

TESTE PRELIMINAR DE RESISTÊNCIA DE DOIS GENÓTIPOS  
DE AMENDOIM, 2117 E TATU VERMELHO,  
COM RELAÇÃO À PRODUÇÃO DE AFLATOXINA B<sub>1</sub>  
POR UMA ESPÉCIE TOXIGÊNICA DE *Aspergillus flavus* Link.

Guilherme PRADO<sup>1</sup>  
Ignácio José de GODOY<sup>2</sup>  
Marize Silva de OLIVEIRA<sup>1</sup>  
Jovita Eugênia GAZZINELLI-MADEIRA<sup>1</sup>  
Roberto Gonçalves JUNQUEIRA<sup>3</sup>  
Solange Oliveira FERREIRA<sup>4</sup>

RIALA 6/818

G. PRADO; I.J. GODOY; M.S. OLIVEIRA; J.E. GAZZINELLI-MADEIRA; R.G. JUNQUEIRA; S.O. FERREIRA;  
Teste Preliminar de Resistência de dois Genótipos de Amendoim, 2117 e Tatu Vermelho, com relação à Produção de Aflatoxina B<sub>1</sub> por uma espécie Toxigênica de *Aspergillus flavus* Link. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 56 (2): 71-74, 1996.

RESUMO: Um teste inicial de resistência à contaminação com aflatoxina B<sub>1</sub> foi realizado em dois genótipos de amendoim, Tatu Vermelho, o mais plantado no Brasil, e 2117, originário da Índia. Ambos os genótipos foram cultivados no Instituto Agrônomo de Campinas (1995/1996). Após colheita e autoclavagem foram inoculados com *Aspergillus flavus* IMI 190443, forte produtor de aflatoxina B<sub>1</sub>. A produção da toxina no genótipo 2117 foi 2 a 14 vezes menor que no genótipo Tatu Vermelho nos primeiros 14 dias após a inoculação, tornando-se praticamente equivalente no 21º dia.

DESCRITORES: Amendoim; genótipos; resistência; *Aspergillus flavus*; aflatoxina B<sub>1</sub>.

## INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, ocorrendo após a fase de crescimento exponencial desses fungos<sup>3,4</sup>, podendo contaminar as culturas no campo, os grãos durante o armazenamento os produtos alimentícios destinados ao consumo humano, apresentando atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica<sup>18</sup>.

No Brasil, a maior contaminação com aflatoxinas ocorre em amendoim e milho<sup>2</sup>, sendo a temperatura entre 24 e 30°C e atividade de água superior a 0,86 os principais fatores para a sua biossíntese pelos fungos<sup>2,13,8,1</sup>.

Métodos para a destruição de aflatoxina não são totalmente efetivos<sup>7</sup>, e além disso, causam alterações

indesejáveis nos alimentos, tais como, perda de substâncias nutritivas e mudanças no aroma e sabor<sup>14</sup>. Dessa forma, alternativas baseadas na prevenção da contaminação por fungos e a conseqüente produção de aflatoxinas são, na atualidade, linhas de pesquisa de grande importância prática. Dentro desse contexto, a descoberta de novos genótipos de amendoim resistentes à contaminação surge como uma outra opção<sup>17,6,5,10</sup>. Alguns genótipos resistentes apresentam, no entanto, baixa produtividade e instabilidade desta resistência frente a fatores climáticos e geográficos<sup>14</sup> estimulando a procura de novos genótipos.

O objetivo do presente trabalho foi verificar a produção de aflatoxina B<sub>1</sub> pelo *Aspergillus flavus* IMI 190443, após inoculação em dois genótipos de amendoim: Tatu Vermelho, o mais plantado no Brasil e o 2117, originário da Índia.

1. Divisão de Bromatologia e Toxicologia - Fundação Ezequiel Dias - Rua Conde Pereira Carneiro, 80. Gameleira - Belo Horizonte/Minas Gerais - 30510-010

2. Instituto Agrônomo de Campinas.

3. Departamento de Alimentos - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

4. Bolsista de Aperfeiçoamento Científico da FAPEMIG.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Planejamento experimental

O plantio foi executado no Centro Experimental de Campinas, no dia 13/11/95, em solo classificado como Latossolo Roxo. O delineamento do ensaio foi em blocos ao acaso com 4 repetições. A área útil foi de 8,4 m<sup>2</sup> (3 linhas de 4 metros). A colheita foi efetuada em 04/03/96.

### 2.2 Genótipos estudados

Foram plantados os genótipos: Tatu Vermelho, comercialmente plantado em São Paulo, e o 2117, introduzido na Índia no ICRISAT ( International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics). Ambos pertencem ao grupo ereto/precoce.

