**AVALIAÇÃO EM LABORATÓRIO DO CONTROLE
QUÍMICO DA PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS NO
AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.) EM CASCA**

MARIA ANTONIA CALORI - DOMINGUES

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 1993**

**AVALIAÇÃO EM LABORATÓRIO DO CONTROLE
QUÍMICO DA PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS NO
AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.) EM CASCA**

MARIA ANTONIA CALORI - DOMINGUES
(Engenheira Agrônoma)

Orientador: Prof. Dr. HOMERO FONSECA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 1993

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP**

Calori-Domingues, Maria Antonia
C165a Avaliação em laboratório do controle químico da
 produção de aflatoxinas no amendoim (*Arachis hypogaea*
 L.) em casca. Piracicaba, 1993.
 57p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Aflatoxina em amendoim - Controle químico
2. Amendoim - Toxicologia I. Escola Superior de Agri-
cultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 664.726

AVALIAÇÃO EM LABORATÓRIO DO CONTROLE QUÍMICO DA PRODUÇÃO
DE AFLATOXINAS NO AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.) EM CASCA

Maria Antonia Calori-Domingues

Aprovada em 26.02.1993

Comissão Julgadora

Prof.Dr. Homero Fonseca

ESALQ/USP

Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo

ESALQ/USP

Prof. Dr. José Otávio Machado Menten

ESALQ/USP

Prof. Dr. Homero Fonseca

Aos meus pais,
Geraldo ("in memorian") e Elisa;
Ao meu marido,
José Luiz;
às minhas filhas,
Luiza e Paula;

- DEDICO -

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Homero Fonseca pela orientação segura, amizade e confiança a mim dedicadas.
- À Econ. Dom. Márcia Regina de Toledo Camargo Ranzani pela amizade, incentivo e contribuição na elaboração e execução desta pesquisa.
- Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela colaboração em minha formação profissional e amizade.
- Ao Engº Agrº Eduardo Micotti da Glória e à Biom. Ivani Valarini Zambello pela colaboração e apoio amigo.
- À acadêmica Erika Madeira Kliauga pelo auxílio no preparo das amostras e análises de laboratório.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro necessário para a realização desta pesquisa.
- À Assessoria Estatística do Departamento de Matemática da ESALQ e ao Prof. Dr. Humberto de Campos pela orientação e revisão da análise estatística.
- Ao Prof. Hiroshi Kimati e à Engª Agrª Maria Heloísa Duarte de Moraes pela atenção e sugestões.
- À BASF Brasileira, CHEMIE Brasileira Ind. e Com. Ltda., MERCK SHARPE & DHOME Química Farmacêutica Ltda, pelo fornecimento dos produtos testados e atenção.

- Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia Sabino e Kátia Maria de Andrade Ferraz pela atenção dedicada à revisão da bibliografia.
- À bibliotecária Beatriz Helena Giocongo pela atenção e auxílio durante o curso.
- À minha mãe Elisa, minha tia Angelina e minha irmã Márcia pelo carinho e dedicação em todos os momentos.
- Ao meu marido José Luiz que sempre acompanhou minhas atividades, pelas sugestões, carinho e compreensão.
- À todas as pessoas e entidades que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	vii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Características gerais das aflatoxinas	3
2.2. Fatores envolvidos na produção das aflatoxinas	5
2.3. Prevenção e controle das aflatoxinas	10
3. METODOLOGIA	20
3.1. Material	20
3.1.1. Amendoim	20
3.1.2. Substâncias controladoras de fungo em avaliação	20
3.2. Métodos	21
3.2.1. Formação das amostras	21
3.2.2. Ajuste do teor de umidade do amendoim em casca	22
3.2.3. Preparo das substâncias utilizadas na pulverização do amendoim em casca ...	22
3.2.4. Aplicação das substâncias	23
3.2.5. Determinação do teor de umidade	23
3.2.6. Avaliação visual do crescimento fúngico	23
3.2.7. Análise de aflatoxinas	24

3.2.7.1. Preparo da amostra	25
3.2.7.2. Extração e purificação do extrato .	25
3.2.7.3. Cromatografia em camada delgada ...	26
3.2.7.4. Cálculo da concentração das aflatoxinas	27
3.2.8. Avaliação micológica	28
3.2.9. Avaliação quanto à produção de aflatoxinas das colônias isoladas de fungos potencialmente aflatoxigenicos	28
3.2.10. Avaliação dos tratamentos	29
3.2.11. Análise Estatística	29
3.2.12. Fluxograma de execução	30
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 31
4.1. Teor de umidade	31
4.2. Avaliação micológica	33
4.3. Avaliação visual	36
4.4. Teor de aflatoxinas	41
4.5. Avaliação da eficiência dos tratamentos	42
 5. CONCLUSÕES	 49
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 50

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Teor médio de umidade inicial, em percentagem no amendoim em casca	31
2	Teor médio de umidade, em percentagem, no amendoim em casca durante o experimento	32
3	Valores médios da contaminação fúngica no amendoim em casca seco, antes do reumedecimento.....	34
4	Resultado dos isolados, de fungos potencialmente aflatoxigênicos das amostras de amendoim em casca antes do reumedecimento, testados em meio "YES" quanto à produção de aflatoxinas.....	34
5	Avaliação visual das vagens e grãos de amendoim em casca tratado, após 7 dias de incubação.....	37
6	Avaliação visual das vagens e grãos de amendoim em casca tratado, após 14 dias de incubação.....	38
7	Avaliação visual das vagens e grãos de amendoim em casca tratado, após 21 dias de incubação.....	38
8	Avaliação visual das vagens e grãos de amendoim em casca tratado, após 28 dias de incubação.....	39
9	Teor de aflatoxinas (B_1+G_1), em $\mu\text{g/kg}$, no amendoim em casca após o reumedecimento, no tempo zero	40
10	Teor de aflatoxinas (B_1+G_1), em $\mu\text{g/kg}$, no amendoim em casca após 7 dias de incubação	40
11	Teor de aflatoxinas (B_1+G_1), em $\mu\text{g/kg}$, no amendoim em casca após 14 dias de incubação	41
12	Teor de aflatoxinas (B_1+G_1), em $\mu\text{g/kg}$, no amendoim em casca após 21 dias de incubação	41
13	Teor de aflatoxinas (B_1+G_1), em $\mu\text{g/kg}$, no amendoim em casca após 28 dias de incubação	42

AVALIAÇÃO EM LABORATÓRIO DO CONTROLE QUÍMICO DA PRODUÇÃO
DE AFLATOXINAS NO AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.) EM CASCA

Autora: Maria Antonia Calori-Domingues

Orientador: Homero Fonseca

RESUMO

Ácido propiônico (na forma de sal de amônio) nas doses de 3000 (AP1) e 5000 mg/kg (AP2) de amendoim em casca; extrato de semente de "grapefruit" nas doses de 5000 (GF1) e 10000 mg/kg (GF2); ortofenilfenato de sódio nas doses de 2500 (OFS1) e 5000 mg/kg (OFS2) e thiabendazole nas doses de 1000 (TBZ1) e 5000 mg/kg (TBZ2), foram avaliados, em laboratório, para verificar sua eficiência no controle do crescimento fúngico e da produção de aflatoxinas no amendoim em casca reumedecido (16 a 18% de umidade). Amostras de amendoim em casca reumedecido foram pulverizadas com as substâncias e doses acima, acondicionadas em sacos de polietileno e incubadas a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 28 dias. Amostras testemunhas foram pulverizadas apenas com água.

Foram feitas avaliação visual, quanto ao crescimento fúngico externo (sobre as vagens) e interno (grãos), e análise de aflatoxinas nos tempos zero (após

reumedecimento), 7, 14, 21 e 28 dias de incubação. Considerou-se como eficiente, no controle da produção de aflatoxinas, o tratamento em que o teor de aflatoxinas ($B_1 + G_1$) se manteve abaixo de 30 $\mu\text{g/kg}$. O tratamento AP1 foi eficiente até o 14º dia de incubação e o AP2 durante os 28 dias de incubação. Os demais tratamentos não foram eficientes durante todos os períodos de incubação, apresentando teores de aflatoxinas entre 150 e 108.333 $\mu\text{g/kg}$. Na avaliação visual o tratamento AP1 a partir do 14º dia apresentava crescimento fúngico moderado sobre as vagens e incipiente sobre os grãos. O tratamento AP2 apresentou controle do crescimento fúngico sobre as vagens e grãos durante todo período de incubação. Os tratamentos OFS1 e OFS2 apresentaram controle no desenvolvimento fúngico da parte externa das vagens, porém nos grãos foi observado crescimento variando de incipiente a moderado e 1 a 2% dos grãos com intenso crescimento esverdeado. Nos demais tratamentos observou-se já a partir do 7º dia crescimento fúngico variando de moderado a intenso em todas as vagens e grãos das amostras avaliadas.

LABORATORY EVALUATION OF CHEMICAL CONTROL OF AFLATOXIN
PRODUCTION IN UNSHELLED PEANUTS (*Arachis hypogaea* L.)

Author: Maria Antonia Calori Domingues

Adviser: Homero Fonseca

SUMMARY

Propionic acid (ammonium salt) at 3000 mg/kg (PA1) and 5000 mg/kg (PA2) of unshelled peanuts (UP); grapefruit seed extract at 5000 mg/kg (GF1) and 10000 mg/kg (GF2); sodium orthophenilphenate at 2500 mg/kg (SOP1) and 5000 mg/kg (SOP2); thiabendazole 1000 mg/kg (TBZ1) and 5000 mg/kg (TBZ2) were studied in laboratory, to verify their efficiency on fungal growth control and aflatoxins (AF) production on moist UP (16-18% moisture content). Moistened UP were put into polyethylene bags with cotton plugs and incubated at $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 28 days. Control samples were sprayed with water. Visual evaluation, in 200 g samples, of external (pods) and internal (kernels) fungal growth and AF analyses were made at 0, 7, 14, 21 and 28 days of incubation. Treatments were considered efficient when AF content ($B_1 + G_1$) remained under 30 $\mu\text{g/kg}$. PA1 treatment was efficient till 14 days and PA2 till 28 days of incubation. All other treatments were not efficient showing AF contents from 150 to 108,333 $\mu\text{g/kg}$ during the incubation periods. Visual evaluation showed that treatment PA1 was able to control fungal growth till the

14th day when it started to present a moderate growth on pods and incipient growth over kernels. PA2 has controlled fungal growth on pods and kernels all over the experiment. SOP1 and SOP2 did control fungal growth on the pods but, in kernels, an incipient to moderate growth was always observed presenting 3 to 5 kernels with intense growth. In all other treatments a moderate to intense fungal growth was observed from the 7th day both in pods and kernels.

1. INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma das principais culturas oleaginosas do mundo. É utilizado pelas indústrias de alimentos na fabricação de pastas, confeitos e salgados, e na extração de óleo. Seu farelo, rico em proteína, é utilizado na alimentação humana e animal.

As aflatoxinas são substâncias hepatocarcinogênicas que causam danos à saúde humana e animal, além de grandes perdas econômicas, principalmente por doenças e morte de animais. Essas substâncias têm sido frequentemente encontradas no amendoim em casca *in natura* e em produtos de amendoim, que são normalmente comercializados no Brasil.

