**AVALIAÇÃO MICOLÓGICA DE AMENDOIM
EM CASCA (*Arachis hypogaea* L.)
TRATADO QUIMICAMENTE**

MARCIA REGINA T. DE CAMARGO RANZANI
(Economista Doméstica)

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
Outubro - 1993

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

Ranzani, Marcia T. de Camargo

R214a Avaliação micológica de amendoim em casca (*Arachis
hypogaea* L.) tratado quimicamente. Piracicaba, 1993.
161p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Amendoim em casca - Tratamento químico - Efeito
2. Fungo em amendoim - Tratamento químico I. Escola
Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 635.659

**AVALIAÇÃO MICOLÓGICA DE AMENDOIM EM CASCA
(*Arachis hypogaea* L.) TRATADO QUIMICAMENTE**

Marcia Regina T. de Camargo Ranzani

Aprovada em 19.11.1993

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Homero Fonseca ESALQ/USP

Prof. Dra. Rhame Nelly Neder ESALQ/USP

Prof. Dr. José Otávio Machado Menten ESALQ/USP

Prof. Dr. Homero Fonseca
Orientador

Aos meus pais,
Rodolpho e Déa,
pelo amor e incentivo;

Ao meu esposo, Adriano
e às minhas filhas
Fábia Regina e Rafaela,
pelo carinho, apoio e compreensão;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Homero Fonseca pela orientação sempre amiga, confiança, e dedicação.
- À Eng. Agron. Maria Antônia Calori-Domingues pela amizade, incentivo e valorosa contribuição na elaboração e execução desta pesquisa.
- Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela atenção e contribuição à minha formação profissional.
- Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, em especial à Denise de Almeida Leme Baptista e Rosalina Fátima Ocangne pelo apoio e auxílio no preparo do material.
- À acadêmica Erika Madeira Kliauga pelo auxílio no preparo das amostras.
- Ao Eng^o Agr^o Eduardo Micotti da Glória e à Biom. Ivani Valarini Zambello pela colaboração e amizade.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro indispensável à realização desta pesquisa.
- À Assessoria Estatística do Departamento de Matemática da ESALQ, em especial à Prof^a Dr^a Maria Cristina Stolff Nogueira pela definição da metodologia estatística e a MS Maria Izalina Ferreira Alves pela orientação e revisão da análise estatística.

- Aos Profs. Dr. Cláudio Rosa Gallo e Paulo César Vertoni pela atenção e relevantes sugestões.
- À bibliotecária Beatriz Helena Giocongo pela atenção prestada à revisão bibliográfica.
- Ao Prof. Dr. Rodolpho de Camargo, meu pai, que sempre acompanhou minhas atividades, pelas sugestões e pelo exemplo de vida acadêmica.
- À todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	xv
SUMMARY.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1. A contaminação fúngica do amendoim.....	6
3.2. Controle do crescimento e produção de toxinas por fungos potencialmente aflatoxigênicos pelo emprego de preservativos químicos.....	22
4. METODOLOGIA.....	32
4.1. Material.....	32
4.1.1. Amendoim.....	32
4.1.2. Substâncias em avaliação.....	32
4.1.3. Meios de cultura.....	33
4.1.4. Para a identificação das estruturas fúngicas.....	36
4.2. Métodos.....	36
4.2.1. Formação das amostras e dos blocos..	36
4.2.2. Determinação e ajuste do teor de umidade do amendoim em casca e aplicação dos tratamentos.....	37
4.2.3. Avaliação da microbiota fúngica total e dos fungos potencialmente aflatoxigênicos	39
4.2.4. Método estatístico.....	41
4.2.5. Avaliação qualitativa da microbiota fúngica presente no amendoim em casca (vagem e grão) antes e após tratamentos químicos.....	42
4.2.6. Fluxograma das avaliações para cada tratamento em cada bloco.....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1. Avaliação das amostras de amendoim seco....	47
5.2. Avaliação das amostras de amendoim reumede- cido.....	48
5.3. Avaliação das amostras de amendoim tratadas quimicamente.....	52
5.3.1. Análise estatística da variável con-	

tagem total de fungos presente nas vagens.....	59
5.3.2. Análise estatística para a variável contagem total de fungos nos grãos..	73
5.3.3. Análise estatística da variável con- tagem de fungos potencialmente afla- toxigênicos nas vagens e grãos.....	93
5.3.4. Avaliação qualitativa dos fungos pre- sentes nas vagens e grãos isolados do meio DRBC.....	101
6. DISCUSSÃO.....	114
6.1. Contaminação fúngica do amendoim em casca seco e do amendoim reumedecido.....	114
6.2. Efeito dos tratamentos químicos no controle da microbiota fúngica total presente na amendoim em casca	121
6.3. Efeito de tratamentos químicos no controle de fungos potencialmente aflatoxigênicos presentes no amendoim em casca.....	134
7. CONCLUSÕES.....	147
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	150

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Médias da contagem total de fungos em vagens de amendoim tratadas quimicamente.....	57
2	Médias da contagem total de fungos em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas quimicamente.....	57
3	Médias da contagem de fungos aflatoxigênicos em vagens de amendoim tratadas quimicamente..	58
4	Médias da contagem de fungos aflatoxigênicos em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas quimicamente.....	58
5	Médias de contaminação em vagens de amendoim tratadas com ácido propiônico na dose de 3.000 mg/kg.....	67
6	Médias de contaminação em vagens de amendoim tratadas com ácido propiônico na dose de 5.000 mg/kg.....	67
7	Médias de contaminação em vagens de amendoim tratadas com extrato de semente de "grapefruit" na dose de 10.000 mg/kg.....	69
8	Médias de contaminação em vagens de amendoim tratadas com ortofenilfenato de sódio na dose de 2.500 mg/kg.....	72
9	Médias de contaminação em vagens de amendoim tratadas com ortofenilfenato de sódio na dose de 5.000 mg/kg.....	72
10	Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com ácido propiônico na dose de 3.000 mg/kg.....	81
11	Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com ácido propiônico na dose de 5.000 mg/kg.....	81
12	Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit" na dose de 5.000 mg/kg.	84

Figura	Página
13 Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit" na dose de 10.000 mg/kg	84
14 Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio na dose de 2.500 mg/kg.....	87
15 Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio na dose de 5.000 mg/kg.....	87
16 Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com thiabendazole na dose de 1.000 mg/kg.....	90
17 Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com thiabendazole na dose de 5.000 mg/kg.....	90
18 Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens das amostras sem tratamento (testemunha).....	92
19 Médias gerais de contaminação por fungos potencialmente aflatoxigênicos em vagens de amendoim.....	100
20 Médias gerais de contaminação por fungos potencialmente aflatoxigênicos em grãos de amendoim.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Valores médios da contaminação fúngica no amendoim em casca seco, antes do reumedecimento.....	48
2 Contagem total de fungos (ufc/g) do amendoim em casca reumedecido, após 5 dias a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$..	50
3 Contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos (ufc/g) de amendoim em casca reumedecido, após 5 dias a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$	51
4 Análise de variância das médias observadas na contaminação fúngica do amendoim em casca reumedecido.....	51
5 Contagem total de fungos (ufc/g), após 7 dias de incubação a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$	53
6 Contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos (ufc/g), após 7 dias de incubação a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$	53
7 Contagem total de fungos (ufc/g), após 14 dias de incubação a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$	54
8 Contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos (ufc/g), após 14 dias de incubação a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$	54
9 Contagem total de fungos (ufc/g), após 21 dias de incubação a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$	55
10 Contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos (ufc/g), após 21 dias de incubação a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$	55
11 Contagem total de fungos (ufc/g), após 28 dias de incubação a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$	56
12 Contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos (ufc/g), após 28 dias de incubação a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$	56
13 Análise de variância geral das médias observadas na contagem total de fungos nas vagens...	59

Tabela	Página
14 Análise de variância da contagem total de fungos nas vagens, após 7, 14, 21, e 28 dias de incubação	60
15 Teste de Tukey para médias de tratamentos da contagem total de fungos nas vagens, após 7 dias de incubação	61
16 Teste de Tukey para médias de tratamentos da contagem total de fungos nas vagens, após 14 dias de incubação.....	62
17 Teste de Tukey para médias de tratamentos da contagem total de fungos nas vagens, após 21 dias de incubação.....	63
18 Teste de Tukey para médias de tratamentos da contagem total de fungos nas vagens, após 28 dias.....	64
19 Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos em vagens tratadas com ácido propiônico 3.000 mg/kg de amendoim em casca.....	65
20 Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos em vagens tratadas com ácido propiônico 5.000 mg/kg de amendoim em casca.....	66
21 Análise de variância de regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos em vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit" 10.000 mg/kg de amendoim em casca.....	68
22 Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos em vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio 2.500 mg/kg de amendoim em casca.....	70
23 Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos em vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio 5.000 mg/kg de amendoim em casca.....	70
24 Análise de variância geral das médias observadas na contagem total de fungos nos grãos..	73

Tabela

Página

25	Análise de variância da contagem total de fungos nos grãos, após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$	74
26	Teste de Tukey para médias de tratamentos da contagem total de fungos nos grãos, após 7 dias incubação.....	75
27	Teste de Tukey para médias de tratamentos da contagem total de fungos nos grãos, após 14 dias de incubação.....	76
28	Teste de Tukey para médias de tratamentos da contagem total de fungos nos grãos, após 21 dias de incubação.....	77
29	Teste de Tukey para médias de tratamentos da contagem total de fungos nos grãos, após 28 dias de incubação.....	78
30	Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos em grãos de vagens tratadas com ácido propiônico 3.000 mg/kg de amendoim em casca.....	79
31	Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos em grãos de vagens tratadas com ácido propiônico 5.000 mg/kg de amendoim em casca.....	79
32	Análise de variância de regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos em grãos de vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit" 5.000 mg/kg de amendoim em casca.....	82
33	Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos em grãos de vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit" 10.000 mg/kg de amendoim em casca.....	83
34	Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos em grãos de vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio 2.500 mg/kg de amendoim em casca.....	85