### 2.3 Dados climáticos

Durante o ensaio, o índice pluviométrico de novembro/1995 a março/1996 foi de 388,6mm. A temperatura máxima alcançada foi de 34,2°C e a mínima de 14,6°C.

### 2.4 Amostragem

Uma amostra de cada genótipo foi formada a partir da mistura de grãos de quatro áreas cultivadas (vide item 2.1). Para o laboratório foram enviados 3,0 Kg de cada genótipo.

### 2.5 Preparo das amostras

Para a determinação inicial de aflatoxinas (verificação de contaminação durante o cultivo e pós-colheita) as amostras foram moídas e homogeneizadas. Posteriormente, foram passadas em peneira de abertura 20 mesh. Seguiu-se quarteamento até 1,0 Kg.

Para a determinação de aflatoxinas, após inoculação de uma cepa de *Aspergillus flavus*, grãos de amendoim foram previamente autoclavados a 121°C por 20 minutos para destruição da microbiota natural<sup>9</sup>.

### 2.6 Microrganismo

Foi utilizada uma cepa de *Aspergillus flavus* IMI 190443, isolado de pistache da Turquia, forte produtora de aflatoxina B<sub>1</sub>, do International Mycological Institute (Inglaterra).

### 2.7 Metodologia

#### 2.7.1 De inoculação da cepa de *Aspergillus flavus* IMI 190443

O *Aspergillus flavus* IMI 190443 foi inoculado em placa de Petri contendo o meio de AB (ágar, batata e glicose). Seguiu-se incubação por 7 dias a 37°C. Após a esporulação, uma alça de platina cheia de esporos foi colocada em um tubo de Eppendorf, contendo aproximadamente 2 mL de Tween 0,1%, e agitado por 1 minuto para dispersão dos esporos. Transferiu-se então 200 µl desta suspensão para um erlenmeyer de 250 mL, contendo 25 mL do meio de AB solidificado. Incubou-se a 37°C por 7 dias para esporulação. Adicionou-se 20 mL de Tween 0,1% no frasco e 10 pérolas de vidro. Agitou-se gentilmente e pipetou o sobrenadante para um outro erlenmeyer. O número de esporos/mL da suspensão foi calculado e ajustado para 10<sup>3</sup> esporos/mL. A contagem e o cálculo do número de esporos/mL foi feito através da Câmara de Neubauer. Para a

inoculação, utilizou-se 5 mL dessa suspensão para 15g de amendoim previamente autoclavado, em duplicata, como descrito no item 2.5. Seguiu-se incubação por 21 dias a 25°C. Após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14 e 21 dias as amostras foram retiradas e analisadas para a quantificação de aflatoxina B<sub>1</sub>.

#### 2.7.2 Da determinação de aflatoxinas

Foi utilizado o método descrito por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA<sup>16</sup> para a quantificação de aflatoxina B<sub>1</sub> nas amostras iniciais e após inoculação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de aflatoxina B<sub>1</sub> obtida nos dois genótipos de amendoim, Tatu Vermelho e 2117, após inoculação com *Aspergillus flavus* IMI 190443 e incubados a 25°C, são mostrados na TABELA 1 e GRÁFICO 1. Observa-se que os valores encontrados foram elevados, que podem ser explicados pela força toxigênica do fungo, condições adequadas de temperatura e umidade utilizadas e ausência de uma microbiota natural competitiva destruída pelo aquecimento.

Verificou-se que em todos os tempos de incubação analisados os valores de aflatoxina B<sub>1</sub> encontrados no genótipo 2117 foram inferiores aos do genótipo Tatu Vermelho, e que os níveis neste genótipo foram bem superiores, atingindo às vezes o dobro ou o triplo do encontrado no 2117, revelando uma maior resistência desse genótipo à produção de aflatoxina B<sub>1</sub> pelo *Aspergillus flavus* IMI 190443 ou uma menor adaptação do fungo ao genótipo 2117. Estudos *in vitro* com outras cepas, de igual toxigenicidade, com amostras *in natura* e autoclavadas poderão explicar os resultados obtidos.

O teor máximo de aflatoxina B<sub>1</sub> encontrado nos genótipos 2117 e Tatu Vermelho, após 10 e 14 dias de incubação a 25°C, foi 41836 e 144032 µg/Kg, respectivamente, sendo que o decréscimo dos níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> surgiu na variedade 2117 entre o décimo e o décimo quarto dia de incubação, enquanto na Tatu Vermelho entre o décimo quarto dia e o vigésimo primeiro dia. Resultados semelhantes estão descritos na literatura. PREVIDI & CASOLARI<sup>11</sup> trabalhando com algumas cepas toxigênicas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* verificaram que a maior produção de aflatoxinas ocorria aos 14 dias de incubação a 25°C, ocorrendo um decréscimo aos 21 e 28 dias. SHARMA *et alii*<sup>15</sup> notaram também uma maior produção de aflatoxinas pelo *Aspergillus parasiticus* NRRL 3145, em concentrações de esporos/mL de 10<sup>1</sup> a 10<sup>6</sup>, em meio de cultura, após 14 dias de incubação a 25°C. WLOSTOWSKI *et alii*<sup>9</sup> relataram uma maior produção de aflatoxinas após 8 dias de incubação do *Aspergillus parasiticus* E-37 em meio de cultura a 28°C. PRADO<sup>9</sup> verificou uma maior produção de aflatoxina B<sub>1</sub> em amendoim em grão, após 7 dias de incubação do *Aspergillus flavus* NRRL 6513, em uma concentração de 10<sup>6</sup> esporos/mL.

