AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Estudo comparativo entre os processos de irradiação e congelamento nos aspectos químicos, físicos, sensoriais e microbiológicos de grãos de ervilhas armazenados

MARIA LUIZA MARCHIORI VISINTIN FORMIGONI

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Profa. Dra. Susy Frey Sabato**

**São Paulo
2018**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Estudo comparativo entre os processos de irradiação e congelamento nos aspectos químicos, físicos, sensoriais e microbiológicos de grãos de ervilhas armazenados

MARIA LUIZA MARCHIORI VISINTIN FORMIGONI

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Profa. Dra. Susy Frey Sabato**

Versão Corrigida

**São Paulo
2018**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

FORMIGONI, M. L. M. V. ***Estudo comparativo entre os processos de irradiação e congelamento nos aspectos químicos, físicos, sensoriais e microbiológicos de grãos de ervilhas armazenados***. 2018. 110 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.
Disponível em: <www.teses.usp.br> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Formigoni, Maria Luiza Marchiori Visintin

Estudo comparativo entre os processos de irradiação e congelamento nos aspectos químicos, físicos, sensoriais e microbiológicos de grãos de ervilhas armazenados / Maria Luiza Marchiori Visintin Formigoni; orientador Susy Frey Sabato. -- São Paulo, 2018.

110 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2018.

1. Ervilhas. 2. Radiação gama. 3. Bioacessibilidade. I. Sabato, Susy Frey, orient. II. Título.

Aos meus pais Madalena e Irineu, pelo incentivo, pelo apoio, por sempre estarem presentes de maneira positiva na minha vida, me incentivando a buscar meus objetivos, pelo caminho do bem,

Ao meu marido Ricardo, pela compreensão, pela parceria, por ser um exemplo de coragem, determinação, carisma e por estar ao meu lado dividindo sonhos e conquistas,

Aos meus irmãos Rafael e Thiago, pelo carinho, pela amizade, por se interessarem pela minha vida e sempre estarem disponíveis a me ajudar,

Aos meus filhos Bianca e Felipe, por me proporcionarem alegria de viver e vontade de me tornar, a cada dia, uma pessoa melhor,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por colocar em meu caminho pessoas tão maravilhosas e inspiradoras.

À Dra. Susy Frey Sabato, por me aceitar como sua orientada, pela amizade, pela sua compreensão, confiança e suporte em todos os momentos.

À amiga Sônia do SENAI, por ter me apresentado o IPEN.

Ao Prof. Dr. Wilson Aparecido Parejo Calvo, por ter me acolhido e ter me apresentado a Dra. Susy Frei Sabato.

Ao Dr. Alexandre Bera e ao Dr. Leonardo Gondim de Andrade e Silva, pela disponibilidade e participação em todas as etapas do trabalho, sempre contribuindo de forma expressiva.

Às colegas de trabalho Adriana Fabbri, Amanda Ramos, Fabiana Kawassaki e Juliana Sagretti por sempre estarem dispostas a me auxiliar, de maneira respeitosa e prática.

À Dra. Solange Cadore (UNICAMP), que mesmo sem me conhecer, me deu a oportunidade de aprender e trabalhar no seu laboratório, oferecendo atenção, respeito e os recursos disponíveis.

À Dra. Ligia Bicudo de Almeida Muradian (FCF/USP) por me dar a oportunidade de aprender e de trabalhar no seu laboratório.

À Dra. Emanuelli do Nascimento da Silva (UNICAMP), por ter me auxiliado e conduzido nas análises de bioacessibilidade, de maneira amiga e respeitosa, dividindo seus conhecimentos e seu tempo durante esse último ano.

À Ex-Diretora Silvia Helena Carabolante, ao Diretor Estebe Ormazabal Insausti, a Coordenadora Cristiana Ambiel e a Coordenadora Maria Alice Binoto, por terem contribuindo de maneira significativa na condução desse trabalho, disponibilizando a infraestrutura necessária existente na Escola SENAI Horácio Augusto da Silveira.

À funcionária do irradiador Gammacell, Elizabeth Somessari, que sempre me foi solícita aos pedidos de irradiação de material.

As amigas Cíntia Gillio, Dra. Cristina Pascual, Janaina Mainardi e Jéssica Meneguelli pela amizade e por terem me auxiliado, doando tempo e conhecimento.

Aos amigos do Laboratório de Prestação de Serviços do SENAI Horácio Augusto da Silveira Lilian Duarte, Samira e Fábio pelo apoio oferecido durante as análises microbiológicas.

Ao colega Elias Araújo (FCF/USP), por me auxiliar, de maneira calma e prestativa, durante o tempo que estive no laboratório.

À colega Gabi, por me auxiliar na busca por metodologia adequada para determinação da bioacessibilidade.

À minha mãe e amiga Madalena, que com seu amor incondicional, sempre esteve presente, me ajudando e incentivando a seguir em frente.

Ao meu irmão Rafael Marchiori Visintin, por ter oferecido seus conhecimentos, sua amizade e seu amparo em tudo que estava ao seu alcance.

Aos meus familiares Irineu, Ricardo, Bianca, Felipe, Thiago, Carol, Cláudia e Renata pelo incentivo, apoio, compreensão e respeito oferecidos durante toda essa trajetória.

Aos funcionários e amigos do CTR (IPEN), do Programa de Pós-Graduação do IPEN, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP), da Unicamp e da Escola SENAI Horácio Augusto da Silveira, pelo auxílio em todas as situações.

Agradeço a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização desse trabalho.

*A ciência não é, e nunca será um livro terminado.
Todo progresso importante levanta novas questões.
Dificuldades novas e mais profundas são reveladas
posteriormente a cada desenvolvimento.
(Albert Einstein)*

RESUMO

FORMIGONI, Maria Luiza M. V. *Estudo comparativo entre os tratamentos de irradiação e congelamento nos aspectos químicos, físicos, sensoriais e microbiológicos de grãos de ervilhas armazenados*. 2018. 110 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

A ervilha é considerada uma fonte nutritiva de proteína vegetal de alta qualidade, sendo também reconhecida como boa fonte de vitaminas, minerais, compostos fenólicos e carboidratos. Considerando que nem todos os nutrientes presentes no alimento tornam-se acessíveis para absorção pelo organismo e considerando ainda que a irradiação é uma técnica que permite garantir a segurança e a qualidade de um alimento, controlando microrganismos patogênicos, sem afetar significativamente qualquer atributo organoléptico e sensorial, estudou-se comparativamente os efeitos gerados na bioacessibilidade de Fe e Zn, tomando como base, uma amostra controle, o processo tradicional de ervilhas congeladas e o processo utilizando radiação gama na dose de 1 kGy. As ervilhas foram avaliadas em duas condições de tempo: tempo inicial, correspondente ao tempo após o término do processamento e tempo após quinze dias de armazenamento. Verificou-se que para as amostras controle e irradiada, a bioacessibilidade do Fe foi inferior à das amostras congeladas. A bioacessibilidade do Zn para as amostras de ervilhas analisadas (controle, irradiada e congelada), apresentou um teor médio de 71%, de acordo com os testes estatísticos de ANOVA e Tukey, não houve diferença significativa entre as amostras. Este trabalho avaliou também os aspectos sensoriais (cor, textura e sabor), microbiológicos e a composição centesimal dos produtos obtidos por esses tratamentos. Nos aspectos sensoriais observou-se pela análise de variância (ANOVA) em um nível de significância de $p > 0,05$, que não houve diferença significativa entre as amostras analisadas. Nos aspectos microbiológicos, para as análises de bolores e leveduras, contagem de aeróbios mesófilos, coliformes a 45°C, *E. coli* e *Salmonella*, verificou-se que a irradiação trouxe melhor preservação microbiológica às ervilhas quando comparadas com o congelamento e com as ervilhas apenas refrigeradas (controle). Em relação à composição centesimal, constatou-se que os resultados encontrados estão alinhados aos referenciados na literatura.

Palavras chaves: ervilhas, radiação gama e bioacessibilidade.

ABSTRACT

FORMIGONI, Maria Luiza M. V. *Comparative study between irradiation and freezing treatments on chemical, physical, sensory and microbiological aspects of stored pea grains*. 2018. 110 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

The pea is considered a nutritious source of high quality vegetable protein and is also recognized as a good source of vitamins, minerals, phenolic compounds and carbohydrates. Considering that not all the nutrients present in the food become accessible for absorption by the body, and also considering that irradiation is a technique that ensures the safety and quality of a food by controlling pathogenic microorganisms without significantly affecting any sensory attributes, this work evolved the effects generated in the bio accessibility of Fe and Zn. The study performed the comparison between the control sample (the traditional process of frozen peas) and those submitted to the process using gamma radiation at 1 kGy dose. The peas were evaluated in two conditions: initial time, corresponding to time after processing, and after fifteen days of storage. For both samples - control and the irradiated - the bioaccessibility of Fe was lower than that of the frozen samples. Considering the initial time and after 15 days of storage, the bioaccessibility of the Zn to the analyzed (control, irradiated and frozen) pea samples, was about 71% and according to the statistical tests of ANOVA and Tukey there was no difference between the samples. This work also evaluated the sensory aspects (color, texture and flavor), microbiological and the centesimal composition of the products obtained by these treatments. Sensory aspects presented no statistical differences among analyzed samples ($p > 0.05$). Microbiological aspects (for yeast and mold counts, aerobic mesophilic counts, *Salmonella*, coliforms organisms and *Escherichia coli*) demonstrated that the irradiation brought better microbiological preservation to the peas when compared with the freezing and the chilled peas (control). In relation to the centesimal composition, results found are in agreement with those referenced in the literature.

Key words: peas, gamma radiation, bioaccessibility.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Dados de composição centesimal de macro e micronutrientes para ervilha em vagem e ervilha enlatada	24
Tabela 2 – Conteúdo de aminoácidos essenciais e valor nutricional na ervilha <i>versus</i> padrão recomendado de aminoácidos para as proteínas alimentares	28
Tabela 3 – Classificação do métodos cromatográficos em coluna	50
Tabela 4 – Estruturas das análises realizadas no projeto	57
Tabela 5 – Preparação da solução estoque utilizada para simulação da digestão	65
Tabela 6 – Condições utilizadas para simulação da digestão gastrointestinal das amostras de ervilhas controle, irradiada (1 kGy) e congeladas	67
Tabela 7 – Programa utilizado no forno de micro-ondas para digestão de amostras de ervilhas e materiais de referência certificados	68
Tabela 8 – Resultados obtidos nas análises microbiológicas de ervilhas para amostras controle, irradiada e congelada nos tempos iniciais e após 15 dias de armazenamento	76
Tabela 9 – Composição centesimal para amostras de ervilhas controle, irradiada e congelada, no tempo zero e após quinze dias de armazenamento	79
Tabela 10 – Concentração total de Fe (mg/kg de massa úmida) e bioacessibilidade (% da concentração total) em amostras de ervilha controle, irradiada e congelada	80
Tabela 11 – Concentração total de Zn (mg/kg de massa úmida) e bioacessibilidade (% da concentração total) em amostras de ervilha controle, irradiada e congelada	81
Tabela 12 – Teores de vitamina B ₁ (tiamina) em amostras de ervilhas controle, irradiada (1 kGy) e congelada nos tempos inicial e após quinze dias de armazenamento, expressos em mg/100 g de amostra seca	83
Tabela 13 – Teores de vitamina B ₂ (riboflavina) em amostras de ervilhas controle, irradiada (1 kGy) e congelada nos tempos inicial e após quinze dias de armazenamento, expressos em mg/100 g de amostra seca	84
Tabela 14 – Valores de média e desvio padrão obtidos durante a análise sensorial, utilizando teste de escala hedônica com 9 pontos, para as amostras de ervilhas controle, irradiada (1kGy) e congelada, após sete de armazenamento	86

Tabela 15 – Análise de variância (ANOVA) dos atributos utilizados na análise sensorial de amostras de ervilhas controle, irradiada (1 kGy) e congelada armazenadas durante sete dias	86
--	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Regiões de cultivo de ervilhas - Nativo e introduzido	22
Figura 2 – Diferentes formas de processamento de grãos de ervilha	25
Figura 3 – (A) Estrutura da amilose (polímero linear composto por D-glicoses unidas em α -1,4); (B) Estrutura da amilopectina (polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em α -1,4 e α -1,6)	27
Figura 4 – Estrutura de várias formas de tiamina que exercem função vitamínica	30
Figura 5 – Estruturas químicas da riboflavina	32
Figura 6 – Laboratório de análise sensorial da Escola SENAI Horácio Augusto da Silveira. (a) Local de preparo das amostras. (b) Local onde os provadores realizam as análises	47
Figura 7 – (a) Diagrama mostrando a separação de uma mistura de componentes A e B por eluição cromatográfica em coluna. (b) A saída do sinal do detector em vários estágios da eluição mostrada em (a)	49
Figura 8 – Diferentes formas de cromatografia líquida em coluna	51
Figura 9 – Diagrama ilustrativo dos componentes do cromatógrafo de alta eficiência	52
Figura 10 – Esquema de ICP OES	54
Figura 11 – Irradiador GAMMACELL do Instituto de Pesquisas Energéticas (IPEN)	59
Figura 12 – Esquema analítico do 1-2 Test (BioControl)	62

LISTA DE FLUXOGRAMAS

	Página
Fluxograma 1 – Preparo das amostras de ervilha controle, irradiada (1 kGy) e congelada	56
Fluxograma 2 – Esquema utilizado para determinação da concentração total de Fe e Zn e da bioacessibilidade em amostras de ervilhas	64

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 – Concentração das enzimas e da bile utilizados nos fluidos de digestão simulada (FDS)	66
Quadro 2 – Preparação dos fluidos de digestão simulada (volumes e massas necessárias)	66
Quadro 3 – Descrição dos comentários apresentados pelos provadores para a amostra controle	86
Quadro 4 – Descrição dos comentários apresentados pelos provadores para a amostra irradiada	86
Quadro 5 – Descrição dos comentários apresentados pelos provadores para a amostra congelada	87

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1 – Curva padrão para determinação da concentração total e da bioacessibilidade de Fe nas amostras de ervilhas	69
Gráfico 2 – Curva padrão para determinação da concentração total e da bioacessibilidade de Zn nas amostras de ervilhas	69
Gráfico 3 – Curva padrão para determinação da concentração da vitamina B ₁ em amostras de ervilhas	72
Gráfico 4 – Curva padrão para determinação da concentração da vitamina B ₁ em amostras de ervilhas	73
Gráfico 5 – Análise sensorial das amostras de grãos de ervilhas - Divisão dos participantes por sexo	84
Gráfico 6 – Análise Sensorial das amostras de grãos de ervilhas - Divisão dos participantes por faixa etária	84

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Objetivos	21
1.1.2 Objetivo geral	21
1.1.3 Objetivos específicos	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Classificação, origem, produção e consumo de ervilha	22
2.2 Características do grão	23
2.2.1 Carboidratos	26
2.2.2 Proteínas	28
2.2.3 Lipídeos	29
2.2.4 Vitaminas B ₁ e B ₂	29
2.2.4.1 Vitamina B ₁	30
2.2.4.2 Vitamina B ₂	32
2.2.5 Minerais Fe e Zn e bioacessibilidade	33
2.3 Radiação e irradiação de alimentos	35
2.4 Branqueamento e congelamento	39
2.5 Análises microbiológicas	41
2.5.1 Coliformes	42
2.5.2 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas	42
2.5.3 Contagem de bolores e leveduras	43
2.5.4 <i>Salmonella</i> spp.	43
2.6 Análise sensorial	44
2.7 Cromatografia	48
2.7.1 Cromatografia líquida	50
2.8 Espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1 Amostras	56
3.2 Irradiação das amostras	58
3.3 Análises microbiológicas	59

3.3.1	Preparo das diluições	60
3.3.2	Contagem total de bolores e leveduras	60
3.3.3	Contagem de aeróbios mesófilos	60
3.3.4	Coliformes totais e <i>E. coli</i>	60
3.3.5	<i>Salmonella</i>	61
3.4	Análises químicas de composição centesimal	62
3.4.1	Teor de umidade	62
3.4.2	Cinzas - resíduo mineral	62
3.4.3	Lipídios - extrato etéreo	63
3.4.4	Proteínas	63
3.4.5	Carboidratos	63
3.5	Determinação da concentração total de ferro e zinco e da bioacessibilidade .	63
3.5.1	Digestão in vitro	65
3.5.2	Mineralização das amostras	67
3.5.3	Determinação das concentrações de Fe e Zn por ICP OES	68
3.6	Vitaminas B₁ e B₂	69
3.6.1	Extração simultânea das vitaminas B ₁ e B ₂	70
3.6.2	Determinação da vitamina B ₁ (tiamina), com reação pré-coluna	70
3.6.2.1	Preparo da fase móvel para determinação da vitamina B ₁ por detecção com reação de pré-coluna	71
3.6.2.2	Conversão da tiamina em tiocromo por meio de reação pré-coluna	71
3.6.3	Determinação da vitamina B ₂ (riboflavina)	72
3.6.3.1	Condições cromatográficas para a análise da vitamina B ₂	72
3.6.3.2	Preparo da fase móvel para determinação da vitamina B ₂	72
3.7	Análise sensorial	73
3.8	Análise estatística dos resultados de composição centesimal, determinação de vitaminas B₁ e B₂, determinação e bioacessibilidade de Fe e Zn	74
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1	Análises microbiológicas	75
4.2	Análise da composição centesimal	77
4.3	Análises para determinação da concentração total de Fe e Zn e bioacessibilidade	79
4.4	Análises de vitaminas	82
4.4.1	Vitamina B ₁ (tiamina)	82

4.4.2	Vitamina B ₂ (riboflavina)	83
4.5	Análise sensorial	83
5	CONCLUSÃO	84
6	PERSPECTIVA PARA TRABALHOS FUTUROS	89
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
	ANEXO 1 – TABELA DE CONVERSÃO <i>SIMPLATE</i>	103
	ANEXO 2 – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA ANÁLISE SENSORIAL	104
	ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO DE LIVRE ESCLARECIDO	106
	ANEXO 4 – FICHA UTILIZADA PARA ANÁLISE SENSORIAL NAS AMOSTRAS DE ERVILHAS – TESTE DE ESCALA HEDÔNICA	110

1 INTRODUÇÃO

A ervilha (*Pisum sativum* L.) pertence à família de plantas Leguminosae, também conhecida como Fabaceae (KEW SCIENCE, 2018).

A origem da *Pisum sativum* não é muito conhecida, no entanto, foram encontradas evidências arqueológicas na região denominada historicamente como Crescente Fértil, área que corresponde atualmente aos estados de Israel e Jordânia e as terras ao redor dos rios Tigre e Eufrates, indicando um cultivo desde 8000 aC. As regiões da Ásia Ocidental são consideradas as primeiras produtoras e em seguida o cultivo foi espalhado pelos seres humanos para Europa, China e Índia. Atualmente o grão é cultivado em todos os países de clima temperado e nas regiões de montanhas tropicais (KEW SCIENCE, 2018).

A produção mundial de grãos de ervilhas é quantificada utilizando-se como critério as ervilhas frescas e as ervilhas secas. No cenário mundial, a China e a Índia são as maiores produtoras dos grãos frescos, representando respectivamente 61,5% e 22,2% do volume total de produção. Considerando-se os grãos secos, ocupam posições de destaque em relação ao volume total de produção, as regiões do Canadá com 30,8%, da Federação Russa com 13,4% e da China com 12,1%. O Brasil apresenta-se na quinquagésima quinta posição na produção de ervilhas secas com uma quantidade anual de 3692 toneladas (FAOSTAT, 2014).

A ervilha é reconhecida como uma fonte nutritiva de proteína vegetal de alta qualidade, além de representar uma boa fonte de vitaminas, minerais, compostos fenólicos, carboidratos incluindo fibras alimentares e amido (LETERME, 2002; THARANATHAN e MAHADEVAMMA, 2003; TOSH et al., 2013).

O consumo de grãos, tais como ervilha, de maneira regular, tem sido associado com menores riscos de: desenvolvimento de diabetes tipo 2, doença cardíaca coronária e algumas formas de câncer. Uma alimentação a base de grãos traz ainda como benefício menores taxas de obesidade e síndrome metabólica (CHIBBAR; AMBIGAIPALAN e HOOVER, 2010; RIZKALLA; BELLISLE e SLAMA, 2002).

Um dos desafios da grande produção de grãos é a preservação e armazenamento. A preservação de alimentos é uma ação ou método utilizado para manter os alimentos a um nível desejado de qualidade. Novas técnicas de preservação são desenvolvidas para satisfazer as demandas econômicas e ainda satisfazer os consumidores nos aspectos de segurança, nutricionais e sensoriais (POTTER e HOTCHKISS, 1995).

Os alimentos são perecíveis ou deterioram-se por natureza. Com base no modo de ação, as principais técnicas de conservação de alimentos podem ser categorizadas como: retardo ou inibição da deterioração química e do crescimento microbiano; inativação direta de bactérias, leveduras, fungos e enzimas; e recontaminação antes e depois do processamento (PROKOPOV e TANCHEV, 2007).

A radiação pode ser definida como a emissão e propagação de energia através do espaço ou de um meio material. Os diferentes tipos de radiação são separados em função do comprimento de onda, sendo os menores comprimentos de onda mais deletérios para os microrganismos. O espectro eletromagnético de interesse na conservação de alimentos pode ser dividido da seguinte forma: micro-ondas, radiação ultravioleta, raios X e radiação gama. O processo de exposição de produtos às energias radiantes é denominado irradiação. (JAY, 2005).

A irradiação é um processo bastante eficaz contra a maioria dos patógenos relacionados com o produto e oferece benefícios por ser capaz de atingir os poros internos e fissuras onde os patógenos podem se alocar, longe do alcance de métodos de higienização tradicionais. Também, por ser a frio, o tratamento mantém as características de frescor do produto (PRAKASH, 2016). A estabilidade da temperatura do produto é uma das vantagens da utilização do tratamento por radiação. Praticamente não há aumento da temperatura quando há a aplicação da radiação, permitindo a utilização de embalagens que não suportam aquecimento. Assim, o tratamento pode ser aplicado também após a embalagem, evitando a recontaminação ou reinfestação do produto (FARKAS; MOHÁCSI-FARKAS, 2011). Ainda, essas embalagens devem ser fabricadas em material que mantém a integridade dos alimentos, não ocasionando a difusão de quaisquer materiais tóxicos, durante ou depois do processo (ROBERTS, 2016).

Com relação às doses de radiação geralmente aplicadas em alimentos, estas podem ser classificadas em 3 níveis (CGEE, [s.d.]; LIMA FILHO et al., 2012). Quando se utilizam doses baixas, de até 1 kGy, o processo é chamado de radurização. São doses de radiação que reduzem sensivelmente a carga microbiana sem que haja alteração do produto. Quando as doses são intermediárias, o processo é chamado de radicidação ou

radiopasteurização, com valores de 1 kGy a 10 kGy. Já na radapertização ou esterilização comercial, são utilizadas doses elevadas, acima de 10 kGy, sendo suficientes para eliminar todos os microrganismos vivos de forma que não possam ser detectados por nenhum método microbiológico.

Apesar de ser uma técnica muito eficiente para a preservação de alimentos, a irradiação ainda é relativamente nova e, então, mais estudos devem ser feitos para avaliar os possíveis efeitos do processo na bioacessibilidade e biodisponibilidade de nutrientes. A bioacessibilidade é definida como a fração do nutriente que é liberado de sua matriz no trato gastrointestinal, tornando-o disponível para absorção efetiva pelo intestino. Inclui os processos que ocorrem durante a transformação alimentar digestiva em uma substância que pode ou não ser assimilada pelo corpo. A biodisponibilidade é o processo que pode prever a absorção e utilização de nutrientes por funções fisiológicas (COZZOLINO, 2015; FERNÁNDEZ-GARCIA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009).