Tabela		Página
35	Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos em grãos de vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio 5.000 mg/kg de amendoim em casca.....	86
36	Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos em grãos de vagens tratadas com thiabendazole 1.000 mg/kg de amendoim em casca..	88
37	Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos em grãos de vagens tratadas com thiabendazole 5.000 mg/kg de amendoim em casca..	89
38	Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos em grãos de vagens das amostras sem tratamento (testemunha).....	91
39	Análise de variância geral das médias observadas na contagem total de fungos potencialmente aflatoxigênicos nas vagens.....	94
40	Análise de variância geral das médias observadas na contagem total de fungos potencialmente aflatoxigênicos nos grãos.....	94
41	Teste de Tukey para médias de tratamentos da contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos nas vagens.....	96
42	Teste de Tukey para médias de tratamentos da contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos nos grãos.....	96
43	Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos potencialmente aflatoxigênicos presentes nas vagens de amendoim tratadas quimicamente.....	98
44	Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos presentes nos grãos de amendoim em casca tratado quimicamente.....	98
45	Fungos presentes em vagens de amendoim e seus grãos isolados do meio DRBC, no 2º bloco.....	101

Tabela

Página

46	Fungos presentes em vagens de amendoim e seus grãos isolados do meio DRBC, no 3º bloco.....	102
47	Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) nas vagens de amendoim em casca reumedecido isolados do meio DRBC.....	103
48	Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) nos grãos de amendoim em casca reumedecido isolados do meio DRBC.....	104
49	Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com ácido propiônico na dose de 3.000 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação...	105
50	Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com ácido propiônico na dose de 5.000 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação...	106
51	Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com extrato de semente de "grapefruit" na dose de 5.000 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação.....	107
52	Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com extrato de semente de "grapefruit" na dose de 10.000 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação.....	108
53	Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com ortofenilfenato de sódio na dose de 2.500 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação.....	109
54	Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com ortofenilfenato de sódio na dose de 5.000 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação.....	110
55	Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com thiabendazole na dose de 1.000 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação...	111

Tabela

Página

56	Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com thiabendazole na dose de 5.000 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação...	112
57	Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca sem tratamento (testemunha) isolados do meio DRBC ao longo período de avaliação.....	113

AVALIAÇÃO MICOLÓGICA DE AMENDOIM EM CASCA
(*Arachis hypogaea* L.) TRATADO QUIMICAMENTE

Autora: Marcia Regina T. de Camargo Ranzani

Orientador: Homero Fonseca

RESUMO

No presente estudo, o efeito do ácido propiônico (na forma de sal amônio) nas doses de 3.000 (AP1) e 5.000 mg/kg (AP2) de amendoim em casca, extrato de semente de "grapefruit" nas doses de 5.000 (GF1) e 10.000 mg/kg (GF2), ortofenilfenato de sódio nas doses de 2.500 (OFS1) e 5.000 mg/kg (OFS2) e thiabendazole nas doses de 1.000 (TBZ1) e 5.000 mg/kg (TBZ2), foi estudado sobre a microbiota fúngica total e sobre os fungos potencialmente aflatoxigênicos presentes em amendoim em casca. Amostras de 500 g de amendoim em casca sadios e maduros foram selecionadas à mão, reumedecidas pela adição de água e mantidas sob refrigeração ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) até que alcançassem aproximadamente 16% - 18% de umidade. As amostras foram então, pulverizadas com as soluções das substâncias químicas, colocadas em sacos de polietileno tamponados com algodão e incubadas a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 28 dias. Amostras testemunha foram pulverizadas com água. A avaliação da

microbiota fúngica total e dos fungos potencialmente aflatoxigênicos foi feita, no amendoim em casca (100 g) e em seus grãos (50 g) obtidos assepticamente, antes e aos 7, 14, 21 e 28 dias de incubação por diluição em série, inoculando-se alíquotas de 1 ml, em duplicata, em "Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol" (DRBC) e *Aspergillus flavus parasiticus* Agar (AFPA). As placas em DRBC foram incubadas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 - 5 dias quando então os fungos totais foram contados. As placas em AFPA foram incubadas durante 42 - 48 horas quando as colônias de fungos potencialmente aflatoxigênicos, distinguidas pela coloração laranja-amarelada do reverso, foram contadas. Paralelamente, efetuou-se o monitoramento dos gêneros de fungos presentes em DRBC, relativos aos tratamentos estudados. As menores médias de contagem total de fungos em amendoim em casca foram obtidas no tratamento AP2 durante todo o período avaliado. O desempenho do OFS2 no controle de fungos presentes nas vagens foi similar ao AP2 ($P > 0,01$) mas, isto não aconteceu nos grãos ($P < 0,01$). As menores médias de contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos nas vagens foram do amendoim em casca tratado com AP2 e AP1 mas estas não foram diferentes de OFS1, OFS2 e TBZ2 ($P > 0,01$). Quando os grãos foram considerados, as menores médias desses fungos foram obtidas do AP2 e AP1, nesta ordem, diferindo de todos os outros tratamentos ($P < 0,01$). Em vagens e grãos de amendoim em casca tratados com AP2 e AP1 *Eurotium* sp. prevaleceu durante todo período avaliado.

As maiores médias de contagem total de fungos que não diferiram da testemunha ($P>0,01$) foram de vagens tratadas com AP1, GF1, GF2, OFS1, TBZ1 e TBZ2 e em grãos de amendoim em casca tratado com GF1, GF2, OFS1, TBZ1 e TBZ2. As maiores médias de contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos que não diferiram da testemunha ($P>0,01$) foram de vagens tratadas com GF1 e GF2 e de grãos de amendoim em casca tratado com GF1, TBZ1 e TBZ2. Considerando todo o período avaliado e as condições deste experimento o melhor tratamento foi AP2. O tratamento AP1 embora não tenha diferido de AP2, nos grãos, quando os fungos aflatoxigênicos foram considerados, ele diferiu ($P<0,01$) na contagem total de fungos quando, no tratamento AP1, aumentou durante o período de incubação sugerindo um controle indireto dos fungos potencialmente aflatoxigênicos.

MYCOLOGICAL EVALUATION OF CHEMICALLY TREATED
UNSHELLED PEANUTS (*Arachis hypogaea* L.)

Author: Marcia Regina T. de Camargo Ranzani

Adviser: Homero Fonseca

SUMMARY

In the present work, the effect of propionic acid (ammonium salt) at 3.000 (PA1) e 5.000 mg/kg (PA2) of unshelled peanuts, grapefruit seed extract at 5.000 (GF1) e 10.000 mg/kg (GF2), sodium ortho-phenylphenate at 2.500 (SOPP1) e 5.000 mg/kg (SOPP2) and thiabendazole at 1.000 (TBZ1) e 5.000 mg/kg (TBZ2), was studied for controlling total and potentially aflatoxigenic fungi in unshelled peanuts. Samples of 500 g of sound mature unshelled peanuts, hand picked selected were moistened by adding water and kept refrigerated ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) till they reached ca. 16% - 18% moisture. The samples were then sprayed with the chemicals substances solutions, put in polyethylene bags with cotton plugs and incubated at $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 28 days. Test samples were sprayed with water. The evaluation of total and aflatoxigenic fungi was made, on unshelled peanuts (100 g) and in its kernels (50 g) obtained aseptically, before and at 7, 14, 21 e 28 days of

incubation by serial dilution, inoculating 1 ml aliquots, in duplicate, in Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) and in *Aspergillus flavus parasiticus* Agar (AFPA). DRBC plates were incubated at $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 4 - 5 days when total fungi were counted. AFPA plates were incubated at $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ during 42 - 48 hours when the potentially aflatoxigenic fungi colonies, distinguished by orange yellow reverse color, were counted. In parallel, monitoring was effectuated of fungi genus presents in DRBC plates, relative to the studied treatments. The lowest average values of total fungi count of unshelled peanut were of PA2 treatment during all evaluation period. OFS2 performance on fungal control in pods was similar to PA2 ($P>0,01$) but this didn't happen towards the kernels ($P<0,01$). The lowest average values of potentially aflatoxigenic fungi in pods were that of unshelled peanuts treated with PA2 and PA1 but they were not different of SOPP1, SOPP2 and TBZ2 ($P>0,01$). When kernels are concerned the lowest average values of these fungi were found in PA2 and PA1, orderly, differing from all treatments ($P<0,01$). In pods and kernels of unshelled peanuts treated with PA2 and PA1 *Eurotium* sp. was prevalent during all evaluation period. The greatest average values of total fungi count that did not differ from test treatments ($P>0,01$) were from pods treated with PA1, GF1, GF2, SOPP1, TBZ1 and TBZ2 and in kernels of unshelled peanuts treated with GF1, GF2, SOPP1, TBZ1 e TBZ2. The greatest average values of potentially

aflatoxigenic fungi that did not differ from test treatment ($P>0,01$) were from pods treated with GF1 and GF2 and in kernels of unshelled peanuts treated with GF1, TBZ1 e TBZ2. Considering the whole evaluated period and the conditions of this experiment the overall treatment was PA2. The PA1 treatment, although not differing from PA2, in kernels, when aflatoxigenic are concerned, it did differ ($P<0,01$) within the total fungi count when, in PA1 treatment, it increased during the period of incubation suggesting an indirect control on aflatoxigenic fungi.

1. INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* Linn.) é uma planta herbácea anual pertencente à divisão Papilionaceae da família Leguminosae que necessita para seu desenvolvimento de um clima quente com chuvas moderadas ou irrigação e pleno sol durante a fase de crescimento. É um dos alimentos com maior concentração de lipídeos e proteínas (OKE et al., 1975). No processamento para obtenção de óleo, a torta residual, rica em proteínas, é destinada a alimentação animal.

É uma leguminosa incomum pois seus frutos desenvolvem-se no solo. Desta forma a vagem subterrânea, está associada à microbiota do solo até o período da colheita e seus frutos, conseqüentemente, ficam expostos à invasão por fungos e outros microrganismos. Estudos sobre a ecologia dos fungos na geocarposfera foram intensificados quando em 1960 substâncias tóxicas, associadas ao *Aspergillus flavus*, foram detectadas em torta de amendoim.

A produção destas substâncias tóxicas, denominadas aflatoxinas, metabólitos reconhecidos como potentes hepatocarcinógenos para determinados animais e possivelmente para o homem, depende das linhagens

envolvidas. *Aspergillus flavus* Link e *A. parasiticus* Speare, do grupo *A. flavus*, parecem ser as únicas espécies do grupo capazes de produzir aflatoxinas e aflatrem (DIENER & DAVIS, 1969; DIENER & DAVIS, 1977; SMITH & MOSS, 1985), embora outras espécies de fungos também possam elaborar aflatoxinas (MOREAU, 1979; SCHMIDT & ESSER, 1985).

