



## DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS EM GRÃOS DE AMENDOIM INOCULADOS ARTIFICIALMENTE COM *Aspergillus parasiticus* EM FUNÇÃO DE DIFERENTES PERÍODOS DE INCUBAÇÃO<sup>1</sup>

Pollyne Borborema Alves de Almeida<sup>1</sup>; Tatiana Silva Santos<sup>2</sup>; Wirton Macedo Coutinho<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista CNPq, graduada em Ciências Bilógicas - pollynecaroca@hotmail.com; <sup>2</sup>Doutoranda na UFCG – tatsilvasantos@hotmail.com; <sup>3</sup>Pesquisador da Embrapa Algodão - [wirton@cnpa.embrapa.br](mailto:wirton@cnpa.embrapa.br)

**RESUMO** – Objetivou-se neste trabalho avaliar o nível de contaminação de aflatoxinas em grãos de amendoim inoculados artificialmente com uma cepa toxicogênica de *Aspergillus parasiticus* em função de diferentes períodos de incubação. Os grãos de amendoim foram previamente irradiados com irradiação gama (<sup>60</sup>CO) na dose de 25 kGy (Kilograys) e inoculados artificialmente com inóculo em pó de *A. parasiticus* na concentração de  $30 \times 10^5$  esporos/g de caolim em pó. Para simular as condições ideais de umidade e temperatura à produção de micotoxinas por fungos toxicogênicos, 800 g de grãos de amendoim foram fracionados em porções de 200 g e acondicionados em dessecadores contendo solução salina saturada de nitrato de potássio - KNO<sub>3</sub> (93,58% UR) no interior de câmaras BOD ajustadas à temperatura de 30°C e fotoperíodo de 12 horas, durante 28 dias. A cada sete dias de incubação foi realizado o teste de sanidade dos grãos, extração, identificação e quantificação das aflatoxinas associadas. O isolado testado não produziu aflatoxinas aos 7 dias de incubação; aos 14 dias, *A. parasiticus* produziu apenas as aflatoxinas B<sub>1</sub> (6,0 µg.kg<sup>-1</sup>) e G<sub>1</sub> (5,1 µg.kg<sup>-1</sup>). A partir de 21 dias de incubação, o isolado de *A. parasiticus* sintetizou elevadas concentrações das aflatoxinas B<sub>1</sub> – 21 dias (86,7 µg.kg<sup>-1</sup>), 28 dias (960,0 µg.kg<sup>-1</sup>); G<sub>1</sub> – 21 dias (89,1 µg.kg<sup>-1</sup>), 28 dias (505,6 µg.kg<sup>-1</sup>); e G<sub>2</sub> – 21 dias (27 µg.kg<sup>-1</sup>), 28 dias (713,3 µg.kg<sup>-1</sup>). A aflatoxina B<sub>2</sub> não foi detectada nos grãos de amendoim utilizados neste estudo.

**Palavras-chave** – *Arachis hypogaea*, Micotoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

### INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são as principais micotoxinas e representam o maior perigo associado à cadeia produtiva do amendoim. São produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* Link e *A. parasiticus* Speare em condições favoráveis de umidade e temperatura (CAST, 2003).

A contaminação por aflatoxinas em amendoim é decorrente principalmente de falhas no controle da umidade e temperatura, tanto na produção quanto no armazenamento, que favorecem o desenvolvimento de fungos toxicogênicos. No campo de produção, as micotoxinas podem ser

<sup>1</sup> Embrapa Algodão / PIBIC





produzidas quando ocorrem elevadas temperaturas e estresse hídrico prolongado durante as últimas três a seis semanas do ciclo da cultura, enquanto no armazenamento a produção desses metabólitos secundários é favorecido pelo alto teor de umidade dos grãos (FONSECA, 2009).

Apesar do avanço em relação ao conhecimento dos fatores que favorecem a produção de aflatoxinas, pouco se sabe a partir de quanto tempo após a infecção por fungos toxicogênicos são produzidas as micotoxinas. Essa informação é importante para que se possam definir estratégias de controle de micotoxinas, desde o manejo da cultura no campo de produção até a seleção de genótipos resistentes aos fungos toxicogênicos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o nível de contaminação de aflatoxinas em grãos de amendoim inoculados artificialmente com *A. parasiticus* em função de diferentes períodos de incubação.

