

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
CAMPUS DE CAMPO MOURÃO

JULIANA MARTINS

**CONTAMINAÇÃO FUNGICA EM SEMENTES DE CHIA COMERCIALIZADAS NO
MUNICIPIO DE CAMPO MOURÃO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2015

JULIANA MARTINS

**CONTAMINAÇÃO FUNGICA EM SEMENTES DE CHIA COMERCIALIZADAS NO
MUNICIPIO DE CAMPO MOURÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos do Departamento Acadêmico de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Profa. Dra. Macia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini.

CAMPO MOURÃO

2015



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA
FEDERAL DO PARANÁ
Campus Campo Mourão
Departamento Acadêmico de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

CONTAMINAÇÃO FUNGICA EM SEMENTES DE CHIA COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE CAMPO MOURÃO

por

JULIANA MARTINS

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 1 de dezembro de 2015 como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Macia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini.
Orientador

Profa. Dra. Ailey Tanamati
Membro da banca

Profa. Dra. Angela M. Gozzo
Membro da banca

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no Departamento Acadêmico de Alimentos da UTFPR Campus Campo Mourão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por me proteger e guiar nos momentos difíceis e por me acompanhar em toda minha trajetória.

Agradeço a Neide Mingrone Fidelis e Alceu Martins, por serem pais tão dedicados, meus melhores exemplos e maiores inspirações. Sou grata por todos os conselhos, apoio e confiança que depositaram em mim ao longo desse período. Sem eles, nada disso seria possível.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Macia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini pela sua dedicação, apoio e, sobretudo pela sua paciência em estar sempre me corrigindo e auxiliando em meus trabalhos.

Ao meu irmão, Alceu Martins Junior, pelo simples fato de existir na minha vida, e por todo carinho, eu amo você incondicionalmente.

Agradeço também a Júlio Reginaldo dos Santos, por todo amor, dedicação e companheirismo ao longo desses anos. Por ter me orientado e me dado força na escolha da minha profissão, e fazer presente em minha vida e me incentivar a ser uma pessoa melhor.

.Aos meus grandes amigos Anderson Clayton da Siva, Regiane Maria Rodrigues, e Larissa Cristina Costa, pela amizade parceria nos estudos, pelo apoio nas horas de desespero, risadas e companheirismo, sem vocês teria sido tudo mais difícil.

A todos os membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões apresentadas.

Por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

Os meus mais sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

RESUMO

MARTINS, J. Contaminação Fungica em Sementes de Chia Comercializadas no Município de Campo Mourão. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal Do Paraná (UTFPR). Campo Mourão, 2015.

A semente de chia (*Salvia hispanica* L.) é rica em ácidos graxos insaturados (ômega-3 e ômega-6) fibras, proteínas, carboidratos, sais minerais, antioxidantes e vitaminas, e devido à suas propriedades funcionais, vem sendo cada vez mais consumida pela população. Porém suas sementes podem ser alvo da presença de fungos. O objetivo deste trabalho foi analisar a contaminação fungica de sementes de chia comercializadas na cidade de Campo Mourão PR. Foram analisadas oito amostras, pela técnica do plaqueamento direto das sementes com desinfecção de superfície e sem desinfecção de superfície. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de contaminação fúngica. Todas as amostras apresentaram contaminação fúngica e as amostras que passaram por tratamento de superfície tiveram crescimento fúngico reduzido. Os gêneros predominantes de fungos foram identificados, sendo eles *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rizhopus*.

Palavras-chave: sementes de chia, contaminação, fungos.

ABSTRACT

The chia seed (*Salvia hispanica* L.) is rich in unsaturated fatty acids (omega-3 and omega-6) fibers, proteins, carbohydrates, minerals, antioxidants and vitamins, and due to its functional properties, has been increasingly consumed by the population. However, the seeds can be contaminated by the presence of fungi. The objective of this study was to analyze the fungal contamination of chia seed sold in Campo Mourão, PR. Eight samples were analyzed by direct plating seed technique with surface disinfection and no surface disinfection. Analyses were performed in triplicate. The results were expressed as percentage of fungal contamination. All samples had fungal contamination and the samples that have undergone surface treatment had reduced fungal growth. The predominant genera of fungi were identified, and were *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* and *Rizhopus*.

Key-words: chia seed, contamination, fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura1–Plaqueamento das amostras de sementes de chia	18
Figura 2 – Amostras de sementes de chia em hipoclorito de sódio.....	18
Figura 3 – Plaqueamento das sementes.....	19
Figura 4 – Identificação dos fungos através de microscópio óptico	19
Figura 5 – Preparação das laminas.....	19
Figura 6 – Comparação de sementes sanitizadas com hipoclorito de sódio, das sem sanitização.....	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS.....	12
2.1. OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1 CHIA	13
3.2 FUNGOS.....	15
3.3 ARMAZENAMENTO DOS GRÃOS.....	16
4 MATERIAL E METÓDOS	19
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO	19
4.2 MATERIAL	19
4.3 PREPARO DO MEIO DE CULTURA	19
4.4 INOCULAÇÃO DAS SEMENTES DE CHIA.....	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	24
6 CONCLUSÃO	29
7 REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

Mudanças no padrão de vida da população mundial têm sido observadas, incluindo mudanças de hábitos e comportamentos como a busca por realização de atividades físicas e novos hábitos alimentares. Tais mudanças estão associadas a maior conscientização sobre a necessidade de melhor qualidade de vida como principal requisito para a longevidade. Neste cenário, o aumento do consumo de grãos como Chia, na alimentação tem sido observada (TOMBINI, 2006).