BRIGIDE (2002) estudou a bioacessibilidade de ferro em grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris L.*) irradiados e observaram que o processo de irradiação com dose de 6,0 kGy levou a redução dos fatores antinutricionais no feijão cozido. Como consequência dessa diminuição desses fatores, houve aumento da bioacessibilidade de Fe, enquanto que nos grãos crus foi de 2,4%, nos grãos cozidos o valor foi de 8,0%.

Um estudo sobre irradiação, usando o feixe de elétrons, mostrou que a bioacessibilidade do ácido fólico em produtos cárneos variou entre 61-82%, e que o tratamento com feixe de elétrons aumentou a bioacessibilidade entre 6-30% dependendo do produto (GALÁN et al., 2014). Outro trabalho, mostrou que o processamento da polpa de tomate, utilizando ultrassom, pode induzir alterações nas propriedades viscoelásticas da matriz alimentar, causando uma diminuição acentuada na bioacessibilidade do licopeno (ANESE et al., 2013).

Tendo em vista que o processo de irradiação pode causar alguns efeitos na bioacessibilidade de nutrientes, este estudo teve como aspecto inovador e objetivo ampliar as informações na literatura sobre irradiação de alimentos utilizando raios-gama, avaliando a influência da irradiação na bioacessibilidade de Fe e Zn em amostras de grãos de ervilha. Considerando a importância do consumo de grãos de ervilha na alimentação, estudou-se ainda, comparativamente os efeitos gerados na composição química, nos aspectos sensoriais (cor, textura e sabor) e microbiológicos durante o período de armazenamento de 15 dias, nos grãos de ervilha, tomando como base o processo tradicional de ervilha congelada e o processo utilizando radiação gama. No que diz respeito a composição

química, estudou-se comparativamente os teores de Fe, Zn, umidade, cinzas, proteínas, lipídios, vitaminas B₁ e B₂.

Este estudo também pode auxiliar na construção de informações, reforçando dados importantes sobre os alimentos irradiados, assunto este que ainda mantém mitos por parte dos consumidores que apresentam aversão a este tipo de processamento.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar os efeitos na composição química, nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de grãos de ervilhas irradiados e congelados.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a composição química, incluindo os macronutrientes (carboidratos, proteínas, lipídios, umidade e cinzas) e os micronutrientes (ferro, zinco, tiamina e riboflavina) nas amostras: controle, irradiada (1 kGy) e congelada, no tempo zero, que corresponde ao momento logo após o processamento, e ainda depois de decorridos 15 dias de armazenamento.
- Avaliar a bioacessibilidade de ferro e zinco nas amostras de ervilha: controle, irradiada (1 kGy) e congelada, no tempo zero e após 15 dias de armazenamento.
- Avaliar as características sensoriais (cor, textura, sabor e aspecto global) das amostras de ervilha: controle, irradiada (1 kGy) e congelada por meio de análise visual e sensorial decorridos 7 dias de armazenamento.
- Avaliar as características microbiológicas das amostras de ervilhas: controle, irradiada (1 kGy) e congelada, no tempo zero e após 15 dias de armazenamento.
- Comparar os efeitos nos processamentos de ervilhas irradiadas (1 kGy) e congeladas durante o período de armazenamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Classificação, origem, produção e consumo de ervilha

A ervilha (*Pisum sativum* L.) pertence à família de plantas Leguminosae, também conhecida como Fabaceae (KEW SCIENCE, 2018).

A origem da *Pisum sativum* não é muito conhecida, no entanto, foram encontradas evidências arqueológicas na região denominada historicamente como Crescente Fértil, área que corresponde atualmente aos estados de Israel e Jordânia e as terras ao redor dos rios Tigre e Eufrates, indicando um cultivo desde 8000 anos antes de Cristo. As regiões da Ásia Ocidental são consideradas as primeiras produtoras e em seguida o cultivo foi espalhado pelos seres humanos para Europa, China e Índia. Atualmente o grão é cultivado em todos os países de clima temperado e nas regiões de montanhas tropicais (KEW SCIENCE, 2018).

O mapa mostrado na Figura 1, ilustra as regiões de onde a ervilha é nativa e ainda os locais onde o grão foi introduzido.

Figura 1 – Regiões de cultivo de ervilhas - Nativo e introduzido

Fonte: KEW SCIENCE, 2018.

A produção mundial de grãos de ervilhas é quantificada utilizando-se como critério as ervilhas frescas e as ervilhas secas. No cenário mundial, a China e a Índia são as maiores produtoras dos grãos frescos, representando respectivamente 61,5% e 22,2% do volume total de produção. Considerando-se os grãos secos, ocupam posições de destaque em relação ao volume total de produção, as regiões do Canadá com 30,8%, da Federação Russa com 13,4% e da China com 12,1%. O Brasil apresenta-se na quinquagésima quinta posição na produção de ervilhas secas com uma quantidade anual de 3692 toneladas. (FAOSTAT, 2014).

2.2 Características do grão

A ervilha é reconhecida como uma fonte nutritiva de proteína vegetal de alta qualidade, além de representar uma boa fonte de vitaminas, minerais, compostos fenólicos, carboidratos incluindo fibras alimentares e amido (LETERME, 2002; THARANATHAN e MAHADEVAMMA, 2003; TOSH et al., 2013).

O consumo de grãos, tais como ervilha, de maneira regular, tem sido associado com menores riscos de: desenvolvimento de diabetes tipo 2, doença cardíaca coronária e algumas formas de câncer. Uma alimentação a base de grãos traz ainda como benefício menores taxas de obesidade e síndrome metabólica (CHIBBAR; AMBIGAIPALAN e HOOVER, 2010; RIZKALLA; BELLISLE e SLAMA, 2002).

A ervilha (*Pisum sativum L.*) é uma hortaliça com amplas alternativas de uso na alimentação. Na forma de grãos verdes, pode ser consumida "in natura", enlatada ou congelada imediatamente após a colheita. Na forma de grãos secos, pode ser reidratada para consumo imediato. Dos grãos secos pode ser obtida ainda a farinha de ervilha, que tem emprego direto na fabricação de sopas instantâneas e em produtos de panificação. Pode-se também, obter-se isolados proteicos de ervilha que já são comercialmente disponíveis para uso como substituto de proteína animal e/ou vegetal e ainda em suplementos para fins de nutrição esportiva (GIORDANO, 1997; TOMÉ, 2012).

As diferentes formas de processamento, podem interferir nos aspectos nutricionais dos grãos de ervilha. Na Tabela 1 é apresentada uma comparação entre a ervilha em vagem e a ervilha enlatada.

Tabela 1 – Dados de composição centesimal de macro e micronutrientes para ervilha em vagem e ervilha enlatada

Item	Ervilha em vagem	Ervilha enlatada drenada
Umidade (g)	76,8	80,1
Proteína (g)	7,5	4,6
Lipídeos (g)	0,5	0,4
Carboidratos (g)	14,2	13,4
Fibra alimentar (g)	9,7	5,1
Cinzas (g)	1,0	1,4
Cálcio (mg)	24	22
Magnésio (mg)	42	23
Manganês (mg)	0,40	0,46
Fósforo (mg)	152	79
Ferro (mg)	1,4	1,4
Sódio (mg)	Traços	372
Potássio (mg)	311	147
Cobre (mg)	0,20	0,14
Zinco (mg)	1,2	0,9
Tiamina (mg)	0,27	0,07
Riboflavina (mg)	0,07	0,03
Piridoxina (mg)	0,06	Traços
Niacina (mg)	1,16	Traços
Vitamina C (mg)	12,4	--

Fonte: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2011.

A esterilização utilizada para a produção de ervilhas enlatadas apresenta os benefícios de segurança alimentar para o produto, no entanto, analisando a Tabela 1, verifica-se que ocorre redução nos teores de macronutrientes (proteína, lipídeos, carboidratos, fibra alimentar) e perda de micronutrientes (magnésio, fósforo, potássio, cobre, zinco, tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina e vitamina C). Observa-se também uma alta quantidade de sódio na ervilha enlatada, decorrente das condições do processo, que consiste em acondicionar as ervilhas em uma lata, adicionar uma salmoura, fechar a lata e empregar o tratamento térmico, considerando as condições adequadas de tempo e temperatura. A esterilização também influencia na textura e na cor das ervilhas. O produto final obtido é mole e sua coloração é verde acinzentada, conforme mostrado na Figura 2.

Esse estudo apresenta uso da irradiação como forma de garantir a segurança alimentar do produto e manter suas características organolépticas, sensoriais e nutricionais

próximas as condições das ervilhas “in natura”. A radiação pode ser utilizada como alternativa para o processamento de grãos de ervilhas. Ela pode ser definida como sendo a emissão e propagação da energia ou partículas através do espaço ou matéria, sendo a irradiação o processo de aplicação de energia radiante a um alvo qualquer, no caso, um determinado alimento (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Uma das vantagens na utilização do tratamento por radiação é a estabilidade da temperatura do produto. Praticamente não há aumento da temperatura quando há a aplicação da radiação, permitindo a utilização de embalagens que não suportam aquecimento. Assim, o tratamento pode ser aplicado também após a embalagem, evitando a recontaminação ou reinfestação do produto (FARKAS e MOHÁCSI-FARKAS, 2011). Na Figura 2 é mostrada uma comparação visual entre as diferentes formas de processamento de grãos de ervilhas.

Figura 2 – Diferentes formas de processamento de grãos de ervilhas

a. Ervilha irradiada. b. ervilha branqueada e congelada. c. ervilha esterilizada (ervilha enlatada). d. ervilha controle (passou pelas etapas de limpeza e higienização).

Fonte: autor da tese.

Em geral, os grãos de leguminosas são ricos em proteínas, carboidratos, vitaminas (especialmente do complexo B) e minerais. Por outro lado, possui componentes antinutricionais, tais como inibidores de enzimas proteolíticas, dentre eles a tripsina, os quais se ligam as proteínas reduzindo a disponibilidade de aminoácidos no trato gastrointestinal e os taninos que se ligam aos minerais, como, por exemplo o ferro, inibindo

a sua absorção e biodisponibilidade. (DISLER et al., 1975; LINDER, 1988; HALLBERG et al., 1992; GILANI; COCKELL e SEPEHR et al., 2005; CANNIATTI-BRAZACA, 2006).

Existem relatos de que as leguminosas apresentam baixos valores nutritivos, devido à presença de algumas substâncias antinutricionais, tais como os inibidores de proteases, lectinas, fítico, tanino e fibra dietética, incluindo o amido resistente (MORROW, 1991; SIDDHURAJU; BECKER e MAKKAR, 2000; SIDDHURAJU; MAKKAR e BECKER, 2002). Os taninos inibem a digestibilidade da proteína, enquanto que o ácido fítico reduz a biodisponibilidade de alguns minerais essenciais (VAN DER POEL, 1990; REHMAN e SHAH, 2006).

2.2.1 Carboidratos

A ervilha representa uma fonte significativa de carboidratos, dentre eles destacam-se as fibras dietéticas e o amido (POLESI; SARMENTO; ANJOS, 2011). O amido de ervilha apresenta teor considerável de amilose (61%) e de amido resistente, cerca de 40% (DEL BEM et al., 2012; POLESI; SARMENTO e ANJOS, 2011; POLESI; SARMENTO e FRANCO, 2011).

As fibras dietéticas representam os materiais da parede celular de plantas, principalmente a celulose, outros polissacarídeos não amiláceos e a lignina. A característica em comum desses polímeros é que eles não são digeridos no intestino delgado. A fibra dietética é nutricionalmente importante, pois mantém o funcionamento normal do trato gastrointestinal, aumentando o volume do conteúdo intestinal e das fezes, o que reduz o tempo de trânsito intestinal e ajuda a prevenir a sua constipação. Sua ingestão induz à saciedade (FENNEMA; PARKIN e DAMODARAN, 2010).

O amido é encontrado na natureza em partículas denominadas grânulos. Os grânulos são constituídos de moléculas de amilose e/ou amilopectina dispostas de modo radial, conforme mostrado na Figura 3 (FENNEMA; PARKIN e DAMODARAN, 2010).

A amilose é formada por moléculas de glicose ($C_6H_{10}O_5$) unidas por ligações glicosídicas α -1,4, formando uma cadeia linear com massa molecular na ordem de 250kDa (aproximadamente 1500 unidades de glicose). A amilopectina se caracteriza por uma longa cadeia ramificada de glicose, contendo de maneira intercalada, cerca de 30 ligações α -1,4 e uma ligação α -1,6, sua massa molecular é na ordem de 50000 – 500000kDa (DENARDIN e SILVA, 2009).

Figura 3 – (A) Estrutura da amilose (polímero linear composto por D-glicoses unidas em α -1,4); (B) Estrutura da amilopectina (polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em α -1,4 e α -1,6)

Fonte: DENARDIN e SILVA, 2009.

Quanto à digestibilidade, o amido é, em geral, potencialmente digerível pelas enzimas no trato gastrointestinal, sendo absorvido na forma de glicose no intestino delgado. Apesar disto, uma quantidade significativa de amido pode não ser digerida, alcançando o cólon, onde é fermentada pela flora bacteriana. Parte desta fração é chamada amido resistente. Estudos clínicos demonstraram que os amidos resistentes têm propriedades semelhantes às das fibras e promovem benefícios fisiológicos, podendo prevenir doenças (PEREDA, 2005; WALTER; SILVA e EMANUELLI, 2005; PEREIRA, 2007).

2.2.2 Proteínas

As proteínas são constituídas por cadeias de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, constituindo cadeias polipeptídicas que diferem umas das outras pelo número e sequência dos resíduos de aminoácidos presentes na molécula (SIKORSKI, 2001).

As principais proteínas presentes nos grãos de ervilhas (*Pisum sativum L.*) são as globulinas e as albuminas (SCHROEDER, 1982).

Os grãos de ervilhas têm 20-30% de proteína, correspondente as proteínas de armazenamento. As duas principais proteínas, a legumina (7S) e a vicilina (11S), são globulinas e representam 65-80% de todas as proteínas extraíveis. Estas têm uma estrutura quaternária regular que depende do pH e da concentração de sal (SCHROEDER, 1982; GHARSALLAOUI et al., 2009).

A qualidade de uma proteína está relacionada principalmente a seu conteúdo de aminoácidos essenciais e a digestibilidade. As proteínas de alta qualidade são aquelas que contém todos os aminoácidos essenciais em níveis maiores do que os níveis de referência da FAO/OMS/UNU, apresentando digestibilidade comparável ou melhor do que as proteínas da clara do ovo ou do leite (FAO/WHO/UNU, 1985 apud FENNEMA; PARKIN; DAMODARAN, 2010). Na Tabela 2 são apresentados os valores de aminoácidos essenciais encontrados na ervilha, bem como os valores de referência estabelecidos pela FAO/OMS/UNU.

Tabela 2 – Conteúdo de aminoácidos essenciais e valor nutricional na ervilha *versus* padrão recomendado de aminoácidos para as proteínas alimentares

Propriedade (mg/g de proteína)	Padrão recomendado (mg/g de proteína)				
	Ervilha	Bebês	(2-5 anos)	(10-12 anos)	Adultos
Histidina	26	26	19	19	16
Isoleucina	41	46	28	28	13
Leucina	70	93	66	44	19
Lisina	71	66	58	44	16
Met + Cys	24 ^b	42	25	22	17
Phe + Tyr	76	72	63	22	19
Treonina	36	43	34	28	9
Triptofano	9 ^a	17	11	9	5
Valina	41	55	35	25	13
Total de aminoácidos	394	434	320	222	111
Escore químico (%) (baseado no padrão da FAO/OMS)	82	-	-	-	-

Met – metionina; Cys – cisteína; Phe – fenilalanina; tyr – tirosina.

^a Primeiro aminoácido limitante. ^b Segundo aminoácido limitante.

Fonte: adaptado FENNEMA; PARKIN e DAMODARAN, 2010.

Como as necessidades reais de aminoácidos essenciais dos indivíduos de uma determinada população variam dependendo de suas condições nutricional e fisiológica, as necessidades de aminoácidos essenciais de crianças (2-5 anos) geralmente são recomendadas como um nível seguro para todos os grupos etários (FAO/WHO 1992 apud FENNEMA; PARKIN e DAMODARAN, 2010).

Do ponto de vista nutricional, a proteína de ervilha tem a vantagem de apresentar uma composição equilibrada em aminoácidos, especialmente em lisina, um aminoácido essencial. Tal como as características nutricionais, as suas boas propriedades funcionais, como a gelificação, a emulsificação e a formação de espumas têm levado a um grande interesse na utilização destas proteínas como um ingrediente alimentar alternativo ao uso de proteína de soja (SCHNEIDER e LACAMPAGNE, 2000; RAYMUNDO et al., 2005).

2.2.3 Lipídeos

Os lipídeos correspondem a um grande grupo de compostos quimicamente diversos que são solúveis em solventes orgânicos. Em geral são denominados gorduras (sólidos) ou óleos (líquidos) devido ao estado físico quando em temperatura ambiente (FENNEMA; PARKIN e DAMODARAN, 2010).

As principais funções dos lipídios são: fornecer energia, ser precursores de hormônios, auxiliar na absorção e no transporte das vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e melhorar a textura e sabor dos alimentos (PINHEIRO; PORTO e MENEZES, 2005)

Aproximadamente 50-60% do conteúdo lipídico total de ervilhas está presente na fração lipídica neutra, mas os fosfolipídios e glicolipídios também estão presentes em quantidades apreciáveis (REICHERT e MACKENZIE, 1982).

2.2.4 Vitaminas B₁ e B₂

As vitaminas são agentes ativos essenciais para a manutenção das funções biológicas, podendo ocorrer na natureza como tal ou sob forma de precursores, provitaminas, que são ingeridas com os alimentos. O organismo humano pode promover a síntese de algumas vitaminas, necessitando, no entanto, do suprimento alimentar (FRANCO, 2008).

As vitaminas podem ser divididas em dois grupos principais, os solúveis em água: tiamina (vitamina B₁), riboflavina (B₂), niacina (B₃), ácido pantotênico (B₅),

piridoxina (B₆), ácido fólico (B₉), cobalamina (B₁₂), biotina e ácido ascórbico (C); e os solúveis em gordura: A, D, E e K (FRANCO, 2008).

2.2.4.1 Vitamina B₁

A vitamina B₁ é formada por duas moléculas: uma pirimidina substituída e um anel tiazol, ligados por um radical metileno. A tiamina tem ampla distribuição em tecidos vegetais e animais. A maior ocorrência natural da tiamina encontra-se na forma de pirofosfato, com quantidades menores da tiamina não fosforilada, monofosfatada e trifosfato de tiamina. Na Figura 4 são mostradas as estruturas de várias formas de tiamina que exercem atividade vitamínica (PENTEADO, 2003; FENNEMA; PARKIN e DAMODARAN, 2010).

Figura 4 – Estrutura de várias formas de tiamina que exercem função vitamínica.

Fonte: FENNEMA; PARKIN e DAMODARAN, 2010.

A vitamina B₁ é essencial para ajudar as células a converterem carboidrato em energia, participando das etapas do Ciclo de Krebs. A forma fisiologicamente ativa da tiamina, a tiamina pirofosfato (TPP), é uma coenzima que atua como uma cocarboxilase na descarboxilação oxidativa de alfacetoácidos, como o piruvato e o alfacetoglutarato. Participa também nas reações da transcetolase na via da pentose fosfato, fornecendo ribose para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucleicos. Tem papel na síntese de ácidos graxos, por promover a redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Há evidências que a TPP e a tiamina trifosfato (TT) participam da transmissão do impulso

nervoso, garantindo o bom funcionamento das células nervosas e do cérebro (VANNUCCHI e CUNHA, 2009; MAIHARA et al., 2006).

A deficiência de tiamina pode resultar em três síndromes distintas: 1) beribéri seco, caracterizado por neuropatia periférica crônica; 2) beribéri úmido, no qual insuficiência cardíaca e anormalidades metabólicas predominam, com pouca evidência de neuropatia periférica e 3) encefalopatia de Wernicke com psicose Korsakoff, caracterizada por confusão mental, dificuldade na coordenação motora e paralisia do nervo ocular (oftalmoplegia) (VANNUCCHI e CUNHA, 2009).

Com o objetivo de atender as necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos adultos e grupo de pessoas saudáveis, a ingestão diária recomendada (IDR) atualmente no Brasil, para a tiamina, é de 1,2 mg/dia (BRASIL, 2005). O consumo de cem gramas de grãos de ervilhas representa cerca de 50% da IDR (FRANCO, 2008).

A B₁ é uma das vitaminas do complexo B mais sensíveis à temperatura, levando a grandes perdas durante o processamento térmico dos alimentos (BALL, 2006). Esta vitamina é igualmente instável em soluções neutras e à exposição ao ar (DIÉGUEZ e HIERREZUELO, 1997).

Existem dados publicados comprovando a estabilidade da tiamina nos alimentos. Estudos apontam perdas favorecidas de tiamina quando: (1) as condições favorecem a lixiviação de vitaminas no meio aquoso que a envolve; (2) o pH é aproximadamente neutro ou maior; (3) ocorre exposição a um agente sulfitante. As perdas de tiamina também podem ocorrer em alimentos completamente hidratados, durante o armazenamento em temperaturas moderadas (FENNEMA; PARKIN e DAMODARAN, 2010).

Em relação aos métodos analíticos empregados para detecção da vitamina B₁ em alimentos, podem ser utilizadas a fluorimetria, a microbiologia ou a cromatografia (GREENFIELD e SOUTHGATE, 2003). Dentre as opções citadas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a mais aplicada, abrangendo diferentes matrizes alimentares, tais como vegetais (repolho, brócolis, alface e demais folhas verdes) pólen apícola, grão de bico, leite em pó, fórmulas infantis, carne de porco, trigo, centeio, aveia e seus derivados e palmeiras (ARRUDA et al., 2013; ASLAM et al., 2008; ASLAM; KHAN e KHAN, 2013; BUCHHOLZ; DROTLEFF e TERNES, 2012; JAKOBSEN 2008; MONDRAGÓN-PORTOCARRERO; VÁZQUEZ-ODÉRIZ e ROMERO-RODRÍGUEZ, 2011; RODRIGUES et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

2.2.4.2 Vitamina B₂

A riboflavina, 7,8-dimetil-10-ribitol-isoaloxazina, é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B₂, apresenta coloração amarela e é fluorescente. Ela é encontrada no leite, carne, peixe e principalmente em vegetais de cor verde-escura. A riboflavina proveniente da dieta, possui fórmula empírica C₁₇H₂ON₄O₆ e pode ser encontrada na forma das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) ligadas a proteínas. Na Figura 5 é mostrada a estrutura química das formas ativas dessa vitamina (POWERS, 2003; SOUZA et al., 2005)

Figura 5 – Estruturas químicas da riboflavina

Fonte: BALL, 2006.

A riboflavina tem papel importante nos diversos processos metabólicos, estando envolvida nas transformações para obtenção de energia por meio de lipídios, proteínas e carboidratos (FRANCO, 2008).

A deficiência da vitamina B₂ causa lesões nas comissuras labiais e nos lábios, língua avermelhada, seca, atrófica e descamativa, dermatite seborreica. Pode também, ocorrer conjuntivite e opacidade do cristalino. Ocasionalmente, a deficiência da riboflavina pode associar-se à anemia hipocrômica e microcítica, como resultado da absorção diminuída de ferro nessas condições. O reconhecimento da deficiência de riboflavina é difícil, visto que as manifestações clínicas como dermatite e glossite são comuns a outros estados de deficiência vitamínica. Além disso, a riboflavina é necessária para a

metabolização da vitamina B₆, do folato, da niacina e da vitamina K, ocorrendo superposição de deficiências vitamínicas (VANNUCCHI e CUNHA, 2009).