As linhagens toxigênicas destas espécies são ubíquas e sua ocorrência é conhecida há muito tempo no solo sendo prontamente isoladas de vários substratos. Dentre as culturas economicamente importantes e mais frequentemente invadidas por estes fungos, e que podem apresentar elevados teores de aflatoxinas, estão as oleaginosas, principalmente, o amendoim (DIENER & DAVIS, 1977; MOREAU, 1979; DIENER et al., 1987).

A invasão, pelas linhagens toxigênicas no campo, tem sido associada com o estresse da planta, causado por um período de seca e, a danos mecânicos e/ou ataque de insetos do solo na fase pré-colheita mas, várias pesquisas demonstram que mesmo grãos sadios podem tornar-se infectados pelos própagulos desses fungos sem danos aparentes às vagens (GRIFFIN & GARREN, 1976).

Assim sendo, para o controle do crescimento de fungos e da produção de aflatoxinas tem-se recomendado, além de práticas agrícolas adequadas (como uso de sementes sadias, rotação de culturas, eliminação e destruição de restos de culturas depois da colheita), o controle da umidade do solo durante o processo de desenvolvimento dos

frutos pelo emprego da irrigação e o controle da umidade no período da colheita e secagem das vagens maduras, bem como, durante o período de estocagem.

Entretanto, esses fatores, principalmente os dependentes de condições climáticas como umidade relativa elevada e chuvas coincidentes com as necessidades diferenciadas da cultura, nem sempre podem ser eficientemente controlados.

O emprego de fungicidas, após a colheita, pode, então, ser uma opção no controle do crescimento de fungos envolvidos com a produção de aflatoxinas quando as condições de clima não forem favoráveis a uma secagem rápida e eficiente das vagens a serem ensacadas e estocadas. Mas a eficiência do tratamento químico pode depender da capacidade destas substâncias, pulverizadas sobre as vagens, em ultrapassar os limites da casca dada à possibilidade de propágulos desses fungos estarem associados não só à superfície dos grãos (película) mas também presentes em tecidos internos (cotilédones) (JACKSON, 1964; GRIFFIN & GARREN, 1976).

Além deste fato, pode-se considerar que a atuação destas substâncias como fungicidas, pode ser modificada quando sob condições naturais onde, além do substrato, existe uma microbiota fúngica; condições estas diferentes daquelas normalmente empregadas nos testes que comprovam seus efeitos fungicidas onde o substrato é um meio de cultura no qual fungos isolados são inoculados.

A presente pesquisa teve por objetivo avaliar o efeito de tratamentos químicos sobre a microbiota fúngica total e sobre aqueles fungos do grupo *A. flavus* do amendoim em casca e de seus grãos, uma vez que o controle externo pode não garantir a ausência de própagulos viáveis, internamente.

2. OBJETIVOS

Avaliar o efeito de quatro tratamentos químicos aplicados à vagens de amendoim em casca intactas e sadias, com teor de umidade ajustado propício ao desenvolvimento fúngico, mantidas sob temperatura controlada. A avaliação da contaminação fúngica, nas vagens e grãos, foi feita:

- quantitativamente: mediante a contagem total de fungos e daqueles potencialmente aflatoxigênicos;
- qualitativamente: através do monitoramento visual e isolamentos dos gêneros de fungos presentes.

Os tratamentos químicos utilizados, em dois níveis de concentração, foram:

- ácido propiônico (fonte: propionato de amônio)
- extrato de semente de "grapefruit"
- ortofenilfenato de sódio
- thiabendazole (2-(4-tiazolil-benzimidazol)

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A contaminação fúngica do amendoim

O amendoim (*Arachis hypogaea* Linn.) é uma planta herbácea anual pertencente à divisão Papilionaceae da família Leguminosae. Necessitando de um clima quente para o desenvolvimento, com chuvas moderadas ou irrigação e pleno sol durante a fase de crescimento, adapta-se melhor em climas tropicais, subtropicais, mediterrâneo e temperado. É um dos alimentos com maior concentração de lipídeos e proteínas (OKE et al., 1975). É consumido *in natura*, torrado e/ou processado na elaboração de confeitos. Dado seu alto teor de lipídeos é processado para obtenção de óleo e a torta residual, rica em proteínas, é destinada a alimentação animal sob a forma de farelo (GODOY et al., 1982).

É uma leguminosa incomum pois suas flores são formadas e fertilizadas acima do solo com subsequente desenvolvimento do fruto no solo. Assim a vagem, subterrânea, está associada com a microbiota do solo até o período da colheita e, portanto, sujeita à invasão dos frutos por fungos e outros microrganismos. Estudos sobre a ecologia dos fungos nas vagens e grãos de amendoim, bem

como na geocarposfera e ginóforos em desenvolvimento, foram intensificados a partir de 1960 quando substâncias tóxicas foram detectadas em torta de amendoim. Posteriormente estas substâncias passaram a ser denominadas de aflatoxinas quando foram associadas a espécies do grupo *A. flavus*.

Aspergillus flavus Link e *A. parasiticus* Speare pertencentes ao grupo *A. flavus* do gênero *Aspergillus*, classe Deuteromycetes, parecem ser as únicas espécies capazes de produzir grandes quantidades de aflatoxinas embora inúmeros pesquisadores considerem que existem outros gêneros e espécies de fungos aflatoxigênicos (DIENER & DAVIS, 1977; MOREAU, 1979). *A. parasiticus* parece estar mais adaptado ao solo, sendo proeminente em vagens de amendoim, enquanto que *A. flavus* parece estar mais adaptado ao ambiente aéreo e foliar, sendo dominante em milho, semente de algodão e outras amêndoas. *A. flavus* produz aflatoxina B₁ e aflatoxina B₂ enquanto que isolados de *A. parasiticus* além das aflatoxinas B₁ e B₂ produzem aflatoxinas G₁ e G₂ e, aflatoxinas M₁ (DIENER et al., 1987).

Aflatoxinas são metabólitos que, em laboratório, são na sua grande parte sintetizadas durante a fase de crescimento secundário em culturas estacionárias. São consideradas as mais carcinogênicas das substâncias naturais, sendo a aflatoxina B₁ a de maior ocorrência e o composto mais tóxico causando danos ao fígado de animais domésticos e experimentais; e, em humanos, quando expostos prolongadamente à dietas contendo doses subagudas de

aflatoxina, está associada ao câncer primário de fígado (SCHMITH & ESSER, 1985; DIENER et al., 1987).

Enquanto quase todas as linhagens de *A. parasiticus* são consideradas toxigênicas, a produção de aflatoxinas pelo *A. flavus* varia consideravelmente de linhagem para linhagem, sendo a produção de aflatoxinas resultado do genótipo da linhagem envolvida, e das condições ambientais na qual ela cresce. Todavia, as linhagens de origem tropical parecem, segundo MOREAU (1979), ser mais toxigênicas do que aquelas de regiões mais temperadas.

A distinção entre as duas espécies de fungos aflatoxigênicos dada por RAPER & FENNEL (1965), segundo as diferenças de suas características morfológicas, principalmente naquelas que se referem à coloração e característica da superfície dos conídios e estrutura das fialídes, não tem sido feita por muitos pesquisadores (DIENER et al., 1987). Consequentemente, muitos trabalhos referem-se somente ao *A. flavus* para denominar ambas as espécies.

Dos inúmeros substratos que estes fungos podem ser isolados, as sementes de oleaginosas, especialmente o amendoim e seus produtos, estão frequentemente envolvidas e, as linhagens isoladas destes são tidas como sendo mais toxigênicas do que aquelas isoladas de outros produtos, como os cereais (MOREAU, 1979; PITT & HOCKING, 1985). Este fato pode estar associado à

dependência da presença de lipídeos (ácidos graxos) na produção de aflatoxinas que, degradados pela ação destes fungos, formam precursores, como a acetil-coenzima A que entra na via metabólica da biossíntese de aflatoxinas; íons como zinco, cádmio, magnésio e ferro e certos aminoácidos parecem ser fatores estimulantes à produção de aflatoxinas (MOREAU, 1979).

Inicialmente considerados como fungos de armazenamento, dada à sua capacidade de sobreviver e crescer em substratos com atividade de água de até 0,78 foram, posteriormente, relacionados à contaminação de culturas como amendoim, milho e algodão antes da colheita (NORTHOLT & BULLERMAN, 1982; CHRISTENSEN, 1987; DIENER et al., 1987).

Dentre os fatores ambientais que condicionam a invasão das vagens de amendoim antes da colheita e produção de aflatoxinas pelos fungos *A. flavus*, a umidade relativa ao redor do substrato associada à temperatura é considerada ser a mais importante (CARTER, 1970; DIENER & DAVIS, 1977; ZAMBETTAKIS, 1977; SANDERS et al., 1981; HILL et al., 1983; SANDERS et al., 1984). Entre outros fatores condicionantes estão: injúrias mecânicas e/ou danos causados por insetos e/ou outros patógenos (GRIFFIN, 1972; DIENER & DAVIS, 1977; LACEY, 1989), a competição microbiana (ASHWORTH et al., 1965; LINDSEY, 1970; WELLS et al., 1972) e a densidade de inóculo (MEHAN et al., 1988).

As linhagens toxigênicas do grupo *A. flavus* crescem em temperaturas entre 6°C e 8°C a 44°C e 46°C sendo a temperatura mínima para a produção de toxina de $12 \pm 2,5^\circ\text{C}$ e a máxima de $42 \pm 2,5^\circ\text{C}$, em grãos de amendoim inoculados. A temperatura ótima para produção está entre 25°C e 28°C, e para crescimento entre 36°C e 38°C (DIENER & DAVIS, 1977). Estes valores são, contudo, afetados pela umidade, concentração de oxigênio, disponibilidade de nutrientes entre outros fatores, sendo que temperaturas máximas de crescimento mais elevadas são observadas em substratos naturais (DIENER & DAVIS, 1977). Em climas tropicais têm sido observada a produção após 48 horas a 30°C (DIENER & DAVIS, 1969; MOREAU, 1979).