A Chia (*Salvia hispanica L.*) é uma planta da família *Lamiaceae* e teve sua origem no México e norte da Guatemala, podendo ser cultivada em regiões áridas e semiáridas. Tem seu cultivo comercial nos países de origem e na América do Sul, inclusive no Brasil, onde a introdução da cultura é recente. Além do grão, são disponibilizados como principais derivados comerciais, a farinha e óleo. Possui características similares às linhaças douradas e marrons, sendo consumida para a mesma finalidade (TOMBINI, 2006).

É uma semente atualmente utilizada na sociedade devido ao seu valor nutricional e propriedades funcionais, tais como: rica em fibras solúveis e insolúveis, ômega-3, proteínas, minerais, aumenta a saciedade, melhora o funcionamento intestinal, reduz o risco do surgimento de doenças cardiovasculares, entre outros. Ela pode ser incluída na classe dos alimentos funcionais, uma vez que é nutricionalmente rica e contém componentes benéficos a saúde. Entre os principais benefícios a saúde pode ser mencionada: a diminuição de problemas de prisão de ventre, redução de risco de doenças cardiovasculares, redução de risco de alguns tipos de câncer entre outros. Porém, devido à comercialização a granel e algumas vezes embalada industrialmente, as sementes podem ser alvo de microrganismos deteriorantes, tais como fungos produtores de aflatoxinas tais como *Aspergillus aflatoxigênicos* (WANDERLEY, 2014).

Geralmente, a infecção e a deterioração dos grãos podem ocorrer ainda no campo, agravando-se durante as operações de colheita, transporte, secagem, beneficiamento e armazenamento, resultando na redução da qualidade sanitária, física e nutricional dos grãos e seus derivados. Entre os prejuízos causados pelos fungos está o emboloramento visível, a descoloração, o odor desagradável, a perda

de matéria seca, o aquecimento, as mudanças químicas e nutricionais, além da produção de compostos tóxicos, as micotoxinas. Essa contaminação pode fazer com que grãos tornem-se impróprios para o consumo humano e animal, resultando em grandes perdas econômicas (BENTO, *et al.*, 2012).

Dentre os vários fungos responsáveis pela deterioração de grãos na pré-colheita e, depois, durante o armazenamento, destacam-se os do gênero *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Esses fungos, além de causarem severos danos aos grãos, são conhecidos também pelo seu elevado potencial em produzir micotoxinas (EMBRAPA, 2015).

Os grãos assim como todo alimento, podem ser contaminados em seus diversos estados: in natura e industrializados. A sua contaminação microrgânica pode ocorrer antes e depois de sua colheita, através do solo, do ar, da rega ou lavagem com águas impróprias, das más condições higiênicas de envoltórios e recipientes, por transportes inadequados e agressões mecânicas contra a estrutura do produto (ENVAGELISTA, 2001)

Desta forma o objetivo deste trabalho foi analisar a presença de contaminação fúngica em sementes de Chia sanitizadas e não sanitizadas por hipoclorito de sódio.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi determinar a porcentagem de contaminação fúngica em sementes de chia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a porcentagem de contaminação fúngica em sementes de chia comercializadas no município de Campo Mourão através da técnica do plaqueamento direto de sementes sanitizadas e não-sanitizadas por hipoclorito de sódio;
- Identificar os principais gêneros de fungos contaminantes nas amostras analisadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CHIA

O aumento do consumo de alimentos mais saudáveis e com propriedades funcionais no Brasil é uma prerrogativa para que efetivamente seja possível consolidar uma alimentação saudável e segura em várias regiões do país. A semente de chia tem mostrado um amplo crescimento de consumo, que passou a ser relacionado amplamente com a perda de peso. Um dos motivos que fazem da chia uma grande aliada na perda de peso está na sensação de saciedade que a semente proporciona. Suas fibras têm a capacidade de absorver muita água, transformando-se em uma espécie de gel. Em contato com os sucos gástricos, suas fibras se transformam nesse gel, que aumentam a dilatação do estômago. É esse mecanismo um dos fatores que favorecem a saciedade e, conseqüentemente, acarreta um menor consumo de alimentos (FERREIRA, 2013).