A ingestão diária recomendada de riboflavina varia desde 0,4 mg (na infância) a 1,3 mg/dia para adultos sendo que, para mulheres grávidas, recomenda-se uma dose suplementar de 0,3 mg/dia durante a gestação e 0,5 mg/dia durante o período de lactação, já que estudos mostram que durante o terceiro trimestre de gestação há uma queda progressiva nos níveis de riboflavina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1974; COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1993; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

Trata-se de uma vitamina bastante estável as condições habituais de processamento e armazenamento, retendo-se até 90%. As condições de tratamento térmico, oxigênio e pH ácido permitem a estabilidade da vitamina. Já, em pH alcalino, e exposição a luz ultravioleta, a riboflavina é degradada a lumiflavina, que apresenta um alto poder oxidante, sendo capaz de catalisar a destruição de outras vitaminas (FENNEMA; PARKIN e DAMODARAN, 2010; ORDÓÑEZ, 2007; PENTEADO, 2003; TRUSWELL, 2009).

Os métodos analíticos utilizados para detecção da riboflavina podem ser: fluorimetria, microbiologia ou ainda cromatografia. Aplicando-se a cromatografia, é necessário que a detecção dessa vitamina ocorra por fluorescência, devido as características naturais do analito de interesse e a maior sensibilidade desse equipamento em relação ao detector de UV-vis (ARRUDA et al., 2013; ASLAM et al., 2008; ASLAM, KHAN e KHAN, 2013; BUCHHOLZ; DROTLEFF e TERNES, 2012; JAKOBSEN 2008; GREENFIELD e SOUTHGATE, 2003; RODRIGUES et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

2.2.5 Minerais de Fe e Zn e bioacessibilidade

Amostras de ervilhas apresentam em média, na sua composição, 97 partes por milhão (ppm) de Fe e 41 ppm de Zn entre outros minerais (GAWALKO et al., 2009).

Os minerais, assim como as vitaminas, não podem ser sintetizados pelo organismo, dessa forma devem ser fornecidos com a alimentação (AMMERMAN; BAKER e LEWIS, 1995; PINHEIRO; PORTO e MENEZES, 2005).

Os elementos Fe e Zn são considerados essenciais, com funções específicas no organismo. O ferro possui duas formas conhecidas como: ferro heme e ferro não heme. O ferro inorgânico (forma não heme) pode ser encontrado nos alimentos de origem vegetal como Fe(II) ou Fe(III). O ferro orgânico (forma heme) tem uma maior concentração em

alimentos de origem animal, participando da constituição da hemoglobina (metaloproteína que transporta oxigênio dos pulmões até os tecidos). A deficiência de ferro no organismo ocasiona anemia, que por sua vez, promove alterações no desenvolvimento da criança ou adolescente, problemas de peles, mucosas, sistema digestivo e aumento da mortalidade em crianças devido a um estágio mais avançado da doença (QUEIROZ e TORRES, 2000; BRIGIDE, 2002).

O zinco está envolvido no processo de crescimento, cicatrização, regulação do metabolismo e do sistema imunológico. Sua deficiência causa o retardamento do crescimento, anormalidades na formação óssea, dermatite entre outros problemas (SILOTO, 2005).

Apesar da concentração total de um determinado elemento ser importante para a composição mineral do alimento, ela não reflete a quantidade do nutriente disponível para absorção do organismo. A fração solúvel do elemento que é liberada de sua matriz durante o trato gastrointestinal, tornando-a disponível para absorção efetiva pelo intestino é conhecida como bioacessibilidade. O termo biodisponibilidade engloba a bioacessibilidade e é utilizado para determinar a quantidade do nutriente ingerido que está disponível para uso das funções fisiológicas do organismo, ou que será estocado para usos futuros, e avalia a eficiência nutricional. Dessa forma torna-se importante determinar a fração de nutrientes potencialmente livres para serem absorvidos, além dos fatores que aumentam a absorção (por exemplo, ácido ascórbico, albumina de soro bovino e proteínas de carne) ou inibem a absorção (por exemplo, fibras dietéticas, polifenóis, ácidos, fosfatos, sais de cálcio e caseína) (COZZOLINO, 2015; FERNÁNDEZ-GARCIA; CARVAJAL-LÉRIDA e PÉREZ-GÁLVEZ, 2009).

Apesar do alto conteúdo mineral das ervilhas, a biodisponibilidade pode ser pobre devido às altas concentrações de fitato. SANDBERG (2002) relatou que o fitato atua como um inibidor da absorção de Zn, Fe e Ca. Um estudo realizado por TRINIDAD et al. (2010) em legumes descobriram que o conteúdo de fitato afetou o Fe, mas não influenciou a disponibilidade de Zn e Ca. De fato, esses autores concluíram que quando a disponibilidade de Fe era baixa, a disponibilidade de Ca e Zn era alta.

Os estudos da bioacessibilidade podem ser realizados por meio de experimentos *in vivo* ou *in vitro*. Nos experimentos *in vivo* são utilizados animais com metabolismo próximo ao metabolismo humano, trata-se de um método com duração e custos mais altos, envolvendo também questões éticas e experimentais. A determinação da biodisponibilidade, nos experimentos *in vivo* é estimada subtraindo-se a quantidade do

elemento de interesse excretado pelo animal da quantidade ingerida, por meio da técnica do balanço de massa (DANIELSSON; SPARÉN e GLYNN, 1995; HE; LV e WANG, 2004). Os experimentos *in vitro* são feitos visando a simulação das condições fisiológicas, bem como a sequência de eventos que ocorrem durante a digestão no trato gastrointestinal. Fatores importantes como temperatura, movimentos peristálticos e a composição química e enzimática da saliva, do suco gástrico, do suco duodenal e do suco biliar devem ser reproduzidos de forma que os resultados possam refletir as condições reais do indivíduo (DO NASCIMENTO DA SILVA, 2016).

2.3 Radiação e irradiação de alimentos

A radiação pode ser definida como a emissão e propagação de energia através do espaço ou de um meio material. Os diferentes tipos de radiação são separados em função do comprimento de onda, sendo os menores comprimentos de onda mais deletérios para os microrganismos. O espectro eletromagnético de interesse na conservação de alimentos pode ser dividido da seguinte forma: micro-ondas, radiação ultravioleta, raios X e radiação gama. O processo de exposição de produtos a energias radiantes é denominado irradiação. (JAY, 2005).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2001), fontes de radiação são aquelas autorizadas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, na conformidade das normas pertinentes, a saber: isótopos radioativos emissores de radiação gama – Cobalto 60; raios X gerados por máquinas que trabalham com energias de até 5 MeV e elétrons gerados por máquinas que trabalham com energias de até 10 MeV. A quantidade de energia absorvida é chamada de dose. A unidade no Sistema Internacional de Unidades é gray (Gy) e equivale a 1 J/kg de alimento (INTERNATIONAL CONSULTATIVE GROUP ON FOOD IRRADIATION, 1992).

A radiação gama emitida por radioisótopos e os feixes de elétrons produzidos pelos aceleradores industriais transferem suas energias, por meio de interações com os elétrons das órbitas dos átomos que constituem os produtos. Essas interações, provocam a excitação desses elétrons para níveis de energia superiores ou os arrancam de suas órbitas (ionização), com energia suficiente para interagirem com elétrons orbitais de outros átomos. Os produtos da ionização (íons, elétrons secundários, átomos e moléculas excitadas) são responsáveis pelos efeitos físicos, químicos e biológicos nos materiais irradiados (CALVO, 2005).

A radiação gama pode ser emitida a partir do isótopo de cobalto, o ^{60}Co (mais comum, com energia de 1,17 e 1,33 MeV). A vantagem desta fonte é o seu alto poder de penetração e boa uniformidade de dose, além de estar comercialmente disponível e possuir baixo risco ambiental (decaimento do ^{60}Co em níquel não radioativo). Porém, apresenta meia-vida de 5,261 anos, devendo ser repostado anualmente 12,34% da fonte para manter o potencial original (ARVANITOYANNIS, 2010; CALVO, 2005; KOMOLPRASERT; MOREHOUSE, 2004; LEONEL, 2008).

A irradiação é reconhecida como um processo de conservação a frio, uma vez que inativa os microrganismos, sem aumento considerável da temperatura. Os principais benefícios advindos da irradiação de alimentos em relação as doses recebidas são:

- Dose baixa – até 1 kGy – inibição de brotamento; atraso na maturação, desinfestação de insetos; inativação de parasitas.
- Dose média – 1 a 10 kGy – redução do número de microrganismos deterioradores; redução ou eliminação de patógenos não formadores de esporos; melhora das propriedades tecnológicas dos alimentos; extensão da vida-de-prateleira.
- Dose alta – acima de 10 kGy – redução do número de microrganismos ao ponto de esterilidade, incluindo formadores de esporos (GOBRIL, 2008).

O comitê misto de especialistas FAO/IAEA/WHO em estudo sobre a integridade dos alimentos irradiados, determinou que os alimentos submetidos à dose média de 10 kGy de irradiação não apresentam risco toxicológico e não introduz a qualquer problema nutricional e microbiológico aos humanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981). Em 2003, após vários estudos com Doses Superiores a 10 kGy, a Comissão do Codex Alimentarius, permitiu a utilização de qualquer dose para atingir o objetivo tecnológico proposto (CGSIF, 2003). A justificativa consiste em que o alimento tratado com raios gama não se torna radioativo, já que os nêutrons não são emitidos pelo ^{60}Co e, portanto, nenhuma alteração nuclear é produzida nos núcleos das moléculas do alimento (STEFANOVA; VASILEV e SPASSOV, 2010).

No Brasil, foi implementado pela ANVISA, em 2001 o “Regulamento técnico para irradiação de alimentos” com o objetivo de estabelecer os requisitos gerais para o uso da irradiação com vistas à qualidade sanitária do produto final. Nele consta que a irradiação não deve ser utilizada em substituição às boas práticas de fabricação ou agrícolas e impõe que a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a

finalidade pretendida, e a dose máxima absorvida deve ser menor do que àquela que comprometeria as propriedades funcionais ou os atributos sensoriais do alimento.

O impacto da radiação sobre os nutrientes tem sido motivo de muitas pesquisas na área de alimentos, observando-se que as alterações são as mesmas que ocorrem nos outros processos empregados na conservação de alimentos, principalmente no que se refere a oxidação de lipídios, formação de radicais livres, entre outros. Os micronutrientes, em especial as vitaminas, podem sofrer redução em pequenas proporções pelo emprego da irradiação. A sensibilidade das vitaminas ao processo é variada, dependendo das condições nas quais se irradiam os alimentos, sendo as vitaminas C e B₁ as mais sensíveis no grupo das hidrossolúveis e as vitaminas E e A as mais sensíveis entre as lipossolúveis. (KILCAST, 1994). Contudo, na irradiação, essas alterações podem ser minimizadas simplesmente pela mudança das condições de processo, como, por exemplo, o emprego de embalagens com atmosfera modificada (LIMA et al., 2001).

VILLAVICENCIO et al. (2000) avaliaram o efeito da radiação gama no conteúdo de tiamina, riboflavina e vitamina B₆ em duas variedades de feijão brasileiro cozido (*Carioca* e *Macaça*). Observou-se após seis meses de estocagem em temperatura ambiente, um pequeno efeito sobre o conteúdo de tiamina em feijão *Carioca*, quando foram utilizadas doses maiores que 2,5 kGy. Já para o feijão *Macaça*, não houve perdas significativas dessa vitamina. O conteúdo de riboflavina não apresentou variação significativa entre o controle e as amostras irradiadas do feijão *Carioca*. No feijão *Macaça* houve uma elevação no teor dessa vitamina, com o aumento da dose utilizada.

O estudo que analisou o efeito da radiação gama ionizante (5,0, 10,0, e 15,0 kGy) sobre tiamina e riboflavina em quatro tipos de cereais (trigo, milho, cevada e, sorgo) identificou uma redução no conteúdo de riboflavina (conhecida como a vitamina hidrossolúvel menos sensível à radiação) de 20,8 a 32,1%, quando utilizada uma dose de 15,0 kGy. Já para a tiamina (vitamina mais sensível entre as hidrossolúveis), houve um decréscimo da ordem de 33,3 a 47,9 %, na mesma dose mencionada. No entanto, a dose permitida pela Comissão do Codex Alimentarius, igual a 1,0 kGy, não afetou adversamente o conteúdo nutricional dos cereais analisados (AZIZ; SOUZAN e SHAHIN AZZA, 2006).

BRIGIDE (2002) estudando a disponibilidade de ferro em grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiados, observou que o processo de irradiação com dose de 6,0 kGy mostrou redução dos fatores antinutricionais no feijão cozido. A

irradiação foi efetiva para a disponibilidade do ferro, com consequente melhora no valor nutritivo, além de conferir conservação prolongada do grão.

Durante o estudo comparativo sobre os efeitos de tratamentos de radiação gama em grão de bico (*Cicer arietinum* L.) cru que posteriormente foi submetido a cocção observou-se que no controle e nas doses de 4,0 e 6,0 kGy a cocção não influenciou na digestibilidade da proteína. Mas nos tratamentos que receberam radiação de 2,0, 8,0, e 10,0 kGy houve influência na digestibilidade proteica. O grão de bico cozido apresentou uma melhor digestibilidade em doses maiores de radiação. A cocção melhorou a digestibilidade dos grãos, proporcionando melhor aproveitamento da proteína (FERREIRA; BRAZACA e ARTHUR, 2006).

Foi observado por trabalhos anteriores, que o processamento por radiação melhora a qualidade nutricional dos legumes para várias extensões (EL-NIELY, 2007). A melhoria na qualidade da proteína de soja e em favas tem sido relatada após a remoção parcial de inibidor de tripsina e hemaglutinina como resultado de um simples processamento de irradiação (FARAG, 1998; EL-NIELY, 2001). O ácido fítico, a α -amilase e oligossacarídeos foram inativados de forma considerável quando as amostras leguminosas foram irradiadas. (SIDDHURAJU; BECKER e MAKAR, 2000; SIDDHURAJU; MAKAR e BECKER, 2002).

O tratamento por radiação em níveis de dose de 5,0, 7,5, e 10 kGy reduziu significativamente o teor de ácido fítico de ervilhas por 8,9%, 11,4% e 17,2%, de feijão-frade 8,6%, 11,4% e 14,8%, de lentilha por 15,1%, 25,2% e 32,7% e grão de bico de 6,5%, 11,5% e 20,2%, quando comparado com as respectivas sementes não irradiadas, respectivamente. A extensão da redução aumentou linearmente com o aumento da dose de radiação (EL-NIELY, 2007).

EL-NIELY (2007) estudou também o teor de taninos em leguminosas e observou variações significativas no conteúdo desse item. O tratamento por radiação resultou em uma redução significativa moderada em taninos em todas as leguminosas em comparação aos controles. Cerca de 13,6 %, 19,9 % e 27,8 % do teor de taninos de ervilhas foi reduzido utilizando doses de radiação de 5,0, 7,5, e 10,0 kGy, respectivamente. A digestibilidade *in vitro* da proteína aparente das ervilhas, após o efeito do tratamento por irradiação, aumentou significativamente cerca de 1,7%, 3,1% e 5,3%, como resultado de 5,0, 7,5 e 10,0 kGy, respectivamente.

SILVA et al. (2014) avaliaram os efeitos da radiação gama na conservação da polpa de amora, utilizando as doses de radiação de 0,75 kGy; 1,5 kGy e 3,0 kGy, e os

tempos de 0; 7; 15; 30 e 60 dias, onde verificaram o aumento da vida útil da polpa em até 60 dias, sendo que o tratamento com a dose de 1,5 kGy foi o que proporcionou a melhor qualidade microbiológica.

Os efeitos da radiação gama em amostras de framboesas submetidas aos tratamentos com doses de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 kGy, embaladas e armazenadas a 4°C durante 14 dias mostrou que a contagem microbiana inicial da amostra não irradiada foi de 104 unidades formadoras de colônia (UFC)/ grama, tendo esse valor aumentado durante o período de estocagem. As amostras irradiadas apresentaram inicialmente uma contagem inferior, tendo este valor permanecido constante durante o período de estocagem. A dose de 1,5 kGy apresentou os melhores resultados nos parâmetros microbiológicos (VERDE et al., 2013).

2.4 Branqueamento e congelamento

As variedades de grãos de ervilhas destinadas ao congelamento devem ter coloração verde escuro e casca macia, o tamanho da semente não é importante apesar de ervilhas maiores serem mais aceitas no mercado (DESHPANDE e ADSULE, 1998).

Os grãos de ervilhas congelados são processados por meio das etapas de: recepção, seleção, lavagem em água corrente, branqueamento, resfriamento, embalagem, congelamento e armazenamento (FURTUNATO; MAGALHÃES e MARIA., 2000).

O branqueamento consiste em um tratamento térmico prévio suave, que utiliza água fervente ou vapor há um tempo e uma temperatura pré-estabelecidos, tendo como finalidade inativar enzimas responsáveis por reações de deterioração, que causam alterações sensoriais e nutricionais. Trata-se de uma etapa essencial do processamento de frutas e vegetais. A peroxidase é uma das enzimas mais estáveis ao calor, sendo utilizada, como um indicador de branqueamento. Os efeitos principais dele são a inativação de enzimas potencialmente deletérias, redução da carga microbiana, diminuição intersticial de gases antes de tratamento posterior e amaciamento de tecidos vegetais. A inativação de enzimas costuma apresentar efeitos benéficos sobre a estabilidade das vitaminas em muitos alimentos durante o armazenamento posterior (AZEREDO, 2004; CORREIA; FARAONI e PINHEIRO-SANT'ANA, 2008; FENNEMA; PARKIN e DAMODARAN, 2010; NEGI e ROY, 2000).

PROCHASKA et al. (2000), revisando o efeito do branqueamento sobre o conteúdo nutricional em alimentos, constataram uma redução de 35% do teor de vitaminas hidrossolúveis em espinafre, provocada pelo branqueamento com água quente. De acordo

com o trabalho de JAE-YEUN; GIL-HWAN e CHUL-JAI (2003), onde foram analisados três diferentes binômios de temperatura/tempo (80°C/ 3 min; 90°C/ 2 min e 100°C/ 1 min). No branqueamento de soja, observou-se que as perdas das vitaminas B₁, B₂ e C foram mínimas, a 100 °C/ 1 min. Esses resultados indicaram que o branqueamento em altas temperaturas, por curto período de tempo, é benéfico para a retenção de nutrientes (CORREIA; FARAONI e PINHEIRO-SANT'ANA, 2008).

O congelamento consiste em reduzir a temperatura do alimento para uma condição na qual uma proporção elevada de água muda de estado físico, formando cristais de gelo (FELLOWS, 2017). As temperaturas utilizadas são baixas o suficiente para reduzir ou paralisar a deterioração causada pelos microrganismos, enzimas ou agentes químicos, como o oxigênio. O congelamento é um dos melhores tratamentos para se manter a cor, o aroma e a aparência de muitos alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 2008). A fim de se evitar efeitos deletérios ao produto, a remoção do calor do alimento, durante o seu congelamento, deve ser realizada de forma rápida, uma vez que, no congelamento lento há a formação de grandes cristais de gelo, pontiagudos, que provocam o rompimento das estruturas celulares, tendo como consequência a perda de suco celular e, portanto, redução do valor nutricional, durante o descongelamento. O congelamento rápido evita a formação de grandes cristais de gelo e a ruptura de membranas celulares, mantendo o valor nutricional do alimento (TAVARES et al., 1998, SILVA, 2006).

No estudo feito por TAVARES et al. (1998), avaliando o efeito de diferentes métodos de congelamento (túnel e câmara fria) para a conservação da acerola, observaram-se perdas mais elevadas de vitamina C nos frutos congelados em câmara fria (-16 a -18°C/ 48 horas) do que naqueles congelados em túnel (-72°C/ 5 min). A diferença média no teor de vitamina C provocada pelos dois métodos foi de 5,61%. Este fato pode estar relacionado à maior velocidade de reação de oxidação que ocorre no intervalo de -5 a -15°C, antes da estabilização da temperatura na faixa de -20°C. Houve uma redução no teor de vitamina C da ordem de 21,4% nos frutos congelados no túnel. Já no congelamento em câmara fria a redução foi um pouco maior (27,05%).

Um estudo realizado por SOARES e SÃO JOSÉ (2013), comparou diferentes tratamentos de branqueamento seguido de congelamento em mangas e constatou que o branqueamento a vapor com posterior congelamento da polpa de manga Rosa e Espada é o tratamento mais eficaz para manter o ácido ascórbico e os carotenoides no produto armazenado por 60 dias.

2.5 Análises microbiológicas

A incidência de microrganismos em vegetais deve refletir a qualidade sanitária das etapas do processamento e as condições microbiológicas do produto fresco na hora do processo (JAY, 2005). SPLITTSTOESSER, WETTERGREEN e PEDERSON (1961) demonstraram que as contagens totais de vagens, antes do branqueamento, variavam entre 5,60 e 6,00 log/g, em duas plantas de processamento. Após o branqueamento, os números foram reduzidos para 3,00 a 3,60 log/g. Posteriormente as etapas de processamento e empacotamento, as contagens foram de 4,72 a 5,94 log/g. Em ervilhas verdes, o comportamento foi semelhante, antes do branqueamento, as contagens totais foram de 4,94 e 5,95 log/g, após o branqueamento os números foram reduzidos e em seguida, aumentaram a cada etapa de processamento.

As análises microbiológicas são realizadas a fim de avaliar a qualidade e a segurança dos alimentos, tendo como princípio o uso dos microrganismos indicadores. O termo microrganismo indicador pode ser aplicado a qualquer grupo taxonômico, fisiológico ou ecológico de organismos cuja presença ou ausência proporcionam uma evidência indireta referente a uma característica específica da história da amostra. Normalmente são utilizados microrganismos indicadores de origem intestinal. O termo “microrganismo indicador” foi sugerido por Ingram, em 1977, para um organismo, cuja presença indicasse a possível presença de um patógeno ecologicamente similar (FORSYTHE, 2013).

Um microrganismo indicador deve apresentar as seguintes características:

- ser fácil e rapidamente detectável;
- ser facilmente distinguido dos outros membros da microbiota do alimento;
- ter um histórico de frequente associação com o patógeno cuja presença deve indicar;
- sempre estar presente quando o patógeno de interesse estiver presente;
- ser um microrganismo cujo os números idealmente estejam correlacionados com as contagens dos patógenos de interesse;
- possuir necessidades e uma taxa de crescimento equivalentes às do patógeno de interesse;
- ter uma taxa de morte ao menos paralela à taxa de morte do patógeno de interesse e, de preferência, sobreviver um pouco mais do que ele;

- estar ausente no alimento livre do patógeno de interesse, exceto, talvez quando este estiver presente em pequenas concentrações (JAY, 2005).

2.5.1 Coliformes

Coliformes é um termo geral para bactérias Gram-negativas, anaeróbias, facultativas, em forma de bastonetes. Os critérios utilizados para identificação são a produção de gás proveniente da glicose (e de outros açúcares) e a fermentação da lactose com a produção de ácido e de gás, em um período de 48 horas, a 35-37°C (FORSYTHE, 2013; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Fazem parte desse grupo as bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destes, apenas a *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais. Os demais, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas de origem intestinal (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Com o objetivo de diferenciar os coliformes fecais dos não fecais, foi desenvolvido um teste para detecção dos coliformes de origem fecal. Os coliformes de origem fecal são capazes de fermentar a lactose em meio de cultura denominado EC, com produção de gás, no período de 48 horas, a 45,5°C. A *E. coli* é a principal espécie no grupo dos coliformes fecais (FORSYTHE, 2013).

2.5.2 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas

Esta contagem é empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos. Mesmo que os patógenos estejam ausentes e que não tenham ocorrido alterações organolépticas do alimento, um número elevado de microrganismos indica que o alimento é insalubre.

