

EFEITO DO FERRO NA BIOSSÍNTESE DE AFLATOXINA B₁ POR *ASPERGILLUS FLAVUS* IMI 190443 APÓS INOCULAÇÃO EM DOIS GENÓTIPOS DE AMENDOIM

Guilherme PRADO¹
Ignácio José de GODOY²
Marize Silva de OLIVEIRA¹
Roberto Gonçalves JUNQUEIRA³
Jovita Eugênia Cruz GAZZINELLI-MADEIRA¹

RIALA 6/824

PRADO, GUILHERME e col. - Efeito do ferro na biossíntese de aflatoxina B₁ por *Aspergillus flavus* IMI 190443 após inoculação em dois genótipos de amendoim. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 35-39, 1998.

RESUMO: Avaliou-se a produção de aflatoxina B₁ pelo *Aspergillus flavus* IMI 190443 em sementes de amendoim, genótipos Tatu Vermelho e VRR-245, cultivados no Centro Experimental do Instituto Agronômico de Campinas em 1994/1995 e submetidos a adubação com sulfato ferroso. Após a colheita, os grãos de amendoim foram previamente autoclavados a 121 °C por 20 minutos, e inoculados com uma suspensão de esporos do *Aspergillus flavus* IMI 190443, em três concentrações: 10³, 10⁴ e 10⁵ esporos/mL. Observou-se uma menor produção de aflatoxina B₁ no genótipo VRR-245, independente da concentração de esporos de *Aspergillus flavus* IMI 190443 (10³, 10⁴ e 10⁵ esporos/mL) e do tratamento com e sem sulfato ferroso (p<0,05), quando comparado ao Tatu Vermelho. Verificou-se uma menor contaminação com aflatoxina B₁ nos genótipos Tatu Vermelho e VRR-245, após adubação e inoculação com *Aspergillus flavus* IMI 190443, apenas na concentração de 10³ esporos/mL.

DESCRITORES: Amendoim; *Aspergillus flavus*; aflatoxina B₁; adubação; sulfato ferroso.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, ocorrendo após a fase de crescimento exponencial dos fungos^{2,3} podendo contaminar as culturas no campo, os grãos durante o armazenamento e os produtos alimentícios destinados ao consumo humano, apresentando atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica¹⁸.

A contaminação dos alimentos com fungos toxigênicos está geralmente relacionada com condições ambientais de cultivo e armazenamento. Segundo ELLIS *et alii*³ os principais fatores que regulam o crescimento do fungo e produção de aflatoxina podem ser ambientais (temperatura, atividade de água, intensidade de luz, pH), químicos (tipo

de substrato, tipo de nutrientes, agentes antifúngicos) e biológicos (variabilidade da linhagem e competição com a microflora).

No Brasil, o número de trabalhos que abordam a contaminação de aflatoxinas em amendoim é muito maior quando se compara com outros substratos¹⁶, sendo que o processo de produção de aflatoxinas pode ser interrompido mediante aquecimento ou refrigeração⁷. Entretanto, métodos utilizados para a destruição da aflatoxina já elaborada não são totalmente efetivos⁸.

Dessa forma, alternativas voltadas para a prevenção da contaminação dos alimentos e a produção de aflatoxinas são linhas de pesquisa em desenvolvimento, como: novos genótipos de amendoim resistentes à infecção do fungo e à produção de aflatoxina⁵; práticas agrícolas recomendadas, como a irriga-

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

²Instituto Agronômico de Campinas - Caixa Postal 28 - Campinas/São Paulo - 13001-970

³Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais - Av. Olegário Maciel, 2360 - Belo Horizonte/MG.

ção adequada para manter a atividade de água do grão superior a 0,95, valor mínimo necessário para a formação dos estilbenos fitoalexinas, substâncias naturais de defesa das plantas contra a invasão fúngica^{1,9}, e a utilização de solos para cultivo de amendoim com maior retenção de água e menor aeração, onde os níveis de contaminação são menores^{6,13}.

A utilização de substâncias químicas para evitar a contaminação com fungos e/ou a produção de aflatoxinas é também objeto de estudos de alguns pesquisadores. GUPTA *et alii*⁴ e PRADO *et alii*^{11,12} observaram uma correlação entre níveis de metais e produção de aflatoxinas. REDING *et alii*¹⁵ notaram uma menor contaminação de amendoim com aflatoxinas, após inoculação com *Aspergillus parasiticus* NRRL 5139, quando solos foram suplementados com sulfato de cálcio em diferentes níveis. PRADO¹⁰ trabalhando com amendoim em grão, genótipo Tatu Vermelho, observou que alumínio, ferro, níquel e zinco, em diversas concentrações, inibia a produção de aflatoxina B₁ quando se inoculava o *Aspergillus flavus* NRRL 6513 a 26 °C durante 7 dias. E que o ferro, nas três concentrações estudadas (40, 80 e 160 µg/g) além de inibir a biossíntese de aflatoxina impedia totalmente o crescimento vegetativo do fungo.