Com relação à atividade de água, a mínima para produção de aflatoxinas está em torno de 0,83 a 0,87, enquanto que o crescimento pode ocorrer em atividade de água tão baixa quanto 0,78 a 0,80 (LACEY, 1988). Estes dados se aplicam a todas as culturas de armazenamento já investigadas que incluem o amendoim, pistache, castanha do Brasil, milho, trigo e arroz (CORY, 1987).

Para o crescimento e consequente produção de aflatoxinas pelas linhagens toxigênicas, o amendoim deve estar com teor de umidade entre 9 a 30% (CARTER, 1970; PETTIT et al., 1971). Na prática esses valores são alcançados quando os grãos secam durante o período da colheita ou, quando elas ainda estão no solo e este apresentar-se seco antes do arranque e, durante o

armazenamento se a umidade relativa ao redor das vagens alcançar 80% de umidade ou mais (CARTER, 1970).

O teor de água dos cotilédones tem uma grande influência sobre o grau de invasão das vagens pelo *A. flavus* no período pré-colheita que é, por sua vez controlado pelas condições de umidade e temperatura do solo. Desta forma, mesmo vagens não danificadas que cresceram em condições de estresse pela seca, com temperaturas do solo entre 28°C a 35°C, tornam-se facilmente contaminadas por estes fungos e aflatoxinas. Nestas condições a casca e a película, barreiras naturais de proteção, bem como os cotilédones, tendem a perder água para o solo seco e quente. A secagem prematura das vagens leva ao rompimento da casca e da película dos grãos e determina uma diminuição da atividade fisiológica dos cotilédones. A invasão ocorre dada à pronta disponibilidade de nutrientes e inibição de organismos competidores que têm valores mínimos para atividade de água acima daqueles do grupo *A. flavus* (CARTER, 1970; PETTIT et al., 1971; ZAMBETTAKIS, 1977; HILL et al., 1983; SANDERS et al., 1984; MEHAN et al., 1991).

A resistência fisiológica das vagens em desenvolvimento tem sido associada ao grau de maturação destas (DIENER et al., 1965; CARTER, 1970; DIENER & DAVIS, 1977). Vagens imaturas e sobre-amadurecidas são mais susceptíveis que vagens maduras e, são prontamente invadidas quando crescidas sob condições de estresse e/ou

danificadas (DIENER et al., 1965; PETTIT et al., 1971; SANDERS et al., 1981).

Vários trabalhos relatam que, sob condições ideais de campo, durante a colheita e secagem e armazenamento *A. flavus* está em percentagem minoritária, embora seja constituinte persistente da superfície das vagens e grãos (AUSTWICK & AYERST, 1963; HANLIN, 1969; PORTER & GARREN, 1968; 1970; JOFFE, 1969b; GARREN & PORTER, 1970; GAONA & ZEVADA, 1976/1982). Desta forma, membros do grupo *Aspergillus flavus* são capazes de colonizar os frutos de amendoim a partir de baixa densidade de inóculo e estabelecer-se na comunidade endocárpica se as condições tornarem-se favoráveis, principalmente de umidade e temperatura (GRIFFIN & GARREN, 1974). Sob condições assépticas *A. flavus* penetra a casca e coloniza tecidos vivos de vagens imaturas e maduras em alta percentagem sugerindo que a presença da microbiota endogeocárpica provê uma barreira à invasão dos grãos pelo *A. flavus* (LINDSEY, 1970; GRIFFIN, 1972; WELLS et al., 1972).

A competição, nas condições naturais, ocorre entre os inúmeros microrganismos e o crescimento de espécies do grupo *A. flavus* pode ser inibido bem como a degradação das aflatoxinas pode ocorrer (MOREAU, 1979). Entre os antagonistas de *A. flavus* encontram-se aqueles frequentemente presentes em amendoim como *A. niger*, *Fusarium solani*, *Penicillium funiculosum*, *P. rubrum* e membros do grupo *A. glaucus* (JOFFE, 1969b),

Trichoderma viride (WELLS et al., 1972; WICKLOW et al., 1980) e *Rhizoctonia solani* (ASHWORTH et al., 1965). Outros antagonistas citados por LACEY (1989) incluem a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a bactéria *Brevibacterium linens* e o fungo *Rhizopus stolonifer*.

A redução na produção da aflatoxina B₁ e inibição do crescimento de *A. flavus* por *A. niger*, *Trichoderma viride* e *Fusarium oxysporum* foi constada, *in vitro*, por ROY & CHOURASIA (1990) e por *A. niger* e *Rhizopus* sp. por MUJICA & BRACALENTI (1985), assim como por *A. candidus* e *A. chevaliere* citado por MOSS & FRANK (1987) e *Penicillium viridicatum* e *Fusarium graminearum* citado por LACEY (1989). A redução da produção de aflatoxina B₁ produzida por *A. flavus* constatada, *in vitro*, por HORN & WICKLOW (1983) e PASTER & MENASHERON (1988) foi, segundo HORN & WICKLOW (1983), consequência do abaixamento do pH devido à presença de *A. niger* e, possivelmente, devido a fatores químicos, como a quelação do zinco, necessário na biossíntese das aflatoxinas, pelos ácidos produzidos por este fungo.

Entretanto, em substratos naturais e sólidos onde o efeito de variáveis como umidade relativa, temperatura, extensão de danos aos grãos e quantidade de inóculo demonstram que a presença de *A. niger* e outros fungos, capazes de reduzir ou impedir a formação de aflatoxinas, podem ter pouco ou nenhum efeito na formação de aflatoxinas (HORN & WICKLOW, 1983). ASHWORTH et al.

(1965), verificaram que a capacidade de degradação de aflatoxinas pelo *A. niger* era dependente da concentração inicial destas no amendoim.

HILL et al. (1983) observaram uma colonização fúngica extensiva em amendoim maduro aparentemente sadio devido ao estresse sofrido pela planta durante o desenvolvimento dos frutos. Nessas condições os pesquisadores demonstraram que quando a razão de *A. flavus* para *A. niger* excedeu 19:1 detectou-se aflatoxinas, mas quando a razão foi menor que 9:1 nenhuma aflatoxina foi formada. Esta constatação foi explicada em decorrência da capacidade de *A. flavus* crescer em atividade de água mais baixa (0,76 a 0,80) do que *A. niger* (0,88) não permitindo seu crescimento. Em contraste, em solos quentes e úmidos *A. niger* cresce vigorosamente e pode degradar ou mesmo inibir a formação de aflatoxinas.

Vários estudos visando a identificação da microbiota fúngica das vagens e grãos de amendoim têm sido feitos, comparações entre eles são entretanto restritas devido à diferenças de cultivar, local de plantio, condições de clima, tipo de solo (JACKSON, 1965; HANLIN, 1969; MEHAN et al., 1991). Mesmo para um mesmo lote de grãos as variações encontradas entre as espécies e quantidades presentes foram altas (JACKSON, 1964; HANLIN, 1969). Entre outros fatores a serem considerados estão: o período em que a amostra foi estudada pois a colheita, a secagem e o armazenamento denotam condições diferentes que

afetam o crescimento de fungos em amendoim, implicando em dominância de diferentes grupos de fungos em cada estágio (AUSTWICK & AYERST, 1963); e os procedimentos de isolamento, incluindo o emprego de diferentes meios de cultura, temperatura e aditivos de solo (PORTER & GARREN, 1970).

JACKSON (1964), trabalhando com vagens de amendoim obtidos de várias fontes identificou vários isolados da superfície das vagens e de seus grãos, retirados assepticamente. *Aspergillus flavus* e espécies de *Penicillium* mostraram similaridade de localização, sendo mais frequentes na película e menos nos cotilédones. *A. niger* e *Fusarium* spp. estavam frequentemente associados como contaminantes externos, bem como *Mucor* spp..

Em outro estudo conduzido por JACKSON (1965), *A. niger*, *A. flavus*, *Sclerotium bataticola*, *Rhizopus* spp. foram isolados da superfície de grãos moídos, obtidos assepticamente de vagens lavadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,5%.

JOFFE (1969b) encontrou em grãos frescos e armazenados *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium solani*, *Penicillium funiculosum*, *P. rubrum*, *Rhizopus nigrificans*, *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotium* sp. como sendo de maior frequência. *A. niger* foi mais numeroso em grãos armazenados do que em frescos e *P. funiculosum* e *P. rubrum* em grãos frescos. Um total de 26 gêneros foi isolado em estudo com frutos de amendoim em desenvolvimento conduzido

por HANLIN (1969), *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. foram mais comuns nas vagens e, *Penicillium* spp. e *Gliocladium* spp. nos grãos. Uma menor quantidade, 17 gêneros, foi isolada por GARREN & PORTER (1970).

PORTER & GARREN (1970) observaram que os microrganismos endocárpicos de grãos de amendoim secos enleirados e enleirados invertidos eram diferentes, quanto aos gêneros e frequência, daqueles de grãos frescos. Os fungos dominantes em vagens frescas foram *Chaetomium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizoctonia* e *Fusarium*, nos grãos *Penicillium* e *Aspergillus*. Nas vagens enleiradas os fungos dominantes foram *Chaetomium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotium* e *Alternaria*, nos grãos as únicas espécies dominantes foram do gênero *Aspergillus*. Outras constatações referem-se à frequência de isolamento que nas vagens enleiradas invertidas (e seus grãos) reduziu-se de 13% e 36%, respectivamente, em relação àquelas somente enleiradas. A frequência de isolamento foi maior nas cascas que nos grãos para todos os casos estudados.

EL-MAGRABY & EL-MARAGHY (1988), estudando a microbiota de grãos de amendoim obtidos assepticamente de vagens sadias e maduras, encontraram fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* como sendo dominantes e dentre estes gêneros as espécies predominantes foram *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *P. chrysogenum* e *F. oxysporum*.

A frequência de isolamento de linhagens toxigênicas varia, principalmente, de acordo com o solo, clima e práticas culturais. MEHAN (1988) sugere uma correlação positiva entre a densidade de inóculo presente no solo com o percentual de grãos de amendoim invadidos por *A. flavus* e com os teores de aflatoxinas formados. Na prática isso ocorre quando não se faz rotineiramente, rotação de cultura e restos de culturas contaminadas não são destruídos antes do preparo do terreno para novo cultivo. Possivelmente, este fato pode explicar porque os solos de regiões tropicais, segundo MOREAU (1979), parecem ter maiores números de *A. flavus* do que aqueles de regiões temperadas.