A contaminação com aflatoxinas ocorre principalmente quando o amendoim em casca, recém colhido, é armazenado com teores de umidade acima de 10%, níveis estes que proporcionam condições para o desenvolvimento de fungos envolvidos com a produção das toxinas.

A prevenção dessa contaminação é a alternativa ideal para solução do problema e baseia-se principalmente na utilização de práticas agrícolas adequadas durante as fases de plantio (rotação de culturas, uso de sementes saudáveis, e

controle de pragas e doenças) e nos períodos de colheita (evitando danos às vagens), secagem e armazenamento.

O emprego de fungicidas, pós-colheita, pode ser uma opção no controle do crescimento de fungos capazes de produzir aflatoxinas (*Aspergillus flavus*/*A. parasiticus*) quando as condições climáticas não favorecerem uma secagem rápida e eficiente do amendoim que será armazenado.

Vários trabalhos, utilizando substâncias controladoras do desenvolvimento fúngico e da produção de aflatoxinas, foram realizados em laboratório empregando meios de cultura como substrato e apresentaram resultados promissores. Entretanto, trabalhos realizados *in vitro* não consideram inúmeros fatores que podem afetar a ação das substâncias, entre eles, a competição microbiana e a presença, no caso do amendoim, da casca e película atuando como uma barreira física.

Acredita-se que o emprego do amendoim em casca, em substituição aos meios de cultura, na avaliação das substâncias controladoras do desenvolvimento fúngico, em laboratório, oferece condições de se obter resultados concludentes quanto à validade do emprego dessas substâncias no campo.

Este trabalho teve por objetivo avaliar, em laboratório, o efeito de quatro substâncias aplicadas no amendoim em casca, sobre a produção de aflatoxinas e crescimento fúngico visível a olho nu.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Características gerais das aflatoxinas

Segundo DIENER & DAVIS (1977) o fato dos fungos ou bolores produzirem "flavors" desagradáveis ou outras mudanças indesejáveis em alimentos é conhecido há tempo. Além disso, alguns fungos têm a capacidade de sintetizar substâncias químicas, que produzem sintomas tóxicos quando alimentos que as contêm são ingeridos pelo homem ou animais. Essas substâncias, produtos do metabolismo secundário de fungos, são conhecidas como micotoxinas e as doenças causadas pelo consumo de alimentos ou rações contaminados são conhecidas por micotoxicoses.

Dentre as micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas são consideradas as mais perigosas devido à sua frequente ocorrência em alimentos e rações e seu efeito carcinogênico, mutagênico e teratogênico, representando assim, um risco significativo à saúde humana e animal (ROY & CHOURASIA, 1990; GARNER, 1992). Em vários países subdesenvolvidos, a correlação epidemiológica entre a contaminação de aflatoxinas na dieta e a incidência de câncer primário no fígado é alta (PEERS et al., 1976; SCOTT, 1981).

As aflatoxinas possuem propriedades imunossupressivas, vinculadas provavelmente ao seu efeito inibitório da síntese protéica (ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, 1983).

De acordo com WOGAN (1966), as propriedades tóxicas das aflatoxinas manifestam-se diferentemente, dependendo do método de avaliação, da dose e duração da exposição.

Os perigos referentes às aflatoxinas não são apenas aqueles relacionados ao consumo direto de amendoim ou outros produtos. Testes sensíveis e seguros demonstraram que as aflatoxinas estão presentes em tecidos comestíveis e no leite de animais alimentados com produtos contaminados com as toxinas (SALUNKE & DESAI, 1986).

São conhecidos dezessete compostos químicos, todos designados aflatoxinas. O termo se refere, normalmente, aos quatro principais compostos (do grupo de metabólitos bis-furanocumarina), identificados como B₁, B₂, G₁ e G₂ que se distinguem por sua fluorescência quando observados sob luz ultravioleta (365 nm); assim B corresponde à cor azul ("blue") e G à cor verde ("green"), e os índices correspondem à mobilidade cromatográfica relativa. Das quatro principais aflatoxinas, as maiores concentrações observadas correspondem à B₁ seguida por G₁, enquanto B₂ e G₂ ocorrem em menor escala (ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (1983). Entretanto, FONSECA (1968 e 1969), constatou que em determinadas regiões

pode ocorrer maior concentração de G_1 e G_2 que B_1 e B_2 ou apenas as aflatoxinas G.

2.2. Fatores envolvidos na produção das aflatoxinas

Aspergillus flavus Link e *A. parasiticus* Speare, pertencentes ao grupo-espécie *A. flavus*, são fungos filamentosos intimamente relacionados (RAPER & FENNEL, 1965). Segundo DIENER & DAVIS (1977), parecem ser as únicas espécies capazes de produzir aflatoxinas, apesar de vários trabalhos considerarem outros gêneros e espécies de fungos como produtores. O grupo de espécies de *A. flavus* é um constituinte normal da microflora do ar e solo, sendo encontrado sobre e dentro de plantas e animais vivos ou mortos (RAPER & FENNEL, 1965). São ubíquos na natureza, associados a um largo espectro de produtos agrícolas armazenados (DIENER & DAVIS, 1977).

O *A. parasiticus* parece estar mais adaptado ao solo, sendo predominante em vagens de amendoim, enquanto o *A. flavus* parece estar mais adaptado ao ambiente aéreo e foliar, sendo dominante em milho, caroço de algodão e nozes. O *A. flavus* produz as aflatoxinas B_1 e B_2 enquanto os isolados de *A. parasiticus*, além destas, produzem as aflatoxinas G_1 , G_2 (DIENNER et al., 1987; LIN, 1980). A aflatoxina B_1 é a substância carcinogênica, de ocorrência natural, mais potente que se conhece, causando danos à saúde humana e animal (DIENER et al., 1987).

As linhagens toxigênicas do grupo *A. flavus* desenvolvem-se em temperaturas entre 12 a 42°C, sendo a temperatura mínima para produção de toxina de 18°C e a máxima de 42°C. Algumas das condições ótimas para crescimento do *A. flavus* e produção de aflatoxinas são: temperatura de 25 a 35°C, umidade relativa do ar de 85 a 90% ou maior e teor de umidade no grão de amendoim acima de 10% (DIENER & DAVIS, 1977). A temperatura mínima para crescimento do micélio de *A. flavus* e *A. parasiticus*, segundo LACEY (1989), é 6°C e a temperatura mínima de esporulação é maior, porém próxima da mínima para crescimento. Em climas tropicais observou-se a produção de aflatoxinas após 48 horas a 30°C (BAMPTON, 1963). As temperaturas para crescimento e produção de aflatoxinas dependem da linhagem envolvida, do substrato e da umidade relativa do ar (CARTER, 1970).

Os produtos que têm apresentado maiores contaminações com aflatoxinas são o amendoim, milho e algodão; entretanto, qualquer cultura pode apresentar contaminação caso não tenha sido adequadamente seca depois da colheita (DIENNER et al., 1987).

Segundo MOREAU (1979), as linhagens isoladas de amendoim e seus produtos parecem ser mais toxigênicas do que aquelas isoladas de outros produtos, como os cereais. A produção de aflatoxinas parece depender da presença de lipídeos (ácidos graxos). Estes, quando degradados pela ação destes fungos, originam precursores como acetilcoenzima A, que entra na via metabólica da biossíntese das aflatoxinas.

A interação microbiana e a competição da microflora do solo e vagem parece reduzir o crescimento e a produção de aflatoxinas por *A. flavus*. O crescimento de *A. flavus* é inibido por fungos como *Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani* ou espécies de *Penicillium* (MOREAU, 1979; DIENER & DAVIS, 1977;). BULLERMAN & LEE (1987) verificaram que a presença de fungos competidores diminuem a produção de aflatoxinas por *A. flavus* e *A. parasiticus*. NOUT (1989) constatou que, quando *A. flavus* foi inoculado simultaneamente com *Rhizopus* spp e *Neurospora* spp em amendoim triturado, era capaz de crescer, porém em menor extensão, apresentando redução no crescimento e na produção de aflatoxinas e que as cepas de *Rhizopus* e *Neurospora* degradaram a aflatoxina B₁.

Segundo LINDSEY (1970), não há evidências da resistência natural à invasão de grãos de amendoim em vagens ligadas à planta. Assim, a presença da microflora endogeocárpica parece proporcionar uma barreira à invasão dos grãos de amendoim pelo *A. flavus*. Entretanto propágulos de *A. flavus* no solo podem invadir grãos e vagens de amendoim intactos sob certas condições, de teor de umidade e maturidade no grão favoráveis ao fungo (DIENER & DAVIS, 1977).

Para explicar a presença de *A. flavus* em grãos provenientes de vagens aparentemente sadias, SMITH & MOSS (1985) relataram que os esporos desse fungo podem ser encontrados no estigma de flores em desenvolvimento. Esses esporos podem germinar e assim, contaminar os tecidos dos grãos em desenvolvimento.

De acordo com ZAMBETTAKIS (1977), a contaminação de vagens e grãos de amendoim depende de vários fatores como variedade, estado de maturação das vagens no momento da colheita, técnica de secagem e condições climáticas durante o último mês da cultura, sendo que a ocorrência de um período de seca nesse estágio aumenta a infestação. O fator mais importante no crescimento e produção de aflatoxinas pelo *A. flavus* é a umidade relativa do ar (UR) ao redor de um substrato natural como o amendoim.

De acordo com DIENER & DAVIS (1977), o teor de umidade seguro para armazenamento de sementes e outros substratos naturais, onde não ocorre nenhum crescimento de fungos, é definido como a umidade do substrato em equilíbrio com uma UR de 70%, na qual os fungos não crescem.

Em estudos de laboratório realizados por AUSTWIK & AYERST (1963), o crescimento vegetativo de *A. flavus* foi limitado por uma UR de 80%, que é equivalente a 9% de umidade no grão de amendoim. Quando o amendoim que está em processo de secagem apresenta faixa de umidade dos grãos entre 14-24%; a interrupção ou atraso no ciclo de secagem no campo por chuvas, tempo nublado e úmido ou reabsorção de umidade após a colheita e armazenamento, normalmente resultam no desenvolvimento do *A. flavus* e subsequente formação de aflatoxinas .

Em experimentos realizados no Texas por PETTIT et al. (1971), verificou-se que, quando o teor de umidade dos

grãos de amendoim estava acima de 30% ou abaixo de 10%, a atividade do *A. flavus* era restrita.

De acordo com DIENER & DAVIS (1977), a contaminação com *A. flavus* e subsequente elaboração das aflatoxinas no amendoim pode ocorrer tanto no campo antes da colheita como após o arranquio durante o processo de secagem e armazenamento.

A contaminação do amendoim pelo fungo e produção de aflatoxinas, no campo, é maior nos grãos de vagens secas lentamente do que naquelas secas rapidamente (JACKSON, 1967). Pesquisas realizadas por DICKENS & PATTEE (1966), DICKENS & KHALSA (1967), PETTIT & TARBER (1970) e PORTER & WRIGHT (1971), demonstraram que a umidade decresce mais rapidamente em leiras invertidas do que naquelas formadas ao acaso e que ocorre também menor contaminação por *A. flavus* em vagens de leiras invertidas.