O fato do genótipo 2117, originário da Índia, apresentar uma maior resistência à contaminação com aflatoxina B<sub>1</sub>, quando comparado ao Tatu Vermelho,

TABELA 1

Níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> de dois genótipos de amendoim, Tatu Vermelho e 2117, inoculados com *Aspergillus flavus* IMI 190443 e incubados a 25°C por 1 a 21 dias.

Tempo de incubação (Dias)	Genótipos	
	Tatu Vermelho	2117
	Aflatoxina B <sub>1</sub> (µg/kg) <sup>a</sup>	
1	27	13
2	19	7
3	77	30
4	930	114
5	39510	2707
6	58880	5811
7	53715	8780
8	51649	21176
9	71275	27890
10	108462	41836
14	144032	38736
21	35831	25824

\* Média (duplicata).

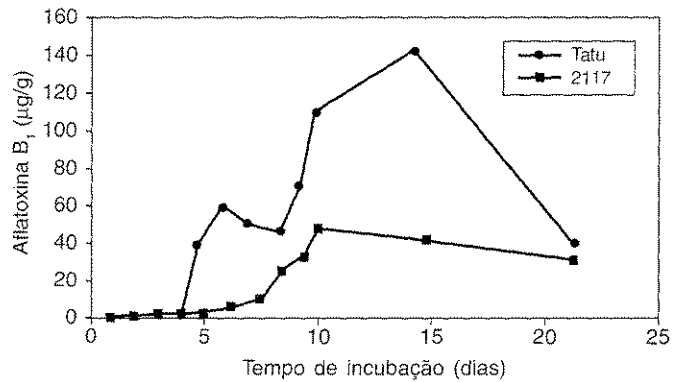


Gráfico 1 - Curva de produção de aflatoxina B<sub>1</sub> do *Aspergillus flavus* IMI 190443 nos genótipos de amendoim Tatu Vermelho e 2117.

o mais plantado no Brasil, adquire uma grande importância para a agricultura brasileira, pois não foi observada uma diferença significativa entre a produção dos dois genótipos: 3633 Kg/ha e 3272 Kg/ha, para o 2117 e o Tatu Vermelho, respectivamente (comunicação pessoal do Dr. Ignácio José de Godoy, Campinas, SP). Isso demonstra, que as nossas condições climáticas não afetaram as características do genótipo 2117, e que pode ser, no futuro, depois de outros ensaios experimentais, uma opção aos agricultores brasileiros.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram uma diferença clara no comportamento dos genótipos, Tatu Vermelho e 2117, com relação a produção de aflatoxina B<sub>1</sub> por

uma cepa toxigênica. O genótipo 2117, originário da Índia, apresentou nas mesmas condições experimentais níveis de aflatoxina B<sub>1</sub> inferiores aos encontrados no genótipo Tatu Vermelho, sugerindo uma maior resistência à contaminação quando comparado ao genótipo brasileiro.

Verificação da contaminação natural desses genótipos com aflatoxinas, no período pós-colheita e durante o armazenamento, em no mínimo três anos agrícolas, podem confirmar esse atributo do genótipo indiano e servir como alternativa aos produtores no Brasil.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio financeiro.

RIALA 6/818

G. PRADO; I.J. GODOY; M.S. OLIVEIRA; J.E. GAZZINELLI-MADEIRA; R.G. JUNQUEIRA; S.O. FERREIRA; Teste Preliminar de Resistência de dois Genótipos de Amendoim, 2117 e Tatu Vermelho, com relação à Produção de Aflatoxina B<sub>1</sub> por uma espécie Toxigênica de *Aspergillus flavus*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (2): 71-74, 1996.

ABSTRACT. PRELIMINARY RESISTANCE TESTING OF TWO PEANUTS GENOTYPES, 2117 AND TATU VERMELHO, IN RELATION TO AFLATOXIN B<sub>1</sub> PRODUCTION BY A TOXIGENIC STRAIN OF *Aspergillus flavus*. A preliminary test of resistance to aflatoxin contamination was conducted on two genotypes of peanuts, Tatu Vermelho, the most widely used in Brasil, and 2117, originated in Índia. Both genotypes were planted in test plots of the Instituto Agronômico de Campinas (1995/1996). After autoclaving samples of the genotypes were inoculated with *Aspergillus flavus* IMI 190443, a strong producer of aflatoxin B<sub>1</sub>. The production of the toxin was 2 to 14 times greater in Tatu Vermelho than in 2117 during the 14 days after inoculation but leveled off in the 21st day.