Dos 33% de óleo da semente, 58,7 % corresponde ao ácido α -linolênico, ácido graxo insaturado ômega-3 (ω -3), importante para a saúde humana, considerado essencial, já que o corpo não é capaz de sintetizá-lo. Entre os componentes principais do óleo também se encontra o ácido linoléico que varia entre 17 e 26%. Uma notável diferença entre a chia e as outras fontes de ω -3 é o baixo teor de sódio das sementes, o que a torna uma excelente opção de alimento para as pessoas que sofrem de pressão sanguínea alta e necessitam de uma dieta com baixos níveis de sódio (MIGLIAVACCA, *et al.*, 2014). Ela também contém carboidratos considerados de baixo índice glicêmico, pois aproximadamente 34,4% da porção de 100 g da semente é composta por fibras alimentares. Por fim, a semente ainda contém compostos fenólicos sendo considerada uma fonte natural de antioxidantes. Entre eles estão o ácido cafêico e ácido clorogênico (FERREIRA, 2013).

A semente de chia é considerada como uma boa fonte proteica por possuir um alto teor de proteínas, sendo em sua maior parte aminoácidos essenciais, ou

seja, aqueles que não são produzidos pelo nosso organismo (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina e histidina). Para se ter uma ideia, é preciso consumir cerca de 50 gramas de proteínas todos os dias de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), considerando uma dieta de 2 mil calorias diárias. Isso significa que 25 gramas de chia contém 8% da proteína que precisamos em um único dia (AYERZA et al., 2011).

A chia pode ser facilmente consumida junto a saladas ou na mistura de sucos e vitaminas, além de outras receitas, como na quantidade de duas colheres de sopa, que equivale a 25 gramas. Ela contém alto teor de ácidos graxos poli-insaturados essenciais, tipos de gorduras consideradas benéficas ao organismo, sendo rica em ácido graxo alfa-linolênico, também conhecido como ômega 3 (CAPITTANI et al., 2012).

A chia já é cultivada comercialmente na Austrália, Bolívia, Colômbia, Guatemala, México, Peru e Argentina, nas províncias de Salta, Jujuy, Tucumán e Catamarca. No Brasil, a chia vem sendo produzida com 3 a 4 meses de cultivo, nos estados de Rio Grande do Sul e São Paulo, a semente de chia é classificada como produtos sem histórico de uso coberto por regulamentos técnicos específicos contidos na petição de avaliação de novos alimentos ou novos ingredientes (CAPITTANI et al., 2012).

Apesar de todos esses benefícios, e mesmo apresentando uma baixa atividade de água, a chia pode ser alvo de contaminação fúngica. Como a forma de consumo é na maioria das vezes in natura, geralmente não passando por processo prévio de limpeza, a ingestão deste alimento quando contaminado pode tornar-se não seguro. Quando a lavoura é voltada para a produção de sementes, devem receber a atenção do produtor para obter um produto de qualidade. O objetivo final da lavoura para produção de sementes é a perpetuação da espécie, a continuidade da vida; assim, o produto colhido deve reunir características que assegurem o alto vigor, a boa germinação, a pureza física e a isenção de patógenos. Já o propósito da lavoura destinada à produção de grãos para consumo é obter um produto limpo, uniforme e sem manchas, isento de restos culturais e de sementes de outras espécies. De uma maneira geral, patógenos associados às sementes são transportados de duas maneiras: infecção ou infestação (contaminação). A infecção implica que o patógeno é transportado internamente, incrustado nos tecidos da semente. Quando um patógeno é transportado passivamente, ele é um

contaminante ou infestante. Neste caso, o patógeno localiza-se sobre a superfície da semente (SÁ et al., 2011).

3.2 FUNGOS

Os principais fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos durante o armazenamento de grãos são umidade, temperatura, período de armazenamento, nível inicial de contaminação, impurezas, insetos, concentração de CO₂ intergranular e condições físicas e sanitárias dos grãos (LAZZARI, 1997). Em condições ambientais favoráveis, de umidade e de temperatura, os esporos dos fungos germinam, desenvolvendo hifas, que infestam grãos, rações e outros substratos (PRADO et al., 1991).

Os fungos potencialmente capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos são denominados toxigênicos e podem contaminar os grãos no campo, antes mesmo da colheita ou durante o armazenamento, persistindo em alimentos e rações destinados ao consumo humano e de animais. Os fungos toxigênicos pertencem basicamente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, os quais são responsáveis pela produção da maioria das micotoxinas até hoje conhecidas e estudadas (LAZZARI, 1997).

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos, que, quando ingeridos, são prejudiciais à saúde humana e animal, além de apresentarem elevada atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica (SILVEIRA, 1981). As espécies de *Fusarium* são patógenos de plantas, produzindo micotoxinas antes da colheita ou imediatamente após ela. Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são mais comumente encontrados como contaminantes de produtos durante a secagem e o armazenamento, sendo denominados de fungos de armazenamento (RUPOLLO et al., 1991).

Em condições favoráveis, várias espécies fúngicas podem produzir micotoxicoses, ao homem e aos animais, quando as sementes contaminadas são destinadas à alimentação (ROSSETO et al., 2015). Os piores efeitos das micotoxinas no homem tendem a ser os crônicos, de difícil associação com o

consumo de alimentos contaminados. Os principais efeitos registrados são indução de câncer, lesão renal e depressão do sistema imune (PRADO *et al.*, 1991).