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de Fe (II) na produção de aflatoxina B₁ pelo *Aspergillus flavus* IMI 190443, após adubação com sulfato ferroso, durante o plantio dos genótipos Tatu Vermelho, o mais plantado no Brasil, e VRR-245, originário da Índia e citado na literatura como resistente à produção de aflatoxina⁵.

MATERIAL E MÉTODOS

Planejamento experimental

O plantio foi executado no Centro Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas, no dia 19/11/94, em solo classificado como Latossolo Roxo. O ensaio foi implantado segundo o delineamento experimental em blocos casualizados em parcelas subdivididas, com 4 repetições. As subparcelas consistiram dos tratamentos com e sem adição de ferro, via adubação em cobertura com sulfato ferroso. As parcelas principais consistiram de dois genótipos de amendoim: Tatu Vermelho e VRR-245. Cada parcela experimental apresentava 5 linhas úteis de aproximadamente 50 plantas/linha, com espaçamento de 0,70 entre linhas. A área útil por parcela foi de 17,5 m². A colheita foi efetuada em 20/03/95.

Genótipos estudados

O genótipo Tatu Vermelho é do grupo Valência, largamente difundido nas regiões produtoras de amendoim do Brasil, principalmente no estado de São Paulo. As plantas

são de porte ereto, ciclo curto e produzem vagens com predominância de 3 a 4 sementes/vagem. O genótipo VRR-245 foi introduzido no ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics), Índia. É de ciclo curto, vagens com duas sementes pequenas, de película clara.

Tratamentos efetuados

Foram aplicados aos 35 dias do plantio (início do florescimento) 180Kg/ha de sulfato ferroso, o equivalente a 50Kg/ha de ferro. O modo de aplicação foi adubação em cobertura, consistindo em esparramar o produto no solo, ao longo da linha das plantas, próximo à região do colo, seguido de leve incorporação com solo.

Dados climáticos

Durante o ensaio, o índice pluviométrico de novembro/1994 a março/1995 foi de 1255,4 mm. A temperatura máxima alcançada foi de 35,4 °C e a mínima de 14,6 °C.

Amostragem

Foram obtidas amostras de cada genótipo, com e sem ferro, formadas a partir da mistura de grãos das respectivas quatro áreas cultivadas. Para o laboratório foi enviado, então, 5,0 Kg/amostra, em um total de 4 amostras.

Preparo das amostras

Para a determinação inicial de aflatoxinas e metais as amostras foram previamente moídas e homogeneizadas. Posteriormente, foram passadas em peneira plástica de abertura 20 mesh. Seguiu-se quarteamento até 1,0 Kg.

Para a determinação da atividade de água utilizou-se grãos inteiros, sem nenhum tratamento prévio.

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 a destruição da microbiota natural.

Cepa de *Aspergillus flavus*

Foi utilizada uma cepa de *Aspergillus flavus* IMI 190443, isolada de pistache da Turquia, forte produtora de aflatoxina B₁, do International Mycological Institute (Inglaterra).

Metodologia

Determinação da atividade de água

Para a determinação da atividade de água, aproximadamente 10g de amostra foi picada e colocada no aparelho

“NOVASINA”, pré-calibrado com soluções salinas saturadas conforme orientação do fabricante.

Suspensão de esporos

Cepa de *Aspergillus flavus* IMI 190443 foi inoculada em placa de Petri contendo o meio de Ágar dextrose batata. 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 Ágar dextrose batata. 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 10³, 10⁴ e 10⁵ 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 4 repetições. Seguiu-se incubação por 7 dias a 25 °C.

Determinação de aflatoxinas

Foi utilizado o método descrito por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA¹⁷ para a quantificação de aflatoxina B₁ nas amostras iniciais e após inoculação e incubação.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados e submetidos à análise de variância, adotando o modelo fatorial 2x2, em que os fatores eram genótipo e adubação com e sem sulfato ferroso.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram detectadas aflatoxinas no início do experimento nas amostras analisadas, sendo que os valores de atividade de água variaram de 0,49 a 0,55, o que demonstra que todas as práticas agrícolas recomendadas para o cultivo do amendoim foram executadas.