DESCRIPTORS: Peanuts; genotypes; resistance; *Aspergillus flavus*; aflatoxin B<sub>1</sub>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASEVEDO, I.G.; GAMBALÉ, W.; CORRÊA, B.; PAULA, C.R.; ALMEIDA, R.M.A.; FRAMIL, V.M.S. Influence of temperature and relative humidity in the production of aflatoxins in samples of stored maize, artificially contaminated with *Aspergillus flavus* (Link). *Rev. Microbiol.*, **24**: 32-37, 1993.
2. DIENER, U.I. & DAVIS, N. D. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. *J.Amer.Oil Chem. Soc.*, **44**: 259-263, 1967.
3. DUTTON, M.F. Enzymes and aflatoxin biosynthesis. *Microbiol. Rev.* **52**: 274-295, 1988.
4. ELLIS, W.O.; SMITH, J. P.; SIMPSON, B. K.; OLDHAM, J.H. Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **30**: 403-439, 1991.
5. MEHAN, V.K.; MCDONALD, D.; RAMAKRISHNA, N. Varietal resistance in peanut to aflatoxin production. *Peanut Sci.*, **13**: 7-10, 1986.
6. MIXON, A. C.; Reducing *Aspergillus flavus* infection of peanut seed using resistant genotypes. *J. Environ. Qual.*, **15**: 101-103, 1986.
7. MOSS, M.O.; Mycotoxins of *Aspergillus* and other filamentous fungi. In: *FILAMENTOUS FUNGI IN FOODS AND FEEDS*. Oxford: Blackwell Scientific. 1989. 149p. p.69-81.
8. PRADO, G.; MARTINS VIEIRA, M.B.C.; NICÁCIO, M. A. S. ; GLÓRIA, M. B. A. Efeito da umidade relativa na contaminação microbiana e produção de aflatoxinas em amendoim em grão. *Ciê. Tecnol. Alim.*, **11**: 264-273, 1991.
9. PRADO, G. *Influência de alumínio, ferro, níquel e zinco na produção de aflatoxina B, pelo Aspergillus flavus NRRL 6513 em amendoim (Arachis hypogaea L.) - variedade Tatu Vermelho*. Dissertação. Mestrado em Ciência de Alimentos. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia. 1992. 110p.
10. PRADO, G.; GODOY, I. J.; OLIVEIRA, M. S.; MARTINS VIEIRA, M. B. C. Influência de ferro na biossíntese de aflatoxina B, pelo *Aspergillus flavus* NRRL 5940 em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) variedades Tatu Vermelho e VRR-245. *Ciê. Tecnol. Aliment.*, **16**: 22-25, 1996.
11. PREVIDI, P. & CASOLARI, A. Aflatoxigenicity in ceppi del gruppo *Aspergillus flavus*. *Ind. Conser.*, **60**: 102-106, 1985.
12. SABINO, M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Mycotoxin research in Brazil. *Ciê. Cult.*, **45**: 359-371, 1993.
13. SCHINDLER, A.F.; PALMER, J.G.; EISENBERG, W. V. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. *Appl. Microb.*, **15**: 1006-1009, 1967.
14. SCHMIDT, F.R. & ESSER, K. Aflatoxins: medical, economic impact, and prospects for control. *Process Biochem.*, **20**: 167-174, 1985.
15. SHARMA, A.; BEHERE, A.G.; PADWAL-DESAI, S.R.; NADKARNI, G.B. Influence of inoculum size of *Aspergillus parasiticus* spores on aflatoxin production. *Appl. Envir. Microb.*, **40**: 989-993, 1980.
16. SOARES, L.M.V. & RODRIGUES-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in Brazilian foods by using multi-toxin thin layer chromatographic methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**: 22-26, 1989.
17. WILSON, D.M. ; MIXON, A.C. ; TROEGER, J.M. Aflatoxin contamination of peanuts resistant to seed invasion by *Aspergillus flavus*. *Posth. Path. Mycot.*, **67**: 922-924, 1977.
18. WHO-Environmental Health Criteria 11: *Mycotoxins*. Geneva, World Health Organization, 1979. 127p.
19. WLOSTOWSKI, T.; BERNACKA, B.; PEPIŃSKI, W. The relationship of mycelial zinc to the aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Act. Microb. Pol.*, **38**: 37-43, 1989.

Recebido para publicação em 20/01/97