sejam consideravelmente menores que os dos grãos, não é possível considerá-los desprezíveis. Observou-se visualmente que, quando as vagens eram íntegras, a intensidade de infestação era baixa, mas, quando as vagens apresentaram pequenas fissuras, a infestação foi intensa. A casca serve de proteção aos grãos, mas a infestação pode ocorrer através da face externa na divisão da casca, por difusão por meio dos espaços intercelulares e pelas fissuras na casca. As duas primeiras formas de infestação são inerentes da planta e não são possíveis de serem evitadas de forma operacionalmente simples. De todo modo, a ocorrência de ambas indica que períodos prolongados de armazenamento favorecem a infestação dos grãos. Quanto à quebra das cascas, esta poderia ser minimizada pelo ajuste fino dos maquinários de colheita e dos equipamentos de beneficiamento.



Figura 12.1 - Amostra de amendoim no período P_1 na umidade relativa de $\pm 90,3$ % na isoterma de crescimento do *Aspergillus flavus* em amendoim Runner IAC 886 .

Tabela 12.2 - Contagem de *Aspergillus flavus* expressas em esporos/mL e UFC/gramas de amostras a 25° C.

	Umidade Relativa (%)	Concentrações (esporos/mL)	Período 1 – 15 dias		Período 2 – 30 dias		
			Esporos/ mL	UFC/gramas	Esporos/ mL	UFC/gramas	
G R Ã O S	U₁ - NaCl (75,32 %)	C₁ (10 ⁴)	0	0 (zero)	0	1 x 10 ⁶	
			0	0 (zero)	0	3 x 10 ⁵	
			C₂ (10 ⁶)	1	4 x 10 ⁶	0	0 (zero)
				0	2 x 10 ⁶	0	3 x 10 ³
		U₂ - KCl (84,34 %)	C₁ (10 ⁴)	1	1 x 10 ⁴	0	15 x 10 ⁶
				0	6 x 10 ³	0	1 x 10 ⁶
		C₂ (10 ⁶)	0	2 x 10 ⁶	0	6 x 10 ⁶	
			0	1 x 10 ³	0	18 x 10 ⁶	
	U₃ -BaCl₂ (90,30 %)	C₁ (10 ⁴)	16	12 x 10 ⁷	65	> 6,5 x 10 ⁶ Est	
			19	10 x 10 ⁷	54	> 6,5 x 10 ⁶ Est	
			C₂ (10 ⁶)	14	11 x 10 ⁷	33	> 6,5 x 10 ⁶ Est
				16	> 6,5 x 10 ⁶ Est	38	> 6,5 x 10 ⁶ Est
V A G E N S	U₁ - NaCl (75,32 %)	C₁ (10 ⁴)	0	1 x 10 ³	0	0 (zero)	
			0	0 (zero)	0	0 (zero)	
			C₂ (10 ⁶)	0	1 x 10 ⁶	0	19 x 10 ⁶
				0	2 x 10 ⁶	0	15 x 10 ⁶
		U₂ - KCl (84,34 %)	C₁ (10 ⁴)	0	4x 10 ⁶	0	1 x 10 ⁵
				0	2 x 10 ⁵	0	3 x 10 ⁵
		C₂ (10 ⁶)	0	1 x 10 ⁴	2	1 x 10 ⁶	
			0	3 x 10 ⁶	1	1 x 10 ⁶	
	U₃ -BaCl₂ (90,30 %)	C₁ (10 ⁴)	1	15 x 10 ⁶	8	> 6,5 x 10 ⁶ Est	
			8	88 x 10 ⁶	10	57 x 10 ⁶	
			C₂ (10 ⁶)	3	8 x 10 ⁶	3	> 6,5 x 10 ⁶ Est
2				38 x 10 ⁶	15	> 6,5 x 10 ⁶ Est	

Tabela 12.3 - Contagem de *Aspergillus flavus* expressas em esporos/mL e UFC/gramas de amostras a 30° C.

		Período 1 – 15 dias		Período 2 – 30 dias			
	Umidade Relativa (%)	Concentrações (esporos/mL)	Esporos/ mL	UFC/gramas	Esporos/ mL	UFC/gramas	
G R Ã O S	U₁ - NaCl (75,09 %)	C₁ (10 ⁴)	0	1 x 10 ⁵	0	2 x 10 ²	
			0	2 x 10 ⁶	0	1 x 10	
			C₂ (10 ⁶)	0	4 x 10 ⁶	15	4 x 10 ⁶
				0	1 x 10 ⁶	0	3 x 10 ⁶
		U₂ - KCl (83,62%)	C₁ (10 ⁴)	0	4 x 10 ³	2	2 x 10 ⁶
				0	16 x 10 ²	0	1 x 10 ⁶
			C₂ (10 ⁶)	0	3 x 10 ⁶	10	4 x 10 ⁵
				1	3 x 10 ⁶	6	3 x 10 ⁶
	U₃ - BaCl₂ (89,90%)	C₁ (10 ⁴)	38	13 x 10 ⁶	199	> 6,5 x 10 ⁶ Est	
			74	3 x 10 ⁶	234	> 6,5 x 10 ⁶ Est	
			C₂ (10 ⁶)	106	12 x 10 ⁶	274	> 6,5 x 10 ⁶ Est
				143	16 x 10 ⁶	233	> 6,5 x 10 ⁶ Est
V A G E N S	U₁ - NaCl (75,09 %)	C₁ (10 ⁴)	0	0 (zero)	0	2 x 10 ⁵	
			0	0 (zero)	0	3 x 10 ⁶	
			C₂ (10 ⁶)	0	1 x 10 ⁶	0	13 x 10 ⁶
				0	1 x 10 ⁶	0	3 x 10 ⁶
		U₂ - KCl (83,62%)	C₁ (10 ⁴)	0	3 x 10 ³	3	9 x 10 ³
				0	4 x 10 ⁵	3	6 x 10 ⁶
		C₂ (10 ⁶)	0	2 x 10 ⁵	4	2 x 10 ⁶	
			1	3 x 10 ³	5	3 x 10 ⁵	
	U₃ - BaCl₂ (89,90%)	C₁ (10 ⁴)	1	10 x 10 ²	8	3 x 10 ⁵	
			3	2 x 10 ⁴	25	1 x 10 ⁵	
			C₂ (10 ⁶)	5	1 x 10 ⁵	14	> 6,5 x 10 ⁶ Est
				1	17 x 10 ⁶	10	3 x 10 ⁶

Tabela 12.4 - Contagem de *Aspergillus flavus* expressas em esporos/mL e UFC/gramas de amostras à 35° C.