A contagem de bactérias aeróbias mesófilas está associada as seguintes justificativas:

- a elevada contagem nos alimentos não perecíveis é indicativa do uso de matéria-prima contaminada ou processamento insatisfatório, sob o ponto de vista sanitário. Em alimentos perecíveis pode indicar o uso incorreto do binômio tempo/temperatura durante o armazenamento;

- todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas. Uma alta contagem de mesófilos (que crescem à mesma temperatura do corpo humano) significa que houve condições para que esses patógenos se multiplicassem (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

2.5.3 Contagem de bolores e leveduras

O crescimento de bolores e leveduras é mais lento do que o de bactérias em alimentos de baixa acidez e alta atividade de água. Portanto dificilmente serão responsáveis pela deterioração desses alimentos. Em alimentos ácidos e de baixa atividade de água, o crescimento de fungos é maior, provocando deterioração com grande prejuízo de frutas frescas, vegetais e cereais (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A presença desses microrganismos pode tornar-se um perigo à saúde pública devido à produção de micotoxinas pelos bolores (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A fim de reduzir ou eliminar a contagem de bolores e leveduras, devem ser adotadas algumas medidas: boas práticas de higiene para redução da carga de esporos; envio rápido do alimento ao consumidor; uso de temperaturas inferiores a -12°C para alimentos congelados; uso de embalagens que reduzam ou eliminem o contato com o ar; adição de ácidos ou conservadores químicos, tais como benzoatos ou sorbatos; aquecimento do alimento na etapa final de processamento já na embalagem final para destruição de células vegetativas e esporos (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

2.5.4 *Salmonella* spp.

A *Salmonella* é uma causa importante de doenças de origem alimentar no mundo todo, que pode levar a morbidade, mortalidade e perdas econômicas. A *Salmonella* é um gênero da família *Enterobacteriaceae*. São Gram-negativas, anaeróbias facultativas, não formam endósporos e têm forma de bastonetes curtos (1 a 2 µm). A *Salmonella* fermenta a glicose, produzindo ácido e gás, porém é incapaz de metabolizar a lactose e a sacarose. A temperatura ótima de multiplicação é de cerca de 38°C e a mínima fica em torno de 5°C (FORSYTHE, 2013).

A maioria das infecções humanas por *Salmonella* são associadas com a transmissão de origem alimentar a partir de carne e de produtos lácteos. No entanto, surtos de salmonelose têm sido relacionado com uma variedade de frutas e vegetais. A *Salmonella* foi isolada em muitos tipos de frutas e vegetais crus, incluindo brotos de feijão,

melões, suco de laranja não pasteurizado, suco de maçã e tomates. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2007; FORSYTHE, 2013).

2.6 Análise sensorial

A análise sensorial é uma ciência relacionada com a avaliação dos atributos sensoriais de um produto pelos órgãos dos sentidos. Segundo o *Institute of Food Technologists* (IFT), a análise sensorial é definida como “ciência usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações às características dos alimentos e materiais como são percebidas pelos cinco sentidos: visão, olfação, gustação, tato e audição. (ABNT NBR ISO 5492:2017).

A análise sensorial pode ser utilizada nas indústrias de alimentos e nas instituições de pesquisa tendo como objetivo, uma ou mais das seguintes aplicações:

- controlar as etapas de desenvolvimento de um novo produto, por meio de análise descritiva das amostras experimentais, de classificação de cada amostra de acordo com os padrões estabelecidos, estabelecendo que um dos vários produtos experimentais apresente aceitabilidade igual ou melhor que o padrão;
 - avaliar o efeito das alterações nas matérias-primas ou no processamento tecnológico sobre o produto;
 - reduzir custos baseando-se em elementos como utilização de ingrediente de menor preço, processos menos onerosos ou a produção num local diferente;
 - selecionar um novo fornecedor de ingrediente;
 - controlar o efeito da embalagem sobre o produto;
 - controlar, graduar ou avaliar o nível de qualidade;
 - avaliar a estabilidade do produto durante o seu armazenamento por meio de um estudo de vida de prateleira;
 - realizar teste de mercado de um novo produto ou produto reformulado.
- (DUTCOSKY, 2007)

Os atributos de um alimento são tipicamente percebidos na seguinte ordem: aparência; odor/ aroma; consistência/ textura e sabor (compostos aromáticos, percepções químicas, gosto) (MEILGAARD; CIVILLE e CARR, 2006).

A aparência compreende todos os atributos visíveis de uma substância ou objeto (ABNT NBR ISO 5492:2017). A aparência do produto e ou da embalagem é, muitas vezes, no momento da compra o único atributo utilizado pelo consumidor. Desta forma, o

analista sensorial deve realizar de maneira cuidadosa uma ampla análise em todos os aspectos considerando as seguintes características:

- cor – Trata-se de um fenômeno que envolve tanto o aspecto físico como componentes psicológicos. Sua percepção é influenciada pelo uso de iluminação com diferentes comprimentos de onda: 400-500nm (azul), 500-600nm (verde e amarelo) e 600-800nm (vermelho), normalmente expressos em termos de tonalidade, valor e cor pelo sistema de cores de Munsell. A uniformidade da cor é um aspecto importante a ser observado. Mudanças na coloração acompanham o processo de deterioração do alimento (MEILGAARD; CIVILLE e CARR, 2006).
- tamanho e forma – As irregularidades de comprimento; espessura; largura; tamanho de partícula; forma geométrica (quadrado, circular, etc.); distribuição dos pedaços, por exemplo, de vegetais, macarrão, alimentos preparados; indicam defeitos no produto (MEILGAARD; CIVILLE e CARR, 2006).
- textura da Superfície – devem ser observados o ressecamento ou brilho da superfície; a rugosidade ou uniformidade a fim de identificar defeitos nos produtos. A consistência e a textura dos produtos alimentícios são percebidas por meio de sensores da boca. (MEILGAARD; CIVILLE e CARR, 2006). De acordo com as características dos produtos alimentícios, são adotados os termos: viscosidade – para fluidos Newtonianos; consistência – para fluidos Não-Newtonianos, líquidos heterogêneos e semissólidos e textura – para sólidos ou semissólidos. (MEILGAARD; CIVILLE e CARR, 2006).
- odor - detectado quando substâncias voláteis entram pela via nasal e são percebidas pelo olfato. Aroma é o odor de um produto alimentício. A quantidade de voláteis que escapam de um produto é influenciada pela temperatura e pela natureza dos componentes (MEILGAARD; CIVILLE e CARR, 2006).
- sabor - inclui os aromáticos, isto é, as percepções olfativas causadas por substâncias voláteis liberadas de um produto na boca durante a mastigação; os gostos, percepções gustativas (salgado, doce, azedo e amargo) causadas por substâncias voláteis na boca e os fatores de sensação química que estimulam terminações nervosas das cavidades bucal e nasal (adstringente, picante, refrescante, metálico, umami). (MEILGAARD; CIVILLE e CARR, 2006).
- som produzido durante a mastigação de alimentos - também é considerado um atributo sensorial. É comum medir o tom, o volume e a duração do som produzidos pelos alimentos. O tom e o volume contribuem para a impressão sensorial geral. Diferenças do tom

na ruptura de alimentos fornecem informações sensoriais que são utilizadas por exemplo para avaliar o estado de frescor de um determinado produto (MEILGAARD; CIVILLE e CARR, 2006).

A análise sensorial de um produto alimentício e a execução de experimentos em análise sensorial de alimentos requer um planejamento do experimento, um planejamento das técnicas analíticas, seguido da interpretação dos resultados e observações obtidas desses experimentos (GRANATO; DE ARAUJO CALADO e JARVIS, 2014; YU; LOWB e ZHOUA, 2018)

Os testes usados para avaliar os produtos podem ser divididos em três grupos, os testes discriminativos ou de diferenciação, as análises descritivas e os testes afetivos ou hedônicos (STONE; REBECCA e HEATHER, 2012; ABNT NBR ISO 5492:2017).

Os testes discriminativos representam qualquer método de teste que envolva comparação entre amostras para determinar se existe diferença perceptível. As análises descritivas representam qualquer método usado para descrever ou quantificar as características sensoriais de estímulos por um painel de avaliadores treinados (ABNT NBR ISO 5492:2017).

O teste hedônico tem como objetivo medir a percepção hedônica global, por meio da determinação da aceitabilidade de um produto e/ou a determinação de preferência entre dois ou mais produtos pela população específica de consumidores. A percepção hedônica representa a quantidade de prazer dada pelas propriedades sensoriais de um produto (ABNT NBR ISO 5492:2017).

A escala hedônica avalia o quanto um provador gostou ou desgostou de uma determinada amostra, foi desenvolvida por Peryam e Pilgrim (1957). A forma geral da escala apresenta nove pontos: 1 (desgostei extremamente); 2 (desgostei muito); 3 (desgostei moderadamente); 4 (desgostei ligeiramente); 5 (indiferente); 6 (gostei ligeiramente); 7 (gostei moderadamente); 8 (gostei muito); 9 (gostei extremamente) (DUTCOSKY, 2007).

Os consumidores responsáveis pela avaliação do produto no teste hedônico, devem ser voluntários, não treinados e não devem apresentar nenhum envolvimento com o teste em andamento. A confidencialidade deve ser adotada, bem como a legislação relevante deve ser cumprida no que diz respeito a criação ou documentação de arquivos contendo documentos pessoais. As legislações referentes as restrições de idade também devem ser observadas. (ABNT NBR ISO 11136:2016).

A análise sensorial deve ser realizada em ambiente controlado que forneça: preparação e apresentação controladas do produto; condições confortáveis para o consumo de produtos e para o questionamento aos consumidores e ainda ausência de comunicação verbal e

não verbal entre os consumidores (ABNT NBR ISO 11136:2016). Na Figura 6 é mostrado um exemplo de um local onde são realizadas análises sensoriais.

Figura 6 - Laboratório de análise sensorial da Escola SENAI Horácio Augusto da Silveira. (a) Local de preparo das amostras. (b) Local onde os provadores realizam as análises

(a)

(b)

Fonte: autor da tese.

A análise dos dados obtidos na análise sensorial deve começar pela verificação da consistência interna dos dados e pelo cálculo da estatística descritiva básica. Deve haver pelo menos uma medida de dispersão (desvio padrão, amplitude de variação ou outra) para cada medida de posição (média, mediana entre outras) que apareça no relatório (ABNT NBR ISO 11136:2016).

A construção de gráficos auxilia na análise dos dados. Recomenda-se a construção de um histograma das avaliações para cada amostra de produto, a fim de avaliar se a distribuição é ou não unimodal e ainda se há grandes diferenças entre as amostras (ABNT NBR ISO 11136:2016).

Em testes de escalas, os dados podem ser analisados por meio da análise de variância (ANOVA), que consiste em uma técnica estatística utilizada na comparação de

dois ou mais tratamentos ou amostras, em que não se tem relação de causa e efeito entre os resultados obtidos, o que obriga os tratamentos a serem independentes. Em seguida, pode ser utilizado o Teste de Tukey, que permite verificar se existe diferença significativa entre duas médias, a um dado nível de confiança, em geral de 95% (ABNT NBR ISO 11136:2016; FARIA e YOTSUYANAGI, 2002; MEILGAARD; CIVILLE e CARR, 2006).

2.7 Cromatografia

A cromatografia é uma técnica físico-química usada para separação dos componentes de uma amostra, os quais se distribuem em duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da amostra são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes, conforme mostrado na Figura 7. A fase estacionária pode ser um sólido, um líquido retido sobre um sólido ou um gel. A fase móvel pode ser líquida ou gasosa (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009; CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000).

Figura 7 - (a) – Diagrama mostrando a separação de uma mistura de componentes A e B por eluição cromatográfica em coluna. (b) A saída do sinal do detector em vários estágios da eluição mostrada em (a)

Fonte: (SKOOG; HOLLER e NIEMAN 2006).

A invenção dessa técnica é usualmente atribuída ao botânico russo Mikhael Tsweett, o qual, no início do século XX, separou pigmentos coloridos presentes em extratos de folhas verdes de plantas, utilizando um tubo preenchido com carbonato de cálcio. Os termos “cromatografia”, “cromatograma” e “método cromatográfico” deriva das palavras gregas *chrom* (cor) e *graph* (escrever), embora ele tenha explicado que o processo não depende da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes separados (TSWEETT, 1903, 1906, apud. LANÇAS, 2016; COLLINS; BRAGA e BONATO, 2009).

A cromatografia pode ser classificada de acordo com a geometria da superfície na qual ocorre a separação dos componentes: se dentro de um tubo (de vidro ou metal) é denominada de cromatografia em coluna, se em uma superfície plana (placa de vidro ou metal impregnada com a fase estacionária, ou então uma folha de papel de filtro embebida com um solvente apropriado) denomina-se cromatografia planar (LANÇAS, 2016). Somente a cromatografia líquida pode ser realizada tanto em colunas como em superfícies

planares. As cromatografias gasosas e com fluido supercrítico, estão restritas aos procedimentos em coluna, sendo a fase móvel contida nas paredes das colunas (SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2006).

Os métodos cromatográficos em coluna são apresentados da Tabela 3.

Tabela 3 - Classificação dos métodos cromatográficos em coluna

Classificação Geral	Método Específico	Fase Estacionária	Tipo de Equilíbrio
Cromatografia Líquida (CL) (fase móvel: líquido)	Líquido-líquido ou partição	Líquido absorvido em um sólido	Partição entre líquidos imiscíveis
	Fase líquido-ligado	Espécies orgânicas ligadas a uma superfície sólida	Partição entre líquidos e superfície ligada
	Líquido-sólido ou adsorção	Sólido	Adsorção
	Troca Iônica	Resina de troca-iônica	Troca iônica
	Exclusão por tamanho	Líquido em interstícios de sólido polimérico	Partição/ filtração
Cromatografia gasosa (CG) (fase móvel: gás)	Gás-líquido	Líquido adsorvido em um sólido	Partição entre gás-líquido
	Fase gás-ligado	Espécies orgânicas ligadas a uma superfície sólida	Partição entre líquidos e superfície ligada
	Gás-sólido	Sólido	Adsorção
Cromatografia com fluido supercrítico (CFS) (fase móvel: fluido supercrítico)		Espécies orgânicas ligadas a uma superfície sólida	Partição entre fluido e superfície ligada

Fonte: SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2006

2.7.1 Cromatografia líquida

A cromatografia líquida em coluna pode ser dividida em: cromatografia líquida clássica (CLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou (HPLC) iniciais do termo em inglês *High Pressure Liquid Chromatography* – cromatografia líquida de alta pressão) (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000; LANÇAS, 2016).

Na Figura 8 são mostradas as diferenças entre cromatografia líquida clássica (CLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Figura 8 – Diferentes formas de cromatografia líquida em coluna

Fonte: COLLINS; BRAGA e BONATO, 2009.

A cromatografia líquida clássica (CLC) é praticada em tubos abertos, geralmente de vidro, denominados colunas, em pressão ambiente ou com aplicação de baixas pressões. As frações separadas são geralmente coletadas em tubos de ensaio, o solvente (eluente) é cuidadosamente evaporado e os tubos são pesados. A diferença de massa entre a do tubo após a evaporação do solvente e a do tubo original fornece a massa eluída naquele tubo, permitindo a construção dos cromatogramas de concentração da amostra *versus* o número da fração. Trata-se de um processo lento que, na maioria das vezes, requer o uso de alguma técnica auxiliar, tal como a espectrofotometria, para dosar cada um dos componentes da amostra nas frações coletadas (LANÇAS, 2016; COLLINS; BRAGA e BONATO, 2009).

Na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) emprega-se uma coluna fechada nas duas extremidades que pode ser utilizada por diversas vezes. Essa característica permite o uso de fases estacionárias de melhor qualidade, uma vez que o custo é diluído entre as várias análises e ainda o emprego de processos de empacotamento mais caros e aprimorados. As técnicas de injeção utilizadas são mais precisas e ocorrem por meio de válvulas de injeção que podem ser facilmente automatizadas de maneira

elétrica, pneumática entre outras. As colunas são muito eficazes, mas oferecem resistência a fase móvel, sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão fazendo com que a fase móvel migre a uma velocidade razoável através da coluna. Na saída da coluna é colocado um detector capaz de realizar um registro contínuo da composição do efluente, esse registro permite a construção do cromatograma (LANÇAS, 2016; COLLINS; BRAGA e BONATO, 2009).

A CLAE é menos dependente do operador e mais conveniente, por proporcionar: análises mais rápidas, de melhor qualidade e com reprodutibilidade. Trata-se de uma das técnicas mais procuradas atualmente (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000; COLLINS; BRAGA e BONATO, 2009).

A instrumentação utilizada na CLAE é modular sendo possível intercambiar um módulo de um equipamento de uma marca (um detector, por exemplo) para outra marca, permitindo ao usuário configurar um cromatógrafo líquido de acordo com as suas necessidades. Na Figura 9 é mostrado um diagrama ilustrativo dos itens necessários (LANÇAS, 2016).

Figura 9 – Diagrama ilustrativo dos componentes do cromatógrafo de alta eficiência.

Fonte: LANÇAS, 2016.

O solvente, também denominado eluente ou fase móvel, acondicionado em um frasco apropriado, é impulsionado por uma bomba de alta pressão em direção a coluna. No caminho, a amostra é introduzida na fase móvel por uma válvula de injeção e arrastada pela coluna, onde ocorre a separação. O efluente da coluna é direcionado para um detector, que acusa a presença dos analitos eluidos da coluna. O sinal gerado pelo detector é captado por um *software* apropriado, tratado no computador, e um cromatograma é gerado, mostrando a variação do sinal do detector em função do tempo (LANÇAS, 2016).

2.8 Espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado

A determinação de formas químicas de elementos é ainda um desafio analítico. As espécies são muitas vezes instáveis e as concentrações encontradas nas diferentes matrizes são a níveis de traços, na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou ainda menores: ng L^{-1} (formas alquiladas de Sn ou Pb e ng g^{-1} (sedimentos e tecidos biológicos). Por esta razão técnicas sensíveis como a espectrometria por meio de espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) é utilizada na análise de especiação (CORNELIS et al., 2003; EBDON et al., 2001; URE e DAVIDSON, 2002; DO NASCIMENTO da SILVA, 2016).

Um plasma é uma mistura gasosa condutora de eletricidade, que contém uma concentração significativa de cátions e elétrons (as concentrações dos dois são equivalentes a uma carga total aproximada de zero). Em um plasma de argônio, os íons de argônio e elétrons são as principais espécies condutoras, embora os cátions da amostra também estejam presentes em menor quantidade. Os íons de argônio também formado em um plasma, são capazes de absorver energia suficiente para manter a temperatura em um nível no qual ionizações adicionais sustentam o plasma, temperaturas superiores há 10.000 K podem ser encontradas (SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2006).

Um ICP OES típico é composto por: sistema de introdução de amostras, tochas e conexões, gerador de radiofrequência, sistema óptico, sistema de detecção e sistema computacional. A Figura 10 é mostrado um esquema das etapas envolvidas na espectrometria de plasma indutivamente acoplado (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000; SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2006).

Figura 10 – Esquema de ICP OES

Fonte: SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2006.

O processo de introdução da amostra é iniciado com a aspiração da amostra por bomba peristáltica, que em seguida é nebulizada pelo fluxo de gás. A amostra líquida e o fluxo de gás se misturam por meio de um nebulizador produzindo um aerossol no interior da câmara de nebulização. Após a nebulização, o aerossol formado é conduzido até a tocha do plasma. A tocha é composta por três tubos concêntricos de quartzo com funções distintas: tubo intermediário – pelo qual o fluxo de gás de alimentação (argônio) é introduzido; tubo externo – recebe o fluxo de argônio promovendo a refrigeração da tocha e a prevenção do depósito de sais na parede da tocha de forma que o plasma fique confinado em uma única região; tubo interno – também conhecido como tubo injetor, transporta o aerossol criado no sistema de introdução de amostra para o interior do plasma (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000; SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2006).

O sistema gerador de radiofrequência fornece corrente alternada com frequência definida para a bobina de indução usada para formar e manter o plasma acoplado indutivamente. O sistema óptico em um ICP OES tem como finalidade coletar

fótons liberados no plasma e separá-los de acordo com comprimentos de onda preestabelecidos para cada elemento de interesse analítico. (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000; SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

As amostras de grãos de ervilhas (*Pisum sativum L.*), foram adquiridas em feira livre e no Sacolão OBA localizados no Bairro do Tatuapé, da cidade de São Paulo, conforme planejamento das análises. As amostras foram preparadas para posteriores análises conforme apresentado no Fluxograma 1.

Fluxograma 1 - Preparo das amostras de ervilha controle, irradiada (1 kGy) e congelada

Fonte: autor da tese.

De acordo com o fluxograma, as amostras de grãos de ervilhas foram selecionadas, lavadas em água corrente, sanitizadas em cloro a 100 ppm durante 10 minutos, enxaguadas, escorridas em peneiras para retirada do excesso de água e submetidas a três métodos diferentes tendo como controle a amostra seca em papel

absorvente e armazenada na temperatura de refrigeração de 4 a 7°C, durante 7 dias para a análise sensorial e 15 dias para as demais análises.

No método de irradiação, os grãos de ervilhas foram secos em papel absorvente, irradiados a 1 kGy e armazenados em temperatura de refrigeração de 4 a 7°C, durante 7 dias para a análise sensorial e 15 dias para as demais análises.

A dose de radiação adotada teve como referência testes prévios de percepção sensorial, com 1 e 3 kGy, onde verificou-se que a dose de 1 kGy manteve-se adequada para consumo e a de 3 kGy apresentou residual amargo, descaracterizando o produto.

O método de congelamento, consistiu em branquear os grãos de ervilha em água na temperatura de 100°C durante 1 minuto, condição que conforme descrito JAE-YEUN; GIL-HWAN; CHUL-JAI (2003) apresentou menores perdas de vitaminas, e em seguida foram congelados a temperatura de -18°C, durante 7 dias para a análise sensorial e 15 dias para as demais análises.

Após o preparo das amostras, os grãos de ervilhas (*Pisum sativum* L.) crus e processados pelo método tradicional de congelamento e por meio de irradiação foram analisados conforme fracionamento apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Estruturas das análises realizadas no projeto

Tempo de Armazenamento	Análises realizadas nas amostras controle, irradiada e congelada
Zero/ 15 dias	<ul style="list-style-type: none"> Análises Microbiológicas (Contagem total de bolores e leveduras, contagem de aeróbios mesófilos, coliformes totais e <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i>) Análises de Composição Centesimal (umidade, cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos) Determinação de Vitaminas B₁ e B₂ Determinação de Ferro e Zinco Bioacessibilidade de Ferro e Zinco
7 dias	<ul style="list-style-type: none"> Análise Sensorial utilizando Teste de Escala Hedônica

Fonte: autor da tese.

O período de armazenamento de 15 dias foi adotado, tendo como referência os parâmetros de conservação da amostra controle. Após este período a amostra controle já apresentava sinais de deterioração, tornando-se imprópria para o consumo.

A escolha pela determinação das vitaminas B₁ e B₂ foi decorrente do estudo da revisão bibliográfica, onde relatava-se que a vitamina B₁ era a mais sensível das vitaminas

ao tratamento térmico, enquanto que a B₂ era a mais estável as condições de processamento e armazenamento (BALL, 2006; FENNEMA; PARKIN e DAMODARAN, 2010; ORDÓÑEZ, 2007; PENTEADO, 2003; TRUSWELL, 2009).

Definiu-se como parâmetros a determinação e a bioacessibilidade de Fe e Zn, uma vez que estes dois minerais foram os que apresentaram maiores concentrações na ervilha durante um prévio estudo da amostra.

O Fluxograma 1 foi repetido de acordo com as necessidades desse trabalho. As amostras foram separadas para cada tipo e tempo de análise. Toda vez que o fluxograma foi reproduzido, partiu-se de uma massa inicial homogênea representativa do lote exposto na feira livre/ sacolão OBA em torno de 3 kg para cada uma das análises, considerando as análises microbiológicas, análises de composição centesimal, determinação de vitaminas B₁ e B₂ e determinação da concentração e da bioacessibilidade de Fe e Zn. A massa inicial era posteriormente fracionada em 6 embalagens plásticas, contendo aproximadamente 500 g, sendo cada uma delas correspondente a um período e a um tratamento utilizado. Para a análise sensorial foram adquiridas um total de 9 kg de grãos de ervilhas, que posteriormente foram separados em três partes sendo processadas conforme descrito no Fluxograma 1.