Os elevados teores de aflatoxina B₁ obtidos na presente investigação (TABELA 1), podem ser atribuídos a potencialidade toxigênica da cepa utilizada, condições adequadas de temperatura e umidade utilizadas e ausência de uma microbiota natural competitiva destruída pelo aquecimento.

Independente do genótipo e do tratamento com e sem ferro, os maiores níveis de aflatoxina B₁ foram obtidos quando a concentração de esporos de *Aspergillus flavus* inoculada era de 10⁴ esporos/mL, observando-se um decréscimo nos teores de aflatoxina B₁ quando o tamanho do inóculo era de 10³ e 10⁵ esporos/mL.

Independente da concentração de esporos de *Aspergillus flavus* (10³, 10⁴ e 10⁵ esporos/mL) e o tratamento com e sem sulfato ferroso, os níveis de aflatoxina B₁ encontrados nos grãos do genótipo VRR-245 foram inferiores e variaram significativamente (p < 0,05) em relação aos determinados no Tatu Vermelho. Tais resultados confirmam o atributo do genótipo VRR-245 em apresentar uma maior resistência à produção de aflatoxinas^{5,14}.

Considerando-se a aplicação de sulfato ferroso em cada um dos genótipos estudados, observou-se que nos grãos de amendoim do genótipo Tatu Vermelho, inoculados com *Aspergillus flavus* (10³ esporos/mL), os valores de aflatoxina B₁ diferiram significativamente (p < 0,05), indicando um efeito positivo da adubação, visto que os valores encontrados de aflatoxina B₁ nas amostras tratadas com ferro foram praticamente a metade dos níveis determinados nas amostras sem ferro.

No genótipo VRR-245, não foi observado diferença significativa entre os níveis de aflatoxina B₁ nos grãos tratados e não tratados com ferro, indicando que talvez a

TABELA 1

Teores de aflatoxina B₁ de dois genótipos de amendoim, Tatu Vermelho e VRR-245, cultivados em latossolo roxo, com e sem adubação com sulfato ferroso, e inoculados com *Aspergillus flavus* IMI 190443.

Tratamentos	Aflatoxina B ₁ (µg/g)*		
	<i>A. flavus</i> IMI 190443 (esporos/mL)		
	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
Com adubação			
Tatu Vermelho	34,25 _b	88,30 _a	55,20 _a
VRR - 245	11,55 _c	56,28 _b	37,50 _b
Sem adubação			
Tatu Vermelho	63,30 _a	73,58 _a	55,75 _a
VRR - 245	14,33 _c	31,45 _c	30,90 _c

* Médias (4 repetições) seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo Teste F ao nível de 5% de probabilidade.

maior resistência natural desse genótipo tenha prevalecido, quando a concentração de esporos de *Aspergillus flavus* era de 10³ esporos/mL. Entretanto, em concentrações mais elevadas, 10⁴ e 10⁵ esporos/mL, os níveis de aflatoxina B₁ foram maiores nos grãos provenientes de solo adubado com ferro, ao nível de significância de 5%, indicando que a planta deve apresentar um limite natural de resistência e/ou que a adubação possa ter afetado sua fisiologia.

No genótipo Tatu Vermelho, não houve diferença significativa entre os níveis de aflatoxina B₁ encontrados nos grãos tratados e não tratados, quando a concentração de esporos de *Aspergillus flavus* era de 10⁴ e 10⁵ esporos/mL, indicando também que o efeito tamanho do inóculo tenha prevalecido sob o efeito tratamento com ferro.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos revelaram uma maior resistência do genótipo VRR-245, originária da Índia, em relação ao Tatu Vermelho, o mais cultivado no Brasil, quanto à produção de aflatoxina B₁, após inoculação com uma cepa

produtora, em condições ideais de temperatura e umidade. Pesquisas que envolvam verificação da contaminação natural dessas duas variedades com aflatoxina B₁, no período pós-colheita e durante o armazenamento, podem ratificar esse atributo do genótipo indiano e servir como alternativa aos produtores no Brasil.

A menor contaminação com aflatoxina B₁ do genótipo Tatu Vermelho, após adubação com sulfato ferroso e inoculação com *Aspergillus flavus* (10³ esporos/mL), é um dado promissor, mas que deve ser testado em outras condições experimentais para ratificar um possível efeito protetor do ferro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e ao Dr. Benedito Corrêa do Instituto de Ciências Biomédicas/USP pela determinação da atividade de água das amostras de amendoim.

RIALA 6/824

PRADO, GUILHERME et al. - Effect of iron on the biosynthesis of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus* IMI 190443 after inoculation in two peanuts genotypes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 57(1): 35-39, 1998.