	Umidade Relativa (%)	Concentrações (esporos/mL)	Período 1 – 15 dias		Período 2 – 30 dias		
			Esporos/ mL	UFC/gramas	Esporos/ mL	UFC/gramas	
G R Ã O S	U₁ - NaCl (74,87%)	C₁ (10 ⁴)	0	0 (zero)	0	2 x 10 ³	
			1	0 (zero)	0	0 (zero)	
			C₂ (10 ⁶)	0	15 x 10 ⁵	0	18 x 10 ⁶
				0	4 x 10 ⁶	0	1 x 10 ⁶
		U₂ - KCl (82,95%)	C₁ (10 ⁴)	0	1 x 10 ⁵	0	4 x 10 ³
				0	7 x 10 ²	0	1 x 10 ⁵
		C₂ (10 ⁶)	0	3 x 10 ⁶	1	1 x 10 ⁵	
			1	1 x 10 ⁶	4	1 x 10 ⁴	
	U₃ - BaCl₂ (89,50%)	C₁ (10 ⁴)	83	1 x 10 ⁶	155	13 x 10 ⁶	
			238	2 x 10 ⁶	217	5 x 10 ⁶	
			C₂ (10 ⁶)	228	8 x 10 ⁶	448	22 x 10 ⁶
				236	3 x 10 ⁶	379	68 x 10 ⁶
V A G E N S	U₁ - NaCl (74,87%)	C₁ (10 ⁴)	0	0 (zero)	0	1 x 10 ³	
			0	1 x 10	0	0 (zero)	
			0	1 x 10	0	8 x 10 ⁶	
			C₂ (10 ⁶)	0	0 (zero)	0	3 x 10 ⁶
				1	24 x 10 ⁶	1	1 x 10 ⁴
				0	1 x 10 ⁵	0	11 x 10 ³
		C₂ (10 ⁶)	4	7 x 10 ⁵	0	3 x 10 ³	
			1	3 x 10 ⁶	5	1 x 10 ⁴	
	U₃ - BaCl₂ (89,50%)	C₁ (10 ⁴)	14	8 x 10 ⁵	38	3 x 10 ⁶	
			14	9 x 10 ⁵	16	2 x 10 ⁵	
			C₂ (10 ⁶)	21	2 x 10 ⁶	17	23 x 10 ⁶
				27	7 x 10 ⁵	26	30 x 10 ⁶

Nas visitas técnicas realizadas na Empresa A (Beneficiamento) e Empresa B (Fabricação de doces), não há controle efetivo das variáveis temperatura e UR no armazenamento, uma vez que os custos envolvidos em tal controle são muito elevados. Como na empresa B trabalha-se com baixos estoques e um bom sistema de PEPS (o Primeiro que Entra é o Primeiro que Sai), acredita-se que a possibilidade de infestação seja pequena, caso os grãos não estejam fortemente contaminados na Recepção. Como não são feitas as análises microbiológicas dos grãos, apenas de aflatoxina, é recomendável que os períodos de armazenamento sejam rigorosamente controlados nos meses de maior precipitação chuvosa do ano.

Observou-se que também é minimizada a infestação de fungos na empresa B, pois o armazenamento é feito em sacas de ráfia, empilhadas de acordo com as Boas Práticas de Fabricação, ou seja, em pilhas separadas por palletes de PVC, com volume máximo 10 sacas, afastadas umas das outras e da parede com espaçamento de 60 cm.

Já na Empresa A, a situação é mais crítica, uma vez que a movimentação do estoque não obedece apenas ao fluxo de oferta de produtores e de pedidos das fábricas, mas também a um fator de preço de mercado, uma vez que é prática comum aguardarem-se as melhores cotações da *commodity* para negociar os estoques. Agrava esta situação o fato de o armazenamento ser feito em pilhas de grãos soltos (piramidal), num ambiente com temperaturas elevadas e sem ventilação, de modo que a probabilidade de infestação é elevada.

Na análise estatística dos resultados apresentados, considerou-se uma análise fatorial em diagrama de blocos inteiramente casualizados com 3 fatores, pelo teste de Tukey para as médias. Foram adotados como fatores a temperatura, a umidade relativa e a concentração inicial de esporos. A variável período de armazenamento não foi considerada como fator na análise estatística pelo fato de o período de armazenamento nas indústrias de doces de amendoim ser geralmente inferior a 15 dias, adotando-se este período fixo para a avaliação da influência dos demais fatores no crescimento do fungo.

Os resultados dos testes de Tukey para as contagens de esporos, em amendoim em grão e em vagem, são resumidamente apresentados, nas Tabelas 12.5 e 12.6, respectivamente.

Tabela 12.5 - Testes de Tukey para as médias de número de esporos/mL em amendoim em grão.