3.2 Irradiação das amostras

As amostras foram irradiadas no Irradiador de pequeno porte tipo Gammacell, do Centro de Tecnologia das Radiações (IPEN-CNEN/SP) que possui como fonte o ⁶⁰Co, com monitoramento dosimétrico pelo Laboratório de Dosimetria do CTR sob a supervisão da Me. Célia Napolitano. Na Figura 11 é mostrado o modelo do irradiador utilizado. Após a irradiação, as amostras foram mantidas em câmara fria entre 4 e 7°C, durante 7 dias para a análise sensorial e 15 dias para as demais análises.

Figura 11 – Irradiador GAMMACELL do Instituto de Pesquisas Energéticas (IPEN)

Fonte: autor da tese.

3.3 Análises microbiológicas

As amostras controle, irradiada e congelada foram analisadas em duas condições de tempo: tempo zero, ou inicial, correspondente ao momento logo após o processamento; e após 15 dias de armazenamento. Todas as análises microbiológicas foram realizadas em triplicata, no Laboratório de Prestação de Serviços da Escola SENAI Horácio Augusto da Silveira.

3.3.1 Preparo das diluições

As porções de 25 g da amostra foram homogeneizadas com 225 mL de água salina peptonada (0,1%) em *stomacher*. A partir desta suspensão, foram preparadas diluições decimais seriadas com o mesmo diluente (BAM/FDA, 2003). Para *Salmonella* de acordo com a legislação que exige ausência em 25 gramas (BRASIL, 2001), foram pesadas 25 g de amostra, e transferidos para 225 mL de água peptonada tamponada 0,1% (BAM/FDA, 2003).

3.3.2 Contagem total de bolores e leveduras

Para bolores e leveduras utilizou-se o método “*SimPlate* Bolores e Leveduras Color Indicator (YM-CI)” que detectou e quantificou os bolores e leveduras nas amostras de ervilhas. O método baseia-se na Tecnologia de Detecção Binária (BDT) que equaciona a presença de bolores e leveduras com a mudança de coloração do meio. A amostra foi adicionada ao meio, dispensada na placa *SimPlate* e incubada por 48 horas. A contagem de Bolores e Leveduras foi obtida pela contagem das cavidades que apresentaram mudança de cor e da tabela de conversão *SimPlate* (ANEXO 1), (AOAC, 2002.11).

3.3.3 Contagem de aeróbios mesófilos

Para Contagem de aeróbios mesófilos foi utilizado o método “*SimPlate* Contagem Total de Bactérias Color Indicator (TPCCI)” que detectou e quantificou os microrganismos aeróbios totais nas amostras de ervilhas. O método baseia-se na Tecnologia de Detecção Binária (BDT) que equaciona a presença de microrganismos aeróbicos totais com a mudança de coloração do meio. A mistura da amostra com o meio foi adicionada na placa *SimPlate* e em seguida incubada entre 24 - 28 horas. O meio muda de cor na presença dos microrganismos aeróbicos totais. A Contagem Total de Bactérias foi obtida pela contagem das cavidades que apresentarem mudança de cor e posterior utilização da tabela de conversão *SimPlate* (ANEXO 1) (AOAC, 2002.07).

3.3.4 Coliformes totais e *E. coli*

Para contagem de Coliformes Totais e *E. coli* foi utilizado o método “*SimPlate* coliformes totais e *E. coli* Color Indicator (CEC-CI)” que detectou e quantificou os coliformes totais e *E. coli* nas amostras de ervilhas. O método baseia-se na Tecnologia de Detecção Binária (BDT) que equaciona a presença de Coliformes Totais com a mudança de coloração do meio e a contagem de *E. coli* com a mudança de cor e fluorescência

azulada devido a ação da enzima β -glucoronidase, em razão da reação enzimática entre o substrato MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide) e a enzima β -glucuronidase. A mistura da amostra com o meio foi adicionada na placa *SimPlate* e em seguida incubada por 24 - 28 horas. A contagem de coliformes totais e *E. coli* foi obtida pela contagem das cavidades que apresentarem mudança de cor e posterior utilização da tabela de conversão *SimPlate*. Cavidades coloridas indicam a presença de coliformes totais e as cavidades coloridas que apresentarem fluorescência indicam a presença de *E. coli* (AOAC, 2005.03).

3.3.5 *Salmonella*

Para *Salmonella* foi utilizado o “1-2 test” da Biocontrol. Trata-se de um método qualitativo rápido para a detecção de *Salmonella* móvel em alimentos. O método baseia-se na imobilização da *Salmonella ssp* no meio de motilidade utilizando-se de anticorpos polivalentes H (flagelar). A imobilização de espécies móveis de *Salmonella ssp* resulta na formação de uma imunobanda viável no alto da câmara de motilidade do *kit* móveis.

Após o preparo da diluição, as amostras de ervilhas foram incubadas por (24 ± 2) horas a $35-37^{\circ}\text{C}$. Em seguida, uma gota da solução de iodo/iodeto que acompanha o *kit* foi adicionada a câmara de inoculação e transferiu-se 0,1 mL da amostra de ervilha. Feita a inoculação da câmara de inoculação, a posição do *kit* foi invertida (com a tampa branca para cima). Após a remoção da tampa branca, a ponta plástica da tampa foi cortada e adicionou-se uma gota da solução de anticorpos anti-*Salmonella ssp* à câmara de motilidade. O *kit* foi então incubado à $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ por 14 a 30 horas, com a tampa branca para cima. A formação de uma zona branca (névoa) em forma de “U” na câmara de motilidade indica um resultado positivo presuntivo (AOAC, 989.13).

Na Figura 12 é mostrado o esquema do 1-2 Test (BioControl).

Figura 12 - Esquema analítico do 1-2 Test (BioControl).

Fonte: KILLNER, 2008.

3.4 Análises químicas de composição centesimal

As amostras controle, irradiada e congelada foram analisadas em duas condições de tempo: tempo zero, ou inicial, correspondente ao momento logo após o processamento; e após 15 dias de armazenamento. As análises de composição centesimal foram realizadas em triplicata, no Laboratório de Bromatologia da Escola SENAI Horácio Augusto da Silveira. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

3.4.1 Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado em estufa a 105°C, onde 5 g da amostra foi acondicionado em cápsula de porcelana previamente tarada por aproximadamente 3 horas, até atingir massa constante (AOAC, 1995).

3.4.2 Cinzas - resíduo mineral

A amostra (5 g) foi incinerada em cadinho de porcelana previamente tarado e calcinado em chapa elétrica até total carbonização e, posteriormente, foi colocada em mufla a 550°C por 5 horas para combustão completa da matéria orgânica, até atingir massa constante (AOAC, 1995).

3.4.3 Lipídios - extrato etéreo

A extração dos lipídeos foi feita em cartucho de papel filtro. Na extração foi utilizado extrator de Soxhlet acoplado a um tubo previamente tarado e éter etílico como solvente, onde o fluxo de extração foi mantido constantemente durante 3 horas. O solvente foi evaporado em estufa a 105°C durante uma hora e o tubo contendo o resíduo foi pesado até atingir massa constante, conforme AOAC (1995).

3.4.4 Proteínas

O teor de nitrogênio total foi analisado pelo método de Kjeldahl e o resultado multiplicado pelo fator 5,75 proposto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para alimentos de origem vegetal. Este fator é aplicado no cálculo de conversão de nitrogênio em proteína (BRASIL, 2003).

O método foi baseado na digestão da amostra com ácido sulfúrico (H_2SO_4) na presença de mistura catalisadora contendo sulfato de cobre ($CuSO_4$) e sulfato de potássio (K_2SO_4). O carbono e o hidrogênio foram oxidados a gás carbônico e água e o nitrogênio da proteína reduzido e transformado em sulfato de amônio. As amostras foram colocadas em tubos apropriados e foram adicionados K_2SO_4 , $CuSO_4$ e H_2SO_4 . Estes mesmos tubos foram colocados em bloco digestor a uma temperatura de 450°C por 4 horas. Destilou-se a amostra digerida após adição de hidróxido de sódio (NaOH) 40% para a liberação da amônia. A amônia foi recolhida em erlenmeyers contendo solução de ácido bórico 4% e indicador de Kjeldahl, que contém vermelho de metila e azul de metileno. Ocorreu a formação de borato de amônio que foi quantificado por titulação com ácido clorídrico 0,01M padronizado com carbonato de sódio (AOAC, 1995).

3.4.5 Carboidratos

Os carboidratos totais foram determinados por diferença: calculou-se a soma das porcentagens de umidade, proteínas, lipídeos e resíduo mineral, sendo o restante considerado carboidrato, de acordo com método descrito pela AOAC (1995).

3.5 Determinação da concentração total de Fe e Zn e da bioacessibilidade

Todas as análises de determinação da concentração total de ferro e zinco e da bioacessibilidade nas amostras de ervilhas controle, irradiada e congelada, foram realizadas em triplicata no Laboratório de Espectrometria Atômica (GEAtom) do Instituto de Química da UNICAMP.

No fluxograma 2 é mostrado um esquema das etapas realizadas para determinação da concentração total de ferro e zinco e da bioacessibilidade nas amostras de ervilha.

Fluxograma 2 – Esquema utilizado para determinação da concentração total de Fe e Zn e da bioacessibilidade em amostras de ervilhas.

Fonte: autor da tese.

3.5.1 Digestão *in vitro*

A digestão no trato gastrointestinal humano é simulada de forma simplificada com base nas condições fisiológicas; por exemplo aproximações da composição química dos fluidos digestivos, o pH e o tempo de residência típico para cada passo no processo de digestão. Este modelo proposto pela ação COST INFOGEST, que é uma rede unida por mais de 200 cientistas (MINEKUS et al., 2014), foi adaptado para ser usado neste estudo.

Este procedimento foi basicamente dividido em três etapas: (1) preparação de soluções de estoque; (2) preparação de fluidos de digestão simulados; (3) simulação da digestão gastrointestinal.

O primeiro passo consistiu em preparar as soluções estoque que foram usadas para fazer as substâncias ativas (saliva, suco gástrico e intestinal). Na Tabela 5 são apresentados os constituintes e as concentrações na solução estoque, bem como as massas e volumes usados para preparar uma certa quantidade de solução.

Tabela 5 - Preparação da solução estoque utilizada para simulação da digestão

Constituinte	Concentração (g L ⁻¹)	Volume (mL)	Massa (g)/ Volume (mL)
KCl	37,3	100	3,73
KH ₂ PO ₄	34,0	50	1,7
NaHCO ₃	84,0	100	8,4
NaCl	117,0	100	11
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	15,25	50	0,7625
(NH ₄) ₂ CO ₃	12,0	50	0,6
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	14,7 (100 mmol L ⁻¹ CaCl ₂)	50	0,735
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	7,5 mmol L ⁻¹	100	7,5 mL (100 mmol L ⁻¹)
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	2 mmol L ⁻¹	50	1 mL (100 mmol L ⁻¹)
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	9 mmol L ⁻¹	50	4,5 mL (100 mmol L ⁻¹)
NaOH	40 (1 mol L ⁻¹)	50	2
HCl	6 mol L ⁻¹	50	25 mL (12 mol L ⁻¹)
HCl	1 mol L ⁻¹	50	8 mL (1 mol L ⁻¹)

Fonte: DO NASCIMENTO DA SILVA, 2016.

Antes de preparar os fluidos de digestão foi necessário o conhecimento das quantidades de cada enzima que podem estar presentes no *bolus* oral e o volume do *bolus*. As quantidades recomendadas por MINEKUS et al. (2014) são mostradas no Quadro 1, assim como as quantidades de enzima que devem ser usadas por grama de amostra e sua

concentração nos fluidos de digestão simulada (FDS), levando em consideração as atividades enzimáticas nos reagentes disponíveis.

Quadro 1 - Concentração das enzimas e da bile utilizados nos fluidos de digestão simulada (FDS)

Enzima	U/mL de bolus	Volume de bolus	U*/g de amostra (úmida)	U/mg de enzima	mg/g de amostra (úmida)	U/mL de FDS
Amilase	15 ^a	10-15	150	1,5	20,0	37,5 ^a
Pepsina	2000	20	8000	250	32,0	4395,6
Pancreatina	100	40	800	156 ^b	4,5	216,2
Bile	12,5 mg/mL		-	-	100	27,0 mg/mL,0

Amilase: α -amilase do *Aspergillus oryzae* (Sigma-86250); Pepsina (Sigma-P7000); Pancreatina (Sigma-P1625); Bile (Sigma-B8631).

* De acordo com a Comissão Internacional para a nomenclatura bioquímica, corresponde a quantidade de enzima necessária para catalisar a transformação de um micromol de substrato por minuto.

^a Digestão salivar de 10 min.

^b Protease: 75 U/mg.

Fonte: MINEKUS et al., 2014.

O segundo passo foi à preparação dos fluidos de digestão simulada. No Quadro 2 são mostrados os volumes de solução estoque e a quantidade de enzima utilizada para preparar estas soluções.

Quadro 2 – Preparação dos fluidos de digestão simulada (volumes e massas necessárias)

Saliva (mL do constituinte para 250 mL)		Suco Gástrico (mL do constituinte para 250 mL)		Suco intestinal (mL do constituinte para 500 mL)	
KCl	7,5 mL	KCl	3,5 mL	KCl	6,8 mL
KH ₂ PO ₄	3,75 mL	KH ₂ PO ₄	0,9 mL (900 μ L)	KH ₂ PO ₄	1,6 mL
NaHCO ₃	3,38 mL	NaHCO ₃	6,3 mL	NaHCO ₃	42,5 mL
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,5 mL (500 μ L)	NaCl	5,9 mL	NaCl	9,6 mL
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,125 mL (125 μ L)	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,4 mL (40 μ L)	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	2,2 mL
HCl 6 M	0,05 mL (50 μ L)	(NH ₄) ₂ CO ₃	1 mL	HCl 6M	0,7 mL (700 μ L)
Amilase	6,2 g	HCl 6 M	0,65 mL (650 μ L)	Bile	13,5 g
		Pepsina	4,4 g	Pancreatina	1,3 g

Fonte: MINEKUS et al., 2014.

Na terceira etapa foi realizada a digestão gastrointestinal. Foram pesadas aproximadamente 5 g de amostra úmida (equivalente a 0,25 g de amostra seca). A digestão gastrointestinal foi conduzida conforme apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições utilizadas para simulação da digestão gastrointestinal das amostras de ervilhas controle, irradiada (1 kGy) e congeladas.

Massa de amostra úmida (g)	Etapas	Solução	Volume (mL)	pH	Tempo
5	1	Saliva + CaCl ₂ 7,5 mM + NaOH 1 M*	4,0 + 1,0	7	10 min
	2	Suco Gástrico + CaCl ₂ 2 mM + HCl 1M*	9,1 + 0,7	3	2 h
	3	Suco intestinal + CaCl ₂ 9 mM + NaOH 1 M*	18,5 + 1,3	7	2 h

* Se necessário ajustar para o pH adequado.

Fonte: DO NASCIMENTO DA SILVA, 2016.

Após realizadas as etapas da simulação gastrointestinal, as amostras foram centrifugadas, durante 20 minutos em 10600 g (centrifuga CT-6000/ CIENTEC). Em seguida, filtradas em membrana de 0,45 µm.

3.5.2 Mineralização das amostras

Para a determinação da concentração total de Fe e Zn e da fração bioacessível, foi conduzida a mineralização em forno de micro-ondas para tratamento das amostras antes de serem submetidas às análises por ICP OES (modelo Ethos 1600, Milestone, Sorisole, Itália).

Para a determinação do teor total, foram pesados, em frascos de Teflon®, ≈ 1 g das amostras úmidas e, posteriormente, foram adicionados 5 mL de HNO₃ (concentrado), 3 mL de H₂O₂ 30% v/v e 1 mL de água deionizada. Esta mistura foi submetida a um programa de aquecimento em forno de micro-ondas e, após a mineralização, o conteúdo foi completado com água deionizada até 20 mL.

Para a determinação da fração bioacessível, 10 mL do sobrenadante obtido nos ensaios da digestão gastrointestinal (quimo) foram adicionados no frasco de mineralização, juntamente com 5 mL de HNO₃ (concentrado) e 3 mL de H₂O₂ 30%, e no final da mineralização o conteúdo também foi levado a 20 mL com água deionizada.

Todos os ensaios de mineralização foram feitos, em triplicata, sendo as amostras submetidas ao programa de aquecimento do forno de micro-ondas conforme mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Programa utilizado no forno de micro-ondas para digestão de amostras de ervilhas e materiais de referência certificados

Etapa	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1 (rampa)	6	80
2 (patamar)	4	80
3 (rampa)	8	120
4 (patamar)	5	120
5 (rampa)	10	180
6 (patamar)	20	180

Fonte: DO NASCIMENTO DA SILVA, 2016.

3.5.3 Determinação das concentrações de Fe e Zn por ICP OES

O instrumento usado para as análises foi um ICP OES (modelo OptimaTM 8300, Perkin-Elmer). Os parâmetros empregados foram: potência de rádio frequência de 1400 W, vazão do argônio do plasma de 15 L min⁻¹, vazão de argônio auxiliar de 0,7 L min⁻¹ e vazão do gás de nebulização de 0,7 L min⁻¹. O nebulizador utilizado foi o concêntrico e a câmara de nebulização utilizada foi a ciclônica. Para as determinações da concentração total e da bioacessibilidade foi utilizado um comprimento de onda de 239,565 nm (a) para Fe e de 213,857 nm (a) para Zn. A letra (a) corresponde ao eixo axial da visão da tocha para as medidas no instrumento.

As condições instrumentais utilizadas para a determinação da concentração de Fe e Zn nas amostras mineralizadas foram avaliadas por meio de testes de adição e recuperação nas concentrações de 0,3 e 0,6 mg L⁻¹ para ambos os elementos.

A determinação da concentração total de Fe e Zn e da bioacessibilidade foram obtidas por meio do uso das curvas padrão mostrados nos Gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 – Curva padrão para determinação da concentração total e da bioacessibilidade de Fe nas amostras de ervilhas.

Fonte: autor da tese.

Gráfico 2 – Curva padrão para determinação da concentração total e da bioacessibilidade de Zn nas amostras de ervilhas.

Fonte: autor da tese.

3.6 Vitaminas B₁ e B₂

As amostras controle, irradiada e congelada foram analisadas em duas condições: tempo zero, ou inicial, correspondente ao momento logo após o processamento; e após 15 dias de armazenamento.

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP).

As análises foram realizadas em quadruplicada e os resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

3.6.1 Extração simultânea das vitaminas B₁ e B₂

A extração das vitaminas foi realizada conforme descrito por MORESCHI (2006) e PRESOTO e ALMEIDA-MURADIAN (2008) em meio ácido utilizando tratamento térmico em banho-maria, com tempo e temperatura definidos, seguida de tratamento enzimático, conforme os seguintes passos:

- Liofilização da amostra durante 72 horas;
- Pesagem em torno de 5 g de amostra em erlenmeyer âmbar;
- Adição de 50 mL de ácido clorídrico 0,1 M;
- Extração em banho-maria sob fervura (98°C) por 30 minutos, com agitação ocasional;
- Resfriamento a temperatura ambiente;
- Correção do pH para 4,6 com acetato de sódio 2,5 M;
- Adição de enzima diastase e reação em banho de 42°C por duas horas;
- Resfriamento a temperatura ambiente;
- Transferência para balão volumétrico de 100 mL com adição de água deionizada;
- Filtragem sobre papel de filtro;
- Filtragem sobre membrana de 0,45 μ m e injeção em cromatógrafo.

3.6.2 Determinação da vitamina B₁ (tiamina), com reação pré-coluna

O método de análise cromatográfico foi baseado no procedimento descrito por OLLILAINEN et. al. (2001) e por PRESOTO e ALMEIDA-MURADIAN (2008). As modificações no método quanto à reação de conversão da tiamina em tiocromo realizada pelo modo pós-coluna para o modo pré-coluna foram na composição da fase móvel e nos valores de comprimentos de onda.

As condições cromatográficas foram:

- Fase móvel: tampão fosfato pH 7,2 e dimetilformamida;
- Fluxo: 1 mL/min;

- Volume de injeção: 100 μ m;
- Coluna Lichrocart Merck C18 de fase reversa RP-18 esférica 5 μ m / 250x4.6 mm com pré-coluna Lichrocart Merck 5 μ m / 5x4.6mm;
- Detecção por fluorescência: ex 368 nm; em 440 nm.

3.6.2.1 Preparo da fase móvel para determinação da vitamina B₁ por detecção com reação de pré-coluna

Em um béquer de 1000 mL, foram pesados 2,28 g de hidrogenofosfato de dipotássio trihidratado (ou 1,74 g de hidrogenofosfato de di-potássio anidro) e dissolvidos em aproximadamente 800 mL de água ultrapura. O pH foi ajustado para 7,2 com solução de ácido clorídrico 1 M utilizando-se um pHmetro. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi completado com água ultrapura. A solução foi filtrada em membrana de ésteres de celulose de 0,45 μ m, antes da mistura dimetilformamida na proporção de 85% de tampão fosfato pH 7,2 e 15% de dimetilformamida.

3.6.2.2 Conversão da tiamina em tiocromo por meio de reação pré-coluna

Para a reação de conversão da tiamina em tiocromo, foram adicionados aproximadamente, 2 mL de água deionizada e 3 mL da solução de ferricianeto de potássio em meio básico a cada 1 mL de solução padrão diluída ou do extrato das amostras, em balões volumétricos âmbar de 10 mL. O volume total foi agitado em agitador de tubos e colocado em repouso por 2 min para que ocorresse a reação. Após esse tempo, foram adicionados 450 μ L de ácido ortofosfórico 85%. A solução foi então resfriada e o volume final foi completado com água deionizada. Estas soluções foram injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) imediatamente após o preparo.

A concentração de vitamina B₁ nas amostras de ervilhas foi determinada por meio do uso da curva padrão mostrada no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Curva padrão para determinação da concentração da vitamina B₁ em amostras de ervilhas

Fonte: autor da tese.

3.6.3 Determinação da vitamina B₂ (riboflavina)

O método de análise foi baseado no procedimento descrito por AUGUSTIN (1984) e PRESOTO e ALMEIDA-MURADIAN (2008), com modificação na composição da fase móvel.

3.6.3.1 Condições cromatográficas para a análise da vitamina B₂

As condições da fase móvel foram:

- Fase móvel: tampão fosfato pH 7,2 e dimetilformamida;
- Fluxo: 1 mL/min;
- Volume de injeção: 20 µm;
- Coluna Lichrocart Merck C18 de fase reversa RP-18 esférica 5 µm / 250x4.6 mm com pré-coluna Lichrocart Merck 5 µm / 5x4.6 mm
- Detecção por fluorescência: ex 450 nm; em 530 nm.

3.6.3.2 Preparo da fase móvel para determinação da vitamina B₂

A mesma fase da determinação da vitamina B₁ por detecção com reação pré-coluna foi utilizada para a determinação da vitamina B₂. Porém, tais vitaminas foram

analisadas em corridas cromatográficas separadas devido à ocorrência de degradação da vitamina B₂ durante a reação pré-coluna que converte a vitamina B₁ em composto fluorescente. O preparo da fase móvel está descrito no item 3.10.2.1. No momento do uso, a fase móvel foi desgaseificada sob vácuo em ultrassom por aproximadamente 20 minutos, antes da utilização no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE).

A curva padrão utilizada para determinação da concentração da vitamina B₂ nas amostras de ervilhas é mostrada no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Curva padrão para determinação da concentração da vitamina B₁ em amostras de ervilhas

Fonte: autor da tese.