Quanto ao tipo de solo, MEHAN et al. (1991), por um período de 5 anos, estudaram a invasão de grãos de amendoim antes da colheita por espécies do grupo *A. flavus* em relação a solos arenosos e argilosos de várias localidades, na estação das águas e da seca. A invasão por *A. flavus* e os teores de aflatoxinas formados foram muito menores em grãos de plantas cultivadas em solo argiloso (36% de areia) do que em solo arenoso (78% a 80% de areia) em todas as localidades e estações, também a população de espécies do grupo *A. flavus* foi maior em solos arenosos. A baixa invasão dos grãos por esses fungos em solos argilosos foi relacionada a alta capacidade de retenção de água destes, necessária ao desenvolvimento e maturação das vagens (GODOY et al., 1982); a alta infestação dos solos

arenosos por espécies do grupo *A. flavus*, por sua vez, foi relacionada a habilidade destes fungos de sobreviverem em ambientes de umidade baixa e à favorável aeração características desse tipo de solo. Trabalhos anteriormente realizados não estabeleceram essa mesma relação (JOFFE, 1968; GRIFFIN & GARREN, 1974).

Um sumário de dados de pesquisadores da Inglaterra, Índia, Israel, África do Sul e Estados Unidos indicou que 60% dos isolados do grupo *A. flavus* eram produtores de aflatoxinas e que entre estes isolados houve uma grande variação na quantidade de aflatoxinas produzidas (DIENER & DAVIS, 1977). No Estado de São Paulo, na região Araraquarense, FONSECA et al. (1974), trabalhando com amendoins da safra da seca e das águas, constataram que das culturas isoladas de fungos do grupo *A. flavus* 31% eram capazes de produzir aflatoxinas.

Estudos mais recentes buscando explicar o modo de invasão das vagens aparentemente sadias têm sugerido que estes fungos podem colonizar as flores de amendoim não patogenicamente durante o período de florescência e permanecer associados aos ginóforos aéreos e subterrâneos durante todo o período de desenvolvimento do amendoim (WELLS et al., 1972; WELLS & KREUTZER, 1972; GRIFFIN & GARREN, 1976; DIENER et al., 1987).

O modo de contaminação das flores pode ser por disseminação por correntes de ar, disseminação por insetos, embora os amendoins sejam autopolinizados em 98%.

Outro fator de inoculação das flores, considerado por GRIFFIN & GARREN (1976), foi a infestação destas por solo contaminado por fungos, borrifado durante um período de chuvas. HANLIN (1969) também observou este fato com ginóforos aéreos em desenvolvimento no campo.

Contudo, a frequência de isolamento destes fungos neste caso também foi baixa e dependente das condições ambientais e da interação microbiana. HANLIN (1969) verificou que apesar de 84% dos ginóforos aéreos apresentarem-se com fungos, apenas 1% continha espécies do grupo *A. flavus*. GRIFFIN & GARREN (1976), em estudo de campo conduzido durante dois anos consecutivos, isolaram *A. flavus* de 7% da flores mas, a frequência de isolamento das partes terminais de ginóforos aéreos lavados e de ginóforos aéreos esterelizados, no mesmo período, foi bem menor (1,5% e 0,3%, respectivamente).

WELLS et al. (1972), trabalhando com plantas de amendoim axênicas, inoculadas com esporos de *A. flavus*, demonstraram alta percentagem de colonização dos ginóforos aéreos. SANDERS et al. (1981), trabalhando em condições de umidade e temperatura do solo controladas durante os últimos 50 dias da colheita, observaram que os ginóforos e as vagens imaturas apresentavam uma incidência extremamente alta de *A. flavus* nas condições de solo seco (28°C), seco e frio (24°C) e irrigado e quente (34°C) exceto no tratamento irrigado (25°C), indicando uma invasão precoce dos frutos em desenvolvimento. Segundo os

pesquisadores essas observações sugerem que pode ter havido diferenças fisiológicas nas flores e ginóforos em relação aos tratamentos bem como na fisiologia dos grãos, predispondo a planta precocemente à invasão por *A. flavus*.

COLE et al. (1986), trabalhando com plantas de amendoim crescendo sob condições de seca e calor (29°C), não confirmaram a infestação por espécies de *A. flavus* em flores e ginóforos aéreos e, concluíram que embora a invasão nestes estágios possa ocorrer, neste estudo, não foi uma via significativa de invasão quando comparada à observada nas vagens em desenvolvimento no solo.

A planta do amendoim necessita de calor e alta luminosidade para desenvolvimento e produção de frutos encontrando melhores condições em regiões de temperaturas relativamente altas e bem ensolaradas. Para florescimento, desenvolvimento dos ginóforos e frutos as temperaturas consideradas ideais estão entre 24°C e 30°C, dada à sua grande influência nos processos fisiológicos e, conseqüentemente, nas diversas fases do ciclo (GODOY et al., 1982).

Estes dados sugerem que as condições ideais para o crescimento dos fungos aflatoxigênicos do grupo *A. flavus* e do amendoim são equivalentes e que a invasão prematura das vagens, via flores e ginóforos em desenvolvimento, condiciona a presença desses fungos, mesmo que em baixas proporções, nos tecidos de frutos sadios, não implicando entretanto, na contaminação com aflatoxinas,

desde que as condições de umidade e temperatura não favoreçam antes e durante o desenvolvimento dos frutos e após o arranque no período de secagem.

O cultivo de plantas de amendoim, mesmo que genótipos resistentes à invasão por *A. flavus*, deve ser conduzido sob condições ótimas de crescimento onde a minimização do estresse pela seca e calor é fator primordial na prevenção e redução da contaminação por aflatoxinas (SCHIMDT & ESSER, 1985).

No período de secagem a condição para que não ocorra o desenvolvimento do *A. flavus* é a de que as vagens atinjam teores de umidade seguros em, no máximo, 4 a 5 dias. Os valores considerados seguros para o armazenamento de amendoim em casca estão abaixo de 10% de umidade e em grãos, abaixo de 8% (FONSECA, 1982). Contudo, estes valores ideais podem não ser alcançados uma vez que a secagem é dependente de condições climáticas, não controláveis nas culturas de campo.

O emprego de fungicidas, após a colheita, pode, então, ser uma opção no controle do crescimento de fungos envolvidos com a produção de aflatoxinas, podendo proporcionar uma estocagem segura até que os teores de umidade atinjam os limites de segurança.

3.2. Controle do crescimento e produção de toxinas por fungos aflatoxigênicos pelo emprego de preservativos químicos

Segundo MOSS & FRANK (1987), LACEY (1989) e SCOTT (1989), vários preservativos químicos têm sido empregados para prevenção de doenças fúngicas em cereais e outras culturas. No controle do crescimento de aflatoxigênicos e produção de toxinas existe, hoje, uma vasta literatura de tais experimentos com várias substâncias, incluindo ácidos orgânicos, antibióticos (nistatina e pimaricina), ervas e condimentos, óleos essenciais, pesticidas e fumigantes, antioxidantes, metilxantinas e substâncias cloradas (RAY & BULLERMAN, 1982; RUSUL & MARTH, 1988; SCOTT, 1989).

Entretanto, a despeito de inibirem o crescimento de fungos *in vitro* podem ter relativamente pouca ou nenhuma atividade contra os fungos saprofíticos no campo e/ou armazenamento, quando a população destes retorna frequentemente aos níveis daqueles não tratados em poucas semanas (LACEY, 1989).

Isto ocorre porque a eficiência dos fungicidas comprovadas *in vitro* não considera os inúmeros fatores envolvidos relacionados ao substrato, que podem afetar a ação destes agentes químicos. Entre esses citam-se as interações microbianas, o potencial hidrogeniônico, a disponibilidade de água, a temperatura e no caso do amendoim, a casca e a película atuando como barreira

física, bem como os níveis de contaminação inicial do produto (MAGAN & LACEY, 1986; LEITÃO, 1989).

Um outro problema relacionado aos estudos realizados é quanto às controvérsias dos resultados obtidos, segundo RUSUL & MARTH (1988), devido à diferenças entre os meios de cultura e linhagens de fungos empregados nos experimentos. As doses subinibitórias podem também atuar como estimulantes da produção de aflatoxinas decorrente da atuação dos biocidas como agentes estressantes no organismo em crescimento, simulando a chegada à fase estacionária, onde ocorre a formação de aflatoxinas. Por outro lado, de acordo com MOSS & FRANK (1987), os biocidas que apresentassem efeito sobre o metabolismo primário do fungo poderiam reduzir a disponibilidade de metabólitos intermediários, tais como a acetil coenzima A e mevalonato, essenciais à formação das aflatoxinas.

Apesar desses problemas, segundo LACEY (1989), o emprego de preservativos adequados poderia ser útil permitindo maior flexibilidade no trabalho da colheita do amendoim sem grande dependência de condições climáticas adequadas ao processo de secagem.

Dentre os ácidos orgânicos, o ácido propiônico tem sido citado no controle de aflatoxigênicos *in vitro* e em grãos de cereias, feno e rações (MOSS & FRANK, 1987; LACEY, 1989; SCOTT, 1989). O ácido propiônico é um líquido oleoso de odor pungente, miscível em água e

solúvel em álcool, éter e clorofórmio. Na indústria de alimentos é frequentemente empregado, na forma de propionato de cálcio e de sódio, como inibidor fúngico (RAY & BULLERMAN, 1982). A inibição do crescimento fúngico está associada à interferência do ácido no metabolismo normal de carboidratos (LEITÃO, 1989).

Vários trabalhos *in vitro* mostram que o ácido propiônico exerce seu efeito inibidor sobre o crescimento de fungos e fungos aflatoxigênicos. Em meio de cultura as doses são potenciadas por pH igual ou menor que 4,5, quando se tem maiores doses do ácido não-dissociado, forma ativa do mesmo (RUSUL et al., 1987; HOLMQUIST et al., 1983; TSAI et al., 1984). As dosagens de inibição completa do crescimento foram maiores em meio de cultura sólido do que em líquido, provavelmente devido à perda da concentração do ácido propiônico dado à volatilização (MILWARD, 1976). Em geral, o ácido propiônico e o propionato de sódio foram mais eficientes no controle do crescimento de aflatoxigênicos e produção de aflatoxinas, tanto em meio de cultura quanto em grãos.