A maioria dos trabalhos têm associado *A. flavus* e aflatoxinas, em amendoim no campo, com maturação excessiva (BAMPTON, 1963; PETTIT et al., 1971), estresse pela seca (HILL et al., 1983; COLE, 1984; MEHAN et al., 1991a) e danos físicos e biológicos na vagem causados por fungos e insetos (BAMPTON, 1963; HILL et al., 1983; ASHWORTH Jr & LANGLEY, 1964).

Segundo HILL et al. (1983), a despeito da presença de *A. flavus* no solo durante o desenvolvimento da vagem de amendoim, raramente ocorre grande contaminação com fungo

e aflatoxinas, a menos que a planta esteja sujeita a estresse ambiental ou o fruto esteja danificado.

COLE et al. (1984), verificaram uma alta incidência de *A. flavus* em grãos de amendoim provenientes de tratamentos em que sofreram estresse pela seca. Entretanto, nenhuma aflatoxina foi detectada neste amendoim, sugerindo assim, que a colonização dos grãos de amendoim por fungos do grupo *A. flavus* não implica, necessariamente, na produção de aflatoxinas. As condições podem ser favoráveis à colonização mas não à produção de aflatoxinas.

O estresse pela seca provavelmente aumenta a suscetibilidade à contaminação pelo fungo, uma vez que diminui o teor de umidade da casca e grãos e diminui acentuadamente a atividade fisiológica do amendoim (DIENER & DAVIS, 1977). Um possível efeito da seca na contaminação pré-colheita é a eliminação dos competidores microbiológicos do *A. flavus* na geocarposfera do amendoim, causada por baixos potenciais de água e elevadas temperaturas no solo (DIENER et al., 1987). HILL et al. (1983), associaram a capacidade do *A. flavus* em prevalecer sob condições de seca por apresentar uma atividade de água (a_w) mínima para seu desenvolvimento de 0,78, que é menor que a da maioria dos microrganismos associados ao amendoim.

2.3. Prevenção e controle da contaminação

Um método de prevenção da contaminação com aflatoxinas nos alimentos é através da inibição do

crescimento de fungos produtores das toxinas. GOLUMBIC & KULIK (1969) verificaram que os danos causados por fungos em grãos e sementes oleaginosas são controlados pela secagem até um nível de umidade seguro. Para produtos úmidos foram pesquisados o armazenamento sob condições herméticas ou de atmosfera controlada e aplicações com fungicidas, mas nenhum resultado prático foi obtido com eficiência.

De acordo com STEWART et al. (1976), é desejável, de um agente inibidor, o controle do crescimento fúngico que, assim, eliminaria a formação da micotoxina. Porém, um composto químico com capacidade de inibir a formação da toxina, a despeito do seu efeito sobre o crescimento fúngico, poderia ser utilizado na prevenção da contaminação de produtos agrícolas, quando práticas adequadas de secagem e armazenamento não pudessem ser empregadas.

Vários inibidores têm sido estudados para verificar sua influência sobre fungos aflatoxigênicos (GOLDBLATT & DOLLEAR, 1977; MARSHALL & BULLERMAN, 1986).

TULPULE et al. (1977) afirmaram que os fungicidas deveriam ser explorados como agentes no controle da contaminação com aflatoxinas. RAY & BULLERMAN (1982), constataram que há vários estudos sobre o efeito no crescimento de fungos potencialmente toxigênicos e na produção de micotoxinas, de alguns inibidores como sorbatos, propionatos, benzoatos, antibióticos (pimaricina) e produtos derivados de plantas, como os componentes de óleos essenciais

de certas ervas e condimentos (alho, canela, mostarda, pimenta-da-Jamaica). Algumas dessas substâncias inibem a produção de micotoxinas em 70%, enquanto apenas 25% ou menos de inibição ocorre no crescimento fúngico.

Sabe-se que as condições de crescimento do fungo têm uma função importante na sua habilidade de produzir metabólitos secundários (AL HILLI & SMITH, 1979). Segundo BU'LOCK (1975), limitações no crescimento de um fungo é o principal fator que regula o metabolismo secundário. De acordo com MOSS & FRANK (1987), é muito provável que qualquer estresse (variação de pH do meio, calor, irradiação, etc.) no crescimento do microrganismo que simule a sua chegada à fase estacionária de crescimento, pode acentuar a formação de toxina. Por outro lado biocidas que têm efeito no metabolismo primário de um fungo, provavelmente reduziriam a disponibilidade de produtos intermediários, tal como a acetilcoenzima A, essencial na biossíntese das aflatoxinas.

Há poucas referências sobre a avaliação de substâncias controladoras do desenvolvimento fúngico utilizando-se amendoim como substrato em substituição aos meios de cultura. Em revisão realizada por MEHAN et al. (1991b) para elaboração de um banco de dados sobre a problemática das aflatoxinas no amendoim, constata-se o pequeno número de trabalhos realizados utilizando-se aplicação de produtos químicos no amendoim em casca.

O efeito de substâncias químicas sobre o fungo *A. flavus* e a contaminação com aflatoxinas em grãos de

amendoim foi estudado por BELL & DOUPNIK Jr. (1971, 1972) em plantas de amendoim enleiradas no campo. Os autores concluíram que a contaminação com aflatoxinas podia ser substancialmente reduzida por meios químicos.

Segundo SMITH & MOSS (1985), difenil, ortofenilfenol e thiabendazole são amplamente empregados para inibir o crescimento fúngico em frutas cítricas, utilizados tanto na água de lavagem da fruta ou impregnado em papel.

JACKSON (1965) avaliou dezoito fungicidas, *in vitro*, para verificar o controle de fungos isolados do amendoim. Vários fungicidas controlaram efetivamente um grande número desses fungos, incluindo-se o *Aspergillus flavus*.

FONSECA et al. (1976), visando diminuir a incidência de fungos produtores de aflatoxinas, testaram a eficiência de vários fungicidas *in vitro* e, posteriormente, a utilização de quatro deles (ortofenilfenato de sódio, Ferban, Thiram e Captafol) no campo aplicados no amendoim em casca, logo após o arranquio. Os resultados obtidos mostraram que embora os fungicidas selecionados tivessem sido eficientes no controle do fungo *in vitro*, não foi possível chegar a uma conclusão segura sobre a eficácia dos mesmos nas condições do experimento. Dentre os fungicidas testados *in vitro* o mais eficiente foi o ortofenilfenato de sódio.

FONSECA et al. (1992), realizaram trabalhos a campo, nos anos de 1986 e 1987, pulverizando amendoim em casca, ainda úmido, com solução de ortofenilfenato de sódio em concentrações que variaram de 0,1 a 5% imediatamente antes

deste ser ensacado visando o controle da contaminação com aflatoxinas. Concluíram haver necessidade da otimização da aplicação do produto no campo para propiciar uma perfeita cobertura das vagens e assim poder avaliar a eficiência do produto. Os autores verificaram que em alguns lotes de amendoim tratado prevaleceram duas situações: a) intenso desenvolvimento fúngico nas vagens e pequena ou nenhuma contaminação com aflatoxinas; b) as vagens e grãos aparentemente sadios, não apresentando desenvolvimento fúngico visível a olho nu, apresentavam-se completamente contaminados com aflatoxinas em níveis elevados.

Segundo KIMATI (1978), o ortofenilfenato de sódio é um fungicida indicado no controle de bolor verde e azul dos citrus, mofo azul da maçã e pera, podridão de *Rhizopus* de cereja e de batata doce. No Brasil, este produto é recomendado para o controle da podridão do abacaxi.

AGUIAR et al. (1980), após testar *in vitro* o efeito de dezesseis compostos químicos sobre o desenvolvimento de *Aspergillus* spp e a produção de aflatoxinas, verificaram, que dos compostos que provocaram inibição sobre as linhagens dos fungos, os que se mostraram mais eficientes foram os fungicidas sistêmicos benzimidazólicos.

O thiabendazole, um fungicida sistêmico, tem sido empregado no controle do crescimento fúngico presente em frutas cítricas (SMITH & MOSS, 1985), sementes e grãos de amendoim (BLANC, 1981).

OLIVERAS & ZEVADA (1976/1982) verificaram total inibição de fungos do gênero *Aspergillus* após 30 dias, em grãos de milho e triticales (híbrido de trigo e centeio) tratados com thiabendazole na dose de 1700 mg/kg e armazenados a 97,5% de umidade relativa do ar.

O efeito do fungicida thiabendazole sobre o desenvolvimento de *A. parasiticus* e produção de aflatoxinas em grãos de milho foi avaliado por AGUIAR & BASTOS (1982). Os autores observaram um efeito gradual no retardamento do aparecimento do fungo sobre os grãos com o aumento da concentração do fungicida. Na concentração de 200 mg/kg o fungo apenas iniciou desenvolvimento visível vinte dias após a inoculação, com uma forte inibição de seu crescimento. A redução máxima, mas não total, da produção de aflatoxinas B₁ e G₁ foi observada na concentração de 200 mg/kg com reduções de aproximadamente 91 a 93%, respectivamente, em relação ao testemunha. Os autores sugerem que um aumento da concentração do produto possa levar à inibição total da produção das toxinas.

AGUIAR & BASTOS (1983), estudando a inibição da produção de aflatoxinas pela ação do extrato da semente de grapefruit, verificaram que os melhores resultados foram obtidos na concentração de 5000 mg/kg, mostrando-se bastante promissor para o controle de *A. flavus*, principalmente por ser uma substância atóxica. Os autores comentam que as dosagens estão acima das concentrações recomendadas para adição destes em rações; entretanto, ressaltam que experimen-

tos biológicos demonstram que a DL_{50} do produto é bastante elevada. TRUJILLO & TRUJILLO (1981), em experimentos com ratos, verificaram que a DL_{50} foi elevada, acima de 5 g/kg de peso corporal; contudo, verificaram que não foi observado efeito carcinogênico e, porisso, o extrato da semente de "grapefruit" foi classificado como não tóxico por via oral.

Em testes *in vitro* realizados pelo Instituto Biológico¹, para verificar o efeito do extrato da semente de "grapefruit" sobre o crescimento de *A. flavus* e produção de aflatoxinas, foi constatado que as doses de 5% e 0,5% reduziram o crescimento do fungo em 100% e 71%, respectivamente, enquanto a produção de aflatoxinas foi totalmente inibida em ambas as doses.

Segundo GOLDBLATT & DOLLEAR (1977), o uso de agentes antifúngicos para controlar a contaminação fúngica e produção de aflatoxinas têm sido objeto de muitos estudos. O tratamento de amendoim em casca através da pulverização com fungicidas, segundo os autores, não foi eficiente na prevenção do crescimento do *A. flavus*. Os melhores resultados foram obtidos com milho onde o ácido propiônico e propionatos se mostraram efetivos na redução do crescimento fúngico e produção de aflatoxinas.