## METODOLOGIA

O estudo foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Algodão. Foram utilizados grãos de amendoim da cultivar BRS Havana (safra 2006/2007) irradiados com radiação gama, na dose de 25 kGy (Kilogray), para eliminar todos os microrganismos associados.

Os grãos foram previamente analisados quanto à contaminação por micotoxinas, não sendo detectadas aflatoxinas associadas e, em seguida inoculados com uma cepa toxicogênica de *A. parasiticus* (#IMI242625), produtora das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, na forma de pó. O inóculo foi preparado utilizando esporos desidratados do fungo misturado à caolim em pó, conforme metodologia descrita por Andrade (2008). Utilizou-se 1 g do inóculo em pó de *A. parasiticus*, ajustado para 30 x 10<sup>5</sup> esporos/g de caolim para cada 1 kg de grãos de amendoim.

Os grãos de amendoim foram incubados em condições de umidade e temperatura ótimas para produção de micotoxinas, ou seja, umidades relativas do ambiente superiores a 85% e temperaturas de 30 °C ± 2 °C. Para simular essas condições, 800 g de grãos foram fracionados em porções de 200 g e acondicionados em dessecadores contendo solução salina saturada de nitrato de potássio - KNO<sub>3</sub> (93,58% UR) no interior de câmaras BOD ajustadas à temperatura de 30°C e fotoperíodo de 12 horas, durante 28 dias. Aos 7, 14, 21 e 28 dias foram realizados testes para avaliação da sanidade e detecção e quantificação das aflatoxinas associadas aos grãos





## Teste de sanidade

Para avaliação da sanidade, 100 grãos de cada tratamento foram distribuídos em placas de Petri esterilizadas de 9,0 cm de diâmetro (10 grãos/placa de Petri), contendo 20 mL de meio Czapeck Ágar previamente esterilizado. As placas contendo os grãos foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Após esse período, foi realizada a identificação e a contagem dos grãos contaminados com *A. parasiticus* e outros fungos associados, examinando individualmente as sementes ao microscópio estereoscópico

## Extração, identificação e quantificação das aflatoxinas

Para cada tratamento empregado (dias de incubação) foram utilizados 200 g de grãos de amendoim, os quais foram moídos e peneirados em malha de 20 Mesh. Depois de peneirado, cada tratamento foi acondicionado em embalagem hermeticamente fechada e mantidas em freezer ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até a realização da extração.

Para as extrações das aflatoxinas foi adotada a metodologia descrita em Brasil (2000) modificado (IN nº. 09, de 24 de março de 2000, DOU Seção 1, p. 35-41, 30 mar. 2000).

A análise das aflatoxinas nos grãos foi realizada por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se cromatofolhas de alumínio da marca Merck (KIESEL GEL-60 / 1.05553), com comprimento e largura de 10 cm e espessura de 0,2 mm.

Nas cromatofolhas foram aplicados 6  $\mu\text{L}$  das amostras e 3, 4 e 6  $\mu\text{L}$  dos padrões B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> (15  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) e B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> (10  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), distribuídos em pontos previamente marcados nas cromatoplaças. Após a aplicação dos padrões e das amostras foi realizada a eluição bidirecional, utilizando-se para isso uma cuba de vidro com clorofórmio:acetona (9:1) e, em seguida, outra cuba contendo o eluente tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (5:4:1). Após a eluição, a cromatofolha foi retirada da cuba e, após a evaporação da solução, a mesma foi colocada em câmara com luz ultravioleta de 366 nm para a observação da presença de manchas fluorescentes indicativas de aflatoxinas.

A concentração de cada aflatoxina detectada foi calculada de acordo com a fórmula:

$$C = \frac{Y \cdot S}{V \cdot X} \cdot W$$

Em que: **Y** = concentração do padrão de aflatoxina ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); **S** = volume em  $\mu\text{L}$  do padrão da toxina com fluorescência equivalente à amostra; **V** = volume final do extrato da amostra em  $\mu\text{L}$ ; **X** = volume aplicado do extrato (amostra) em  $\mu\text{L}$ ; **W** = massa da amostra em gramas no extrato final.