3.7 Análise sensorial

A análise sensorial foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética, conforme apresentado no ANEXO 2 e realizada em conjunto com 50 alunos e ou funcionários da Escola SENAI “Horácio Augusto da Silveira”. Todos os participantes foram orientados em relação a análise sensorial, por meio do documento denominado “Termo de consentimento de livre esclarecido (TCLE)”. Um modelo deste documento é apresentado no ANEXO 3. Somente após assinarem o TCLE é que os participantes estavam aptos a realizarem a análise sensorial.

O objetivo da análise sensorial, foi verificar o grau de aceitação de amostras de ervilhas controle, ervilhas congelada e de ervilhas irradiada, utilizando-se provadores não treinados.

As amostras foram cozidas em água fervente a 100°C durante sete minutos, conforme condição adotada por CARVALHO (2007).

Cada provador, recebeu uma porção de aproximadamente 30g, de cada uma das três amostras de ervilhas (controle, congelada e irradiada), a ordem oferecida das amostras seguiu combinações diferentes entre os provadores.

Os parâmetros analisados foram a cor, o sabor, a textura e o aspecto global. O tipo de teste realizado foi o Teste de Escala Hedônica em que o provador expressa o grau de gostar ou desgostar das amostras numa escala de 9 pontos, que vai de “gostei muitíssimo” a “desgostei muitíssimo”, conforme mostrado no ANEXO 4.

Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância. (SHIROSE e MORI, 1994).

O propósito deste teste é medir efeitos específicos pelo grau de aceitação, partindo-se do princípio de que as amostras tratadas e não-tratadas são sensorialmente distintas (DUTCOSKY, 2007).

3.8 Análise estatística dos resultados de composição centesimal, determinação de vitaminas B₁ e B₂, determinação e bioacessibilidade de Fe e Zn

Os resultados para composição centesimal, determinação de vitamina B₁ e B₂, quantificação de ferro, zinco e bioacessibilidade de Fe e Zn foram avaliados estatisticamente considerando as amostras de ervilhas controle, amostras congeladas e amostras irradiadas, por meio de média, desvio padrão e coeficiente de variação. Em seguida, adotando-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$), foram comparados por Análise de Variância (ANOVA), e quando encontrada diferença significativa entre os fatores, foram tratados com o teste de Tukey (FARIA e YOTSUYANAGI, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas para as amostras: controle, irradiada (1kGy) e congelada de ervilhas, no tempo zero e após quinze dias, apresentaram os resultados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados obtidos nas análises microbiológicas de ervilhas para amostras controle, irradiada e congelada nos tempos iniciais e após 15 dias de armazenamento

Tempo	Amostra	Bolores e leveduras (UFC*/g)	Contagem de aeróbios mesófilos (UFC*/g)	Coliforme 45°C (UFC*/g)	<i>E. coli</i> (UFC*/g)	<i>Salmonella sp</i> /25g
Zero	Ervilha - Controle	$>7,4 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	Ausente
	Ervilha - Congelada	<10	$8,0 \times 10^1$	<10	<10	Ausente
	Ervilha - Irradiada	<10	<10	<10	<10	Ausente
15 dias	Ervilha – Controle	$2,2 \times 10^4$	$>7,4 \times 10^4$	$>7,4 \times 10^4$	$>7,4 \times 10^4$	Ausente
	Ervilha – Congelada	<10	<10	<10	<10	Ausente
	Ervilha - Irradiada	<10	<10	$2,0 \times 10^1$	<10	Ausente

*UFC significa unidades formadoras de colônia.

Fonte: autor da tese.

As amostras controle, no tempo inicial, apresentaram maiores contagens de microrganismos para bolores e leveduras, aeróbios mesófilos, coliforme a 45°C e *E. coli*, quando comparadas aos tratamentos por irradiação a 1 kGy e congelamento. Após 15 dias de armazenamento das amostras controle, houve um crescimento de um ciclo logarítmico na contagem de bolores e leveduras e de dois ciclos logarítmicos para as demais análises realizadas.

No que diz respeito a contagem de bolores e leveduras, considerando o tempo inicial de armazenamento, observou-se que o uso da dose de 1 kGy e o tratamento de conservação pelo congelamento apresentaram uma redução de 3 ciclos logarítmicos em relação a amostra controle. Decorridos 15 dias de armazenamento, verificou-se, em relação

a contagem inicial, um aumento de 1 ciclo logarítmico para a amostra controle, enquanto que para as amostras irradiadas (1 kGy) e congeladas a contagem manteve-se constante, indicando a efetividade dos tratamentos realizados.

As baixas contagens de bolores e leveduras são normais em alimentos frescos e congelados, não sendo, portanto, significativas (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Para contagem de aeróbios mesófilos, no tempo inicial, em relação a amostra controle, o uso da dose de 1 kGy garantiu uma redução de dois ciclos logarítmicos, já a para a amostra congelada a redução foi de um ciclo. Após 15 dias de armazenamento, houve, na amostra controle, aumento na contagem de mesófilos. Enquanto que as amostras irradiada e congelada mantiveram a contagem.

A contagem de bactérias mesófilas foi empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos, um número elevado de microrganismo indicou que o alimento é insalubre, mesmo que os patógenos estejam ausentes e que não tenham ocorrido alterações nas condições organolépticas (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

De acordo com a RDC nº12 (ANVISA, 2001) para hortaliças, legumes e similares que se enquadrem nas condições de: frescos, “in natura”, preparados (descascados ou selecionados ou fracionados), sanificados, refrigerados ou congelados ou branqueadas e refrigeradas, a exigência é de ausência em 25 g de *Salmonella* e tolerância de 10^2 UFC/g para coliformes a 45°C/g. Em relação a análise de *Salmonella* todas as amostras apresentaram-se dentro dos parâmetros exigidos pela legislação.

No que diz respeito a análise de coliformes a 45°C/g verificou-se que, as amostras controle, no tempo inicial, estavam próximas ao limite de tolerância estabelecido pela legislação (ANVISA, 2001). Após 15 dias de armazenamento houve uma taxa de crescimento da ordem de 10^2 nas amostras controle tornando-as impróprias para o consumo.

Considerando ainda a análise de coliformes a 45°C/g observou-se que os tratamentos por irradiação e congelamento permitiram uma redução na contagem inicial de microrganismos na ordem de 10^2 em relação a amostra controle. Transcorridos 15 dias de armazenamento, identificou-se um crescimento na ordem de 10^1 para as amostras irradiadas enquanto que para as amostras congeladas a contagem manteve-se constante. Estes resultados demonstraram que os tratamentos por irradiação e congelamento realizados foram suficientes para garantir os padrões microbiológicos em ervilhas, conforme estabelecido pela legislação (ANVISA, 2001).

Em um estudo feito com amostras irradiadas de salada de frutas minimamente processadas verificou-se resultados semelhantes. O uso do processo de irradiação com uma dose de 1 kGy garantiu uma redução de três ciclos logarítmicos para contagem total de aeróbios mesófilos. A mesma dose, permitiu também a redução de um ciclo logarítmico na contagem de bolores e leveduras. A irradiação com uma dose de 1,5 kGy garantiu uma contagem de microrganismos inferior a 10 UFC/g para coliformes a 45°C/g e para *E. coli* (FABBRI, 2014).

Um estudo sobre a eficácia do processo de irradiação em brotos prontos para o consumo, utilizando doses de 1 kGy e 2 kGy resultou em uma redução na contagem de placas aeróbicas e contagem de coliformes em 2 e 4 ciclos logarítmicos respectivamente. Já a contagem de bolores e leveduras diminuiu em 1 ciclo logarítmico. Após 12 dias de armazenamento em temperatura variando de 4 a 8°C verificou-se que todas as contagens permaneceram constantes (SAROJ et al., 2006), demonstrando similaridade aos resultados encontrados nesse estudo.

O congelamento e o armazenamento a -18°C não destroem totalmente os microrganismos, embora estes sofram algum dano decorrentes do choque térmico, do crescimento de cristais de gelo intracelulares e do aumento de concentração dos solutos na fração não congelada. Os alimentos congelados não são um bom substrato para o crescimento microbiano. A maioria das bactérias não se prolifera em temperaturas inferiores a -8°C, as leveduras, em -10°C e os mofo, em -12°C (ORDÓÑEZ, 2007). Os resultados obtidos nas análises microbiológicas com as amostras de ervilhas congeladas mostraram uma redução significativa na carga microbiana, em relação as amostras controle. Observou-se uma manutenção dessa contagem inicial após 15 dias de armazenamento, garantindo dessa forma o atendimento aos parâmetros estabelecidos pela RDC nº 12 e ainda valores que assegurem a qualidade e segurança das amostras.

4.2 Análise da Composição Centesimal

Os resultados das análises de composição centesimal para as amostras: controle, irradiada (1kGy) e congelada de ervilhas, no tempo zero e após quinze dias de armazenamento, são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Composição centesimal para amostras de ervilhas controle, irradiada e congelada, no tempo zero e após quinze dias de armazenamento

		Tempo Zero			Tempo 15 dias		
		Controle	Irradiada	Congelada	Controle	Irradiada	Congelada
Matéria úmida %	Umidade	73,7± 0,2 ^a	73,3± 0,7 ^{a,c,d}	73,5± 0,6 ^{a,c}	72,5± 0,1 ^{b,c}	72,4± 0,3 ^{b,d}	72,9± 0,2 ^{b,d}
	Cinzas	1,02± 0,07 ^a	1,01± 0,03 ^a	0,8± 0,1 ^c	1,16± 0,02 ^{a,b}	1,22± 0,02 ^b	1,06± 0,01 ^a
	Lipídeos	0,403± 0,001 ^{a,b}	0,42± 0,05 ^{a,b}	0,370± 0,003 ^a	0,50± 0,02 ^c	0,433± 0,002 ^b	0,64± 0,01 ^d
	Proteínas	8,2± 0,6 ^a	4,7± 0,5 ^c	7,3± 0,4 ^{a,b}	9,5± 0,5 ^d	6,5± 0,3 ^b	7,4± 0,3 ^{a,b}
	Carboidratos	16,7± 0,4 ^a	20,6± 0,7 ^b	17,9± 0,9 ^{a,d}	16,3± 0,5 ^a	19,4± 0,5 ^{b,d}	18,0± 0,1 ^{a,d}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3); letras iguais na mesma linha não indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) pelos testes ANOVA e Tukey.

Fonte: autor da tese.

No tempo inicial, as amostras: controle, irradiada (1 kGy) e congelada apresentaram teores de umidade superiores em relação as suas respectivas amostras após 15 dias de armazenamento. Verificou-se que não existe diferença significativa entre as amostras: controle, irradiada (1kGy) e congelada no tempo inicial, apresentando um teor médio de umidade de 73,5%. Após 15 dias de armazenamento, o teor médio para as amostras: controle, irradiada (1kGy) e congelada foi de 72,6%, representando uma queda de 1,21% no teor de umidade, em relação ao tempo inicial.

Os teores de cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos para as amostras: controle, irradiada (1kGy) e congelada, apresentaram-se maiores, após 15 dias de armazenamento, comparando as respectivas amostras no tempo inicial. Esse aumento deve-se a perda de umidade ocorrida nas amostras durante o período de armazenamento.

Os valores apresentados para as amostras: controle, irradiada (1kGy) e congelada nos tempos iniciais e após 15 dias de armazenamento encontram-se na mesma ordem de grandeza aos apresentados na literatura. De acordo com FRANCO (2008), a composição centesimal da ervilha é de 16,0% de carboidratos, 0,5% de lipídios e 7,0% de proteínas. Já a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2011) caracteriza a ervilha em vagem com teores de: 76,6% de umidade, 7,5% de proteínas, 0,5% de lipídios, 14,2% de carboidratos, 1,0% de cinzas. Já a ervilha enlatada drenada, apresenta teores de umidade de 80,1%, proteínas 4,6%, lipídios 0,4%, carboidratos 13,4% e de cinzas de 1,4%.

Verificou-se que as amostras irradiadas (1 kGy), no tempo inicial e após 15 dias de armazenamento apresentaram teores menores de proteínas quando comparadas as amostras controle e congelada no mesmo período de referência. As amostras irradiadas (1

kGy) apresentaram, em relação as amostras controle, diminuição no teor proteico de 43% e de 32% nos tempos: inicial e após 15 dias de armazenamento, respectivamente. As amostras congeladas apresentaram, em relação às amostras controle, menores perdas no teor de proteínas, ocorrendo no tempo inicial uma redução de 11% e após 15 dias de armazenamento uma redução de 22%.

4.3 Análises para determinação da concentração total de Fe e Zn e Bioacessibilidade

As análises para determinação da concentração total de Fe e Zn e da bioacessibilidade para as amostras de ervilhas controle, irradiada e congelada, no tempo zero e após quinze dias, para Fe e Zn, apresentaram os resultados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente. Ademais, as condições utilizadas para as análises mostraram-se adequadas, pois a recuperação para Fe ficou entre 91 e 105% e para Zn entre 97 e 102%, sendo o desvio padrão relativo menor que 10%.

Tabela 10 - Concentração total de Fe (mg/kg de massa úmida) e bioacessibilidade (% da concentração total) em amostras de ervilhas controle, irradiada e congelada

	Amostra	Fe (mg/kg massa úmida)	Bioacessibilidade Fe (% da concentração total)
Tempo Zero	Controle	24±3 ^{a,b,c}	12±2 ^d
	Irradiada	25±3 ^{a,b,c}	7±2 ^d
	Congelada	23±2 ^{a,b,c}	28±8 ^e
Tempo 15 dias	Controle	31±5 ^b	7±2 ^d
	Irradiada	26±1 ^{a,b,c}	12±1 ^d
	Congelada	22±2 ^c	30±5 ^e

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3); letras iguais não indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) pelos testes ANOVA e Tukey.

Fonte: autor da tese.

Tabela 11 - Concentração total de Zn (mg/kg de massa úmida) e bioacessibilidade (% da concentração total) em amostras de ervilhas controle, irradiada e congelada

	Amostra	Zn (mg/kg massa úmida)	Bioacessibilidade Zn (% da concentração total)
Tempo Zero	Controle	11,3±0,4 ^a	78±3 ^b
	Irradiada	11,4±0,4 ^a	73±1 ^b
	Congelada	11,1±0,6 ^a	68±5 ^b
Tempo 15 dias	Controle	12,2±0,2 ^a	68±1 ^b
	Irradiada	11,9±0,5 ^a	70±5 ^b
	Congelada	10,9±0,7 ^a	71±7 ^b

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3); letras iguais não indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) pelos testes ANOVA e Tukey.

Fonte: autor da tese.

Considerando o tempo inicial para as análises de amostras de ervilhas controle, irradiada e congelada, verificou-se que as concentrações totais de Fe são estatisticamente iguais, de acordo com os testes ANOVA e Tukey, apresentando um teor médio de 24 mg/kg de massa úmida. Após 15 dias de armazenamento, o teor total de ferro apresentou um aumento de 29% para a amostra controle, enquanto que para as amostras irradiada e congelada houve um aumento de 4% e uma redução de 4%, respectivamente, em relação a concentração de Fe no tempo zero. As amostras irradiada e congelada são consideradas estatisticamente iguais, tanto na condição de tempo inicial, quanto após 15 dias de armazenamento.

Para Zn, a concentração total não apresentou diferença estatística nem entre os tratamentos e nem entre os tempos de armazenamento, sendo o teor médio de 11,5 mg/ kg de massa úmida.

De acordo com a TACO (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2011), as concentrações de Fe e Zn em 1 kg, de matéria úmida, de ervilha em vagem são de 14 mg e 9 mg, contra 13 mg e 7 mg para ervilha enlatada e drenada. Em outra literatura, para grãos de ervilha crus, os valores são de 17 mg de Fe e 1,6 mg de Zn para 1 kg de matéria úmida (FRANCO, 2008). Diferenças entre os valores podem ser decorrentes das diferentes condições de cultivo.

Verificou-se que para as amostras controle e irradiada, a bioacessibilidade do Fe foi inferior à das amostras congeladas, tanto no tempo zero quanto após 15 dias de armazenamento. No tempo inicial esses valores foram menores em 30% para a amostra controle e em 75% para a amostra irradiada. Após 15 dias de armazenamento, os valores

foram menores em 77% para a amostra controle e de 60% para a amostra irradiada, tudo isso em relação às amostras congeladas. É importante ressaltar que as amostras congeladas sofreram o processo de branqueamento, o qual consistiu na imersão do alimento em água fervente, ocorrendo o cozimento por um curto período, e em seguida esfriou-se imediatamente em água gelada. Esse processo alterou alguns componentes do alimento, pois é realizado visando a inativação de enzimas que podem deteriorar os alimentos (JAE-YEUN; GIL-HWAN e CHUL-JAI 2003). Por isso, provavelmente, algum componente ligado ao Fe é também alterado, mudando a especiação do elemento e, assim, a sua solubilidade durante a digestão gastrointestinal.

A bioacessibilidade de Zn considerando o tempo inicial e após 15 dias de armazenamento apresentou um valor médio de 71%. De acordo com as análises estatísticas, não houve diferença significativa entre as amostras. Além disso, verificou-se que para Zn a bioacessibilidade apresentou um valor superior à do Fe, o qual apresentou valores menores do que 30%. Apesar do alto conteúdo mineral das ervilhas, a bioacessibilidade de Fe pode ser pobre devido às altas concentrações de fitatos. SANDBERG (2002) relatou que o fitato atua como um inibidor da solubilidade e absorção de Zn, Fe e Ca. Um estudo realizado por TRINIDAD et al. (2010) em legumes indicou que o conteúdo de fitato afetou a disponibilidade de Fe, mas não influenciou a disponibilidade de Zn e Ca. De fato, esses autores concluíram que quando a disponibilidade de Fe era baixa, a disponibilidade de Ca e Zn era mais alta.

Um estudo realizado em alface foi observado que houve variação entre a bioacessibilidade de elementos metálicos conforme o tipo de alface, ou seja, dependendo do conteúdo de fitatos na matriz da amostra, sendo a bioacessibilidade de Fe menor que para Zn quanto maior o conteúdo de fatores antinutricionais (DO NASCIMENTO DA SILVA, 2016). Em feijão, observou-se altas concentrações dos minerais Fe, Zn, Cu, K, Mg, Mn e P e em relação a bioacessibilidade, o Zn também apresentou valor superior ao encontrado para o Fe (PAREDES, 2017). O presente estudo teve como resultados, um valor de bioacessibilidade de 71% para o Zn enquanto que para o Fe, a bioacessibilidade variou entre 7 e 30%.

4.1 Análises de vitaminas

4.4.1 Vitamina B₁ (tiamina)

A partir da construção da curva de calibração para determinação da vitamina B₁, calculou-se os parâmetros de R², limite de detecção e limite de quantificação. Os resultados obtidos foram 0,9981 para R², 0,01 para o limite de detecção e 0,03 para o limite de quantificação. esses parâmetros se mostraram adequados para determinação de vitamina B₁ em amostras de ervilhas.

A partir das condições cromatográficas e das massas iniciais de amostras de ervilhas controle, irradiada (1kGy) e congelada foi elaborada a Tabela 12 que apresenta as concentrações da vitamina B₁ nas amostras, no tempo inicial e após quinze dias.

Tabela 12 - Teores de vitamina B₁ (tiamina) em amostras de ervilhas controle, irradiada (1 kGy) e congelada nos tempos inicial e após quinze dias de armazenamento, expressos em mg/100 g de amostra seca

	Tempo Zero	Tempo 15 Dias
Controle (mg/100 g de amostra seca)	0,62± 0,11 ^{a,c}	0,86± 0,06 ^{b,e}
Irradiada (mg/100 g de amostra seca)	0,68± 0,08 ^{a,c,e}	0,84± 0,08 ^{b,d}
Congelada (mg/100 g de amostra seca)	0,64± 0,09 ^{a,c,d}	0,73± 0,11 ^{b,c}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=4); letras iguais não indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) pelos testes ANOVA e Tukey.

Fonte: autor da tese.

Os tratamentos por irradiação (1 kGy) e congelamento apresentaram teores de vitamina B₁ maiores do que o da amostra controle considerando o tempo inicial. Para a amostra irradiada o teor foi 10% superior, enquanto que para a amostra congelada o aumento foi de 4 %.

Após 15 dias de armazenamento verificou-se um aumento nos teores de vitamina B₁ para todas as amostras analisadas. Na amostra controle o aumento foi de 39%, enquanto que para as amostras irradiada (1 kGy) e congelada o aumento foi de 22% e 13% respectivamente.

4.4.2 Vitamina B₂ (riboflavina)

A partir da construção da curva de calibração para determinação da vitamina B₂, calculou-se os parâmetros de R², limite de detecção e limite de quantificação. Os resultados obtidos foram de 0,9981 para R², 0,01 para o limite de detecção e 0,03 para o limite de quantificação, esses parâmetros se mostraram adequados para determinação de vitamina B₂ em amostras de ervilhas.

A partir das condições cromatográficas e das massas iniciais de amostras de ervilhas controle, irradiada (1 kGy) e congelada foi elaborada a Tabela 13 que apresenta as concentrações em miligramas de vitamina B₂ em cem gramas de amostra de ervilha seca, nos tempos inicial e após quinze dias.

Tabela 13 - Teores de vitamina B₂ (riboflavina) em amostras de ervilhas controle, irradiada (1 kGy) e congelada nos tempos inicial e após quinze dias de armazenamento, expressos em mg/100 g de amostra seca

	Tempo Zero	Tempo 15 Dias
Controle (mg/100 g de amostra seca)	0,18± 0,01 ^a	0,19± 0,01 ^{a,c}
Irradiada (mg/100 g de amostra seca)	0,19± 0,01 ^{a,b}	0,20± 0,01 ^{a,c}
Congelada (mg/100 g de amostra seca)	0,23± 0,02 ^{b,c}	0,16± 0,03 ^a

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=4); letras iguais não indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) pelos testes ANOVA e Tukey.

Fonte: autor da tese.

A partir dos dados obtidos, verificou-se que após quinze dias de armazenamento, as amostras controle e irradiada (1 kGy) apresentaram um aumento em torno de 5% na concentração de vitamina B₂. Considerando que o aumento foi baixo pode-se constatar que a concentração da vitamina B₂ manteve-se estável durante o armazenamento para as amostras controle e irradiada (1 kGy). Já na amostra congelada, as perdas foram em torno de 30%.

4.5 Análise sensorial

A partir de análise visual, antes da análise sensorial, verificou-se que: as amostras congeladas apresentavam uma tonalidade de verde mais intensa; as amostras irradiadas apresentaram maior absorção de água pós cozimento e as amostras controle apresentaram maior quantidade de brotamento nos grãos.

O teste de análise sensorial foi realizado após sete dias de armazenamento das amostras de ervilhas controle, irradiada (1kGy) e congelada, com cinquenta provadores,

sendo 79% dos participantes do sexo feminino e 21% do sexo masculino conforme mostrado no Gráfico 5.

Gráfico 5 – Análise sensorial das amostras de grãos de ervilhas - Divisão dos participantes por sexo.

Fonte: autor da tese.

A faixa etária dos 50 provadores que participaram da análise sensorial é mostrado no Gráfico 6.

Gráfico 6 – Análise Sensorial das amostras de grãos de ervilhas - Divisão dos participantes por faixa etária.

Fonte: autor da tese.

Os resultados da análise sensorial para os atributos de cor, textura, sabor e aspecto global são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Valores de média e desvio padrão obtidos durante a análise sensorial, utilizando teste de escala hedônica com 9 pontos, para as amostras de ervilhas controle, irradiada (1kGy) e congelada, após sete de armazenamento.

Amostra	Cor	Textura	Sabor	Nota Global
Controle	8±1 ^a	7±1 ^a	7±1 ^a	7±1 ^a
Irradiada	8±1 ^a	7±2 ^a	6±2 ^a	7±2 ^a
Congelada	8±1 ^a	7±2 ^a	7±2 ^a	7±2 ^a

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=50); letras iguais não indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) pelos testes ANOVA e Tukey.