O ácido propiônico é um dos conservantes mais antigos sendo utilizado principalmente em produtos de panificação (LEITÃO, 1989). Segundo GALLEP (1980), foi

¹Correspondência enviada à CHEMIE Bras. Ind. Com. Ltda., 1983

demonstrado, na Alemanha Ocidental em 1969, a ação antimicrobiana do ácido propiônico e foi comprovado que o mesmo impede a deterioração dos alimentos e a formação de micotoxinas. A ação fungicida ou fungistática do ácido propiônico ocorre através da sua intervenção a nível do metabolismo dos carboidratos, bloqueando a ação de diversas enzimas e causando a morte das células.

BUCHANAN & AYRES (1976), trabalhando com *A. parasiticus* em meio de cultura, verificaram que, na dose de 0,1% o ácido propiônico inibiu parcialmente e a 0,2% completamente, o crescimento fúngico e produção de aflatoxinas.

MALLOZI et al. (1985) testaram a utilização do ácido propiônico no controle do crescimento do *A. flavus* e da produção de aflatoxinas em meio de cultura e concluíram que os resultados obtidos oferecem subsídios para o controle efetivo de fungos produtores de aflatoxinas que ocorrem em grãos de cereais e leguminosas utilizados na alimentação humana e animal. Concentrações de 10% e 1% impediram o crescimento fúngico e conseqüentemente a produção de aflatoxinas.

VANDEGRAFT et al. (1975) verificaram que o ácido propiônico, na concentração de 1%, reduziu significativamente o crescimento de *A. flavus*/*A. parasiticus* e a produção de aflatoxinas em milho com alto teor de umidade, deixando-o livre da toxina por 29 semanas.

HOLBERG et al. (1989) utilizaram o ácido propiônico, na concentração de 0,3% (p/p) em grãos úmidos de cevada, e verificaram que o crescimento de *A. parasiticus* e produção de aflatoxinas foram restritos.

SAUER & BURROUGHS (1974) relataram que propionato de sódio e ácido propiônico foram muito mais efetivos que o propionato de cálcio na preservação de milho contendo 18% de umidade. Eles demonstraram que a níveis de 0,5 e 1% do propionato de cálcio, o milho manteve-se livre de fungos por uma semana, enquanto com o propionato de sódio e ácido propiônico, nas mesmas concentrações, por dezessete semanas.

LACEY & LORD (1977) verificaram que o ácido propiônico e propionato de amônio foram, dos produtos testados, os mais eficientes no controle do desenvolvimento de fungos em feno. O propionato de amônio é ligeiramente menos efetivo que o ácido propiônico no desenvolvimento fúngico, entretanto, não apresenta odor forte, é menos volátil, menos corrosivo e mais agradável e seguro para manuseio.

De acordo com BASF (s.d.), um grande número de ensaios realizados indicaram que o efeito conservante do propionato de amônio equivale ao do ácido propiônico, quando a dosagem é feita baseando-se na concentração do ácido.

Em um estudo realizado por AL HILLI & SMITH (1979), sobre a influência do ácido propiônico no crescimento e produção de aflatoxinas por *A. flavus*, foi demonstrado que,

em concentrações onde não se obtém uma completa inativação do fungo, há um estímulo acentuado na produção de aflatoxinas.

Trabalho realizado por BELL & DOUPNIK Jr. (1972) mostrou que vagens de amendoim tratadas, no campo, com ácido propiônico apresentavam-se descoloridas, com odor forte e repugnante. Os grãos apresentavam coloração normal e um leve odor estranho.

MADAAN & CHOHAN (1978) estudaram o efeito de produtos químicos antimicrobianos e alguns fungicidas no controle pós-colheita do *A. flavus* sobre vagens de amendoim, prevenindo a penetração através da casca e nos grãos, em condições de campo. Constataram que o fungo pode ser eliminado por tratamento pós-colheita, isto é, colhendo o amendoim no ponto apropriado de maturação, invertendo as plantas na leira e pulverizando as vagens com produtos como ácido propiônico a 5%, clorotalonil a 0,15% e ácido sórbico a 0,15%.

3. METODOLOGIA

A pesquisa foi conduzida nos laboratórios de Micotoxinas e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial - ESALQ/USP .

3.1. Material

3.1.1. Amendoim

Foi utilizado amendoim em casca, da variedade Tatu, proveniente da safra das águas de 1991, selecionado, sem danos à casca, com níveis não detectáveis de aflatoxinas e com teor de umidade entre 7,42 a 8,10%.

3.1.2. Substâncias controladoras de fungos em avaliação

Foram avaliadas quatro substâncias em dois níveis de concentração (mg do ingrediente ativo por kg de amendoim em casca).

a) Ácido propiônico (AP), nas doses de 3000 e 5000 mg/kg. Foi utilizado como fonte do ácido propiônico o propionato de amônio. O produto comercial utilizado foi o LUPROSIL NC, da BASF Brasileira, que contém 49% de ácido propiônico, 26% de H_2O , 15% de propilenoglicol e 10% de amoníaco, e se apresenta na forma líquida.

- b) Extrato de semente de "grapefruit" (GF), nas doses de 5000 e 10000 mg/kg. O produto comercial utilizado foi o DF-100, da CHEMIE Brasileira Ind. Com. Ltda., que contém 50% do ingrediente ativo em propilenoglicol e glicerina e se apresenta na forma líquida.
- c) Ortofenilfenato de sódio (OFS), nas dose de 2500 e 5000 mg/kg. O produto utilizado foi o DOWICIDE A, da DOW Química, que contém 97% do ingrediente ativo e se apresenta na forma sólida.
- d) 2-(4-tiazolil) benzimidazol: Thiabendazole (TBZ), nas doses de 1000 e 5000 mg/kg. O produto utilizado foi o TECTO 450, da MERCK SHARPE & DOHME - Química Farmacêutica Ltda, que contém 450 g/l do ingrediente ativo, e se apresenta na forma de suspensão concentrada.

3.2. Métodos

3.2.1. Formação das Amostras

O experimento foi instalado num delineamento em blocos casualizados. Foram montados três blocos, um a cada 30 dias, e cada bloco continha os seguintes tratamentos: AP nível 1; AP nível 2; GF nível 1; GF nível 2; OFS nível 1; OFS nível 2; TBZ nível 1; TBZ nível 2; Testemunha, perfazendo um total de 27 parcelas.

Os tratamentos foram avaliados nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de incubação, perfazendo um total de 135 amostras. Cada amostra de amendoim em casca continha 500 g de vagens, que foram selecionadas, descartando-se as chochas

e/ou danificadas e outras impurezas. A seleção foi visual e por aplicação de uma leve pressão na porção distal da vagem, perpendicular ao plano da sutura mediana, para detectar pequenas rupturas (JACKSON, 1964). Essas amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno.

3.2.2. Ajuste do teor de umidade do amendoim em casca

Foi determinado o teor de umidade inicial do amendoim em casca através do método da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 horas, de acordo com BRASIL (1976). Em seguida, pulverizou-se a quantidade de água necessária para atingir o nível de umidade entre 16 e 18% (o cálculo foi feito baseado na matéria seca do amendoim em casca). Após a adição de água, as amostras foram homogeneizadas manualmente fechando-se os sacos de polietileno com fita crepe que permaneceram sob refrigeração a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 dias (procedimento previamente determinado em laboratório), para que ocorresse o reumedecimento uniforme do material sem que houvesse desenvolvimento fúngico e produção de aflatoxinas.

3.2.3. Preparo das substâncias utilizadas na pulverização do amendoim em casca

Cada uma das quatro substâncias, em suas respectivas concentrações, foi dissolvida em 15 ml de água destilada contendo 0,02% de espalhante adesivo (Adefix), quantidade esta previamente determinada para proporcionar a

melhor cobertura possível nos 500 g das vagens de amendoim durante a pulverização .

3.2.4. Aplicação das substâncias

As amostras, já reidratadas, foram pulverizadas com as substâncias em suas respectivas concentrações. As amostras referentes ao tratamento testemunha foram pulverizadas com 15 ml de água destilada. A pulverização foi realizada através da utilização de uma bomba de pressão e vácuo Primar modelo 141 a uma pressão de 0,355 kgf/cm² e borrifador Prodiciil modelo 09 P.

Após a pulverização, cada amostra, acondicionada em sacos de polietileno, foi homogeneizada manualmente. Em seguida foi colocado um tampão de algodão na abertura do saco, feito de maneira a se assemelhar à de um frasco de Erlenmeyer permitindo trocas gasosas. As amostras foram incubadas em estufa a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7, 14, 21 e 28 dias.

3.2.5. Determinação do teor de umidade

A determinação da umidade foi realizada em cada tratamento e período de incubação, retirando-se 2 amostras de 50 g de amendoim em casca. A metodologia utilizada está descrita no item 3.2.2..

3.2.6. Avaliação visual do crescimento fúngico

Foi realizada a avaliação visual do crescimento fúngico sobre a casca e grãos através da

observação, a olho nu sob luz natural, da presença de micélio e esporos numa amostra de 200 g. Essa amostra apresentou em média 130 vagens e 327 grãos. Elaborou-se uma escala visual, para quantificação do crescimento fúngico, classificada da seguinte maneira:

Para avaliação das vagens:

- = sem presença de fungo
- + = 2 a 4% das vagens apresentando incipiente crescimento fúngico
- ++ = todas as vagens apresentando moderado crescimento fúngico
- +++ = todas as vagens apresentando intenso crescimento fúngico

Para avaliação dos grãos:

- = sem presença de fungo
- + = 1 a 2% dos grãos com incipiente crescimento fúngico
- ++ = todos os grãos com incipiente crescimento fúngico
- +++ = moderado crescimento fúngico em todos os grãos
- ++++ = intenso crescimento fúngico em todos os grãos e apresentando grãos completamente verdes
- ** = incipiente crescimento fúngico em poucos grãos, porém 1 a 2% dos grãos completamente verdes (específico para algumas observações nos tratamentos OFS)

3.2.7. Análise de aflatoxinas

Foi realizada no início do experimento, para verificar a eventual presença de aflatoxinas no lote de amendoim em casca, através da retirada de 10 amostras de 200 gramas de amendoim em casca e durante todo período de incubação (0, 7, 14, 21 e 28 dias). Foram analisadas de

acordo com o método de PONS Jr. et al. (1966) modificado, seguido da quantificação por cromatografia em camada delgada em placas de vidro com sílicagel G, sob luz ultravioleta de 365 nm, segundo COOMES & FEUELL (1965), conforme descrito a seguir:

3.2.7.1. Preparo da amostra

Foram descascados 200 g do amendoim de cada tratamento e os grãos triturados em multiprocessador (Arno), obtendo-se um material finamente triturado. Em seguida o material foi homogeneizado manualmente.

3.2.7.2. Extração e purificação do extrato

De cada amostra triturada e homogeneizada, foi retirada uma subamostra de 50 g e extraída com 250 ml de acetona:água destilada (85+15) em agitador mecânico por 30 minutos, sendo a seguir, filtrado com papel de filtro Whatman nº 1. Do filtrado obtido foi tomada uma alíquota de 100 ml em um béquer de 250 ml e adicionados 80 ml de água destilada e 20 ml de solução de acetato de chumbo a 20%. Em seguida, a mistura foi agitada em movimentos circulares, deixada em repouso por 5 minutos e filtrada diretamente para um funil de separação de 250 ml, lavando-se o filtro com 20 ml de acetona:água destilada (20+80) e depois com 20 ml de água destilada.