Variável Temperatura		Variável UR		Variável Concentração	
25 °C	5,6 B	74,87 %	0,17 B	10 ⁴	26,1 A
30 °C	30,2 B	82,95 %	0,25 B	10 ⁶	41,4 A
35 °C	65,6 A	89,50 %	100,9 A		

Tabela 12.6 - Testes de Tukey para as médias de número de esporos/mL em amendoim em vagem.

Variável Temperatura		Variável UR		Variável Concentração	
25 °C	1,17 B	74,87 %	0,0 B	10 ⁴	2,3 A
30 °C	0,9 B	82,95 %	0,6 B	10 ⁶	3,6 A
35 °C	6,8 A	89,50 %	8,3 A		

Observe-se que os resultados para a quantidade de esporos/mL são similares para os grãos e para as vagens. Para as temperaturas de 25 e 30°C os resultados são estatisticamente iguais ao de 35°C é significativamente diferente. Quanto à influência da umidade relativa, apenas para a maior UR é que os resultados foram significativamente diferentes. Quanto à concentração inicial de esporos, esta não foi uma variável que interferisse na média final dos esporos após 15 dias de incubação. Deste modo, as condições mais favoráveis à produção de esporos são temperatura 35°C e umidade relativa de cerca de 90%.

Os resultados dos testes de Tukey para as contagens de unidades formadoras de colônias/grama, em amendoim em grão e em vagem, são resumidamente apresentados, nas Tabelas 12.7 e 12.8, respectivamente. Para estes resultados, os comportamentos para grãos e fungos são muito distintos. Para as vagens, quaisquer das variáveis adotadas não alteraram significativamente os resultados.

Tabela 12.7: Testes de Tukey para as médias de número de UFC/g em amendoim em grão.

Variável Temperatura		Variável UR		Variável Concentração	
25 °C	28.876.417 A	74,87 %	1.550.000 B	10 ⁴	13.401.239 A
30 °C	4.758.800 B	82,95 %	1.010.275 B	10 ⁶	10.333.389 A
35 °C	1.966.725 B	89,50 %	33.041.667 A		

Tabela 12.8 - Testes de Tukey para as médias de número de UFC/g em amendoim em vagem.

Variável Temperatura		Variável UR		Variável Concentração	
25 °C	13.267.583 A	74,87 %	416.752 A	10 ⁴	7.412.501 A
30 °C	1.643.917 A	82,95 %	2.968.000 A	10 ⁶	4.317.389 A
35 °C	2.683.335 A	89,50 %	14.210.083 A		

Para os grãos, a variável temperatura tem influência positiva sobre as UFC, sendo a maior produção observada para a temperatura de 25°C. Quanto à umidade relativa, os resultados para a maior UR são significativamente distintos dos demais, apresentando uma maior quantidade de UFC. Novamente, as concentrações iniciais de esporos não foi uma variável que interferisse positivamente no processo.

Por outro lado, estes resultados diferem dos de Prado et al. (1991) para a variedade Tatú Vermelho, que observaram um crescimento discreto em até 60 dias de exposição das amostras a ambiente com UR variando entre 75 e 97% a 25°C. Para 15 dias de ensaio, estes autores obtiveram contagem de fungos e leveduras de cerca de 10⁵ UFC/g para UR igual a 97% e após 90 dias cerca de 10⁶ UFC/g em todas UR. Ressalte-se que as amostras de Prado e colaboradores não foram inoculadas com suspensão de esporos de *A.flavus* e eram dotadas de sua carga original de microrganismos. Assim, houve uma competição natural entre os

mesmos até que as colônias de *A. flavus* se sobressaísse, de modo que o período para que houvesse uma maior infestação foi relativamente mais longo.

Comparou-se estes resultados com as condições evidenciadas nas visitas técnicas realizadas na Empresa A (Beneficiamento) e Empresa B (Fabricação de doces), verificou-se que não há controle efetivo das variáveis temperatura e umidade relativa nas diversas etapas que envolvem armazenamento, uma vez que os custos envolvidos em tal controle são muito elevados. Como a Empresa B trabalha com baixos estoques e um bom sistema de PEPS (o Primeiro que Entra é o Primeiro que Sai), acredita-se que a possibilidade de infestação seja pequena, caso os grãos não estejam fortemente contaminados na Recepção. Como não são feitas as análises microbiológicas dos grãos, apenas de aflatoxina, é recomendável que os períodos de armazenamento sejam rigorosamente controlados nos meses de maior precipitação chuvosa do ano.

Já na Empresa A, a situação é mais crítica, uma vez que a movimentação do estoque não obedece apenas o fluxo de oferta de produtores e de pedidos das fábricas, mas também a um fator de preço de mercado, uma vez que é prática comum aguardar-se as melhores cotações da commodity para negociar os estoques. Agrava esta situação o fato do armazenamento ser feito em pilhas de grãos soltos (piramidal), num ambiente com temperaturas elevadas e sem ventilação, de modo que a probabilidade de infestação é elevada. Assim, a probabilidade de infestação não é desprezível e deve haver um reestudo das metodologias para que, na impossibilidade de ser refrigerar e desumidificar os armazéns, a possibilidade de infestação seja minimizada.

12.4 Análise dos teores de Aflatoxinas nos ensaios da isoterma de produção de Aflatoxina.

Os resultados para a produção de aflatoxina pelo *A. flavus* nos grãos de amendoim, nas temperaturas de 25 e 30° C, são apresentados, nas Tabelas 12.9 e 12.10, respectivamente. Note-se que, para a menor umidade relativa (UR=± 75%), não houve produção de aflatoxina e que, para a umidade relativa intermediária (UR

= ± 84 %), os teores ficaram abaixo de 20 ppb, do regulamentado pela Resolução nº 274, de 15 de novembro de 2002 (BRASIL, 2002). Já para a maior UR (UR= ± 90 %), a produção de aflatoxina excede qualquer limite aceitável. Ainda que os outros resultados para UR de ± 84 % sejam aceitáveis, prevêem-se dificuldades para a Empresa A manejar os estoques e atender às legislações dos diferentes mercados consumidores, como os limites apresentados na Tabela 2.3, apresentada no Capítulo 2 deste trabalho.