Uma vez que as micotoxinas costumam ser termoestáveis, a abordagem preventiva em relação a elas é de suma importância. Evitar a contaminação pelos fungos é freqüentemente impossível, visto que os principais bolores toxigênicos são bastante disseminados pelo ambiente. Portanto, restam estratégias ligadas à utilização de linhagens de plantas resistentes à colonização fúngica, colheita apropriada, estocagem adequada, controle de insetos e roedores, controle de temperatura e umidade, tempo de estocagem dentro dos limites de vitalidade dos grãos, e, eventualmente, irradiação dos grãos. Nos cultivos agrícolas, existem aproximadamente 100 fungos encontrados no próprio campo de produção ou em produtos alimentares armazenados, e que são capazes de produzir micotoxinas, sendo que 20 tipos de fungos são causadores de doenças em animais que podem levar a problemas de saúde e, inclusive à morte (ROSSETO, 2015).

Para a agricultura, já foram identificadas mais de quinhentas micotoxinas. Entretanto, as de maior importância são responsáveis pelos maiores índices de contaminação de grãos, sementes e outros alimentos, como: as aflatoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, como *A. flavus* e *A. parasiticus*; as ocratoxinas produzidas por algumas espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*; e as fusariotoxinas, que possuem como principais representantes os tricotecenos, a zearalenona e as fumonisinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium* (EMBRAPA, 2015).

3.3 ARMAZENAMENTO DOS GRÃOS

Os grãos assim como todo alimento, podem ser contaminados em seus diversos estados: in natura e industrializados. A sua contaminação micro-orgânica pode ocorrer antes e depois de sua colheita, através do solo, do ar, da rega ou lavagem com águas impróprias, das más condições higiênicas de envoltórios e recipientes, por transportes inadequados e agressões mecânicas contra a estrutura do produto (ENVAGELISTA, 2001).

Durante o armazenamento, a deterioração das sementes de chia não pode ser impedida, todavia a velocidade do processo pode ser minimizada por meio de procedimentos adequados de produção, colheita, secagem, beneficiamento, transporte e armazenamento. O processo de deterioração em sementes compreende uma sequência de alterações bioquímicas e fisiológicas iniciadas logo após a maturidade fisiológica, que acarretam redução de vigor, culminando na perda da capacidade de germinação (SÁ *et al.*, 2011).

Reduzir a velocidade e os efeitos da deterioração nas sementes são metas prioritárias do armazenamento, entretanto, é sabido que existe acentuada diversidade entre espécies com relação ao potencial de armazenamento das sementes. Além disso, ocorre variabilidade entre lotes e entre sementes do lote, da mesma espécie e do mesmo cultivar, submetidas a condições similares de armazenamento, visto que cada semente e cada lote possuem um histórico, determinado pelas condições de produção. A longevidade corresponde ao período máximo de tempo que as sementes permanecem vivas, quando armazenadas sob condições ambientais ideais, sendo que as espécies apresentam variabilidade natural (VILLELA, *et al.*, 2009).

Geralmente, a infecção e a deterioração dos grãos podem ocorrer ainda no campo, agravando-se durante as operações de colheita, transporte, secagem, beneficiamento e armazenamento, resultando na redução da qualidade sanitária, física e nutricional dos grãos e seus derivados. Entre os prejuízos causados pelos fungos está o emboloramento visível, a descoloração, o odor desagradável, a perda de matéria seca, o aquecimento, as mudanças químicas e nutricionais, além da produção de compostos tóxicos, as micotoxinas. Essa contaminação pode fazer com que grãos tornem-se impróprios para o consumo humano e animal, resultando em grandes perdas econômicas (BENTO, *et al.*, 2012).

Segundo EMBRAPA (2011) o principal objetivo do controle da proliferação de fungos em grãos armazenados é o de evitar a contaminação destes com os produtos da atividade metabólica daqueles. Para isto, é necessário que a armazenagem seja precedida de cuidados durante os processos de colheita, limpeza e secagem dos grãos, além de posterior desinfecção de graneleiros, silos e equipamentos. Pode-se utilizar como guia as seguintes recomendações:

- Realizar a colheita tão logo seja atingido o teor de umidade recomendado para tal que seria de 8 á 9% para sementes de Chia;
- Manter limpos e desinfestados os equipamentos de colheita, os silos e graneleiros;
- Os equipamentos mecânicos de colheita devem estar regulados de forma a manter a limpeza e evitar danos aos grãos;
- Remover impurezas, grãos danificados, finos e materiais estranhos, pois estes podem se constituir como forma de proliferação de fungos;
- .Proceder de forma correta as operações de pré-limpeza e limpeza;
- As operações de secagem devem garantir a redução do teor de umidade e a uniformidade destas, à níveis que impeçam o desenvolvimento de patógenos;
- Monitorar a temperatura de 15 a 25°C;
- Aerar a massa de grãos, sempre que possível, com objetivo de uniformizar a temperatura;
- Evitar a proliferação de insetos e roedores, já que os danos causados por estes proporcionam ambiente para o desenvolvimento de fungos.

Desta forma, seguindo medidas simples, consegue-se evitar transtornos e perda de qualidade dos grãos produzidos e da reputação das entidades responsáveis pelo armazenamento (EMBRAPA, 2011).