Na extração das aflatoxinas do filtrado, foram utilizadas 2 porções de clorofórmio agitando-se fortemente

durante 1 minuto após a adição de cada porção, aguardando-se a separação das fases. As fases clorofórmicas (inferior) foram recolhidas e reunidas, passando-as através de um funil com uma camada de 5 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), diretamente para um balão de destilação. A camada de Na_2SO_4 foi lavada com 25 ml de clorofórmio após a segunda fase clorofórmica ter sido recolhida.

O extrato contido no balão de destilação foi concentrado em evaporador à vácuo até o volume de, aproximadamente, 2 ml e transferido para balão volumétrico de 5 ml, lavando-se o balão de destilação com clorofórmio até completar o volume de 5 ml.

3.2.7.3. Cromatografia em camada delgada

Alíquotas dos extratos juntamente com padrões das aflatoxinas, foram aplicados em placas cromatográficas cobertas com uma camada de 500 μ de espessura de sílicagel G 60 (Merck). Os cromatogramas foram desenvolvidos com o solvente tolueno + acetato de etila + ácido fórmico 86% (5 + 4 + 1) (BALZER et al., 1978), na distância de 10 cm em cuba de vidro, após o que a placa foi retirada e o solvente evaporado.

A observação da placa foi realizada sob lâmpada ultravioleta Philips tipo HPW de 125 W, com emissão máxima de 365 nm a uma distância de 30 cm, em uma câmara escura. A quantificação foi feita de acordo com o método de COOMES & FEUELL (1965), que consiste numa avaliação visual,

através da técnica de diluição para extinção, em que se determinou a menor alíquota onde a fluorescência das aflatoxinas foi apenas observada no limite de sua visibilidade.

3.2.7.4. Cálculo da concentração das aflatoxinas

A concentração das aflatoxinas B_1 e G_1 presentes nas amostras foram calculadas através das seguintes fórmulas:

$$\text{aflatoxina } B_1 = \frac{400 \times D}{P \times V} \mu\text{g/kg}$$

$$\text{aflatoxina } G_1 = \frac{300 \times D}{P \times V} \mu\text{g/kg}$$

D = Volume total de solvente, em ml, utilizado na extração, considerando-se concentração ou diluição da amostra

P = Peso, em gramas, da amostra

V = Volume, em μl , da menor alíquota onde a fluorescência das aflatoxinas foi observada no limite de sua visibilidade

Os valores 400 e 300, que correspondem às aflatoxinas B_1 e G_1 , respectivamente, são decorrentes do fato de que, nas condições do método estabelecidas por COOMES & FEUELL (1965), as menores quantidades das aflatoxinas B_1 e G_1 que podem ser observadas fluorescência na placa é de 0,4 e 0,3 ng, respectivamente.

3.2.8. Avaliação micológica

Foi realizada, a avaliação micológica do amendoim em casca, onde se obteve a detecção e contagem total de fungos e de fungos potencialmente aflatoxigênicos antes do reumedecimento retirando-se de cada bloco, 3 amostras de 100 g. Os meios de cultura utilizados foram: Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Ágar (DRBC) para contagem total de fungos e "*Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* Ágar" (AFPA) para detecção e contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos (PITT & HOCKING, 1985).

Colônias de fungos potencialmente aflatoxigênicos provenientes das placas do meio AFPA do amendoim antes do reumedecimento foram testadas, quanto à produção de aflatoxinas até ser encontrada no mínimo uma que fosse produtora.

O meio utilizado foi o "Yeast Extract Sucrose" (YES) descrito por DAVIS et al. (1966), composto por 2% de extrato de levedura, 20% de sacarose e 1000 ml de água destilada. O período de incubação foi de 10 dias, a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sendo em seguida realizada a extração da toxina do meio de cultura de acordo com a metodologia de FONSECA et al. (1974) descrita a seguir:.

O meio de cultura foi filtrado em funil de Büchner, com papel de filtro Whatman nº 1, utilizando-se vácuo e o meio recebido em kitazato. Foi tomada uma alíquota de 5 ml e transferida para um funil de separação de 250 ml, onde se adicionou 25 ml de clorofórmio para extração das

aflatoxinas. A fase clorofórmica foi recolhida em frasco escuro, passando-a através de uma camada de sulfato de sódio anidro. Em seguida foi feita a cromatografia em camada delgada para detecção das toxinas.

3.2.9. Avaliação dos tratamentos

Considerou-se como eficiente o tratamento em que o nível médio de aflatoxinas ($B_1 + G_1$) foi mantido abaixo de 30 $\mu\text{g/kg}$. Este valor é o limite máximo atualmente permitido pela legislação brasileira em produtos para alimentação humana (BRASIL, 1991b).

3.2.10. Análise Estatística

Foi utilizada a análise estatística descritiva, de acordo com orientação da Assessoria Estatística do Departamento de Matemática da ESALQ, em decorrência do tipo de avaliação dos tratamentos, onde não se considerou a magnitude dos resultados, mas somente o limite de 30 $\mu\text{g/kg}$. Isto permitiu uma discussão mediante um gráfico, sem aplicação de qualquer teste estatístico aos resultados obtidos.

3.2.11. Fluxograma de Execução

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teor de umidade

O teor médio de umidade inicial (base úmida), umidade após o reumedecimento (tempo zero) e umidade durante todo período de incubação (7, 14, 21 e 28 dias), das vagens de amendoim estão apresentados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Teor médio de umidade inicial, em percentagem (%), no amendoim em casca

Bloco	Umidade (*)
I	7,94
II	8,10
III	7,42

(*) média de 3 determinações

Tabela 2. Teor médio de umidade (*), em percentagem (%), no amendoim em casca durante o experimento.

Tratº	Após reume decimento	Períodos de incubação (dias)			
		7	14	21	28
AP1	17,27	17,70	17,36	15,68	12,60
AP2	17,25	17,82	17,15	15,33	14,50
GF1	17,32	17,87	17,14	15,74	15,36
GF2	16,95	17,63	15,47	14,90	14,01
OFS1	16,71	17,37	16,47	14,95	12,92
OFS2	16,28	17,86	16,20	14,95	13,54
TBZ1	17,26	18,08	17,10	15,66	14,65
TBZ2	16,39	17,22	15,24	15,03	14,80
TEST	17,26	17,96	17,15	17,10	16,55

(*) média de 2 determinações em cada bloco

Legenda para os tratamentos:

AP1 = ácido propiônico 3000 mg/kg de amendoim em casca

AP2 = ácido propiônico 5000 mg/kg de amendoim em casca

GF1 = extrato de semente de "grapefruit" 5000 mg/kg de amendoim em casca

GF2 = extrato de semente de "grapefruit" 10000 mg/kg de amendoim em casca

OFS1 = ortofenilfenato de sódio 2500 mg/kg de amendoim em casca

OFS2 = ortofenilfenato de sódio 5000 mg/kg de amendoim em casca

TBZ1 = thiabendazole 1000 mg/kg de amendoim em casca

TBZ2 = thiabendazole 5000 mg/kg de amendoim em casca

TEST = sem tratamento

Observa-se, pela Tabela 2, que o teor médio de umidade do amendoim em casca sempre foi superior a 10%. Acima de 10% de umidade pode haver desenvolvimento de fungos e consequente produção de aflatoxinas (FONSECA et al., s.d.; COLE, 1989).

Isso demonstra a existência de umidade favorável ao crescimento fúngico e produção de aflatoxinas durante todo período do experimento. A umidade relativa da estufa, onde o amendoim permaneceu incubado, não foi controlada, entretanto uma bandeja com água foi colocada dentro da estufa para manter o ar úmido e assim evitar que houvesse grande perda de umidade do amendoim.

4.2. Avaliação micológica.

Os resultados da avaliação micológica e do potencial de produção de aflatoxinas dos isolados de fungos potencialmente aflatoxigênicos, do amendoim em casca antes do reumedecimento, estão apresentados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Valores médios da contaminação fúngica no amendoim em casca seco, antes do reumedecimento.

Bloco	Amostra	Contagem total de fungos ¹ (UFC/g) [*]	Contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos ² (UFC/g) [*]
I	vagem	$8,7 \times 10^3$	$2,1 \times 10^2$
	grão	$2,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10$
II	vagem	$5,9 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$
	grão	$2,3 \times 10^3$	$7,3 \times 10$
III	vagem	$2,8 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$
	grão	$1,0 \times 10^2$	-**

UFC = unidades formadoras de colônias

1 Meio de cultura DRBC

2 meio de cultura AFPA

* Valores médios obtidos de 3 determinações (de duplicatas) em cada bloco

** menor que 10 UFC/g

Tabela 4. Resultado dos isolados, de fungos potencialmente aflatoxigênicos das amostras de amendoim em casca antes do reumedecimento, testados em meio "YES" quanto à produção de aflatoxinas.

Bloco	Amostra	nº isolados testados	nº isolados produtores
I	1	3	0
I	2	2	1
I	3	2	1
II	1	1	1
II	2	1	1
II	3	1	1
III	1	1	1
III	2	1	1
III	3	1	1

As amostras de amendoim em casca seco, com teores de umidade entre 7,42 e 8.10%, foram analisadas antes do reumedecimento de cada um dos três blocos avaliados e mostraram que a ordem de contaminação fúngica das vagens foi de 10^3 UFC/g (unidades formadoras de colônia por grama de amendoim em casca) e de seus respectivos grãos entre 10^2 e 10^3 UFC/g. Na avaliação da contaminação por fungos potencialmente aflatoxigênicos verificou-se que a ordem de contaminação por estes, nas vagens, foi de 10^2 UFC/g e a de seus grãos apresentou-se menor (10 UFC/g) ou mesmo ausente (Tabela 3).

A legislação brasileira permite um máximo de 5×10^3 UFC de bolores + leveduras por grama de sementes comestíveis cruas, torradas, salgadas (BRASIL, 1991a).

KARUNARATNE & BULLERMAN (1990) relataram que alimentos e grãos, com baixas contagens de fungos (10^1 a 10^3 UFC/g), são considerados de melhor qualidade e mais seguros que aqueles que apresentam altas contagens (10^6 UFC/g). Entretanto, experiências de campo têm mostrado que a contaminação fúngica, a despeito de seu nível, pode levar a problemas de toxidez.

A baixa densidade de inóculo de *A. flavus* ou *A. parasiticus* tem sido correlacionada, por estudos *in vitro*, à maior produção de aflatoxinas (SHARMA et al., 1980; KARUNARATNE & BULLERMAN, 1990). Assim, parâmetros de contaminação fúngica considerados seguros não podem ser aplicados aos fungos potencialmente aflatoxigênicos.

De acordo com SCHROEDER & CARLTON (1973), linhagens de espécies produtoras de aflatoxinas, variam acentuadamente na habilidade de produzir e acumular as toxinas. Assim, o objetivo da detecção de *A. flavus* ou *A. parasiticus* não foi a constatação de sua frequência antes e depois dos tratamentos, mas confirmar sua presença, bem como, avaliar seu potencial produtor de aflatoxinas. Como pode ser observado na Tabela 4, todos os blocos apresentaram isolados produtores de aflatoxinas.