## Análise estatística

Utilizou o delineamento em blocos ao acaso com quatro tratamentos (períodos de armazenamento – 7, 14, 21 e 28 dias) e cinco repetições, sendo cada unidade amostral composta por 200 g de grãos de amendoim moído. Em razão de não se ter verificado homogeneidade de variâncias, as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se modelos lineares generalizados, por meio da rotina GENMOD do sistema estatístico SAS® versão 9.1.3 (SAS Institute, Inc. Care, NC, USA). As análises de *deviance* (testes de razão de verossimilhanças para as fontes de variação controladas no modelo) foram realizadas de forma sequencial (tipo I).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação artificial de *A. parasiticus* foi eficaz na contaminação e/ou infecção de 100% dos grãos (Tabela 1). Apenas três das quatro aflatoxinas analisadas foram detectadas - B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (Figura 1). A aflatoxina B<sub>2</sub> não foi constatada nos grãos analisados.

Na avaliação da contaminação por aflatoxinas, verificaram-se diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,001$ ) entre os tratamentos estudados (períodos de incubação de 7, 14, 21 e 28 dias), tanto na detecção quanto na quantificação das aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> associadas aos grãos. A concentração ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) das aflatoxinas detectadas variou em função do período de incubação.

Não se constatou contaminação por aflatoxinas nos grãos com 7 dias de incubação. Aos 14 dias de incubação, constatou-se contaminação dos grãos apenas com as aflatoxinas B<sub>1</sub> ( $6,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e G<sub>1</sub> ( $5,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Com esses níveis de contaminação, o lote não seria descartado para o consumo humano, uma vez que o Ministério da Saúde determina o limite máximo de contaminação de  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para o somatório das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (BRASIL, 2002).

Aos 21 dias de incubação dos grãos, houve um aumento significativo no nível de contaminação das aflatoxinas B<sub>1</sub> ( $86,7,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e G<sub>1</sub> ( $89,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), assim como a detecção da aflatoxina G<sub>2</sub> ( $27,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), o que implicaria no descarte do lote para o consumo, segundo os padrões de contaminação estipulados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2002). Aos 28 dias de incubação, houve um incremento da contaminação dos grãos de forma exponencial, com níveis elevados – B<sub>1</sub> ( $960,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), G<sub>1</sub> ( $505,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e G<sub>2</sub> ( $713,3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Nesse período de incubação verificou-se abundante crescimento do fungo *A. parasiticus* sobre os grãos de amendoim.

A produção de micotoxinas por espécies de *Aspergillus* tem sido extensivamente estudada em diferentes condições de umidade e temperaturas; entretanto, poucos estudos têm sido realizados para





se determinar o tempo que fungos toxicogênicos demandam para produzir micotoxinas em condições ótimas de umidade e temperatura para o seu desenvolvimento. A maioria dos estudos tratam da produção de micotoxinas em meios de cultura sintéticos ou semi sintéticos e não sobre grãos.

Dentre os trabalhos realizados com grãos, destaca-se o de Winn e Lane (1978), que inocularam grãos de milho e sorgo com uma cepa toxicogênica de *A. flavus*, incubaram à 25 °C e 30 °C em ambiente com umidade relativa de 90%, durante 48 e 72 horas, e constataram a produção das aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> nesse curto período de incubação.

Em um outro estudo, Diener e Davis (1968) detectaram elevados índices de aflatoxinas em grãos de amendoim inoculados com *A. parasiticus* e incubados durante 7 e 15 dias em temperaturas de 25 °C e 30 °C. Os resultados obtidos por esses autores diferem dos resultados obtidos neste estudo, quando não foram detectadas aflatoxinas associadas aos grãos de amendoim inoculados com um isolado de *A. parasiticus* incubados por um período de 7 dias. Esse resultado contrastante pode está relacionado à fatores genéticos, como a capacidade em produzir micotoxinas de cada isolado fúngico.

Em vários outros estudos tem se constatado considerável variação na capacidade para produzir aflatoxinas pelas diversas linhagens do grupo *A. flavus*, mesmo quando são isoladas da mesma fonte (LEAICH; PAPA, 1974; MOREAU, 1979; TANIWAKI et al.,1993). A produção de aflatoxinas também varia quantitativamente de cultura para cultura, e isolados toxigênicos crescidos no mesmo substrato, e sob as mesmas condições, podem produzir aflatoxinas variando de 100 a 2000 mg.g<sup>-1</sup> de substrato (MURAKAMY et al., 1966).