Em meio de cultura líquido, MILWARD (1976) observou que as concentrações mínimas inibitórias de ácido propiônico para o crescimento de *Fusarium culmorum* estavam entre 0,05% a 0,07%, para *Aspergillus candidus* e *Cladosporium cladosporoides* as doses foram de 0,025% a 0,05%, *Paecilomyces variotii* foi a espécie mais tolerante, e as doses mínimas inibitórias foram de 0,1% a 0,25%; em

meio sólido essa dosagem não pôde inibir o crescimento desse fungo.

Na inibição do crescimento e da produção de aflatoxinas, ALL-HILLI & SMITH (1979) obtiveram completa inibição do crescimento de *A. flavus* e da produção de aflatoxinas, por 12 dias, quando a dose de ácido propiônico foi de 0,2% a pH 4,5. Doses menores foram encontradas por STEWART et al. (1977), quando 0,03% retardou o crescimento de aflatoxigênicos por 10 dias; quando empregaram propionato de cálcio a 0,05% e 0,1% a pH 6,5, *A. parasiticus* não foi inibido no crescimento contudo, foi constatada uma redução na produção de aflatoxinas. TSAI et al. (1984) alcançaram inibição parcial do crescimento de aflatoxigênicos porém, crescente à medida que o pH decresceu de 6,5 para 4,5 e, uma redução marcante na produção das toxinas quando utilizaram propionato de cálcio a 0,2% e a 0,4%. LENNOX & McELROY (1984), empregando propionato de sódio a 0,96%, obtiveram resultados semelhantes quanto ao crescimento e produção de patulina por *Penicillium expansum*. MARSHALL & BULLERMAN (1986) obtiveram inibição completa do crescimento de aflatoxigênicos, por 20 dias, empregando propionato de cálcio a 0,3% a pH 4,0. Em meio de cultura líquido a dose de 0,3% de ácido propiônico inibiu o crescimento e a produção de toxinas por espécies aflatoxigênicas por 10 dias quando o pH foi igual a 4,5, a pH 5,5 a concentração

máxima que permitiu o crescimento foi de 0,25% após 3 dias, e a pH 4,5 foi de 0,1% após 7 dias (RUSUL et al., 1987).

O efeito do ácido propiônico e seus sais é essencialmente fungistático, extendendo a lag fase de crescimento do fungo, em doses subinibitórias é capaz de metabolizar o ácido e produzir grandes quantidades de aflatoxinas (ALL-HILLI & SMITH, 1979; STEWART et al., 1977; MARSHALL & BULLERMAN, 1986; RUSUL et al., 1987).

Em meio de cultura sólido a dose de 0,3% de propionato de cálcio inibiu o crescimento de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *Penicillium* sp., *P. roquefortii*, *P. patulum*, *P. citrinum* por apenas 2 a 3 dias (AZZOUZ & BULLERMAN, 1982). MALLOZZI et al. (1985), obtiveram completa inibição do crescimento e produção de aflatoxinas por 6 dias, com ácido propiônico nas doses de 10% e 1% a pH 6,5, doses de 0,1% ou menores promoveram inibição parcial do crescimento e aumento progressivo na produção de aflatoxinas. HOLMQUIST et al. (1983), utilizando propionato de sódio na dose de 0,5% a pH 3,0, obtiveram inibição de 90% no crescimento de *A. parasiticus* contra 30% de inibição a pH 5,0. FIORENTIN & BARONI (1991) estudaram várias linhagens toxigênicas do grupo *A. flavus* na presença de propionato de cálcio, a dose de 0,5% inibiu o crescimento e produção de aflatoxinas por 5 dias em todas as linhagens testadas, todavia, recomendam doses de 0,65 a 1.31% para maior segurança.

Em grãos de milho e sorgo, dos vários ácidos e compostos testados, o ácido propiônico e o propionato de sódio foram mais eficientes que o propionato de cálcio como inibidores fúngicos (SAUER & BURROUGHS, 1974). O propionato de sódio a 1% e o ácido propiônico a 0,5% e 1% mantiveram os grãos de milho com 18% de umidade livres do crescimento fúngico por mais de 17 semanas, enquanto que o propionato de cálcio a 1% não funcionou, sendo efetivo por 10 semanas em milho com umidade de 22%. De acordo com os pesquisadores a explicação possível para esta diferença é a de que sendo os sais ativos em contato com água, a umidade de 18% não foi o suficiente para dissolução do sal de cálcio; além disso, o propionato de sódio é higroscópico e deliquescente, enquanto o propionato de cálcio não o é.

VANDEGRAFT et al. (1975) não observaram crescimento de *A. flavus* e *A. parasiticus*, por 29 semanas, em grãos de milho com 36% de umidade e inoculados com estes fungos, quando tratados com ácido propiônico a 1%. Em vagens de amendoim enleiradas no campo e tratadas com ácido propiônico a 5% os resultados foram controvertidos. BELL & DOUPNIK (1972) não obtiveram resultado no controle de aflatoxigênicos após 6 dias do tratamento, enquanto que MADAAN & CHOHAN (1978), após 12 dias não detectaram *A. flavus* nas vagens tratadas e seus grãos, enquanto que *A. niger* não pôde ser inibido.

Muitas substâncias naturais contidas nos alimentos têm sido pesquisadas nas suas atividades antimicrobianas. Entre elas citam-se canela, cravo, pimenta, cebola, alho, mostarda, tomilho, sementes de anis, menta, cominho, extrato de raiz de cenoura e de raiz de ginsém vermelha, e óleos essenciais extraídos de casca de laranja, limão e "grapefruit", que contém materiais inibidores do crescimento de algumas espécies de fungos toxigênicos (RAY & BULLERMAN, 1982; RUSUL & MARTH, 1988; MOROZUMI et al., 1989).

O extrato de semente de "grapefruit", um preservativo natural, demonstrou possuir um largo espectro de ação antimicrobiana, em pH de 2,9 a 9,0. As doses mínimas inibitórias para as várias espécies de fungos testadas foram de 4 mg/kg a 100 mg/kg. O produto líquido é incolor, não corrosivo, solúvel em água, glicol e glicerinas (TRUJILLO & TRUJILLO, 1981). O efeito do extrato de semente de "grapefruit" foi avaliado, *in vitro*, por AGUIAR & BASTOS (1983), na sua capacidade de inibir a produção de aflatoxinas e ocratoxinas por *Aspergillus* spp.. De acordo com os pesquisadores esse produto mostrou-se bastante promissor no controle de *A. flavus* e *A. ochraceus*, inibindo o crescimento e a produção de micotoxinas.

A aplicação de fungicidas, na água de lavagem de frutas cítricas após a colheita, tem sido prática comum na prevenção de infecções e na erradicação de infecções incipientes causadas por fungos. Entre os

fungicidas utilizados citam-se o ortofenilfenato de sódio e os fungicidas sistêmicos, como o thiabendazole (KIMATI, 1978; SALUNKE & DESAI, 1986; MOSS & FRANK, 1987).

O ortofenilfenato de sódio deu bons resultados, *in vitro*, no controle do desenvolvimento do *A. flavus*, em estudo conduzido por FONSECA et al. (1976), quando a dose de 20 g/litro manteve o halo de inibição (< 10 mm em relação ao controle) por 38 dias de incubação. Nas condições de campo, nos anos de 1971/72, quando aplicado ao amendoim, na mesma dose testada *in vitro*, durante o período de secagem, as amostras tratadas apresentaram contaminação por aflatoxinas após 30 dias de armazenamento embora em teores mais baixos que as amostras não-tratadas.

Em estudos subsequentes realizados por dois anos consecutivos, FONSECA et al. (1992), testaram a eficiência do ortofenilfenato de sódio no controle de fungos produtores de aflatoxinas em amendoim em casca, no campo após atingirem 18% a 14% de umidade. As doses testadas foram de 0,1% em 1986 e 0,5% em 1987, na estação das águas e da seca. Nos quatro cultivos deste experimento, observou-se que a pulverização das vagens com esta substância não foi eficiente no controle da contaminação por aflatoxinas, entretanto, alguns fatores como "dificuldade de pulverização das vagens nas leiras invertidas, dificuldade de obtenção de lotes tratados e testemunha no mesmo dia com as mesmas características, especialmente na estação das chuvas, afetaram adversamente o comportamento dos

tratamentos nos dois anos estudados, não permitindo conclusões quanto à eficiência dos mesmos".

O thiabenzole, embora um fungicida sistêmico, tem sido empregado, através de aplicação direta (em pó ou em suspensão), no controle do crescimento fúngico presente em frutas cítricas (SMITH & MOSS, 1985) e outras (SALUNKE & DESAI, 1986), e na preservação de sementes tais como arroz, milho, sorgo e triticales (OLIVERAS & ZEVADA, 1976/1982; MORENO-MARTINEZ & HEREDIA-ABARCA, 1983; GARCIA-AGUIRRE, 1985). Embora seja considerado eficiente contra espécies de *Penicillium*, *Colletotrichum* e outros (KIMATI, 1978; SALUNKE & DESAI, 1986), em sementes de milho e triticales a dose de 1700 mg/kg não controlou o crescimento de espécies de *Penicillium* mas, inibiu o crescimento de espécies de *Aspergillus* (OLIVERAS & ZEVADA, 1976/1982).

O thiabendazole é uma substância largamente utilizada como anti-helmínticos, no tratamento de animais e do homem. As suas propriedades antifúngicas são marcantes e seu espectro é comparável àquele dos polienos (nistatina, pimaricina e pentamicina), por outro lado não possui atividade contra bactérias, actinomicetos e leveduras (STARON & ALLARD, 1964). A capacidade inibitória do thiabendazole sobre o desenvolvimento de fungos deve-se à sua interferência em vários processos metabólicos, como síntese de proteínas, lipídeos e aminoácidos assim como na absorção de nutrientes decorrente da interferência primária no processo respiratório (ALLEN & GOTTLIED, 1970).