4.3. Avaliação visual do crescimento fúngico

Nas Tabelas 5 a 8 são apresentados os resultados da avaliação visual do crescimento fúngico sobre a casca e grãos através da observação a olho nu, sob luz natural.

Tabela 5. Avaliação visual das vagens e grãos de amendoim em casca tratado, após 7 dias de incubação.

TRATQ	BLOCO I		BLOCO II		BLOCO III	
	vagem	grão	vagem	grão	vagem	grão
AP1	-	-	-	+	-	-
AP2	-	-	-	-	-	-
GF1	+++	++++	+++	+++	+++	+++
GF2	++	++++	++	+++	++	+++
OFS1	-	+	+	-	+	+
OFS2	-	+	-	-	-	+
TBZ1	++	++	+++	+++	+++	+++
TBZ2	++	++	++	+++	++	+++
TEST.	+++	++++	+++	++++	+++	+++

Legenda (também utilizada nas demais tabelas a seguir)

Para avaliação das **vagens**:

- = sem presença de fungo
- + = poucas (3-5) vagens apresentando incipiente crescimento fúngico
- ++ = todas as vagens apresentando moderado crescimento fúngico
- +++ = todas as vagens apresentando intenso crescimento fúngico

Para avaliação dos **grãos**:

- = sem presença de fungo
- + = poucos (3-5) grãos com incipiente crescimento fúngico
- ++ = todos os grãos com incipiente crescimento fúngico
- +++ = moderado crescimento fúngico em todos os grãos
- ++++ = intenso crescimento fúngico em todos os grãos e apresentando grãos completamente verdes

- ** = incipiente crescimento fúngico em poucos grãos, porém 3-5 grãos completamente verdes (específico para algumas observações nos tratamentos OFS)

Tabela 6. Avaliação visual das vagens e grãos de amendoim em casca tratado, após 14 dias de incubação.

TRATº	BLOCO I		BLOCO II		BLOCO III	
	vagem	grão	vagem	grão	vagem	grão
AP1	++	++	++	+	++	++
AP2	-	-	-	-	-	-
GF1	+++	+++	+++	++++	+++	+++
GF2	+++	++++	+++	++++	+++	+++
OFS1	+	**	+	**	+	++
OFS2	-	+	-	**	-	**
TBZ1	+++	++++	+++	++++	+++	++++
TBZ2	++	++++	+++	++++	+++	++++
TEST.	+++	++++	+++	++++	+++	++++

Tabela 7. Avaliação visual das vagens e grãos de amendoim em casca tratado, após 21 dias de incubação.

TRATº	BLOCO I		BLOCO II		BLOCO III	
	vagem	grão	vagem	grão	vagem	grão
AP1	++	++	++	++	++	++
AP2	-	-	+	+	-	-
GF1	+++	++++	+++	++++	+++	++++
GF2	+++	++++	+++	++++	+++	++++
OFS1	+	+++	+	**	+	**
OFS2	+	**	+	+	-	**
TBZ1	+++	++++	+++	++++	+++	++++
TBZ2	+++	++++	+++	++++	+++	++++
TEST.	+++	++++	+++	++++	+++	++++

Tabela 8. Avaliação visual das vagens e grãos de amendoim em casca tratado, após 28 dias de incubação.

TRATº	BLOCO I		BLOCO II		BLOCO III	
	vagem	grão	vagem	grão	vagem	grão
AP1	++	++	++	++	++	++
AP2	-	-	-	-	-	-
GF1	+++	++++	+++	++++	+++	++++
GF2	+++	++++	+++	++++	+++	++++
OFS1	+	**	+	**	++	**
OFS2	-	++	-	+	-	**
TBZ1	+++	++++	+++	++++	+++	++++
TBZ2	++	++++	+++	++++	+++	++++
TEST.	+++	++++	+++	++++	+++	++++

4.4. Teor de aflatoxinas

As 10 amostras de amendoim em casca, retiradas inicialmente, apresentaram-se com níveis não detectáveis de aflatoxinas. Considerou-se como não detectada (N.D.), uma contaminação $\leq 0,5 \mu\text{g/kg}$, que é o limite mínimo de detecção do método de PONS Jr. et al. (1966).

Os teores de aflatoxinas ($B_1 + G_1$) após o reumedecimento e durante os períodos de incubação, em cada bloco, estão apresentados nas Tabelas 9 a 13.

Tabela 9. Teor de aflatoxinas ($B_1 + G_1$), em $\mu\text{g/kg}$, no amendoim em casca após o reumedecimento, no tempo zero.

Tratº	BLOCO I	BLOCO II	BLOCO III	MÉDIA
AP1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AP2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
GF1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
GF2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
OFS1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
OFS2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TBZ1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TBZ2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TEST.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. - não detectada

Tabela 10. Teor de aflatoxinas ($B_1 + G_1$), em $\mu\text{g/kg}$, no amendoim em casca após 7 dias de incubação.

Tratº	BLOCO I	BLOCO II	BLOCO III	MÉDIA
AP1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AP2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
GF1	5.833	2.000	437	2.757
GF2	1.563	N.D.	500	688
OFS1	N.D.	275	175	150
OFS2	2.431	1.625	400	1.485
TBZ1	833	1.000	2.375	1.403
TBZ2	958	2.150	350	1.153
TEST.	2.500	7.500	87	3.362

N.D.- não detectada

Tabela 11. Teor de aflatoxinas ($B_1 + G_1$), em $\mu\text{g/kg}$, no amendoim em casca após 14 dias de incubação.

Tratº	BLOCO I	BLOCO II	BLOCO III	MÉDIA
AP1	N.D.	4	N.D.	1.3
AP2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
GF1	5.667	17.500	8.750	10.639
GF2	117	10.000	2.500	4.206
OFS1	14.375	12.500	3.500	10.125
OFS2	2.042	13.750	5.750	7.181
TBZ1	48.333	25.000	13.750	29.028
TBZ2	20.600	10.417	5.000	12.006
TEST.	20.600	21.875	13.750	18.742

N.D. → não detectada

Tabela 12. Teor de aflatoxinas ($B_1 + G_1$), em $\mu\text{g/kg}$, no amendoim em casca após 21 dias de incubação.

Tratº	BLOCO I	BLOCO II	BLOCO III	MÉDIA
AP1	62	N.D.	708	257
AP2	11	N.D.	N.D.	4
GF1	43.000	9.167	12.500	56.334
GF2	5.000	1.250	2.500	2.917
OFS1	2.400	5.000	8.750	5.383
OFS2	10.000	38.335	4.584	17.640
TBZ1	27.500	47.500	35.000	36.667
TBZ2	10.150	10.417	2.708	7.758
TEST.	175.000	115.000	35.000	108.333

N.D. → não detectada

Tabela 13. Teor de aflatoxinas ($B_1 + G_1$), em $\mu\text{g/kg}$, no amendoim em casca após 28 dias de incubação.

Tratº	BLOCO I	BLOCO II	BLOCO III	MÉDIA
AP1	N.D.	312	N.D.	104
AP2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
GF1	43.750	25.375	43.750	37.625
GF2	7.900	2.375	5.000	5.092
OFS1	17.500	13.750	2.500	11.250
OFS2	2.750	1.750	14.375	6.292
TBZ1	22.000	41.500	32.500	32.000
TBZ2	16.600	13.000	17.500	15.700
TEST.	35.000	43.000	12.500	30.167

N.D. → não detectada

4.5. Avaliação da eficiência dos tratamentos

Como mostra a Figura 1, o tratamento AP1 foi eficiente quanto ao controle da produção de aflatoxinas até o 14º dia de incubação. Após essa data, os teores médios de contaminação se mantiveram acima de 30 $\mu\text{g/kg}$. O tratamento AP2 foi eficiente no controle da produção de aflatoxinas durante todo período de incubação. O tratamento testemunha aos 7 dias já apresentava um teor elevado de contaminação (média de 3.362 $\mu\text{g/kg}$).

A eficiência dos tratamentos AP1 até o 14º dia e AP2 durante todo período, parece ser devida à volatilização do ácido, permitindo que além da ação sobre os fungos da superfície externa da vagem, o mesmo agisse, também, sobre os fungos dos grãos contidos nessas vagens. O ácido propiônico,

devido à sua volatilidade, proporciona uma distribuição mais uniforme sobre o material tratado. Entretanto, devido a essa característica, podem ocorrer perdas de até 70% do ácido na aplicação (SMITH & MOSS, 1985). Neste experimento, o acondicionamento das amostras pode ter minimizado essas perdas e de certa forma favorecido a ação do ácido sobre as vagens e grãos por manter o amendoim tratado em um ambiente saturado.

Esta característica de volatilidade, não ocorre nas demais substâncias avaliadas e assim a vagem pode ter sido uma barreira física para ação das mesmas sobre os fungos existentes internamente nos grãos.

Fig. 1. Teor médio de aflatoxinas (B1+G1) no amendoim em casca tratado quimicamente, em cada período de avaliação.

De acordo com AL HILLI & SMITH (1979) e SMITH & MOSS (1985), o ácido propiônico inibe a germinação de esporos de *A. flavus*, apresentando um efeito fungistático. Todavia, a germinação dos esporos pode ocorrer depois que quantidade suficiente do ácido tenha sido metabolizada por estes. Essa observação pode explicar o controle até o 14º dia de incubação no tratamento AP1 onde a dose de ácido propiônico foi menor.

Os demais tratamentos (GF1, GF2, OFS1, OFS2, TBZ1, TBZ2) não foram eficientes no controle da produção de aflatoxinas no amendoim em casca. Os teores médios de contaminação destes tratamentos sempre foram superiores ao limite de 30µg/kg e muitas vezes semelhantes àqueles apresentados pelo tratamento testemunha, como se observa na Figura 1.

Pela análise visual, realizada em todos os tratamentos, verificou-se que o tratamento AP1 até o 14º dia de incubação controlou o crescimento fúngico. Após esse período todas as vagens e grãos sempre apresentaram crescimento fúngico moderado (++) e incipiente (+), respectivamente. Já o tratamento AP2, com apenas uma exceção (amostra referente ao bloco II aos 21 dias de incubação - Tabela 11), nenhuma amostra apresentou crescimento fúngico tanto na vagem como no grão.

Nos tratamentos OFS1 e OFS2, em todos os períodos de incubação, a superfície externa das vagens apresentou-se clara com nenhum ou incipiente crescimento fúngico. Todavia, quando as vagens foram abertas, na maior parte das

amostras, os grãos apresentaram algum tipo de crescimento, com altos níveis de aflatoxinas. A ação do ortofenilfenato de sódio, nas duas doses empregadas, aparentemente, foi limitada aos fungos da superfície externa das vagens. Desse modo, eliminando-se a microbiota fúngica externa, o *A. flavus* já existente nos grãos das vagens intactas (DINNER et al., 1987; SMITH & MOSS, 1985) não encontrando competição, predominou. Esta observação está de acordo com trabalhos realizados por diversos autores mostrando que a presença de fungos competidores diminuem o crescimento e a produção de aflatoxinas pelo *A. flavus* (MOREAU, 1979; BULLERMAN & LEE, 1987; NOUT, 1989).