4 MATERIAL E METODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

As amostras foram analisadas nos laboratórios de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão-PR, Brasil.

Foram utilizadas amostras de sementes de Chia, embaladas em pacotes de plástico armazenadas em temperatura ambiente, adquiridas no comércio da cidade de Campo Mourão/PR em oito estabelecimentos diferentes.

O meio de cultura utilizado foi o ágar Dichloran Rosa Bengala (DRBC) da Biomark Laboratories Pune 411041 Índia; a sanitização das sementes foi realizada com solução de hipoclorito de sódio 0,4 %. Para a realização dos ensaios foram utilizados os seguintes equipamentos: microscópio luminoso; autoclave vertical de chão com capacidade de 18 litros; balança analítica; estufa e câmara de fluxo laminar, vidrarias, além desses foram utilizados outros materiais todo o material pertence ao laboratório de microbiologia da UTFPR- Campus Campo Mourão.

4.2 PREPARO DO MEIO DE CULTURA

O meio de cultura DRBC foi preparado adicionando-se a quantidade necessária do meio em pó em água destilada, conforme instruções do fabricante e dissolvido por aquecimento sob agitação. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave e plaqueado em placas de Petri estéreis. A Figura 1 mostra o meio DRBC no estado líquido previamente ao processo de esterilização na autoclave.

4.3 INOCULAÇÃO DAS SEMENTES DE CHIA

A determinação da porcentagem fúngica das sementes de chia seguiu o método descrito por Samson et al 2010. Foi realizado o plaqueamento direto das sementes no meio de cultura DRBC. Os ensaios foram conduzidos em duas etapas, onde na primeira as sementes foram inoculadas sem desinfecção de superfície (Figura 2) e na segunda com desinfecção de superfície (Figura 3). Nesta, as sementes foram previamente tratadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,4% por dois minutos e enxaguadas em água destilada estéril. Para cada etapa, foram transferidas assepticamente 100 sementes para placas de Petri com meio DRBC (Figura 4). As placas foram incubadas a 25°C por cinco dias. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes com crescimento fúngico. A diferenciação dos gêneros dos fungos ocorreu pela verificação das características morfológicas e microscópicas das colônias (Figuras 5 e 6), segundo técnica descrita por Pitt e Hocking (2009), utilizando-se microscópio luminoso (Figura 7) com aumento de 100 e 400 vezes. Os ensaios foram realizados em triplicata.



Figura 1 – Plaqueamento das amostras de sementes de chia sem desinfecção de superfície.

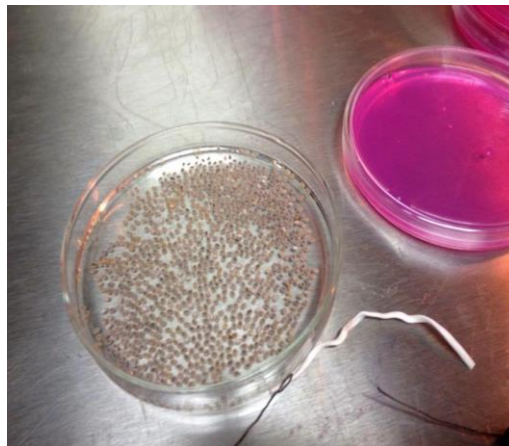


Figura 2 – Amostras de sementes de chia em hipoclorito de sódio..



Figura 3 – Plaqueamento das sementes.



Figura 4 – Verificação das características morfológicas dos fungos através de microscópio óptico.



Figura 5 – Preparação das laminas e lamínulas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados da porcentagem do crescimento fúngico nas oito amostras analisadas de sementes de chia estão apresentados na Tabela 1. Um alto número de contaminação fúngica nas sementes de chia sem sanitização é evidente em todas as amostras. Observa-se que, das amostras não sanitizadas, apenas três não apresentaram 100% de contaminação (amostras 2, 3 e 4), nas demais o crescimento fúngico foi total. A diferença entre as amostras que passaram por desinfecção de superfície daquelas que não passaram por esse processo, foi observada (figura 8), mostrando o efeito inibitório do hipoclorito de sódio sobre a germinação dos esporos fúngicos.

Tabela 1 – Porcentagem de contaminação fúngica em amostras de sementes de chia sanitizadas e não sanitizadas com hipoclorito de sódio a 0,4%.

Resultado do crescimento de fungos em %		
Amostras	Sem NaClO*	Com NaClO**
1	100,0 ^a	74,6 ^{ab}
2	88,0 ^{ab}	79,3 ^{ab}
3	98,0 ^a	44,6 ^b
4	96,6 ^a	53,3 ^{ab}
5	100,0 ^a	53,3 ^{ab}
6	100,0 ^a	93,0 ^{ab}
7	100,0 ^a	66,0 ^{ab}
8	100,0 ^a	61,3 ^{ab}

^{a, b} Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,10$) pelo teste t-Student. Amostras de sementes de Chia sanitizadas (*) e não sanitizadas (**) com hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,4%.