Baseado nos resultados obtidos neste estudo e comparando com os vários outros que também estudaram a influência do período de incubação na produção de aflatoxinas por fungos toxicogênicos (DIENER; DAVIS, 1966; WINN; LANE, 1978), constata-se que o tempo demandado por fungos toxicogênicos para produção de micotoxinas é bastante variável. Vários fatores, dentre os quais a susceptibilidade do substrato à colonização do fungo produtor e fatores biológicos, como capacidade genética do fungo em produzir micotoxinas e quantidade de esporos viáveis, podem interferir no tempo demandado para produção destas micotoxinas.





## CONCLUSÕES

- O isolado testado não produziu aflatoxinas aos 7 dias de incubação;
- Aos 14 dias de incubação, o isolado de *A. parasiticus* utilizado sintetizou apenas as aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> em níveis de contaminação abaixo dos padrões estipulados pelo Ministério da Saúde para descarte do consumo humano,
- Nos períodos de incubação de 21 e 28 dias, grandes quantidades das aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> foram produzidas pelo isolado de *A. parasiticus* testado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, Daniele D. **Inoculação de grãos de amendoim com esporos de fungos toxicogênicos veiculados por caolim em pó**. 2008. 35p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.
- BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 274 de 15 de out. de 2002. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, out. 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 9, de 24 de março de 2000. Aprova os métodos analíticos de referência para análise de micotoxinas em produtos, subprodutos e derivados de origem vegetal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 30 mar. 2000.
- CAST. **Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems**. RICHARD, J. L.; PAYNE, G. A. (Ed.), CAST, 2003. 199 p. (Task Force Report, No. 139).
- DIENER, U. L.; DAVIES, N. D. Effect of environment on aflatoxin production in freshly dug peanuts. **Tropical Science**, v.10, p 22-25. 1968.
- FONSECA, H. Preservação e controle de micotoxina em produtos agrícolas. (Boletim Técnico, 7). Disponível em: < [www.micotoxinas.com.br](http://www.micotoxinas.com.br)>. Acesso em: 10 jun. 2009.
- LEAICH, L. L.; PAPA, K. E. Aflatoxins in mutants of *Aspergillus flavus*. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 52, p. 223-229, 1974.
- MOREAU, C. **Moulds, Toxins & Food**. Chichester: John Wiley, 1979. 477 p.





MURAKAMY, H.; OUWAKI, K.; TAKASE, S. Aflatoxin strain, ATCC 15517. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 12, p. 195-206, 1966.

TANIWAKI, M. H.; FONSECA, H.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Variabilidade de produção de aflatoxinas por linhagens de *Aspergillus flavus* em diferentes tempos de manutenção. **Scientia Agricola**, v. 1, p.140-150, 1993.

WINN, R. T.; LANE, G. T. Aflatoxin production on high moisture corn and sorghum with a limited incubation. **Journal of Dairy Science**, v. 61, n. 6, p. 762-764, 1978.

Tabela 1 – Micoflora associada aos grãos de amendoim inoculados artificialmente com *A. parasiticus* em diferentes períodos de incubação submetidos ao teste de sanidade em meio Czapeck Ágar.

Incubação (dias)	Micoflora (%)		
	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. niger</i>	<i>Penicillium</i> spp.
7	100,0	9,0	32,0
14	100,0	29,0	41,0
21	100,0	0,0	0,0
28	100,0	24,0	9,0

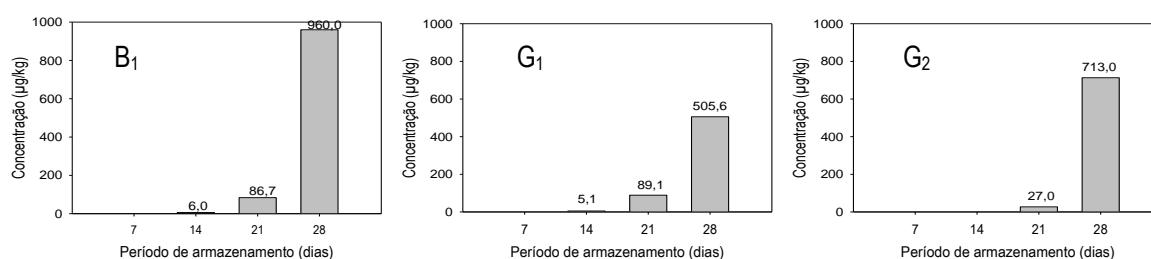


Figura 1 – Concentração das aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em grãos de amendoim inoculados artificialmente com *A. parasiticus* em diferentes períodos de incubação.