Notou-se, nos demais tratamentos (GF1, GF2, TBZ1, TBZ2 e TEST), desde o 7º dia, contaminação com aflatoxinas (Tabelas 10 a 13) e através da avaliação visual, crescimento fúngico sobre as vagens e grãos (Tabelas 5 a 8).

Os tratamentos GF1 e GF2 não controlaram o crescimento de fungos nem a produção de aflatoxinas contrariando os trabalhos realizados *in vitro* por INSTITUTO BIOLÓGICO² e AGUIAR & BASTOS (1983).

Também os tratamentos TBZ1 e TBZ2 não confirmaram os resultados já obtidos *in vitro* e em grãos de milho com doses inferiores às usadas neste trabalho (AGUIAR et al. 1980; AGUIAR & BASTOS, 1982).

²Correspondência enviada à CHEMIE Bras. Ind. Com. Ltda, 1983

Segundo SCOTT (1989) e LACEY (1989), outras substâncias, apesar de se mostrarem eficientes em experimentos *in vitro*, apresentaram pouca ou nenhuma atividade contra fungos de campo ou de armazenamento, quando testadas em produtos agrícolas.

A variação dos teores de aflatoxinas observados entre os blocos em cada tratamento ocorreu, provavelmente, devido à preservação da contaminação natural do amendoim em casca e assim ter sofrido influência de fatores como: competição microbiana, variabilidade no potencial aflatoxigênico das diferentes linhagens presentes (DIENNER & DAVIS, 1977; MOREAU, 1979; NOUT, 1989) e densidade de inóculo de *A. flavus*/*A. parasiticus* (SHARMA et al., 1980; KARANARATNE & BULLERMAN, 1990).

Pelos resultados obtidos, não foi possível correlacionar crescimento fúngico com produção de aflatoxinas, nem a intensidade de crescimento com os teores de aflatoxinas. Alguns tratamentos embora apresentassem crescimento fúngico, não se apresentavam contaminados com aflatoxinas (GF2 bloco II e OFS1 bloco I após 7 dias de incubação); por outro lado, outros tratamentos que apresentavam a mesma intensidade de crescimento que os tratamentos citados, continham teores de aflatoxinas acima de 1.000 µg/kg. Possivelmente, por haver trabalhado com a microbiota natural do amendoim, ocorreu competição do *A. flavus* com outros fungos ou mesmo a presença de fungos antagonistas que afetaram o crescimento e a produção de

aflatoxinas. Essas observações estão de acordo com os resultados encontrados por ROY & CHOURASIA (1990), que verificaram inibição do crescimento de *A. flavus* na presença de *A. niger*, *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma viride* em 95,5%; 60,4% e 53,15% respectivamente e também a produção de aflatoxina B₁ foi reduzida em 91%, 61% e 85%, respectivamente.

Ao ser planejado este trabalho, tinha-se como meta testar substâncias que pudessem controlar a produção de aflatoxinas, quando aplicadas no amendoim em casca e, a partir dos resultados obtidos, utilizá-los em futuros trabalhos, para verificar a viabilidade técnica e econômica da(s) substância(s) eficiente(s), bem como realizar estudos de resíduos nos grãos após armazenamento e/ ou processamento.

5. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1) O ácido propiônico, empregado na forma de propionato de amônio, na concentração de 5000 mg/kg foi eficiente no controle da produção de aflatoxinas quando aplicado no amendoim em casca úmido, mantendo os níveis de contaminação com aflatoxinas abaixo de 30 µg/kg (limite máximo permitido por lei);

2) Os tratamentos: extrato de semente de "grapefruit" (5000 e 10000 mg/kg); ortofenilfenato de sódio (2500 e 5000 mg/kg) e thiabendazole (1000 e 5000 mg/kg), também testados, não se mostraram eficientes;

3) Devem ser realizados ensaios onde o tratamento com ácido propiônico, empregado na forma de propionato de amônio, na dose de 5000 mg/kg possa ser avaliado, quanto ao controle da produção de aflatoxinas, em condições de campo ou a nível de armazém.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L.A.B. & BASTOS, S.T.G. Efeito de thiabendazol sobre o desenvolvimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 7 (3): 573, out. 1982.
- AGUIAR, L.A.B. & BASTOS, S.T.G. Inibição da produção de aflatoxinas e ocratoxinas sintetizadas por *Aspergillus* spp pela ação do extrato da semente de grapefruit. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE AVICULTURA, 8., Camboriú, 1983. *Anais*. Camboriú, Sociedade Brasileira de Avicultura, 1983. p.530-7.
- AGUIAR, L.A.B.; LIN, M.T.; BASTOS, S.T.G. Efeito de dezesseis compostos químicos sobre a produção de aflatoxinas e o desenvolvimento de *Aspergillus* spp. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 5 (3): 378, out. 1980.
- AL-HILLI, A.L. & SMITH, J.E. Influence of propionic acid on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, 6: 367-70, 1979.
- ASHWORTH Jr., L.J. & LANGLEY, B.C. The relationship of pod damage to kernel damage by molds in Spanish peanuts. *Plant Disease Reporter*, Washington, 48 (12): 875-8, 1964.
- AUSTWICK, P.K.C. & AYERST, G. Groundnut microflora and toxicity. *Separata de Chemistry and Industry*, London. p. 55-61, Jan. 1963.
- BALZER, I.; BOGDANIC, C.; PEIJNJAK, S. Rapid thin layer chromatographic method for determination of aflatoxin B₁, ochratoxin A and zearalenone in corn. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, 61: 584, 1978.
- BAMPTON, S.S. Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in groundnuts-Part I. *Tropical Science*, London, 5 (2): 74-81, 1963.
- BASF. Valoración del empleo de ácidos orgánicos en la conservación de alimentos balanceados y en la engorda de cerdos y aves. s.l., s.ed, 1990. 17 p.

- BELL, D.K. & DOUPNIK JUNIOR, B. Chemical treatment of peanuts in windrow to control *Aspergillus flavus* and aflatoxins 1. *Journal American Peanut Research and Education Association*, Yoakum, 3 (1):31-2, 1971.
- BELL, D.K. & DOUPNIK JUNIOR, B. Chemicals in the windrow for controlling aflatoxins in peanuts. *Journal American Peanut Research and Education Association*, Yoakum, 4: 18-20, Aug. 1972.
- BLANC, M. *Moyens de prevention et de destruction des aflatoxines; cas des graines d'arachide et leurs derivés*. Massey, Centres de Documentation Internationale des Industries Utilisatrices de Produits Agricoles, 1981. 115 p. (Synthese Bibliographique Publiée dans le Patronage de la MIDIST, 27).
- BRASIL. Ministério da Agricultura. *Regras para análise de sementes*. Brasília, Depto Nacional de Produção Vegetal, 1976. 188 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 01, de 28 de jan. de 1987. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. *Compêndio da legislação de alimentos*. São Paulo, 1991a. v.1/A, p.7.1(87) - 7.8(87).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 34/76 publicada no Diário Oficial da União de 19 de Jan. 1977. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. *Compêndio da legislação de alimentos*. São Paulo, 1991b. v.1/A, p. 7.20 (76).
- BUCHANAN JR., R.L. & AYRES, J.C. Effect of sodium acetate on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *Journal of Food Science*, Chicago, 41(1): 128-32, 1976.
- BULLERMAN, L.B. & LEE, S. Effects of competitive molds on growth and aflatoxin production by *A.flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Food Protection*, Ames, 50 (10): 896, Oct. 1987.
- BU'LOCK, J.D. Secondary metabolism in fungi and its relationships to growth and development. In: SMITH, J.E. & BERRY, D.R. ed. *The filamentous fungi*. London, Edward Arnold, 1975. v.1, p. 33-56.
- CARTER, J. B. H. *Studies on growth of Aspergillus flavus on groundnut kernels*. Reading, 1970. 152p. (Doctor of Philosophy -Faculty of Agriculture/University of Reading).

- COLE, R.J. Preharvest aflatoxin in peanuts. *The Manufacturing Confectioner*, Chicago, p. 81-2, Nov. 1989.
- COLE, R.J.; BLANKENSHIP, P.D.; HILL, A.; SANDERS, T.H. Effects of geocarposphere temperature on preharvest colonization of drought stressed peanuts by *Aspergillus flavus* and subsequent aflatoxin contamination. In: KURATA, H. & UENO, Y., ed. *Toxigenic fungi; their toxins and health hazard*. Amsterdam, Elsevier, 1984. p.44-51. (Development in Food Science 7).
- COOMES, T.J. & FEUELL, A.J. Recommended procedures for detection and estimation of aflatoxin B₁ in groundnuts and groundnuts materials. *Tropical Products Institute*, London, G13: 1-24, May 1965.
- DAVIS, N.D.; DIENER, U.L.; ELDRIDGE, D.W. Production of aflatoxins B₁ and G₁ By *Aspergillus flavus* in semisynthetic medium. *Applied Microbiology*, Washington, 14: 378-80, 1966.
- DICKENS, J.W. & KHALSA, J.S. Windrow orientation and harvesting damage to peanuts. *Oléagineux*, Montpellier, 22 (12): 741-6, Dec., 1967.
- DICKENS, J.W. & PATTEE, H.E. The effect of time, temperature and moisture on aflatoxin production in peanuts inoculated with a toxic strain of *Aspergillus flavus*. *Tropical Science*, London, 8 (1): 11-22, 1966.
- DIENER, U.L. & DAVIS, N.D. Aflatoxin formation in peanuts by *Aspergillus flavus*. Auburn, Alabama Agricultural Experiment Station, 1977. 44p. (Bulletin, 493).
- DIENER, U.L.; COLE, R.J.; SANDERS, T.H.; PAYNE, G.A.; LEE, L.S.; KLICH, M. A. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 25: 249-70, 1987.
- FONSECA, H. Pré-processamento. In: CÂMARA, G.M.S.; GODOY, O.P.; MARCOS FILHO, J.; FONSECA, H. *Amendoim; produção, pré-processamento e transformação agroindustrial*. São Paulo, Sec. Ind. Com. Ciência e Tecnologia; Piracicaba, FEALQ, s.d. p.39-45. (Extensão Agroindustrial, 3).
- FONSECA, H. Levantamento do teor de aflatoxina em tortas e farelos e farinha de amendoim *Arachis hypogaea* L. no Estado de São Paulo. Piracicaba, 1968. 64 p. (Doutorado -Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- FONSECA, H. Contribuição ao estudo da aflatoxina no amendoim *Arachis hypogaea* L. da colheita à industrialização. Piracicaba, 1969. 81 p. (Livre Docência-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- FONSECA, H.; MARTINELLI FILHO, A.; DEL NERY, H.; RONCATTO, E. Espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxina na região araraquarense, SP. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 31: 519-36, 1974.
- FONSECA, H.; SAVY, A.; SOAVE, J.; CANECCHIO, V. Estudo do controle químico do *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxina no amendoim (*Arachis hypogaea* L.) no campo. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 33: 337-47, 1976.
- FONSECA, H.; NOGUEIRA, J.N.; CALORI-DOMINGUES, M.A.; ZAMBELLO, I.; FONSECA, E.L. Post-harvest chemical treatment of unshelled moist peanuts with sodium orthophenilphenate to control aflatoxigenic fungi. I. Field tests. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 26 (4): 279-83, out./dez., 1992.
- FONSECA, H.; VALARINI, I.; CALORI-DOMINGUES, M.A.; WETTSTEIN, A.S. R.; SILVA, A.E.G. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim no estado de São Paulo nos anos de 1988 e 1989. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS 6., São Paulo, 1990. *Anais*, São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1990. p.46-8.
- GALLEP, J.C.T. Ácido propiônico. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS PROBLEMAS E SOLUÇÕES, São Paulo, 1980. *Anais*. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1980. p.64-8.
- GARNER, R.C. Human biomonitoring for aflatoxin exposure at the molecular level. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS. 8., Mexico City, 1992. *Proceedings*. Mexico City, IUPAC, 1992. P. 35.
- GOLDBLATT, L.A. & DOLLEAR, F.G. Review of prevention, elimination, and detoxification of aflatoxins. *Pure & Applied Chemistry*, Oxford, 49: 1759-64, 1977.
- GOLUMBIC, C. & KULIK, M.M. Fungal spoilage in stored crops and its control. In: GOLDBLATT, L.A., ed. Aflatoxin; scientific background, control, and implications. New York, Academic Press, 1969. cap.11, p.307-32. (Food Science and Technology. A Series of Monographs).