Figura 6 – Comparação de sementes sanitizadas com hipoclorito de sódio.
Fonte: Autorial Própria.

Sabe-se que o efeito inibitório do hipoclorito de sódio quando em solução aquosa, ocorre pela liberação do ácido hipocloroso, em sua forma não dissociada, que apresenta capacidade de penetrar na célula microbiana, destruindo-a (DOMINGUES, 2010).

Na identificação dos gêneros, foi observado o predomínio de *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Mucor* e dentre estes *Aspergillus* e *Penicillium* se destacaram. Resultados semelhantes foram encontrados por RODRIGUES et al.(2003), ao relacionar castanhas industrializadas e castanha artesanalmente processadas, onde constataram que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* também foram os mais prevalentes, enfatizando a elevada contaminação fúngica observada nas amostras analisadas. Freire e Kozakiewicz (2005) relacionaram os fungos já citados a amêndoas de cajueiro no Brasil. Costa et al. (2005), ao identificarem fungos relacionados à castanha-do-Brasil e ao amendoim comercializados em Fortaleza (CE), constataram que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* também foram os mais prevalentes e enfatizaram sobre a elevada contaminação fúngica observadas nos produtos analisados. Esses fungos filamentosos podem produzir micotoxinas, que são metabólitos tóxicos potencialmente carcinogênicos e frequentes em grãos (RODRIGUES et al. 2003).

Das amostras analisadas que não passaram por desinfecção de superfície, cinco apresentam 100% de contaminação, enquanto que as que passaram por desinfecção tiveram uma taxa de inibição que variou entre 11 e 62 %. Câmara (2010), detectou contaminações por bolores e leveduras em 94,5% das 73 amostras de castanha de caju analisadas antes do processo de torragem e em 21,8% após este tratamento, obtendo em apenas duas amostras valores acima de 10^3 UFC/g. Este autor identificou também como bolores de maior incidência *Aspergillus niger*,

Penicillium e *Eurotium*. Diversas espécies de fungos já foram identificadas na castanha-do-brasil em unidades de beneficiamento (Souza et al. 2004), em castanhas com casca adquiridas no varejo (Bayman et al. 2002) e em feiras livres (Freire e Offord 2002), dentre elas *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. niger*, todos produtores de aflatoxina, que, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer - AIPC (FAO 2006) é considerada cancerígena para humanos e animais. Pereira et al. (2002) afirmam que a presença do fungo não implica, obrigatoriamente, em produção de micotoxina.

Segundo Pinheiro (2004), o *Rhizopus* é um sapróbio habitante de solo, ocorrendo também em frutos, alimentos e outros materiais em decomposição. Causa podridão em frutos e outros órgãos de reserva carnosos da planta, nas fases de pós colheita, durante o armazenamento, transporte e comercialização desses produtos. Grigoletto (2012), afirmam que *Rhizopus* é um dos principais fungos de armazenamento e também está associados ao processo de deterioração dos grãos de amendoim.

A presença de uma população de insetos em grãos e sementes pode promover a contaminação por fungos e, se não for controlada a tempo, pode criar condições de umidade e temperatura localizadas que estimulam o rápido desenvolvimento fúngico, podendo ocorrer deterioração da massa de grãos e produção de micotoxinas (PEZZINI, 2005).

O gênero *Aspergillus* é considerado iniciador da deterioração das sementes, contando ou não com a colaboração de alguns fatores, como pequenas aberturas nas superfícies das sementes causadas por algumas espécies de insetos e choques mecânicos resultados das práticas agrícolas durante a colheita, transporte e armazenamento, esses fatores somados as condições de umidade e temperatura promovem uma porta de entrada e um ambiente favorável para o desenvolvimento e o crescimento do propágulo (REIS, 2009).

O gênero *Penicillium*, é conhecido como bolor verde ou azul (PINHEIRO, 2004). Este gênero é considerado importante no que se refere à contaminação alimentar, são amplamente distribuídos no mundo todo, estão presentes em solos, no ar, vegetação em deterioração, algumas espécies desse gênero também são produtoras de micotoxinas (PITT, 2009). Bonifácio, et al. (2015) analisaram amostras de amendoim comercializadas a granel no município de Ji-Paraná/RO e verificaram que o *Penicillium*, esteve presente em apenas uma amostra do estabelecimento,

sendo considerado como um fungo de armazenamento e produtor de micotoxinas tóxicas ao homem. Os fungos do gênero *Penicillium*, se desenvolvem durante o período de armazenamento devido as condições dos lotes de sementes e condições ambientais, principalmente o seu estado físico, grau de umidade, além do inóculo inicial. Algumas espécies de *Penicillium* são responsáveis pela maior fonte de ocratoxina A, sendo suspeita por ser um dos causadores do câncer do trato urinário e dos danos aos rins que ocorrem no leste europeu (ATAYDE, 2009).