No controle de espécies do grupo *A. flavus*, o thiabendazole demonstrou-se eficiente em testes conduzidos *in vitro*. As doses inibitórias variaram de 1,6 mg/l (STARON & ALLARD, 1964) e 6,75 a 9,0 mg/kg em linhagens aflatoxigênicas com inibição parcial ou completa do crescimento desses fungos e total inibição da produção de aflatoxinas (AGUIAR et al., 1990). Doses de 0,1% a 0,2% foram empregadas por ZAMBETTAKIS (1977), no controle do crescimento de *Aspergillus flavus* em grãos e torta de amendoim, respectivamente. BLANC (1981), cita o thiabendazole no tratamento de vagens e grãos de amendoim na dose de 100 mg/kg inibindo o desenvolvimento de *A. flavus*. Em grãos de milho, com 30% de umidade e inoculados com *A. parasiticus* AGUIAR & BASTOS (1982), observaram um efeito paulatino de atraso no aparecimento do fungo sobre os grãos com o aumento da concentração do fungicida. Na dose máxima avaliada, 200 mg/kg do princípio ativo, o desenvolvimento iniciou-se após 20 dias da inoculação; quando o fungicida foi aplicado no dia da inoculação houve uma redução de 91,0% na produção de aflatoxina B₁ e quando foi aplicado antes da inoculação a redução foi de 93,3%, em relação às amostras sem tratamento.

4. METODOLOGIA

A pesquisa foi conduzida nos laboratórios de Micotoxinas e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial-ESALQ, Campus-USP de Piracicaba, no período de julho a dezembro de 1991.

4.1. Material

4.1.1. Amendoim

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

4.1.2. Substâncias em avaliação

Foram avaliadas quatro substâncias em dois níveis de concentração (mg do p.a./kg de amendoim em casca):

- **Ácido Propiônico** (fonte: propionato de amônio), nas doses de 3.000 (AP1) e 5.000 (AP2);
- **Extrato de semente de "grapefruit"**, nas doses de 5.000 (GF1) e 10.000 (GF2);

- Ortofenilfenato de sódio tetrahidratado, nas doses de 2.500 (OFS1) e 5.000 (OFS2);
- Thiabendazole, nas doses de 1.000 (TBZ1) e 5.000 (TBZ2).

4.1.3. Meios de Cultura

4.1.3.1. Para contagem total de fungos

O meio empregado para contagem total de fungos foi o "Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar" - DRBC, desenvolvido por KING et al. (1979) e indicado por PITT & HOCKING (1985).

Composição do meio:

- Glucose.....	10,0 g
- Peptona bacteriológica.....	5,0 g
- KH_2PO_4	1,0 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
- Ágar.....	15,0 g
- Rosa bengala.....	25,0 mg (5% p/v em água, 0,5 ml)
- (2,6-dicloro-4-nitroanilina).....	2,0 mg (0,2% p/v em etanol, 1,0 ml)
- Cloranfenicol.....	100,0 mg
- Água destilada.....	1,0 l

Após a adição de todos os ingredientes, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.1.3.2. Para detecção e contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos

Para a detecção e contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos empregou-se o meio "*Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* Agar" - AFPA, elaborado por PITT et al. (1983) a partir do "*Aspergillus* Differential Medium", desenvolvido por BOTHAST & FENNELL (1974).

Composição do meio:

- Peptona bacteriológica..... 10,0 g
- Extrato de levedura..... 20,0 g
- Citrato férrico de amônio..... 0,5 g
- Cloranfenicol..... 100,0 mg
- Ágar..... 15,0 g
- (2,6-dicloro-4-nitroanilina)..... 2,0 mg
(0,2 % p/v em etanol, 1,0 ml)
- Água destilada..... 1,0 l

Após a adição de todos os ingredientes o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. O pH final do meio é de 6,2.

4.1.3.3. Para estoque e preservação das culturas dos fungos presentes no meio DRBC

O meio utilizado foi o "Malt Extract Agar" - MEA (PITT & HOCKING, 1985).

Composição do meio:

- Extrato de malte..... 20,0 g
- Peptona bacteriológica..... 1,0 g
- Glucose..... 20,0 g
- Ágar..... 20,0 g
- Água destilada..... 1,0 l

Após a adição dos ingredientes o meio foi levado à fervura até completa dissolução do ágar, em seguida foi vertido em tubos e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.1.3.4. Para identificação dos gêneros de fungos isolados do meio DRBC preservados em tubos de MEA inclinado

O meios empregados foram: "Malt Extract Agar"

- MEA, e "Czapeck Yeast Extract Agar" - CYA (PITT & HOCKING, 1985).

Composição do meio:

- Czapeck concentrado*..... 10,0 ml
- Extrato de levedura..... 5,0 g
- Sacarose..... 30,0 g
- K_2HPO_4 1,0 g
- Ágar..... 15,0 g
- Água destilada..... 1,0 l

* Preparo do Czapeck concentrado:

- $NaNO_3$ 30,0 g

- KCl.....	5,0 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
- Água.....	100,0 ml

4.1.4. Para identificação das estruturas fúngicas microscopicamente:

Para a montagem de lâminas das culturas isoladas na identificação das estruturas fúngicas empregou-se o corante lactofucsina que foi preparado de acordo com PITT & HOCKING (1985) da seguinte forma: 0,1% de ácido fucsínico dissolvido em ácido láctico a 85%.

4.2. Métodos

4.2.1. Formação das Amostras e dos Blocos

O experimento foi instalado com delineamento em blocos casualizados. Foram montados três blocos, correspondentes às repetições, (Bloco I, Bloco II e Bloco III), a cada 30 dias, e cada bloco constituiu-se dos seguintes tratamentos: AP1, AP2, GF1, GF2, OFS1, OFS2, TBZ1, TBZ2 e TEST. Cada tratamento, em cada bloco, foi avaliado nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias.

Desta forma cada bloco constituiu-se de 9 parcelas em cada período de avaliação, constituindo um total de 45 subparcelas, com medições repetidas três vezes (blocos), compondo um total de 135 subparcelas. Cada uma das 135 amostras de amendoim em casca (subparcelas) constituiu-se

de 500 gramas de vagens, que foram selecionadas, descartando-se as chochas e/ou danificadas e outras impurezas. A seleção foi executada segundo JACKSON (1964). Essas amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno.

4.2.2. Determinação e ajuste do teor de umidade do amendoim em casca e aplicação dos tratamentos

O preparo das amostras de amendoim em casca bem como a obtenção dos teores de umidade foi realizado pelo Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da ESALQ, Campus - USP, Piracicaba - SP.

Na instalação de cada bloco a determinação da umidade inicial do amendoim (antes dos tratamentos) e a umidade do amendoim tratado ao longo do período de avaliação (0, 7, 14, 21 e 28 dias) foi determinada pelo método da estufa a $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, segundo BRASIL (1976).

A umidade média inicial das amostras de amendoim em casca (500 g) variou de 7,42% a 8,10% e a quantidade de água necessária para atingir o nível de umidade entre 16 e 18% foi adicionada às 45 amostras de 500 g de amendoim em casca correspondentes a cada bloco (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 para que

ocorresse o reumedecimento uniforme do material sem que houvesse aparente desenvolvimento fúngico.

Após a reidratação as amostras, apresentando teores médios (três blocos) de umidade entre 16,28% a 17,32%, foram pulverizadas com as substâncias em suas respectivas concentrações, preparadas em 15 mL de água destilada com 0,02% de espalhante adesivo. As amostras referentes ao tratamento testemunha foram pulverizadas com 15 mL de água destilada.

Após a aplicação das substâncias químicas, cada amostra acondicionada nos sacos de polietileno, foi homogeneizada manualmente. Em seguida colocou-se um tampão de algodão na abertura do saco, feito de maneira a se assemelhar à de um frasco de Erlenmeyer de 2 L a fim de permitir trocas gasosas. O total de amostras preparadas por bloco correspondeu a 45 sacos, destes, 36 sacos que receberam os tratamentos químicos foram incubadas em estufa a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7, 14, 21 e 28 dias. As amostras restantes correspondentes aos tratamentos, porém somente reumedecidas (tempo zero) foram avaliadas quanto à contagem total de fungos e contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos a fim de se obter um padrão da contaminação inicial das vagens e grãos, antes da aplicação de cada um dos tratamentos.

4.2.3. Avaliação da microbiota fúngica total e dos fungos potencialmente aflatoxigênicos:

Foram realizadas avaliações prévias em 3 amostras de 100 gramas do amendoim em casca seco e nos seus respectivos grãos (50 g), antes da instalação de cada um dos três blocos do mesmo modo executado no amendoim reumedecido e tratado quimicamente, a seguir descritas.

As avaliações foram executadas pelo método da diluição em série em solução peptonada (0,1%) contendo 0,01% de "TWEEN 80" nos meios de cultura DRBC (contagem total de fungos) e AFPA (detecção e contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos) nos tempos zero, 7, 14, 21 e 28 dias, plaqueando-se, em duplicata, 1 ml das diluições das amostras das vagens (100 g) e dos grãos (50 g). A técnica de plaqueamento utilizada foi a "pour plate" (KOBURGER & NORDEN, 1975; PITT & HOCKING, 1985).

O número de diluições executadas dependeu do grau de contaminação; assim, quando o crescimento de fungos não era visível a olho nu as diluições consideradas para plaqueamento foram 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000; quando o crescimento de fungos foi visível a olho nu as diluições consideradas no plaqueamento foram 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000, 1:1000.000.

O número total de amostras de amendoim em casca avaliado após o reumedecimento e tratamentos químicos foi igual a 270, sendo 135 amostras das vagens de amendoim

(avaliação externa) e 135 amostras de seus grãos (avaliação interna).

As amostras de grãos de amendoim foram obtidas assepticamente das amostras do amendoim em casca, a partir da primeira diluição de cada tratamento. A assepsia destas vagens foi feita em solução de hipoclorito de sódio a 0,4% por dois minutos (na proporção de 1:10), repetindo-se a operação com água destilada estéril (na mesma proporção). Destas vagens desinfectadas e abertas assepticamente foram obtidas as 50 gramas de grãos por tratamento que foram moídos em gral esterelizado e submetidos às diluições necessárias, conforme grau de contaminação fúngica.

As placas inoculadas em DRBC foram incubadas em estufa tipo BOD a $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 4 a 5 dias, procedendo-se a contagem total de fungos.