Fonte: autor da tese.

Os resultados apresentados na análise sensorial, no teste de escala hedônica com 9 pontos indicaram que as amostras controle, irradiada (1 kGy) e congelada foram bem aceitas, uma vez que a faixa obtida para todas as amostras se encontra entre “gostei ligeiramente” e “gostei muito”.

Por meio da análise de variância (ANOVA) dos atributos de cor, sabor, textura e global, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Análise de variância (ANOVA) dos atributos utilizados na análise sensorial de amostras de ervilhas controle, irradiada (1 kGy) e congelada armazenadas durante sete dias

Atributo	Valor de “p”
Cor	0,42
Textura	0,86
Sabor	0,17
Aspecto global	0,68

Fonte: autor da tese.

De acordo com a análise de variância para os atributos de cor, textura, sabor e aspecto global verificou-se que as amostras de grãos de ervilhas controle, irradiada (1 kGy) e congelada não apresentaram diferenças significativas, uma vez que o “valor-p” foi maior que 0,05 em todos os itens avaliados.

A análise sensorial também permitiu coletar os comentários apresentados nos Quadros 3, 4 e 5.

Quadro 3 – Descrição dos comentários apresentados pelos provadores para a amostra controle

Amostra Controle – Comentários	
<ul style="list-style-type: none"> • Elas poderiam ter a cor mais verde. • Textura um pouco mais firme. • A textura desta amostra é parecida com a da primeira amostra, o sabor é mais agradável. • Sabor menos agradável para uso in natura. Textura um pouco crua e cor sem brilho. • Em relação a cor, a tonalidade do grão de ervilha lembra algo muito sintético, fugindo um pouco a cor natural. • A aparência não estava muito lisa, parecendo alimento velho. • Quase não consumo esse alimento. • A textura está mais firme que a apresentada na amostra anterior. • Achei a textura da segunda amostra melhor e o sabor das duas primeiras amostras melhor que esta terceira, mas não sei explicar a diferença. • Sabor mais agradável. • Eu não gostei principalmente da textura. • Ela aparenta estar um pouco crua. Se eu tivesse que colocar em uma salada eu iria cozinhar uns 10 minutos. • O único fator que me incomodou foi a textura, parecia crua, mas os outros aspectos perfeitos. 	

Fonte: autor da tese.

Quadro 4 – Descrição dos comentários apresentados pelos provadores para a amostra irradiada

Amostra Irradiada – Comentários	
<ul style="list-style-type: none"> • Sabor residual. • O sabor está mais forte que a amostra anterior. • É muito bonita a cor e a textura firme permite uma variedade de uso do produto. • Textura poderia ser um pouco mais macia. • Parece ter gosto de queimada. • Não gostei principalmente da cor. • Essa foi a melhor. Gostei muito do sabor. • Sem sabor. • Tamanho difere uma da outra. A cor muita clara. • A textura é mais durinha, o sabor é menos agradável que os outros. • Muito propício para o uso em salada fria. Textura e sabor agradáveis. 	

Fonte: autor da tese.

Quadro 5 – Descrição dos comentários apresentados pelos provadores para a amostra congelada

Amostra Congelada – Comentários	
•	Sem sabor.
•	A maciez está muito boa.
•	Achei essa amostra mais macia e mais doce que a outra.
•	Sabor um pouco acentuado. Textura agradável e aceitável.
•	Gosto muito amargo.
•	Achei "mole/ murcha".
•	Características iguais as da amostra anterior.
•	Foi a melhor amostra que provei. Para mim, esta é a textura ideal.
•	Textura: com relação a primeira amostra esta segunda está mais macia.
•	Os grãos menores apresentavam um sabor maio, enquanto os grãos maiores não apresentavam muito o sabor de ervilha.
•	Não tem muito aquele gosto característico, acho que fugiu um pouco.
•	Embora eu tenha gostado muitíssimo da amostra, eu não tenho o hábito de comer ervilhas.
•	Gosto muito forte, um pouco ácido.

Fonte: autor da tese.

A partir dos comentários dos provadores verificou-se que muitos notaram diferenças entre a textura das amostras. Essa diferença, não interferiu na aceitação das amostras, no entanto indicaram a necessidade de padronizar os tempos de cozimento, de maneira que as amostras ficassem mais uniformes em relação a esse atributo. Essa padronização requer o uso de tempo de cozimento equivalente entre as amostras, lembrando que, as amostras congeladas passaram pela etapa de branqueamento, condição essa que já iniciou o amolecimento dos tecidos vegetais decorrentes da passagem do produto em água quente, na temperatura de 100°C durante 1 minuto.

É válido ressaltar também, que é mais comum o consumo de ervilhas enlatadas. Essas ervilhas passam por tratamentos térmicos severos levando o produto a uma textura muito mais mole do que a observada nas amostras analisadas.

Verificou-se também comentários recorrentes em relação ao sabor residual das amostras, esse atributo pode ser melhorado por meio do uso de sal e de outros condimentos na hora do consumo.

Em relação ao atributo de cor, verificou-se que os provadores notaram um verde mais intenso nas amostras analisadas. Essa percepção, também decorre da comparação dessas amostras, com o produto enlatado, que é consumido com maior frequência. O tratamento térmico em altas temperaturas por um curto período de tempo, leva o produto a uma tonalidade de verde bem clara.

5 CONCLUSÃO

A irradiação trouxe melhor preservação microbiológica às ervilhas quando comparadas com o congelamento e com as ervilhas apenas refrigeradas (controle).

Ainda que, com uma perda no valor da proteína superior ao do congelamento, os resultados de composição, incluindo os da proteína, para as amostras irradiadas estão alinhados com os valores de referência da literatura.

A bioacessibilidade do Zn para as amostras irradiadas foi comparável ao congelamento e controle, e a bioacessibilidade do Fe para as amostras irradiadas foi estaticamente igual aos valores da amostra controle e um pouco inferior ao da amostra congelada, esses resultados podem ser atribuídos a presença de menores quantidades de componentes antinutricionais nas amostras congeladas, uma vez que a etapa de branqueamento promove um aquecimento nos grãos de ervilha e nesta condição pode ocorrer quebra de moléculas e modificação das espécies químicas do Fe, tornando-o mais bioacessível.

O valor da vitamina B₁ para as amostras irradiadas durante o armazenamento aumentou, enquanto que para a vitamina B₂ o valor permaneceu estável, tendo melhor desempenho do que os resultados obtidos com o congelamento.

A aceitação das características sensoriais das amostras irradiadas foi favorável (escore entre 6 e 8, representando entre gostei ligeiramente e gostei muito). Todos os resultados discutidos demonstraram que o processo de irradiação é adequado como processo de preservação de ervilhas.

6 PERSPECTIVA PARA TRABALHOS FUTUROS

Para um trabalho futuro, sugere-se determinar a concentração de Fe, Zn, vitaminas B₁ e B₂, bem como a bioacessibilidade desses elementos e vitaminas, considerando os processos de irradiação e congelamento em amostras de grãos de ervilhas já cozidas, de maneira a simular a condição de consumo desse vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. H.; LEWIS, A. J. ***Bioavailability of nutrients for animals – amino acids, minerals and vitamins***. 1. ed. San Diego: Academic Press, 1995.
- ANESE, M.; MIROLO, G.; BERALDO, P.; LIPPE, G. Effect of ultrasound treatments of tomato pulp on microstructure and lycopene *in vitro* bioaccessibility. ***Food Chemistry***, v. 136, n. 2, p. 458-463, 2013.
- ARRUDA, A. S. A.; PEREIRA, A. A. S.; ESTEVINHO, L. M.; ALMEIDA MURADIAN, L. B., Presence and stability of B complex vitamins in bee pollen using different storage conditions. ***Food and Chemical Toxicology***, n. 51, p. 143-148, 2013.
- ARVANITOYANNIS, I. ***Irradiation of food commodities - techniques, applications, detection, legislation, safety and consumer opinion***. 1st. ed. Cambridge: Academic Press, 2010.
- ASLAM, J.; KHAN, S. H.; KHAN, S. A.; Quantification of water soluble vitamins in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar's fruits growing in Dubai, United Arab Emirates, though high performance liquid chromatography. ***Journal of Saudi Chemical Society***, v. 17, n. 1, p. 9-16, 2013.
- ASLAM, J.; MOHAJIR, M. S.; KHAN, S. A.; KHAN, A. Q.; HPLC analysis of water-soluble vitamins (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆) *in vitro* and *ex vitro* germinated chickpea (*Cicer arietinum* L). ***African Journal Biotechnology***, v. 7, n. 14, p. 2310-2314, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ***Análise sensorial – vocabulário***. Rio de Janeiro: ABNT, 2017. (NBR ISO 5492).
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ***Análise sensorial — Metodologia — Guia geral para condução de testes hedônicos com consumidores em ambientes controlados***. Rio de Janeiro: ABNT, 2016. (NBR 11136).
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16a. ed. Arlington. v.2, 1995.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Official method 989.13, 1998.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Official method 2002.11, 2002.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Official method 2002.07, 2002.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Official method 2005.03, 2005.

AUGUSTIN, J. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in foods by liquid chromatography. *Journal of AOAC*, v. 67, p. 1012, 1984.

AZEREDO, H. M. C. *Fundamentos de estabilidade de alimentos*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004.

AZIZ, N. H.; SOUZAN, R. M.; SHAHIN AZZA, A. Effect of g-irradiation on the occurrence of pathogenic microorganisms and nutritive value of four principal cereal grains. *Applied Radiation Isotopes*, v.64, n. 12, p.1555-1562, 2006.

BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL (BAM). *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. 8. ed. USA: Food and Drug Administration (FDA), 2003.

BALL, G. F. M. *Vitamins in foods: Analysis, Bioavailability, and Stability*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

BRASIL. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA*. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao/?inheritRedirect=true#/visualizar/27628>> Acesso em 15 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Normas para pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução CNS nº 196/96 e outras)*. 2.ed. ampliada. Brasília: Ministério da Saúde, 1996.

BRASIL. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA*. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/26655>> Acesso em: 11 out. 2018

BRASIL. Resolução RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Dispõe em aprovar o Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA*. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/26672>>. Acesso em: 11 out. 2018.

BRASIL. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe em aprovar o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a Rotulagem Nutricional. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA*. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/27327>>. Acesso em: 20 out 2018.

BRIGIDE, P. *Disponibilidade de ferro em grãos de feijão comum (Phaseolus vulgaris L.) irradiados*. 2002. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>> Acesso: 15 out. 2018.

BUCHHOLZ, M.; DROTLEFF, A. M.; TERNES, W. Thiamin (vitamin B1) and thiamin phosphate esters in five cereal grains during maturation. *Journal of Cereal Science*, v. 56, p. 109-114, 2012.

CALVO, W. A. P. Desenvolvimento do sistema de irradiação em um irradiador multipropósito de cobalto-60 tipo compacto. 2005. 178 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>> Acesso em: 15 out de 2018.

CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Valor nutricional de produtos de ervilha em comparação com a ervilha fresca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, p766-771, 2006.

CARVALHO, O.T. *Carotenóides e composição centesimal de ervilhas (Pisum sativum L.)*. 2007. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF/USP, São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>> Acesso em: 12 out de 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Multistate outbreaks of Salmonella infections associated with raw tomatoes eaten in restaurants – United States, 2005-2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 56, n. 35, p. 909-911, 2007.

CHIBBAR, R. N.; AMBIGAIPALAN, P.; HOOVER, R. Molecular diversity in pulse seed starch and complex carbohydrates and its role in human nutrition and health. *Cereal Chemistry*. v. 87, p. 342-352, 2010.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. *Análise instrumental*. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2000.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (CGEE). *Irradiadores e Aplicações*. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. [s.d.]. Disponível em: <<http://appasp.cnen.gov.br/acnen/pnb/Palestra5-2-Processamento-Irradia%C3%A7%C3%A3o-Agroneg%C3%B3cio.pdf>>. Acesso em: 15 out 2018.

CODEX GENERAL STANDARD FOR IRRADIATED FOODS (CGSIF). *STAN 106-1983*, Rev. 1- 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/input/download/standards/16/CXS_106e.pdf> Acesso em: 15 out de 2018.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Unicamp, 2009.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. *Nutrient and energy intakes for the European Community*. 31 st. series, Luxembourg, 1993.

CORNELIS, R.; CREWS, H.; CARUSO, J.; HEUMANN, K. *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*. 1. ed. England: John Wiley and Sons Ltd, 2003.

CORREIA, L.F.M.; FARAONI, A.S.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M.; Efeitos do processamento industrial sobre a estabilidade de vitaminas. *Alimentos e Nutrição*, v.19, n.1, p. 83-95, 2008

COZZOLINO, S.M.F., *Biodisponibilidade de Nutrientes*, 5.ed. Barueri: Ed. Manole, 2015.

DANIELSSON, L.; SPARÉN, A.; GLYNN, A.W. Aluminium fractionation in a simulated rat stomach: an in vitro study. *Analyst*, v. 120, n. 3, p. 713-720, 1995.

DEL BEM, M. S.; POLES, L. F.; SARMENTO, S. B. S.; ANJOS, C. B. P. Propriedades físico-químicas e sensoriais de massas alimentícias elaboradas com farinhas de leguminosas tratadas hidrotérmicamente. *Alimentos e Nutrição*, v. 23, n. 1, p. 101-110, 2012.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com as propriedades físico-químicas. *Ciência Rural*, v. 39, n. 3, p. 945-954, 2009.

DESHPANDE, S.S.; ADSULE, R.N. Garden pea. In: SALUNKHE, D.K.; KADAM, S.S. eds. *Handbook of vegetable Science and technology: production, composition, storage and processing*. New York: Marcel Dekker, 1998.

DIÉGUEZ, A.; HIERREZUELO, J. Tiamina. *Medisan*, v.1 n.1, p.23-29, 1997.

DISLER, P.B.; LYNCH, S.R.; CHARLATAN, R.W.; TORRANCE, J.D.; BOTHWELL, T.H.; WALKER, R.B.; MAYET, F. The effect of tea on iron absorption. *Gut British Society of Gastroenterology*, v.16, p.193-200, 1975.

DO NASCIMENTO DA SILVA, E. *Nutrientes e elementos tóxicos em alface (Lactuca sativa): Estudos de bioacessibilidade, biodisponibilidade, biofortificação e especiação*. 2016. 116 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, IQ/UNICAMP, Campinas. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/>> Acesso em: 15 out 2018.

DUTCOSKY, S.D. *Análise sensorial de alimentos*. 2. Ed. Curitiba: Champagnat, 2007.

EBDON, L.; PITTS, L.; CORNELIS, R.; CREWS, H.; DONARD, O. F. X.; QUEVAUVILLER, P. *Trace element speciation for environment, food and health*. 1. ed. England: Royal Society of Chemistry, 2001.

EL-NIELY, H.F.G. *Biochemical and nutritional studies on radiation processed peanuts. PhD dissertation*, Department of Biochemistry and Nutrition, Women's College, Ain Shams University. Cairo, Egypt, 2001.

EL-NIELY, H.F.G. Effect of radiation processing on antinutrients, in vitro protein digestibility and protein efficiency ration bioassay of legume seeds. *Radiation Physics and Chemistry*, v.76, p.1050-1057, 2007.

FABBRI, A. D. T. *Avaliação microbiológica, físico-química e sensorial de salada de frutas irradiada pronta para o consume de imunocomprometidos*. 2014. 115 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em <<http://www.teses.usp.br>> Acesso em: 10 out de 2018.

FAO/WHO. Protein quality evaluation, report of a joint FAO/WHO expert consultation. *FAO FOOD Nutritional*, v. 51, p. 23-24, 1991.

FAO/WHO/UNU. Energy an protein requirements, report of a joint FAO/WHO expert consultation. *World Health Organization Technical Report Seriese* 724, WHO, Geneva, 1985.

FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Statiscal databases*, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 26 de jun. 2018.

FARAG, M.D.El-D.H., The nutritive value for chicks of full-fat soybeans irradiated at up to 60kGy. *Animal Feed Science and Technology*, v.73, n. 3, p.319-328, 1998.

FARIA, E.V.; YOTSUYANAGI, K. *Técnicas de análise sensorial*. 1. ed. Campinas: ITAL/LAFISE, 2002.

FARKAS, J.; FARKAS-MOHÁCSI, C. History and future of food irradiation. *Trends in Food Science and Technology*, v.22, p.121-126, 2011.

FELLOWS, P. *Tecnologia del procesado de los alimentos: principios y prácticas*. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2017.

FENNEMA, O. R.; PARKIN, K. L.; DAMODARAN, S.; **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FERNÁNDEZ-GARCIA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, v.29, p.751, 2009.

FERREIRA, A. C. P.; BRAZACA, S. G. C.; ARTHUR, V. Alterações químicas e nutricionais do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) cru e irradiado e submetido à cocção. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 1, p. 80-88, 2006.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da Segurança dos Alimentos*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia de alimentos*. 2. ed. São Paulo; Editora Atheneu, 2008.

FRANCO, G. *Tabela de composição química dos alimentos*. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

FURTUNATO, A. A.; MAGALHÃES, M. M. A.; MARIA, Z. L. Estudo do feijão verde (*Vigna unguiculata* (L) Walp) minimamente processado. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, v. 20, n. 3, p. 299-301, 2000.

GALÁN, I., GARCÍA, M. L., SELGAS, M. D., HAVENAAR, R., Effect of E-beam treatment on the bioaccessibility of folic acid incorporated to ready to eat meat products. ***LWT - Food Science and Technology***, v. 59, p. 547-552, 2014.

GAWALKO E.; GARRETT R. G.; WARKENTIN, T.; WANG, N.; RICHTER A. Trace elements in Canadian field peas: a grain safety assurance perspective. ***Food additives and contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure and risk assessment***, v. 26, n. 7, p. 100–112, 2009.

GHARSALLAOUI, A.; CASES, E.; CHAMBIM, O.; SAUREL, R. Interfacial and emulsifying characteristics of acid-treated pea protein. ***Food Biophysics***, v. 4, p. 273-280, 2009.

GILANI G.S.; COCKELL K.C.; SEPEHR E. Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. ***Journal AOAC International***, v. 88, p. 967-987, 2005.

GIORDANO, L. B. ***Cultivo da Ervilha – Pisum Sativum L.*** Instruções Técnicas. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. v. 1, 1997.

GHOBRIL, C. N. ***Gestão tecnológica para instalação de um irradiador de alimentos no vale do ribeira***. 2008. 271 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>> Acesso em: 15 out. 2018.

GRANATO, D.; DE ARAÚJO CALADO, V. M.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in food science and technology. ***Food Research International***, v. 55, p. 137–149, 2014.

GREENFIELD, H.; SOUTHGATE, D. A. T. ***Food composition data***. 1 st. ed. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations, 2003.

HALLBERG, L.; ROSSANDER-HULTHÉN, L.; BRUNE, M.; GLEERUP, A. Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance. ***European Journal of Clinical Nutrition***, v.46, p.317-327, 1992.

HE, P. P.; LV, X. Z.; WANG, G.Y. Effects of Se and Zn supplementation on the antagonism against Pb and Cd in vegetables. ***Environment International***, v. 30, n. 2, p. 167– 172, 2004.

HOWARD, P. ***Handbook of Physical Properties of Organic Chemicals***. Boca Raton, FL: CRC Press, 1996.

IGAMI, M. P. Z.; VIEIRA, M. M. F. **Guia para a elaboração de teses e dissertações: programa de Pós-graduação Tecnologia Nuclear – IPEN/USP**. 3 ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2017. Disponível em: <https://intranet.ipen.br/portal_por/conteudo/biblioteca/arquivos/NOVO_GUIA_TESSES_E_DISSERTACOES.pdf> Acesso em: 15 out 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 1. ed. São Paulo, 2005.

INTERNATIONAL CONSULTATIVE GROUP ON FOOD IRRADIATION - ICGFI. Collection of ICGFI documents on codes of good irradiation practice for treatment of various food commodities. **Training manual on operation of food irradiation facilities**. 1. ed. Vienna, 1992.

JAE-YEUN, S.; GIL-HWAN, A.; CHUL-JAI, K. Color, texture, nutrient contents, and sensory values of vegetable soybeans [*Glycine max* (L.) Merrill] as affected by blanching. **Food Chemistry**, v.83, p.69-74, 2003.

JAKOBSEN, J. Optimisation of the determination of thiamin, 2-(1-hydroxyethyl) thiamin, and riboflavin in food samples by use of HPLC. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1209-1217, 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed, Porto Alegre: Artmed, 2005.

KEW SCIENCE. **Plants of the world on line**. Disponível em: <<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:60454055-2>>. Acesso em: 26 de jun. 2018.

KILCAST, D. **Effect of irradiation on vitamins**. Food Chemistry, v. 49, n. 2, 157-164, 1994.

KILLNER, M. **Paralelos entre métodos fenotípicos, imunológicos e genotípicos para detecção rápida de Salmonella spp em matrizes alimentares sem contaminação experimental: avaliação em condições reais e simultâneas de uso**. 2008. 161 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF/USP, São Paulo. Disponível em <<http://www.teses.usp.br>> Acesso em: 10 out de 2018.

KOMOLPRASERT, V.; MOREHOUSE, K. M. **Irradiation of food and packaging – recent developments**. 1st. ed. Washington: Oxford University Press, 2004.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna – HPLC/ CLAE**. 2 . ed. Campinas: Átomo, 2016.

LEONEL, Fábio Roberto. **Irradiação e qualidade da carne de frango congelada e embalada à vácuo**. 2008. 88 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal/ Universidade Estadual Paulista, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/104914>> Acesso em: 15 out de 2018.

LETERME P. Recommendations by health organizations for pulse consumption. *British Journal of Nutrition*, v. 88, p. 239-242, 2002.

LIMA FILHO, T.; TEIXEIRA, L.J.Q.; ROCHA, C.T.; FERREIRA, G.A.M.F.; SOUZA, M.C.S. Energia ionizante na conservação de alimentos: revisão. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v. 30, n. 2, p. 243-254, 2012.

LIMA, K. S. C.; GROSSI, J. L. S.; LIMA, A. L. S.; ALVES, P. F. M. P.; CONEGLIAN, R. C. C.; GODOY, R. L. O.; SABAA-SRUR, A. U. O. Efeito da irradiação ionizante γ na qualidade pós-colheita de cenouras (*Daucus carota* l.) cv. Nantes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 21, n. 2, p. 202-208, 2001.

LINDER. M.C. *Nutrición: aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos*. Pamplona: Eunsa, 1988.

MAIHARA, V.A.; SILVA, M. G.; BALDINI, V. L. S.; MIGUEL, A. M. R.; FÁVARO, D. I. Avaliação Nutricional de Dietas de Trabalhadores em Relação a Proteínas, Lipídeos, Carboidratos, Fibras Alimentares e Vitaminas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 16, n. 3, p. 672-677, 2006.

MEILGAARD, M. C.; CIVILLE, G. V., CARR, B. T. *Sensory Evaluation Techniques*. 4. ed. USA: CRC Press, 2006.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EGGER, L.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE FEUNTEUN, S.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A.; MARZE, S.; MC CLEMENTS, D. J.; MÉNARD, O.; RECIO, I.; SANTOS, C. N.; SINGH, R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S. J.; WEITSCHIES, W.; BRODKORB, A. A. standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and Function*, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

MONDRAGÓN-PORTOCARRERO, A. C.; VÁZQUEZ-ODÉRIZ, L.; ROMERO-RODRÍGUEZ, M. A. Development and validation of HPLC method for determination of thiamine and riboflavin in green leafy vegetables using clara-diestase. *Journal of Food Science*, v. 76, n. 4 p. 639-642, 2011.

MORROW, B. The rebirth of legumes: legume production, consumption and export are increasing as more people become aware of legumes nutritional benefits. *Food Technology*. 45, 96-121, 1991.