O gênero *Mucor* contém cerca de 50 espécies reconhecidas, muitos dos quais têm ocorrência generalizada e são de considerável importância econômica. No entanto, apenas algumas espécies termotolerantes são de importância médica e infecções em seres humanos raramente são relatadas (PINHEIRO, 2004). Também não são conhecidas toxinas produzidas a partir deste fungo, entretanto este produz enzimas proteolíticas que são utilizadas na produção de queijo. O curioso neste fungo é seu rápido crescimento, as vezes chega a encher uma placa de Petri, e este crescimento exagerado pode até inibir o crescimento de outros fungos presentes. Por outro lado, o gênero *Mucor* ganha destaque na biotecnologia sendo responsável pela produção de várias enzimas como: amilase, lipase, pectinase e protease. No entanto, apenas algumas espécies termotolerantes são de importância médica e infecções em seres humanos raramente são relatados (PEZZINI, 2005).

A degradação dos alimentos ocorre naturalmente por ação de microrganismos que usam os alimentos como a sua fonte de nutrientes. Esta ação dos microrganismos conduz a uma degradação dos alimentos que os tornam impróprios para consumo (SILVA, 2010). Dentre os fatores que favorecem o desenvolvimento fúngico ressaltam-se temperatura, predomínio de linhagens toxigênicas, competição por substrato e cultivares resistentes (SILVA, 2000).

Segundo Santos et al. (1995), é necessário utilizar os conhecimentos de higiene e controle de qualidade dos alimentos de maneira preventiva, a fim de promover melhorias na produção. Frutas e hortaliças, sementes e grãos consumidos in natura são potenciais veiculadores de microrganismos que podem estar associados à toxinfecções e, conseqüentemente, a doenças transmitidas por alimentos (DTA). Assim, lavar e sanitizar os alimentos é necessário para se consumir um alimento seguro. A sanitização é um conjunto de procedimentos higiênico-sanitários realizados de acordo com legislações específicas, visando garantir a obtenção de alimentos limpos e baixa carga microbiana (PEZZINI, 2005).

6 CONCLUSÃO

Conclui-se com este trabalho que, as amostras analisadas de sementes de Chia sem desinfecção de superfície apresentam porcentagem de contaminação fúngica elevada em relação aquelas que passaram por tratamento com sanitizante. Os gêneros predominantes foram *Aspergillus*, *Penicilium*, *Mucor* e *Rizophus*, possuindo estes dois últimos espécies potencialmente toxigenicas pela produção de micotoxinas. Tais informações servem de alerta para o consumidor que faz a utilização de sementes de chia em sua alimentação, principalmente quando consumidas in natura. Estudos posteriores podem ser realizados com os gêneros isolados dessas amostras para investigar se os mesmos são produtores de micotoxinas.

7 REFERÊNCIAS

AYERZA, R.; COATES, W. O teor de proteínas, teor de óleo e perfil de ácidos graxos como critérios potenciais para determinar a origem da chia cultivada (*Salvia hispanica* L.). **Jornal das Culturas Industriais e Produtos**, v. 34, p. 1366 – 1371, 2011.

ATAYDE, D. D. **Microbiota fúngica e determinação de aflatoxinas em cultivo de amendoim plantado em diferentes regiões produtoras no Estado de São Paulo**. (Dissertação) Mestrado em Microbiologia. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (São Paulo), 2009.

BAYMAN, P; BAKER, J.L.; MAHONEY, N.E. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. **Mycopathologia**, 155: 161–169, 2002.

BENTO, L. F.; CANEPPELE, M. A. B.; ALBUQUERQUE, M.C.F.; KOBAYASTI, L.; CANEPPELE, C.; ANDRADE, P.J.; Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo**, v 71, p.44-49, 2012.

Bonifacio, T. Z.; MARTINELLI, T. C. A.; MARMITT, B. G.; ROMÃO, F. N.; SOBRAL, F. O. S. Avaliação da contaminação fúngica em amendoim comercializado a granel no município de Ji-Paraná/RO. **South American Journal of. Basic Education Technical and Technological**. Ji-Paraná, v.2, n. 1, p.17-29, 2015.

CÂMARA, C. R. S. **Indicadores de qualidade de amêndoas de castanha de caju em pedaços durante o processo industrial**. 2010.118f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Depto. de Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2010.

CAPITANNI, M. I.; SPORTORNO, V.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M. C. **Caracterização físico-química e funcional dos subprodutos de semente de Chia (*Salvia hispanica* L.) da Argentina**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.45, p. 94 – 102, 2012.

COSTA, A.K.F.; FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; ANDRADE, J. A.; MENDES, F.N.P. Fungos associados à castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará). **Revista Ciências Agrônoma**, v. 40 n. 3, p.455-60, 2009.

DOMINGUES, F. P.; **Departamento de higiene veterinária e saúde pública FMVZ-UNESP- HIGIENE ZOOTÉCNICA** – Botucatu , 2010.

EMPRAPA. Arvore de Conhecimento- Perigos Quimicos. **Souza, J. M. L**, Rio Branco, AC, abr 2015.

EVANGELISTA, José. **Tecnologia de Alimentos**. 2ª Edição. São Paulo: Atheneu, 2001.

FAO. **Legislation for mycotoxins**. (www.fao.org.br/.pdf), 2006 Acesso em 29/10/2015. (in Portuguese).