Ao comparar os resultados obtidos na umidade relativa em torno de 90% verificou-se que os resultados em cromatografia em camada delgada são semelhantes aos obtidos no trabalho de resistência dos genótipos de amendoim realizado por Prado et al. (1999).

Tabela 12.9 - Isoterma de produção de Aflatoxina a 25°C.

Sal	Amostra (esporos/mL)	Período P ₁ – 15 dias		Período P ₂ – 30 dias	
		Aflatoxina - Fluorímetro (ppb)	Aflatoxina CCD (μ /grama)	Aflatoxina - Fluorímetro (ppb)	Aflatoxina CCD (μ /grama)
U ₁ - NaCl (75,32 %)	C ₂ ($\pm 10^6$)	ND*	ND**	ND*	ND**
		ND*	ND**	ND*	ND**
U ₂ - KCl (84,34 %)	C ₂ ($\pm 10^6$)	ND*	NA	ND*	NA
		ND*	6,9	1,322	12
U ₃ - BaCl ₂ (90,30 %)	C ₂ ($\pm 10^6$)	250	NA	260	NA
		210	4182,62	220	5155,73

* ND – Não detectado; limite de detecção de 1 a 300 ppb no fluorímetro.

**ND – Não detectado; limite mínimo de detecção de 1 μ g/g.

NA – Não Analisado

CCD – Cromatografia em Camada Delgada.

Tabela 12.10 - Isoterma de produção de Aflatoxina a 30°C.

Sal	Amostra (esporos/mL)	Período P ₁ – 15 dias		Período P ₂ – 30 dias	
		Aflatoxina - Fluorímetro (ppb)	Aflatoxina CCD (µg/ grama)	Aflatoxina - Fluorímetro (ppb)	Aflatoxina CCD (µg/ grama)
U ₁ - NaCl (75,09 %)	C ₂ (±10 ⁶)	ND*	ND**	ND*	ND**
		ND*	ND**	ND*	ND**
U ₂ - KCl (83,62%)	C ₂ (±10 ⁶)	1,3	ND**	ND*	ND**
		1,3	1,33	12	6,7
U ₃ - BaCl ₂ (89,90%)	C ₂ (±10 ⁶)	210	NA	220	NA
		250	NA	250	6141,57

* ND – Não detectado; limite de detecção de 1 a 300 ppb no fluorímetro.

**ND – Não detectado; limite mínimo de detecção de 1 µg/g.

NA – Não Analisado

CCD – Cromatografia em Camada Delgada.

Estes resultados diferem dos de Prado et al. (1991), que verificaram a ocorrência de aflatoxina em umidades relativas de 93 e 97%, após 60 dias de incubação. Estes autores sugeriram que os grãos deveriam ser desidratados até que a atividade de água do material fosse reduzida em níveis inferiores a 86%. No entanto, no presente trabalho os índices de aflatoxina não foram desprezíveis para UR de cerca de 84% em um período relativamente curto, de 15 dias. Ressalte-se que os experimentos de Prado et al. (1991) foram feitos com a carga natural de microrganismos, enquanto que os fungos *A. flavus* do trabalho atual foram inoculados após a esterilização das amostras, o que pode levar a uma maior produção de toxina num curto espaço de tempo devido à falta de microrganismos competidores.

Na Tabela 12.11 são apresentados os resultados dos testes de Tukey para as médias de teor de aflatoxinas determinadas por fluorimetria, tendo como variáveis a temperatura, a umidade relativa e o período de armazenamento.

Observe-se que a variável temperatura não tem influência significativa sobre a produção de aflatoxina nos dois níveis testados, bem como os dois períodos de armazenamento. Apenas a variável umidade relativa, em seu maior valor, apresentou efeito significativo sobre as médias.

Tabela 12.11: Testes de Tukey para as médias de teor de aflatoxinas no amendoim em grão (fluorimetria).

Variável Temperatura		Variável UR		Variável Período	
25 °C	78,4 A	74,87 %	0,0 B	15 dias	76,9 A
30 °C	79,7 A	82,95 %	3,49 B	30 dias	81,3 A
		89,50 %	233,75 A		

Estes resultados são compatíveis com os observados na literatura, uma vez que existe certa discordância em relação à faixa de temperatura ótima para a produção da micotoxina e mesmo quanto à umidade relativa. Diener e Davis (1966) observaram um alto índice de contaminação para temperaturas iguais a 25 e 30°C, enquanto que o ICMSF (1996) indica que os limites ótimos para a produção da toxina vão de 16 a 31°C. Deste modo, o fato de não haver diferença significativa entre os dois níveis de temperatura adotados é provável. Quanto à Umidade Relativa, o ICMSF (1996) indica uma faixa entre 82 e 99% com índices ótimo acima de 95%. Prado et al. (1991) não observaram produção de toxina para UR inferior a 86%, com atividade ótima ocorrendo para UR igual a 93%, de modo que o aumento da produção observado para a maior umidade relativa no presente estudo é coerente.

De acordo com o teste de Tukey para as médias do teor de aflatoxinas nos grãos de amendoim, mantendo-se constantes a umidade relativa e o período de armazenamento e variando-se apenas a temperatura, observou-se que não houve diferença significativa na produção da micotoxina nas temperaturas de 25 e 30 °C, provavelmente pelo fato de o gradiente térmico ser pequeno e estar contido dentro da faixa de temperatura ótima de desenvolvimento do *Aspergillus*. Também os testes de Tukey variando-se apenas o período de armazenamento, mantendo-se constantes a temperatura e a umidade relativa, mostraram não haver diferença significativa no teor de aflatoxinas presentes nos grãos de amendoim armazenados

pelos períodos de 15 e 30 dias, uma vez que o fungo inicia rapidamente as suas atividades metabólicas quando em contato com o substrato presente no amendoim, atingindo uma taxa metabólica estável após um curto período de tempo.