SUMMARY: EFFECT OF IRON ON THE BIOSYNTHESIS OF AFLATOXIN B₁ BY *Aspergillus flavus* IMI 190443 AFTER INOCULATION IN TWO PEANUTS GENOTYPES. Production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus* IMI 190443 in peanuts seeds from Tatu Vermelho and VRR-245 genotypes was evaluated. They were raised in Campinas Experimental Center of Instituto Agrônomico during 1994/1995 and the ground was supplemented with iron sulfate. After harvested seeds were autoclaved at 121 °C for 20 minutes and inoculated with *Aspergillus flavus* spore suspension in three concentrations: 10³, 10⁴ e 10⁵ spores/mL. The production of aflatoxin B₁ was less in VRR-245 genotype even so the concentration of *Aspergillus flavus* was different (10³, 10⁴ e 10⁵ spores/mL) and the supplementation was with or without iron sulfate (p<0,05), when it is compared to Tatu Vermelho. A less amount of aflatoxin B₁ was found in Tatu Vermelho and VRR-245 genotypes when it was supplemented and inoculated with *Aspergillus flavus* only at the concentration of 10³ spores/mL.

DESCRIPTORS: Peanut; *Aspergillus flavus*; aflatoxin B₁; supplementation; iron sulfate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DORNER, U. L. ; COLE, R. J. ; SANDERS, T. H. ; BLANKENSHIP, P. D. Interrelationship of kernel water activity, soil temperature, maturity and phytoalexin production in preharvest aflatoxin of drought-stressed peanuts. *Mycopathol.*, 105: 117-128, 1989.
2. DUTTON, M. F. Enzymes and aflatoxin biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, 52: 274-295, 1988.
3. 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.
4. GUPTA, S. K. ; MAGGON, K. K. ; VENKITASUBRAMANIAN, T.A. Effect of zinc on adenine nucleotide pools in relation to aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32: 753-756, 1976.
5. MEHAM, V. K. ; MCDONALD, D. ; RAMAKRISHNA, N. Varietal resistance in peanut to aflatoxin production. *Peanut Sci.*, 13: 7-10, 1986.
6. MEHAN, V. K. ; MAYEE, C. D. ; JAYANTHI, S. ; MCDONALD, D. Preharvest seed infection by

- Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin contamination in groundnuts in relation to soil types. *Plant and Soil*, 136: 239-248, 1991.
7. MIROCHA, C. J. Historical aspects of mycotoxicology and developments in aflatoxicosis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS, 6-8 Sept. 1981, Cairo. *Proceedings ...* Cairo: Food and Drug Administration, 1983. 187p. p. 23-31.
 8. 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.
 9. MUSINGO, M. N. ; BASHA, S. M. ; SANDERS, T. H. ; COLE, R. J. ; BLANKENSHIP, P. D. Effect of drought and temperature stress on peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed composition. *J. Plant Phys.* , 134: 710-715, 1989.
 10. PRADO, G. *Influência de alumínio, ferro, níquel e zinco na produção de aflatoxina B₁ 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.
 11. PRADO, G. ; ALVAREZ-LEITE, E. M. ; MARTINS-VIEIRA, M. B. C. ; OLIVEIRA, M. S. Correlação entre níveis de metais e aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Bol. SBCTA*, 28: 33-40, 1994.
 12. PRADO, G. ; ALVARES-LEITE, E. M. ; MARTINS VIEIRA, M. B. C. ; OLIVEIRA, M. S. Influência de metais na produção de aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* , 15: 294-297, 1995.
 13. PRADO, G. ; MARTINS VIEIRA, M. B. C. ; OLIVEIRA, M. S. Contaminação fúngica e níveis de aflatoxinas em amendoim recém-colhido cultivado em dois tipos de solo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 16: 72-74, 1996.
 14. PRADO, G. ; GODOY, I. J. ; OLIVEIRA, M. S. ; MARTINS VIEIRA, M. B. C. Influência de ferro na biossíntese de aflatoxina B₁ pelo *Aspergillus flavus* NRRL 5940 em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) variedades Tatu Vermelho e VRR-245. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* , 16: 22-25, 1996.
 15. REDING, C. L. C. ; HARRISON, M. A. ; KVIEN, C. K. *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin synthesis on florunner peanuts grown in gypsum-supplemented soil. *J. Food Protec.* , 56: 593-611, 1993.
 16. SABINO, M. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Mycotoxin research in Brazil. *Ciênc. Cult.* , 45: 359-371, 1993.
 17. SOARES, L. M. V. & RODRIGUEZ-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.
 18. WHO- Environmental Health Criteria 11: *Mycotoxins*. Geneve, Word Health Organization, 1979. 127p.

Recebido para publicação em 16/04/97