NEGI, P. S.; ROY, S. K. Effect of blanching and drying methods on β -carotene, ascorbic acid and chlorophyll retention of leafy vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, v. 33, n. 4, p.295-298, 2000.

OLLILAINEN, V.; FINGLAS, P. M., VAN DEN BERG, H.; FROIDMONT – GORTZ, I. Certification of B-group vitamins (B₁, B₂, B₆ and B₁₂) in four food reference materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 1, p. 315-321, 2001.

ORDÓÑEZ J. A. *Tecnologia de alimentos – componentes dos alimentos e processos*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

PAREDES, R. S. V. *Bioacessibilidade de compostos fenólicos e minerais em feijão comum (Phaseolus vulgaris L.)*. 2017. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, Piracicaba. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>> Acesso em: 15 out 2018.

PENTEADO M. V. C. *Vitaminas – aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. Barueri: Manole, 2003.

PEREDA, J. A. O. *Tecnologia de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos*. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PEREIRA, K. D. Amido resistente, a última geração no 26. controle de energia e digestão saudável. *Ciência Tecnologia Alimentar*, v. 27, supl., p. 88-92, 2007

PINHEIRO, D. M.; PORTO, K. R. A.; MENEZES, M. E. S. *A química dos alimentos: carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas e minerais*. Maceió: EDUFAL, 2005.

POLESI, L. F.; SARMENTO, S. B. S.; ANJOS, C. B. P. 28. Composition and characterization of pea and chickpea starches. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 14, p. 74-81, 2011.

POLESI, L. F.; SARMENTO, S. B. S.; FRANCO, 29. C.M.L. Production and physicochemical properties of resistant starch from hydrolysed wrinkled pea starch. *International Journal of Food Science Technology*, v. 46, p. 2257-2264, 2011.

POTTER, N. N.; HOTCHKISS, J. H. *Food Science*. 5. ed. New York: Chapman and Hall, 1995.

POWERS, J. H. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *The American Journal of Clinical Nutritional*, v. 77, n. 6, p. 1353-1360, 2003.

PRAKASH, A., Particular applications of food irradiation fresh produce. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 129, p. 50-52, 2016.

PRESOTO, A. E. F. ; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Validação de métodos cromatográficos por CLAE para análise das vitaminas B1, B2, B6 e niacina naturalmente presente em farinha de cereais. *Química Nova*, v. 31, n. 3. P. 498-502, 2008.

PROCHASKA, L. J; NGUYEN, X. T.; DONAT, N.; PIEKUTOWSKI, W. V. Effects of food processing on the thermodynamic and nutritive value of foods: literature and database survey. *Medical Hypotheses*, v. 54, n. 2, p. 254-262, 2000.

PROKOPOV, T., TANCHEV, S. *Food Safety – a practical and case study approach*. Boston: Springer, 2007.

QUEIROZ, S. S.; TORRES, M. A. A. Anemia ferropriva na infância. *Jornal de Pediatria*, v. 76, n. 3, p. 298-304, 2000.

RAYMUNDO, A.; GOUVEIA, L.; BATISTA, A. P.; EMPIS, J.; SOUSA, I. Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilized by pea protein. *Food Research International*, v. 38, p. 961-965, 2005.

REHMAN, Z.U.; SHAH, W.H., Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chemistry*, v.91, p.327-331, 2006.

REICHERT, R. D.; MACKENZIE, S. L. Composition of peas (*Pisum sativum*) varying widely in protein content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 30, p. 312-17, 1982.

RIZKALLA, S. W.; BELLISLE, F.; SLAMA, G. Health benefits of low glycaemic index foods, such as pulses, in diabetic patients and health individuals. *British Journal Nutritional*. v. 88, p. 255-262, 2002.

ROBERTS, P. B., Food irradiation: Standards, regulations and world-wide trade. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 129, p. 30-34, 2016.

RODRIGUEZ, R. S. J.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, M.; SÁNCHEZ-MATA, M. C. Simultaneous determination of vitamin B₁ and B₂ in complex cereal foods, by reverse phase isocratic HPLC-UV. *Journal of Cereal Science*, v. 55, p. 293-299, 2012.

SANDBERG A. S. Bioavailability of minerals in legumes. *British Journal Nutricional*. v. 88, n. 3, p. 281–285, 2002.

SANTOS, J.; MENDIOLA, J. A.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; IBAÑEZ, E.; HERRERO, M.; Sequential determination of fat and water-soluble vitamins in green leafy vegetables during storage. *Journal of Chromatography A*, v. 1261, p. 179-188, 2012.

SAROJ, S. D.; SHASHIDHAR, R; PANDEV, M.; DHOKANE, V.; HAJARE, S.; SHARMA, A.; BANDEKAR, JR. Effectiveness of radiation processing in elimination of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* from sprouts. *Journal of Food Protection*. v. 69, n. 8, p. 1858-1864, 2006.

SCHNEIDER A.; LACAMPAGNE, J. P. (2000). Peas: a European production of protein-rich materials for feed and food. *Industrial Proteins*, v. 8, n. 1, p. 3-6, 2000.

SCHROEDER, H. E. Quantitative studies on the cotyledonary proteins in the genus *Pisum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 33, p. 623-633, 1982.

SHIROSE, I.; MORI, E. E. M. *Estatística Aplicada à Análise Sensorial (Módulo 1). Manual Técnico Nº 13*. 1. ed. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, 1994.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K.; MAKKAR, H.P.S. Studies on the nutritional composition and antinutritional factors of three different germplasm seed materials of na under-utilized tropical legume, *Mucuna pruriens* var. *utilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 48, n. 12, p. 6048-6060, 2000.

SIDDHURAJU, P.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. The effect of ionising radiation on antinutritional factors and the nutritional value of plant materials with reference to human and animal food. *Food Chemistry*, v. 78, n. 2, p. 187-205, 2002.

SIKORSKI, Z. E. *Chemical and Functional properties of food proteins*. 1st. ed. USA: CRC Press, 2001.

SILOTO, R. C. *Especiação de cobre e zinco em água de coco e a influência do processo de pasteurização sobre essas espécies*. 2005. 91 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, IQ-USP, São Paulo. Disponível em <<http://www.teses.usp.br>> Acesso em: 15 out. 2018.

SILVA, L. C. *Processamento de alimentos*. Campus de Alegre: Universidade Federal do Espírito Santo, 2006. Disponível em: <http://www.agais.com/d1457.php?download_file=sa0106_processamento_de_alimentos.pdf> Acesso em: 20 out. 2018.

SILVA, M. P.; GOMES, F. S.; FREIRE JUNIOR, M.; CABRAL, L. M. C. Avaliação dos efeitos da radiação gama na conservação da qualidade da polpa de amora-preta (*Rubus spp. L.*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 36, n.3, p. 620-627, 2014.

SKOOG, D. A.; HOLLER F. J.; NIEMAN T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.

SOARES, L.P.; SÃO JOSÉ, A.R. Compostos bioativos em polpas de mangas 'rosa' e 'espada' submetidas ao branqueamento e congelamento. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.35, n. 2, p. 579-586, 2013.

SOUZA, A. C. S.; FERRIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; AOYAMA H.; CAVAGIS, A. D. M.; PEPPELENBOSCH, M. P. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. *Química Nova*, v. 28, n. 4, p. 887-891, 2005.

SPLITTSTOESSER, D.F.; WETTERGREEN, W.P.; PEDERSON, C.S. Control of microorganisms during preparation of vegetables for freezing. I. green beans. *Food Technology*. v. 15, p. 329-331, 1961.

STEFANOVA, R.; VASILEV, N. V.; SPASSOV, S. L. Irradiation of food, current legislation framework, and detection of irradiated foods. *Food Analytical Methods*, v. 3, n. 3, p. 225-252, 2010.

STONE, H.; REBECCA, N. B.; HEATHER A. T. *Sensory evaluation practices*. 4. ed. USA: Academic Press, 2012.

TAVARES, J. C; GÓIS, V. D.; NETO, F. B.; OLIVEIRA, J. A. Métodos de congelamento na conservação da acerola (*Malpighia emarginata* DC.). *Caatinga*, v.11, n. 1-2; p.71-74, 1998.

TEZOTTO-ULIANA, J. V.; SILVA, P. P. M.; KLUGE, R. A.; SPOTO, M. H. F.; Radiação Gama em Produtos de Origem Vegetal. *Revista Virtual da Química*, v. 7, n. 1, p. 267-277, 2015.

THARANATHAN, R. N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes – A boon human nutritional. *Trends Food Science Technology*. v. 14, n. 12, p. 507-518, 2003.

TOMÉ, A. S. A. *Avaliação das propriedades gelificantes e emulsionantes de misturas de proteínas de pescado e de proteínas vegetais*. 2012. 89 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em: < <https://www.repository.utl.pt> > Acesso em: 15 out 2018.

TOSH, S. M.; FARNWORTH E. R.; BRUMMER, Y.; DUNCAN, A. M.; WRIGTH, A. J.; BOYE, J. I.; MARCOTTE, M.; BENALI, M. Nutricional Profile and Carbohydrate Characterization of Spray-Dried Lentil, Pea and Chickpea Ingredients. *Foods*. v. 2, n. 3, p. 338-349, 2013.

TRINIDAD, T. P.; MALLILLIN, A. C.; LOYOLA A. S.; SAGUM, R. S.; ENCABO, R. R. The potential health benefits of legumes as a good source of dietary fibre. *British Journal of Nutrition*. v. 103, n. 4, p. 569 – 574, 2010.

TRUSWELL, A. S. *Nutrição Humana*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

TSWEETT, M. Naturatistes Varisovic. *Trav. Sol*. v. 14, 1903.

TSWEETT, M. Ber. Deut. *Botan. Gessell*, v. 24, n. 316, 1906.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP. *Tabela brasileira de composição de alimentos – (TACO)*. 4. ed. Campinas: UNICAMP/NEPA, 2011. Disponível em:

<http://www.nepa.unicamp.br/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2018.

URE, A. M.; DAVIDSON, C. M. *Chemical Speciation in the Environment*. 2. ed. Malden: Blackwell, 2002.

VAN DER POEL, A.F.B., Effect of processing on antinutritional factors and protein nutritional value of dry beans. *Journal Animal Feed Science Technology*, v.2, p.179-208, 1990.

VANNUCCHI, V.; CUNHA, C.F.S. *Vitaminas do Complexo B: Tiamina, Riboflavina, Niacina, Piridoxina, Biotina e Ácido Pantotênico*. Série de Publicações ILSI Brasil, 2009. Disponível em: <<http://ilsi.org/brasil/wp-content/uploads/sites/9/2016/05/09-Complexo-B.pdf>>. Acesso em: 06 jun. 2018.

VERDE S. C.; TRIGO M. J.; SOUSA M. B.; FERREIRA A.; RAMOS A. C.; NUNES I.; JUNQUEIRA C.; MELO R., SANTOS P.M.P.; BOTELHO M. L.; Effect of gamma radiation on raspberries: safety and quality issues, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 76, n. 4-5, p.291-303, 2013.

VILLAVICENCIO, A. L. C. H. ; MANCINI-FILHO, J. ; DELINCEE, H.; BOGNAR, A. Effect of gamma irradiation on the thiamine, riboflavin and vitamin B6 content in two varieties of Brazilian beans. *Radiation Physics and Chemistry*, v.57, p.299-303, 2000.

WALTER, M.; SILVA, L. P.; EMANUELLI, T. Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. *Ciências Rural*, v. 35, n. 4, p. 975-980, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Handbook on human nutritional requirements - Monograph series 61*, Geneva, 1974.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Wholesomeness of irradiated food: report of a joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee*. Em: World Health Organization Technical Report Series 659, WHO, Geneva, Switzerland, 1981.

YU, P.; LOWB, M. Y.; ZHOUA, W. Design of experiments and regression modelling in food flavour and sensory analysis: A review. *Trends in Food Science and Technology*. v. 71. p. 202-215, 2018.

ANEXO 1 – TABELA DE CONVERSÃO *SIMPLATE***SimPlate®****Normal Counting Range (NCR)
Conversion Table**

No. of positive wells = population per plate*

1 = 2	29 = 70	57 = 190
2 = 4	30 = 74	58 = 196
3 = 6	31 = 76	59 = 202
4 = 8	32 = 80	60 = 208
5 = 10	33 = 84	61 = 216
6 = 12	34 = 86	62 = 224
7 = 14	35 = 90	63 = 232
8 = 16	36 = 94	64 = 240
9 = 18	37 = 96	65 = 248
10 = 22	38 = 100	66 = 256
11 = 24	39 = 104	67 = 266
12 = 26	40 = 108	68 = 276
13 = 28	41 = 112	69 = 288
14 = 30	42 = 116	70 = 298
15 = 32	43 = 120	71 = 312
16 = 36	44 = 124	72 = 324
17 = 38	45 = 128	73 = 338
18 = 40	46 = 132	74 = 354
19 = 42	47 = 136	75 = 372
20 = 46	48 = 142	76 = 392
21 = 48	49 = 146	77 = 414
22 = 50	50 = 150	78 = 440
23 = 54	51 = 156	79 = 470
24 = 56	52 = 160	80 = 508
25 = 58	53 = 166	81 = 556
26 = 62	54 = 172	82 = 624
27 = 64	55 = 178	83 = 738
28 = 68	56 = 184	84 = >738

If there are no positive wells, and the sponge is positive, population is 1.

If there are no positive wells, and the sponge is negative, population is < 1.

* The population reflects the number of microorganisms per plate. To determine the number of microorganisms per gram (mL) food product, see Reading and Interpretation section in directions for use.

PRHTS.B20aig

REVISION 01

REV. DATE 02/08/03

APPROVED BY

BIOCONTROL

Resisto. Não tem.

Worldwide Headquarters: Billerica, MA, USA tel: 401.483.1131 fax: 401.483.0679 www.biocontrolnys.com

European Office: Montesson, France tel: +33 (0)1 30 15 78 08 fax: +33 (0)1 30 15 78 09 europe@biocontrolnys.com

Latin America Office: Campinas, Brazil tel: +55 19 3237 8105 fax: +55 19 3233 7988 latinamerica@biocontrolnys.com

United Kingdom Office: London, UK tel: +44 (0) 1473 461800 fax: +44 (0) 1473 747300 uk@biocontrolnys.com

ANEXO 2 – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA ANÁLISE SENSORIAL

FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo comparativo entre os métodos de irradiação e congelamento nos aspectos químicos, físicos, sensoriais e microbiológicos de grãos de ervilhas armazenados

Pesquisador: Maria Luiza Marchiori Visintin

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 35783714.8.0000.5421

Instituição Proponente: COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

Patrocinador Principal: COMISSAO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 933.908

Data da Relatoria: 22/01/2015

Apresentação do Projeto:

Inalterado.

O projeto havia sido encaminhado à CONEP por ter sido classificado na Área Temática Especial "Genética Humana. Porém, considerando as informações do item IX.4 da Resolução CNS nº 466/2012, não cabia a sua análise ética à CONEP, retornando ao CEP de origem.

Objetivo da Pesquisa:

Inalterado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Inalterados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A CONEP entendeu que o protocolo de pesquisa em tela não se enquadra na Área Temática Especial "Genética Humana.

No âmbito deste não havia comentários/críticas que impedissem a aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Diante do exposto, a CONEP bem como o relator deste CEP entendem que os termos de apresentação obrigatória foram adequadamente expostos, não havendo restrições éticas à

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 715

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 01.246-904

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3061-7779

Fax: (11)3061-7779

E-mail: coep@fsp.usp.br

ANEXO 2 – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA ANÁLISE SENSORIAL

FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

Continuação do Parecer: 933.908

aprovação deste projeto.

Recomendações:

Nada a acrescentar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com o parecer prévio deste relator, não foram identificadas pendências e inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A CONEP entendeu que o protocolo de pesquisa em tela não se enquadra na Área Temática Especial "Genética Humana, recomendando submeter a este CEP.

Acatado parecer do relator deste CEP pela aprovação.

SAO PAULO, 16 de Janeiro de 2015

Assinado por:

Sandra Roberta Gouvea Ferreira Vivolo
(Coordenador)

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO DE LIVRE ESCLARECIDO **INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES****COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR****IPEN – CNEN / SP****TERMO DE CONSENTIMENTO DE LIVRE ESCLARECIDO****I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA**

Nome do Sujeito:.....

Documento de Identidade nº:..... Sexo: () M () F

Data de Nascimento:/...../.....

Endereço: Nº Apto

Bairro: Cidade:

CEP: Telefone:

II. DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Projeto da Pesquisa: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS MÉTODOS DE IRRADIAÇÃO E CONGELAMENTO NOS ASPECTOS QUÍMICOS, FÍSICOS, SENSORIAIS E MICROBIOLÓGICOS DE GRÃOS DE ERVILHAS ARMAZENADOS

Pesquisador: Maria Luiza Marchiori Visintin

Cargo: Aluna Doutorado

Departamento: Centro de Tecnologia das Radiações - CTR

Faculdade (Unidade USP): IPEN – CNEN / SP

Documento de Identidade Nº: 25.610.462-1 Sexo: Feminino

2. Avaliação de Risco da Pesquisa

(X) Risco Mínimo () Risco Médio () Risco Maior

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO DE LIVRE ESCLARECIDO

Este projeto de pesquisa apresentará riscos mínimos relacionados aos procedimentos de análise sensorial. Os riscos estão associados: ao desconforto decorrente das atividades de análise sensorial e também há possíveis intolerâncias, aos itens da composição química dos grãos de ervilhas, apresentadas pelos envolvidos.

3. Duração da Pesquisa: 4 anos

III. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Justificativa

Considerando a importância do consumo de grãos de ervilha na alimentação e que estas podem apresentar fatores antinutricionais, decidiu-se estudar comparativamente os efeitos gerados na composição química, nos aspectos sensoriais (cor, textura e aroma), microbiológicos, na disponibilidade de ferro e na digestibilidade de proteína durante o período de armazenamento de grãos de ervilha, tomando como base o processo produtivo tradicional de ervilha congelada e o processo produtivo utilizando radiação gama.

Este estudo também pode auxiliar na construção de informações, reforçando dados importantes sobre os alimentos irradiados, assunto este que ainda mantém mitos por parte dos consumidores que apresentam aversão a este tipo de alimento.

Objetivos

Avaliar e comparar os efeitos na composição química, nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de grãos de ervilha congelados e grãos de ervilha irradiados.

Procedimentos

Inicialmente, serão adquiridas em feira livre e no sacolão OBA, amostras de grãos de ervilha. As amostras serão tratadas e analisadas conforme apresentado na tabela 1.

As amostras serão irradiadas no Irradiador do Centro de Tecnologia das Radiações (IPEN/SP) que possui como fonte o cobalto 60.

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO DE LIVRE ESCLARECIDO

Tabela 1. Tabela Estruturas das análises a serem realizadas no projeto

Tempo de Armazenamento	Análises realizadas nas amostras controle, irradiada e congelada
Zero/ 15 dias	<ul style="list-style-type: none"> Análises Microbiológicas (Contagem total de bolores e leveduras, contagem de aeróbios mesófilos, coliformes totais e <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i>) Análises de Composição Centesimal (umidade, cinzas, lipídios, proteínas e carboidratos) Determinação de Vitaminas B₁ e B₂ Determinação de Ferro e Zinco Bioacessibilidade de Ferro e Zinco
7 dias	<ul style="list-style-type: none"> Análise Sensorial utilizando Teste de Escala Hedônica

Considerações

Convidamos o (a) Sr (a) para participar dessa Pesquisa. Sua forma de participação consiste em responder um questionário de análise sensorial que usaremos para identificar as características do público envolvido, bem como participar da análise sensorial provando amostras de grãos de ervilhas submetidas aos tratamentos apresentados anteriormente, em seguida o Sr (a) expressará sua opinião em relação aos atributos de cor, sabor e textura utilizando uma escala que varia de “gostei muitíssimo” a “gostei muitíssimo”. O propósito deste teste é medir efeitos específicos pelo grau de aceitação, partindo-se do princípio de que as amostras tratadas e não-tratadas são sensorialmente distintas.

Os riscos decorrentes da sua participação nesse estudo são mínimos e estão associados: ao desconforto decorrente das atividades de análise sensorial e também há possíveis intolerâncias, aos itens da composição química dos grãos de ervilhas. Caso o Sr (a) apresente intolerância aos componentes dos grãos de ervilha recomendamos que não participe da pesquisa. Não estão previstos ressarcimentos ou indenizações, bem como não haverá benefícios imediatos advindos da sua participação. Esse projeto de pesquisa trará como benefícios a possibilidade de uso seguro da utilização da técnica de irradiação para processamento de grãos de ervilhas e seus efeitos na composição química, nutricional, sensorial e microbiológicas.

Se depois de consentir em sua participação o (a) Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, garantindo-se o seu anonimato.

Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com a pesquisadora no endereço: Rua Tagipuru, 242 – Barra Funda - São Paulo - SP, pelo telefone (11) 98247-5034, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, sito a Av. Dr. Arnaldo, 715, Cerqueira César – CEP: 01246-904, São Paulo – SP – Telefone (11) – 3061-7779 e-mail: coep@fsp.usp.br

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO DE LIVRE ESCLARECIDO**Consentimento Pós-Informação**

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do participante

Assinatura do pai ou responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável

Data: ____ / ____ / ____

ANEXO 4 – FICHA UTILIZADA PARA ANÁLISE SENSORIAL NAS AMOSTRAS DE ERVILHAS – TESTE DE ESCALA HEDÔNICA

Código da Amostra: _____

Ficha para Análise Sensorial – Teste de Aceitação

Nome: _____ Idade: _____

Sexo: _____ Data: _____

Você está recebendo uma amostra de grãos de ervilha, por favor, prove a amostra e dê nota para cada solicitação abaixo, seguindo a escala:

<p>Cor</p> <p>() 9 – Gostei muitíssimo</p> <p>() 8 – Gostei muito</p> <p>() 7 – Gostei moderadamente</p> <p>() 6 – Gostei ligeiramente</p> <p>() 5 – Não gostei/ nem desgostei</p> <p>() 4 – Desgostei ligeiramente</p> <p>() 3 – Desgostei moderadamente</p> <p>() 2 – Desgostei muito</p> <p>() 1 – Desgostei muitíssimo</p>	<p>Textura</p> <p>() 9 – Gostei muitíssimo</p> <p>() 8 – Gostei muito</p> <p>() 7 – Gostei moderadamente</p> <p>() 6 – Gostei ligeiramente</p> <p>() 5 – Não gostei/ nem desgostei</p> <p>() 4 – Desgostei ligeiramente</p> <p>() 3 – Desgostei moderadamente</p> <p>() 2 – Desgostei muito</p> <p>() 1 – Desgostei muitíssimo</p>
<p>Sabor</p> <p>() 9 – Gostei muitíssimo</p> <p>() 8 – Gostei muito</p> <p>() 7 – Gostei moderadamente</p> <p>() 6 – Gostei ligeiramente</p> <p>() 5 – Não gostei/ nem desgostei</p> <p>() 4 – Desgostei ligeiramente</p> <p>() 3 – Desgostei moderadamente</p> <p>() 2 – Desgostei muito</p> <p>() 1 – Desgostei muitíssimo</p>	<p>Nota Global</p> <p>() 9 – Gostei muitíssimo</p> <p>() 8 – Gostei muito</p> <p>() 7 – Gostei moderadamente</p> <p>() 6 – Gostei ligeiramente</p> <p>() 5 – Não gostei/ nem desgostei</p> <p>() 4 – Desgostei ligeiramente</p> <p>() 3 – Desgostei moderadamente</p> <p>() 2 – Desgostei muito</p> <p>() 1 – Desgostei muitíssimo</p>

Em relação a intenção de compra desse produto:

() Decididamente eu compraria

() Provavelmente eu compraria

() Talvez sim/ Talvez não

() Provavelmente eu não compraria

() Decididamente eu não compraria

Comentários:

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.**