Por outro lado, de acordo com os testes de Tukey variando-se apenas a umidade relativa, mantendo-se constantes a temperatura e o período de armazenamento, foi observado um teor de aflatoxinas significativamente maior nos grãos de amendoim mantidos em ambiente com umidade relativa de quase 90 %, havendo menor ou nenhuma produção da micotoxina nos grãos mantidos em umidades relativas inferiores, o que se deve ao fato de o fungo exigir elevada atividade de água para o seu desenvolvimento e conseqüente produção da micotoxina como metabólito secundário.

Assim, pode-se afirmar que apenas a variável umidade relativa exerceu influência significativa na produção de aflatoxinas nos grãos de amendoim armazenados sob as condições estabelecidas na pesquisa. Observou-se também que a análise de fluorimetria teve o resultado atingindo o limite de leitura do fluorímetro para a umidade em torno de 90%. Assim, foram realizadas as análises em cromatografia em camada delgada para confirmação dos resultados onde se verificou que o resultado obtido por fluorimetria foi muito elevado.

Ao compararmos os resultados de cromatografia em camada delgada (CCD) com os apresentados por Prado et al. (1999), pode-se dizer que se um lote de amendoim, de qualquer variedade, se estiver com uma contaminação de fungo (esporos) na recepção, e não forem realizadas as medidas preventivas durante as etapas do processo, a contaminação por aflatoxina pode atingir índices de cerca de 1000 até 38000 ppb como foi apresentado pelos quatro genótipos de amendoim no estudo das resistências destes e também nos dados deste trabalho para a variedade Runner IAC 886.

CAPÍTULO 13

CONCLUSÕES – PARTE C

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- As amostras colocadas nas condições de armazenamento com umidade relativa de equilíbrio de cerca de 75 % apresentaram um crescimento baixo do *Aspergillus flavus* e nenhuma produção de aflatoxina. Portanto, é conveniente secar as vagens até uma umidade de equilíbrio inferior a 11 % e os grãos a 8 %, e mantê-los armazenados em ambiente com umidade relativa inferior a 75 %.
- Nas condições de armazenamento com umidade relativa de equilíbrio de cerca de 80 %, o crescimento do *Aspergillus flavus* foi relativamente baixo e a produção de aflatoxina igualmente baixa, nos dois períodos.
- Observou-se que, nas umidades relativas acima de 90%, em temperatura de cerca de 25° C, o *Aspergillus flavus* tem um elevado crescimento e produção de aflatoxina.

Assim, conclui-se que as condições ideais ao crescimento do fungo *Aspergillus flavus* e à produção de aflatoxina são freqüentemente encontradas nos armazéns das empresas estudadas na primeira parte deste trabalho.

CAPÍTULO 14

CONCLUSÕES E SUJESTÕES GERAIS

14.1 Conclusões gerais

As conclusões gerais são:

- Observou-se a necessidade de uma seqüência de gestão do perigo químico aflatoxina desde o plantio até a mesa do consumidor. Essa gestão é difícil de acontecer em todos os seguimentos devido às dificuldades de recursos financeiros e a falta de informação técnica para a realização das medidas preventivas.
- A isoterma de sorção é um método simples, preciso e de baixo custo que, aliado aos programas de computação elaborados para determinação dos parâmetros da equação recomendada, permite obter melhores dados de conteúdo de umidade de equilíbrio para serem utilizados no melhoramento de técnicas de secagem, manuseio, armazenamento e transporte de amendoim e seus derivados.
- Observando-se o comportamento do *Aspergillus flavus* nas altas umidades relativas do ambiente e comparando-se aos resultados obtidos nas isotermas de sorção, verifica-se que pode ocorrer uma infestação durante as etapas com pontos críticos de controle do beneficiamento e na fabricação de doces, já que os controles de umidade relativa e temperatura do ambiente não ocorrem e que o volume de grãos é alto e o custo para realização destas medidas também.

14.2 Sugestões gerais

As sugestões gerais são:

- Na gestão do perigo químico aflatoxina, é importante a conscientização dos produtores, dos beneficiadores e dos fabricantes de derivados de amendoim em realizarem os programas de Boas Práticas Agrícolas e de Fabricação.
- Acompanhar as medidas preventivas em cada etapa dos processos, como: identificar os fornecedores qualificando-os; retirar os lotes com índices altos de contaminação por aflatoxina e de sujidade; realizar amostragens compatíveis para as análises; analisar a umidade dos grãos e os teores de aflatoxinas; separar os lotes com contaminações acima dos limites e destiná-los para a produção de óleo e sementes e proteger os grãos e produtos de amendoim da umidade durante os transportes e distribuição.
- Compor com os resultados obtidos em estudos científicos uma tabela de referência para auxiliar nos controles rotineiros da qualidade dos produtos derivados de amendoim de diversas variedades de grãos.
- Criar uma política para a implantação de silos adequados (coletivos) para armazenamento seguro de amendoim.
- Melhorar a orientação técnica para os pequenos produtores e industrializadores.
- Cumprir os limites das legislações vigentes e adequá-las à realidade das diferentes variedades de grãos de amendoim.

REFERÊNCIAS

ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculos de patógenos de insetos. Controle microbiológico de insetos. Editado por Sérgio Batista Alves, **FEALQ**, cap. 23, p. 765 – 777 de 1163p. 2ª edição, Piracicaba, 1998.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (APHA) **Control of Communicable Diseases Manual**. Abram S. Benenson, 16th ed, p. 57-59; 325-326, 1995.