- HILL, R.A.; BLANKENSHIP, P.D.; COLE, R.J.; SANDERS, T.H. Effects of soil moisture and temperature on preharvest invasion of peanuts by *Aspergillus flavus* group and subsequent aflatoxin development. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 45 (2): 628-33, Feb. 1983.
- HOLBERG, T.; KASPERSSON, A.; GORANSSON, B.; KOZAKIEWICZ, Z.; KRAMNAS, L. Aflatoxin production and tolerance to organic acids by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolated from acid treated moist grain. *Acta Agriculturae Scandinavica*, Stockholm, 39 (4): 449-55, 1989. Apud *Review Medical of Veterinary Mycology* (DIALOG: CAB Abstracts, File 50).
- JACKSON, C.R. Location of fungal contamination or infection in peanut kernels from intact pods. *Plant Disease Reporter*, Washington, 48 (12): 980-3, Dec. 1964.
- JACKSON, C.R. Laboratory Evaluation of fungicides for control of some fungi found on peanuts. *Plant Disease Reporter*, Washington, 49 (11): 928-31, Nov. 1965.
- KARUNARATNE, A. & BULLERMAN, L.B. Interactive effects of spore load and temperature on aflatoxin production. *Journal of Food Protection*, Ames, 53 (3): 227-9, 1990.
- KIMATI, H. Fungicidas. In: GALLI, F., coord. *Manual de fitopatologia*. 2.ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 1978. v. 1, cap.18, p.325-73.
- LACEY, J. Prevention of mould growth and mycotoxin production through control of environmental factors. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 7., Tokyo, 1988. *Mycotoxins and phycotoxins'88*, edited by S. Natori and others. Amsterdam, Elsevier Science, 1989. p.161-9. (Bioactive Molecules, 10)
- LACEY, J. & LORD, K.A. Methods for testing chemical additives to prevent molding of hay. *Annals of Applied Biology*, London, 87: 327-35, 1977.
- LEITÃO, M.F.F. Conservadores em alimentos e fatores que afetam sua eficiência no controle de microrganismos. In: SEMINÁRIO: CONSERVADORES E ACIDULANTES EM ALIMENTOS, Campinas, 1989. *Anais*. Campinas, ITAL, 1989. p.59-80.
- LIN, M.T. Biologia dos fungos toxigênicos. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS PROBLEMAS E SOLUÇÕES, São Paulo, 1980. *Anais*. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1980. p.11-22.

- LINDSEY, D.L. Effect of *Aspergillus flavus* on peanuts grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, Lancaster, 60: 208-11, 1970.
- MADAAN, S.L. & CHOCHAN, J.S. Efficacy of antimicrobial chemicals to control post-harvest occurrence of *Aspergillus flavus* in ground-nut kernels. *Indian Phytopathology*, New Delhi, 31: 57-9, 1978.
- MALLOZI, M.A.B.; CAMPACCI, C.A.; CHIBA S. Ação do ácido propiônico na produção de aflatoxina e no crescimento de *Aspergillus flavus*. *Suma Phytopathologica*, Jaguariúna, 11: 220-9, jul./dez. 1985.
- MARSHALL, D.L. & BULLERMAN, L.B. Effect of sucrose esters in combination with selected mold inhibitors on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection*, Ames, 49 (5): 378-82, 1986.
- MEHAN, V.K.; MAYEE, C.D.; JAYANTHI, S.; McDONALD, D. Preharvest seed infection by *Aspergillus flavus* group fungi and subsequent aflatoxin contamination in groundnuts in relation to soil types. *Plant and Soil*, Dordrecht, 136 (2): 239-48, 1991a.
- MEHAN, V.K.; McDONALD, D.; HARAVU, L.J.; JAYANTHI, S. The groundnut problem: review and literature database. Patancheru: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1991b. 387 p.
- MOREAU, C. Aflatoxicosis. In: MOREAU, C. *Molds, toxins and food*. Chichester, John Wiley, 1979. cap. 3, p. 63-76.
- MOSS, M.O. & FRANK, M. Prevention: effects of biocides and other agents on mycotoxin production. In: WATSON, D.H., ed. *Natural toxicants in food; progress and prospects*. New York, VCH; Chichester, Horwood, 1987. cap.8, p. 231-51.
- NOUT, M.J.R. Effect of *Rhizopus* and *Neurospora* spp. on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and accumulation of aflatoxin B₁ in groundnut. *Mycological Research*, Cambridge, 93 (4): 518-23, 1989.
- OLIVERAS, P.L. & ZEVADA, M.Z. Acción de algunos fungicidas in la conservación de maíz y triticales. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México. Série Botanica*, México, (47/53): 239-65, 1976/1982.
- ORGANIZATION PANAMERICANA DA LA SALUD. *Micotoxinas*. México, 1983. 131p.. (Publicación Científica, 453)

- PEERS, F.G.; GILMAR, G.A.; LINSELL, G.A. Dietary aflatoxins and human liver cancer: a study in Swaziland. *International Journal of Cancer*, New Delhi, 17 (2): 167-76, 1976. Apud MEHAN, V.K.; McDONALD, D.; HARAVU, L.J.; JAYANTHI, S. The groundnut problem: review and literature database. Patancheru: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1991. p. 35 (Resumo).
- PETTIT, R.E. & TARBER, R.A. Fungal invasion of peanut kernels as influenced by harvesting and handling procedures. *Phytopathology*, Lancaster, 60: 1307, Sept. 1970.
- PETTIT, R.E.; TARBER, R.A.; SCHROEDER, H.W.; HARRISON, A.L. Influence of fungicides and irrigation practice on aflatoxin in peanuts before digging. *Applied Microbiology*, Washington, 22 (4): 629-34, Oct. 1971.
- PITT, J.I. & HOCKING, A.D. *Fungi and food spoilage* Sidney, Academic Press, 1985. 412 p. (Food science and technology. A series of monographs).
- PONS JUNIOR, W.A.; CUCULLU, A.F.; LEE, L.S.; ROBERTSON, J. A.; FRANZ, A.O.; GOLDBLATT, L.A. Determination of aflatoxins in agricultural products: use of aqueous acetone for extraction. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Washington, 49 (3): 554-62, 1966..
- PORTER, D.M. & WRIGHT, F.S. Proliferation of *Aspergillus flavus* in artificially infested windrow dried peanut fruit in Virginia. *Phytopathology*, Lancaster, 61: 1194-7, Oct., 1971.
- RAPER, K.V. & FENNELL, D.I. *The genus Aspergillus*. Baltimore, Willians & Wilkins, 1965. 86 p.
- RAY, L.L. & BULLERMAN, L.B. Preventing growth of potentially toxic molds using antifungal agents. *Journal of Food Protection*, Ames, 45 (10): 953-63, Aug. 1982.
- ROY, A.K. & CHOURASIA, H.K. Inhibition of aflatoxins production by microbial interaction. *Journal of General and Applied Microbiology*, Tokyo, 36: 59-62, 1990.
- SALUNKE, D.K. & DESAI, B.B. Groundnut. In: _____ *Post-harvest biotechnology of oilseeds*. Boca Raton, CRC Press, 1986. cap.3 p. 35-56.
- SAUER, D.B. & BURROUGHS, R. Efficacy of various chemicals as grain mold inhibitors. *Transactions of the ASAE*, St. Joseph, 17: 557-9, 1974.

- SCOTT, P.M. Liquid chromatography in the analysis of mycotoxins. In: LAWRENCE, J.L., ed. *Trace analysis*. New York, Academic Press, 1981. p. 193-266.
- SCOTT, P.M. Control of mycotoxins; an overview. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 7., Tokyo, 1988. *Mycotoxins and phycotoxins'88*, edited by S. Natori and others. Amsterdam, Elsevier Science, 1989. p.161-9. (Bioactive Molecules, 10).
- SCROEDER, H.W. & CARLTON, W.W. Accumulation of only aflatoxin B₂ by a strain of *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology*, Washington, 25 (1): 146-8, 1973.
- SHARMA, A.; BEHERE, A.G.; PADWALDESAI, S.R.; NADKARNI, G.B. Influence of inoculum size of *Aspergillus parasiticus* spores on aflatoxin production. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 40 (6): 989-93, Dec. 1980.
- SMITH, J.E. & MOSS, M.O. Control of mycotoxins. In: SMITH, J. E. & MOSS, M.O. *Mycotoxin; formation, analysis and significance*. Chichester, John Wiley, 1985. cap.8, p.127-42.
- STEWART, R.G.; WYATT, R.D.; ASHMORE, M.D. The effect of various antifungal agents on aflatoxin production and growth characteristics of *Aspergillus parasiticus*. *Poultry Science*, Champaign, 56 (5): 1630-5, 1977.
- TRUJILLO, C.H.B. & TRUJILLO, J.A.B. Un nuevo preservativo natural de amplio espectro para uso en alimentos. *Ciencia y Tecnologia de Alimentos*, Bogota, 2 (3): 17-22, sept./dec. 1981.
- TULPULE, P.; MANABE, J.; HAMILTON, P.; PATTERSON, D. Panel on aflatoxins. In: RODRICKS, J.V.; HESSELTINE, C.W.; MEHLMAN, M.A., ed. *Mycotoxins in human and animal health*. Park Forest South, Pathotox Publ., 1977 p. 181-6.
- VANDEGRAFT, E.E.; HESSELTINE, C.W.; SHOTWELL, O.C. Grain preservatives: effect on aflatoxin and ochratoxin production. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, 52 (1): 79-84, 1975.
- WOGAN, G.E. Chemical nature and biological effects of aflatoxins. *Bacteriological Reviews*, Washington, 30 (2): 460-70, June 1966.
- ZAMBETTAKIS, C.H. Facteurs qui déterminent le taux de la pénétration d'*Aspergillus flavus* dans les graines d'*Arachis hypogaea* avant et après la récolte. *Archives de Institute Pasteur de Tunis*, Paris, 54 (314):422-32, 1977.