FREIRE, F.; OFFORD, L. Bacterial and yeast counts in Brazilian commodities and spices. **Brazilian Journal Microbiology**, vol. 33, n.2, p.145–148, 2002.

FREIRE FCO, KOZAKIEWICZ. Filamentous fungi, bacteria and yeasts associated with cashew kernels in Brazil. **Revista Ciências Agrônoma**, vol.36, n.2, p.249-54, 2005.

FERREIRA, B. R. T. Caracterização nutricional e funcional da farinha de chia (*Salvia Hispanica*) e sua aplicação no desenvolvimento de pães. 112 f. **Dissertação para a obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos** – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – 2013.

GRIGOLETO, M. R. P.; MEDINA, P. F.; PARISI, J. D. Levantamento da germinação e de fungos e insetos em sementes de amendoim produzidas e armazenadas no estado de São Paulo. In: **VI Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC**, Jaguariúna, 2012.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba, p. 148, 1997.

MIGLIAVACCA, A. R.; SILVA, B. R. T.; VASCONCELOS, S. L. A.; FILHO, M. W.; BAPTISTELLA, C. L. J.; O cultivo da chia no brasil: futuro e perspectivas - **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v.3, n. especial, p.161-179, 2014.

PEZZINI, V.; VALDUGA, E.; CANSIANI, L. R. Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes condições. **RIALA** 6/1022, 2005.

PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P. DE; PRADO, G. 2002. Growth and production of aflatoxin by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.20, n.1, p. 114-156, 2002.

PITT, J.L.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. London : Blackie Academic & Professional, p.175,1997.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2009.

PINHEIRO, M. R. R. **Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* como base para desenvolvimento de PCR multiplex para detecção de fungos produtores de aflatoxinas em Castanha-do-Brasil e castanha de caju**. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). Universidade Católica de Brasília. Brasília, f 149, 2004.

PRADO, G.; MATTOS, S. V. M.; PEREIRA, E. C. 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.

REIS, G. M. **Variabilidade genética de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia. Instituto de Ciências Biomédicas). Universidade de São Paulo.São Paulo, 2009.

ROSSETO, V. A. C.; SILVA, F. O.; ARAUJO, S. E. A.; Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados – **Ciencia Rural**, Santa Maria, v 35, n.2, p.309-315, 2015.

RODRIGUES KL, GOMES JP, CONCEIÇÃO RCS, BROD CS, CARVALHAL JB, ALEIXO JAG. Condições higiênico-sanitárias no Comércio Ambulante de Alimentos em Pelotas-RS. **Revista Ciência Tecnologia Alimentos**, v.23, n. 3, p.447-52, 2003.

RUPOLLO, G.; GUTKOSKI, C.; MARTINS, R. L.; ELIAS, C.M.; Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de micotoxinas em grãos de aveia. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 118-125, jan./fev., 2006.

SÁ, D. A. C.; FURTADO, G. R. S. G. Q.; EDUARDO ANDRÉA LEMUS ERASMO, E. A. L.; NASCIMENTO, I. R. Patogenicidade e transmissibilidade de fungos associados às sementes de pinhão. **Revista Brasileira de Sementes Transporte**, Londrina vol.33 n.4, 2011.

SANTOS, P.R.V.; OLIVEIRA, A.C.V; TOMASSINI, T.C.B. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. **Rev. Farm. Bioquim.** Univ. S Paulo. V.31 p. 35-38, 1995.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, ed. 4, p.624, 2010.

SILVA LC. Fungos e Micotoxinas em Grãos Armazenado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 12 jun 2000. [acesso 09 out 2015]. Disponível em: <http://www.unioeste.br/agais/fungos.html>

SINGH, K et al. An illustrated manual on identification of some seed-borne **Aspergilli, Fusaria, Penicillia** and their mycotoxins. Copenhagen : Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries Ryvanges, 1992. p .133.

SILVEIRA, V.D. **Micologia**. 5.ed. Rio de Janeiro : Âmbito Cultural, p.332 1981.

SOUZA, J. M. L.; CARTAXO, C. B. C.; LEITE, F. M. N.; REIS, F. S. Microbiological evaluation of the Brazil nut processing plants in Acre. Rio Branco, Acre. **Embrapa Acre, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**.p. 39, 2004.

TOMBIN, J. **Aproveitamento Tecnológico da Semente de Chia (Salvia hispanica L.) na Formulação de Barra Alimentícia**. Trabalho de Conclusão de curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Pato Branco – UTFPR, 2013.

VILLELA, A. F.; MENEZES, L. N.; O potencial de armazenamento de cada semente – SEED NEWS **Revista internacional de sementes**. ano XII – n.4. Jul/ag- 2009.

WANDERLEY, K.; OLIVEIRA, I.; **Determinação da Presença de Micotoxinas em Sementes de Chia (Salvia Hispanica) e Quinoa (Chenopodium Quinoa) Comercializadas no Município de Recife-Pe**. In: Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos - MICROAL Blucher Food Science Proceedings, num.1, vol.1. São Paulo: Editora Blucher, 2014.