AOAC. **Official methods of analysis**. 14th ed; p. 500, Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1984.

AOAC. Official methods of analysis of the Assosiation of Official Analytical Chemists. 16th ed; **Association of Official Analytical Chemists**, Washington, 1995.

AOAC. **Official methods of analysis**. 16th ed; Washington: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

AQUINO, S. et al. Efeitos da radiação gama na contaminação fúngica de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Tecnologia das Radiações, **Universidade de São Paulo**, Brasil. 2005.

ARRUS, K. et al. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 41 n. 5, p. 513 - 527, 2005.

ATHAYDE, A. Sistemas GMP e HACCP garantem produção de alimentos inócuos. **Revista Engenharia de Alimentos**, São Paulo, v. 5, n. 23, p. 13-17, jan./fev. 1999.

BAKKER ARKEMA, F. W. **CIGR Handbook of Agricultural Engineering**. Volume IV: Agro-Processing Engineering. American Society of Agricultural Engineers, 1999. 527 p.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; VEGA-MERCADO, H. Dehydration of foods. **Chapman&Hall**, 330p., 1996.

BARROZO, M. A. S. et al. A study of desorption isotherms of lentilis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Brazilian, v. 17, p. 105 -109, 2000.

BAUCOUR, P.; DAUDIN, J. D. Development of a new method for fast measurement of water sorption isotherms in the high humidity range validation gelatine gel. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 44, n. 2, p. 97-107, May 2000.

BENNET, W. L.; STEED, L. L. An integrated approach to food safet. **Quality Progress**, Milwaukee, v. 32, n. 2, p. 37-42 , Feb. 1999.

BERTOLINI, M.; RIZZI, A.; BEVILACQUA, M. An alternative approach to HACCP system implementation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 79, n. 4, p. 1322-1328, Apr. 2007.

BIANCO, A. M. et al. Influence of oil content on sorption isotherms of four varieties of peanut at 25 °C. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 47, n. 4, p. 327-331, Mar. 2001.

BLATCHFORD, S. M.; HALL, D. W. Methods of drying groundnuts: I. Natural methods. **Trop. Sci.** v.1, p.6-32, 1963.

BLIGH, E. C., DYER, W. J. A rapid method of total lipid: extraction and purification. **Can. J. Biochem Physiol.**, Otthwa, v.37, p. 911-917, 1959.

BOTHAST, R. J.; FENNELL, D. I. Medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. **Mycologia**, New York, v. 66, n. 2, p. 365-369, 1974.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 1.428/MS, de 26 de novembro de 1993. Publicada no **Diário Oficial da União** de 31 de maio de 1993. "Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos", as "Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos" e o "Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ's) para Serviços e Produtos na Área de Alimentos".

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Portaria nº 183, de 21 de março de 1996, publicada no **Diário Oficial da União** de 25 de março de 1996, Aflatoxinas $B_1 + B_2 + G_1 + G_2 = 20$ ppb. Seção I, página 4929.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO. Portaria nº 46, de 10 de fevereiro de 1998. Publicado no **Diário Oficial da União** de 16/03/1998, Seção 1, Página 24. Ementa: Instituir o Sistema de Análise de

Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC a ser implantado, gradativamente, nas indústrias de produtos de origem animal sob o regime do serviço de inspeção federal - SIF, de acordo com o manual genérico de procedimentos.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002. Publicação no D.O.U. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 22 de dezembro de 2002. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o Regulamento Técnico Mercosul sobre os limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Publicação no D.O.U. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 23 de outubro de 2002. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC nº 172, de 04 de julho de 2003. D.O.U. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 07 de julho de 2003. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Amendoins Processados e Derivados e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Amendoins Processados e Derivados.

CALORI-DOMINGUES, M.A. Amostragem e prepare de amostra para análise de aflatoxinas em amendoim. I ENCONTRO PARA CAPACITAÇÃO DE RESPONSÁVEIS TÉCNICOS DE ESTABELECIMENTOS PROCESSADORES DE AMENDOIM – Laboratório de Micotoxinas **LAN/ESALQ/USP**. Piracicaba – 2005.

CHEN, C. Moisture sorption isotherms of pea seeds. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.58, n.1, p. 45–51, 2003.

CHEN, C. S., & CLAYTON, J. T. The effect of temperature on sorption isotherms of biological materials. **Transactions of the ASAE**, v.14, n.5, p. 927–929, 1971.

CHEN, C. A rapid method to determine the sorption isotherms of peanuts. **Journal of Agricultural Engineering Research**, London, v. 75, n. 4, p. 401–408, Apr. 2000.

CHEN, C.; MOREY, R. V. Comparision of four EMC/ERII equacions. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v.32, n.3, p. 983–990, 1989.

CHUNG, D. S., e PFOST, H. B.. Adsorption and desorption of water vapour by cereal grains and their products Part II. **Transactions of the ASAE**, v.10, n. 4, p.549–551, 1967.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Codex Guidelines for the Application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) system. Joint FAO/WHO Codex Committee on Food Hygiene. **In Food hygiene basic text**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, WHO/FNU/FOS/93.3 Annex II. (1993).

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Codex standard for peanuts. Joint FAO/WHO Codex Committee on Food Hygiene. **In Food hygiene basic text**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, CODEX STAN 200. (1995)

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION (1997). Hazard analysis and critical control point (HACCP) system and guidelines for its application. Annex to CAC/RCP 1-1969, Rev. 3 (1997). **In Food hygiene basic text**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations,

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Joint FAO/WHO Food Standards Programme**. Codex Committee on Food Hygiene. Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessments. Secretariat of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. CAC/GL 30 – 1999.

DAVEY, P. M.; ELCOATE, S. Moisture content/relative humidity equilibria of tropical stored produce. (part 2, Oilseeds). **Trop. Sicc. Prod. Inf.**, v. 11, p. 439-467, 1965.

DIENER, U. L. **Unwanted biological substances in foods: aflatoxins**. In: AYRES, J. C.; KIRSCHMAN, J. C. (eds). Impact of toxicology on food processing. Westport: A V I, p. 122-150, 1981.

DIENER, U. L. et al. Epidemiology of Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p.249-70, 1987.

DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR (DDTHA). **Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos: Aflatoxinas e outras Micotoxinas**. Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, abr. 2003. Disponível em: <www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em: 27 jul. 2006.

EUROPEAN MYCOTOXIN AWARENESS NETWORK (EMAN). **HACCP: Prevention and Control of Mycotoxins.** Disponível em: <<http://www.mycotoxins.org>>. Acesso em: 01 jul. 2007.

ELLIS, W. O. et al. Effect of gas barrier characteristics of films on aflatoxin production by *aspergillus-flavus* in peanuts packaged under modified atmosphere packaging (map) conditions. **Food Research International**, Barking, v. 27, n. 6, p. 505-512, 1994.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **World Regulations for mycotoxins: a compendium.** FAO Food and Nutrition, Rome, v. 64, 1995.

FDA/CFSAN. **Bad Bug Book: Aflatoxins.** Disponível em: <<http://www.fao.org>>, <<http://www.cfsan.fda.gov>>. 2003. Acesso em: 29 jul. 2006.

FERNANDEZ, E. M. et al. Fungus incidence on peanut grains as affected by drying method and Ca nutrition. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 52, n. 1/2, p. 9-15, May 1997.

FIGUEIREDO, V. F.; COSTA NETO, P. L. O. Implantação do HACCP na Indústria de Alimentos. **GESTÃO & PRODUÇÃO**, São Carlos, v. 8, n. 1, p. 100-111, abr. 2001.

FONSECA, H. Amendoim: Pré-processamento. Parte B. Departamento de Agricultura e Horticultura. **Escolas Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo**, 1983.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos.** Editora Nobel, p. 159, 272-273, 7ª edição. 1984.

GREENSPAN, L. Humidity fixed-points of binary saturated aqueous-solutions. **Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A: Physics and Chemistry**, Washington, v. 81, n. 1, p. 89-96, Jan./Feb. 1977.

GILLIER, P.; SILVESTRE, P. **El cacahute o mani.** Barcelona: Editorial Blume, 1970. 281p.

GEANKOPLIS, C.J. Transport Process and Unit Operations. 3rd edition, **Prentice-Hall**, 921p., 1993.

GODOY, O. P.; MARCOS, J. F.; CÂMARA, G. M. S. Tecnologia de Produção. Parte A, Departamento de Agricultura e Horticultura. **Escolas Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1983.**

GORAYEB, T. C. C. **Implantação Orientada de planos APPCC em indústrias de doces de amendoim e derivados.** “Escola SENAI Antônio Devisate”, São José do Rio Preto – SP. Programa Alimentos Seguros – PAS. 2004.

GUIA PARA ELABORAÇÃO DO PLANO APPCC. 2ª ed. Série Qualidade e Segurança Alimentar. **Projeto APPCC Indústria**, convênio CNI / SENAI / SEBRAE. Brasília, SENAI / DN. 2000. 301p

HELDMAN, D.R.; HARTEL, R.W. *Principles of Food Processing.* **Chapman & Hall**, p.1-218, 2000.

HENDERSON, S. M. A basic concept of equilibrium moisture content. **Agricultural Engineering**, v.33, n.2, p. 29–31,1952.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Limerick, v. 167, n. 2, p. 101-134, Oct. 2001.

ICMSF. **Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos.** Zaragoza: Acribia. 1996. p. 403- 428.

ILSI - INTERNATIONAL LIFE SCIENCE INSTITUTE **A simple guide to understanding and applying the hazard analysis critical control point concept.** 2nd edition. 1997.

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY. The use of irradiation for quality and safety. Public Affairs and Technical & Legislative Committees. **Food Science and Technology**, London, p 177-179, Mar. 1999.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA (IEA) e INSTITUTO AGRONÔMICO (IAC). Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Universidade de Campinas. Disponível em: <<http://www.redegoverno.gov.br/www.iea.sp.gov.br>>. Acesso em: 26 jul. 2006.

JARDIM, D. C. P. **Medidas de atividade de água.** In: Seminário sobre Atividade de Água em Alimentos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987.

JOUANY, J. P. - Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p. 342–362, 2007.

KIMURA, I. A.; MAEDA, M. Determinação de isotermas de adsorção de umidade: influência da concentração da solução e da variação no volume do recipiente. **Boletim da SBCTA**, Campinas, v. 27, p. 79-87, 1993.

LABUZA, T. P. Interpretation of sorption data in relation to the state of constituent water. In: DUCKWORTH, R. B. **Water Relations of Foods**. London: Academia Press. 1975.

LIN, M. T. Biologia dos fungos toxigênicos. IN: Encontro Nacional de Micotoxinas: Problemas e Soluções. **Anais do encontro**, p.11- 22, São Paulo, 1980.

MOHAPATRA, D.; RAO, P.S. Athin layer drying model of parboiled wheat. **Journal of Food Engineering**, Essex, p. 513- 518, 2005.

MORAES, M. H. P.; ABRANTES, S. M.; SANTOS, R. P. Aflatoxinas em amendoim, ontem e hoje. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 108, p. 49-52, maio 2003.

MUJUMDAR, A. S. **Handbook of Industrial Drying**. Marcel Dekker, Inc. 2 ed., v.1.742p., 1995.

NAVAS, S. A.; SABINO, M.; RODRIGUEZ AMAYA, D. B. Aflatoxin M-1 and ochratoxin A in humam milk bank in the city of São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, n. 5, p. 457 - 462, May 2005.

NETA, R. X. B.; HOLLAND, N.; DAMASCENO, K. S. F. S. C. Análise dos perigos e pontos críticos de controle durante o preparo da alface servida no restaurante universitário da UFRN. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 126, p. 36-43, nov./dez. 2004.

OLIVEIRA, F. S.; FRANCO, B. D. G. M. Análise de risco microbiológico: a nova ferramenta para gestão da segurança alimentar. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 108, p. 14-20, maio 2003.

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, ago. 1997.

OSWIN, C. R. The kinetics of package life. III. The isotherm. **J. Chem. Ind.** n. 65, p. 419-421, 1946.

PANISELLO, P. J.; QUANTICK, P. C. Technical barriers to Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP). **Food control**, Guildford, v.12, p. 165-173, abril, 2001.

PAYNE, G. A.; BROWN, M. P. Genetics e physiology do biosynthesis da aflatoxina. **Review Annual of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 329-62, 1998.

PELCZAR JUNIOR, J. M. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. v. 2, 2^o ed. Tradução de S. F. Yamada; T. V. Nakamura; B. P. Dias Filho. São Paulo: Makron Books, 1996.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus* Link e *Aspergillus parasiticus*. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 20, n.1, janeiro/junho, 2002.

PRADO, G. et al. Efeito da umidade relativa na contaminação microbiana e produção de aflatoxinas em amendoim em grão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 264-273, 1991.

PRADO, G. et al. Resistência de quatro genótipos de amendoim à produção de aflatoxina B₁ após a inoculação com *Aspergillus flavus* link. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, p. 84-87, Campinas,1999.

PRÓ-AMENDOIM INFORMA Um ano de Boas Práticas. **Programa de Auto-Regulamentação e Expansão do Consumo de Amendoim – Pró-Amendoim**, da Associação da Indústria de Chocolate, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (ABICAB). Ano 1- n^o 1, São Paulo, junho, 2004. Disponível em: <www.proamendoim.com.br> Acesso em: 02 de maio de 2006.

RANDALLS ROAD. **Leatherhead, Leatherhead Food Research Association Surrey KT22 7RY**. England, 2006. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br>. Acesso em 29 Jul. 2006.

RESENDE, O. et al. Isoterma e calor isotérmico de sorção do feijão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 626–631, jul./set. 2006.

RESNIK, S. L.; CHERIFE, J. Proposed theoretical water activity values at various temperatures for selected solutions to be used as reference sources in the range of microbial growth. **Journal of food protection**, Des Moines, v. 51, n. 5, p. 419-423, May/1988.

REY, L. Dicionário de termos médicos e saúde. Disponível em: <www.fiocruz.br>. Acesso em: 27 jul. 2006.

ROPKINS, K.; BECK, A. J. Evaluation of worldwide approaches to the use of HACCP to control food safety. **Trends in Food Science Technology**, Cambridge, v. 11, n. 1, p. 10-21, Jan. 2000.

ROSSETTO, C. A. V. et al. Efeito da calagem, da colheita e da secagem na qualidade sanitária de amendoim na seca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 567-573, Maio, 2003.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, London, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.

SABINO, M. et al. Avaliação da eficiência de dois kits comerciais para detecção de aflatoxina B₁ em amostras de milho, ração e amendoim e seus produtos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V.17, n.2, p.107-110, maio-agosto, 1997.

SANTOS, C.C.M. dos; LOPES, M. do R. V.; KOSSEKI, S.Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. V. 60(2), p. 153-157, São Paulo, 2001.

SASSAHARA, M.; NETTO, D. P.; YANAKA, E. K. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M-1 in raw milk in the North of Parana state. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 43, n. 6 p. 981 - 984, June. 2005.

SILVA, L. C. Fungos e Micotoxinas em Grãos Armazenados. **Universidade Federal do Espírito Santo**. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br> Acesso em: 27 jul. 2006.

SIMIONATO, E. M. R.S.; ASTRAY, R. M.; SYLOS, C.M. Ocorrência de Ocratoxina A e aflatoxinas em arroz. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.62(2), p.123-130, 2003.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUES AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 72, n. 1, p. 22-26, Jan./Feb. 1989.

SPERBER, W. H. HACCP does not work from farm to table. **Food Control**, Guildford, v.16, p. 511-514, 2005.

SPIESS, W. E. L.; WOLF, W. **Critical evaluation of methods to determine moisture sorption isotherms**. In: Water activity: theory and applications in food. New York: Academic Press, p. 215-233, 1987.

SWANSON, K. M. J. et al. **Colony count methods**. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: APHA/Technical Committee on Microbiological Examination for Foods. 1984. p. 75-94.

TEIXEIRA NETO, R. O. **Levantamento e aplicação de isotermas**. In: Seminário sobre Atividade de Água em Alimentos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987.

TRUJILLO, F. J.; YEOW, P. C.; PHAM, Q. T. Moisture sorption isotherm of fresh lean beef and external beef fat. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 60, n. 4, p. 357-366, Dec. 2003.

UNTERMANN, F. Microbial hazards in food. **Food Control**, Guildford, v. 9, n. 2/3, p. 119 - 126, Apr. June, 1998.

VITALI, A. A. **Importância da atividade de água em alimentos**. In: Seminário sobre Atividade de Água em Alimentos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987.

WILLIAMS, J. H. et al. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 80, n. 5, p.1106-1122, Nov. 2004.

WOLF, W.; SPIESS, W. E. L.; JUNG, G. **Standardization of isotherm measurements (Cost-Project 90 and 90 bis)**. In: SIMATOS, D.; MULTON, J. L. (Eds.) Properties of water in food: in relation to quality and stability. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985.