As placas inoculadas em AFPA foram incubadas em BOD a $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 42 a 48 horas, procedendo-se a detecção e contagem das colônias de *A. flavus* e *A. parasiticus*. A detecção foi feita mediante observação das colônias típicas de coloração laranja-amarelada no reverso das colônias que ocorre devido à formação da ferriaspergilina e ferrineoaspergilina, produtos da reação do citrato férrico de amônio presente no meio, e ácido aspergílico ou neoaspergílico produzidos pelas colônias de *A. flavus* e *A. parasiticus* quando estas crescem na presença de fontes apropriadas de nitrogênio (ASSANTE et al., 1981).

4.2.4. Método estatístico

A análise das variáveis estudadas, contagem total de fungos e contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos nas vagens e em seus grãos, obedeceu ao esquema fatorial de 9 X 4, no delineamento em blocos casualizados, em que os fatores foram tratamentos químicos e tempo ou período de avaliação a $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Para se verificar se houve efeito de tratamento químico, de tempo de incubação e entre tratamentos e tempos de incubação, para as variáveis estudadas, aplicou-se o teste F na análise de variância. Dando continuidade à análise estatística aplicou-se o teste de Tukey para o confronto de médias duas a duas para tratamentos e tratamentos dentro de cada tempo de incubação quando houve interação significativa. Além disso aplicou-se também a análise de regressão polinomial para tempo e, tempo de incubação dentro de cada tratamento quando a interação foi significativa.

As análises estatísticas foram desenvolvidas utilizando-se do sistema para microcomputadores "SANEST - Sistema da Análise Estatística para Microcomputadores" (MACHADO & ZONTA, 1990).

4.2.5. Avaliação qualitativa da microbiota fúngica presente no amendoim em casca (vagem e grão) antes e após tratamentos químicos

O isolamento, estoque e preservação das culturas presentes no meio DRBC nos diferentes tratamentos (vagem e grão) foi efetuado no 2º e 3º blocos nas amostras de amendoim em casca antes e após aplicação dos tratamentos químicos aos 7, 14, 21 e 28 dias de avaliação.

O propósito desta avaliação qualitativa deveu-se ao fato de observações feitas no decorrer do 1º bloco do experimento apontarem para prevalência de determinados fungos em alguns dos tratamentos realizados, durante todo o período de avaliação, a saber: amendoim em casca (vagem e grão) tratado com propionato de amônia, amendoim em casca (vagem) tratado com ortofenilfenato de sódio e amendoim em casca (vagem) tratado com thiabendazole. Os fungos predominantes destes tratamentos foram isolados e preservados para posterior confirmação durante a avaliação do 2º e 3º blocos.

4.2.5.1. Estoque e preservação das culturas dos fungos presentes e isolados do meio DRBC

Uma avaliação dos fungos presentes nas placas do meio DRBC, em cada tratamento, foi feita mediante observação, a olho nu e sob estereoscópio, da aparência das colônias e coloração (reverso e anverso). As colônias de características diferentes foram isoladas em tubos de MEA

inclinado e codificadas, segundo a origem (vagem e grão), tratamento químico, período de incubação, bloco e número. Estes isolados, após crescimento, foram preservados cobrindo-se as colônias com óleo mineral estéril para posterior identificação.

Quando possível, efetuou-se a contagem das diferentes colônias para estabelecer se havia prevalência de um dado gênero de fungo nos diferentes tratamentos. Considerou-se, neste caso como gênero prevalecente em um dado tratamento, quando este esteve presente em todas as placas das diluições realizadas para a cada amostra avaliada e, representou na contagem total destas mais de 50% do valor absoluto do total presente.

4.2.5.2. Identificação dos fungos isolados do meio DRBC presentes no amendoim em casca (vagem e grão) no 2º e 3º blocos

4.2.5.2.1. Plaqueamento

O plaqueamento para a identificação dos fungos ao nível taxonômico de gênero baseou-se naquele descrito por PITT & HOCKING (1985). As culturas isoladas foram inoculadas em placas de Petri padronizadas (90 - 100 mm) contendo MEA e CYA, e incubadas a 25°C por um período de 7 dias. Cada placa foi inoculada com uma única cultura em três pontos eqüidistantes entre si e do centro e borda da placa. Eventualmente, quando a cultura isolada não apresentou crescimento intenso nos tubos de MEA inclinado inoculou-se

até duas colônias por placa. Neste caso dois pontos para cada cultura foram feitos.

4.2.5.2.2. Exame das culturas

Na identificação das colônias os critérios adotados foram:

- Diâmetro da colônia: após o período de incubação a medida do diâmetro da colônia macroscópica foi tomada em milímetros a partir do seu reverso;

- Característica da colônia: a aparência da colônia foi julgada a olho nu e por exame em estereoscópio com aumentos de 5 a 25 vezes. Esta observação visou determinar tipo e local das estruturas de reprodução, extensão da esporulação e cor da colônia. Quando após os 7 dias de incubação a colônia não apresentou estrutura(s) de reprodução ou a(s) apresentou ainda não madura(s), a placa permaneceu por mais 7 dias incubada. Quando após esse período não houve aparecimento desta(s) estrutura(s) considerou-se o isolado como não identificado.

- Exame microscópico: para exame microscópico pequenas porções das colônias foram obtidas com a ajuda de uma agulha de inoculação e colocadas sobre lâminas. Quando a esporulação apresentou-se abundante retirou-se uma amostra da borda da colônia, onde as estruturas são jovens e o número de esporos não é excessivo. Quando os esporos estavam contidos em estruturas como cleistotécio, amostras do centro da colônia foram retiradas.

A lâmina preparada com a amostra da cultura em estudo recebeu uma gota de álcool a 70%, e após sua evaporação parcial colocou-se uma gota do corante lactofucsina e cobriu-se com laminula. As estruturas fúngicas novas e ativas colorem-se de rosa vivo, desta forma diferem-se do micélio mais velho que se colore de rosa-azulado escuro.

A observação das lâminas foi executada em microscópio ótico binocular. Para a identificação ao nível taxonômico de gênero considerou-se as seguintes características morfológicas microscópicas: talo vegetativo (coloração, septação, características da parede), estruturas reprodutivas (coloração, tipo, forma) e esporos produzidos (cor, tipo quanto a origem e septação, características da parede).

As chaves de classificação empregadas foram aquelas descritas por GILMAN (1957), BARNETT & HUNTER (1972), BARRON (1972) e PITT & HOCKING (1985). Quanto ao gênero *Aspergillus*, a chave de classificação empregada obedeceu a descrita por RAPER & FENNELL (1965) onde as espécies estão agrupadas com base primária na coloração dos conídios.

4.2.6. Fluxograma das avaliações para cada tratamento em cada cada bloco:

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação das amostras de amendoim seco

As amostras de amendoim em casca seco (com teor médio de umidade variando de 7,42% a 8,10%), analisadas antes da instalação de cada um dos três blocos avaliados, mostraram que a ordem de contaminação fúngica das vagens foi de 10^3 ufc/g (unidades formadoras de colônias por grama de amendoim em casca) e que a de seus grãos esteve 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 que a de seus grãos esteve menor 10 ufc/g ou mesmo ausente (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios da contaminação fúngica no amendoim em casca seco, antes do reumedecimento.

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

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

5.2. Avaliação das amostras de amendoim reumedecido

As Tabelas 2 e 3 mostram os resultados obtidos na avaliação da microbiota fúngica das amostras de amendoim em casca e de seus respectivos grãos reumedecidos (16,28% a 17,32% de umidade média). Da observação dos dados verificou-se que houve um aumento na ordem de contagem total presente nas vagens porém, nos grãos a ordem de contagem total sofreu maior variação quando se compara à contagem inicial dos grãos de amendoim obtidos de vagens antes do reumedecimento. A ordem de contagem total do amendoim em casca seco foi de 10^3 ufc/g enquanto que para as vagens de amendoim em casca reumedecido variou de 10^3 a

10^5 ufc/ g no Bloco I e 10^4 a 10^6 ufc/g no Bloco II e Bloco III (Tabela 2). Esse aumento observado ocorreu devido ao aparecimento de leveduras, tanto nas vagens quanto nos grãos. Também observou-se a presença de bactérias nas placas do meio DRBC.

Quanto à contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos observou-se que houve, nas vagens, uma queda da ordem de 10 ufc/g na contagem em relação ao observado no amendoim antes do reumedecimento. Por outro lado, a contaminação dos grãos por estes fungos não foi detectada na diluição 1:10 e, neste caso, observou-se alta contaminação por bactérias nas primeiras diluições 1:10 e 1:100 (Tabela 3). Estas bactérias eram bastonetes.

Em decorrência destes fatos, os resultados obtidos no tempo zero (amostras sem tratamento) não foram incluídos na análise estatística geral que englobou as avaliações realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias de incubação.

Dos resultados obtidos no tempo zero, aplicou-se o teste F na análise de variância das médias de contagem e constatou-se que este não foi significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Desta análise estatística obteve-se médias gerais dos dados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$ relativas à contaminação fúngica inicial, isto é, antes da aplicação dos tratamentos químicos. Estas médias gerais das variáveis analisadas, contagem total de fungos nas vagens e em seus grãos e contagem dos fungos potencialmente

aflatoxigênicos nas vagens, foram consideradas como padrão da contaminação inicial para todos os tratamentos químicos (Tabela 4).

Tabela 2. Contagem total* de fungos (ufc/g) do amendoim em casca reumedecido, após 5 dias a $4 \pm 2^\circ\text{C}$

TRATAMENTO	BLOCO I		BLOCO II		BLOCO III	
	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO
AP 1	$1,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10$	$2,6 \times 10^6$	$5,3 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4$	$8,0 \times 10^2$
AP 2	$5,5 \times 10^3$	$2,5 \times 10$	$2,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$6,6 \times 10^3$
GF 1	$1,9 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$1,9 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4$	$7,7 \times 10^3$
GF 2	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	$3,7 \times 10^5$	$5,9 \times 10^2$	$1,9 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$
OFS 1	$6,2 \times 10^4$	$8,3 \times 10^2$	$7,0 \times 10^5$	$2,9 \times 10^2$	$3,7 \times 10^4$	$6,5 \times 10^2$
OFS 2	$9,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$6,3 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	$9,3 \times 10^2$
TBZ 1	$1,7 \times 10^4$	$1,5 \times 10$	$8,9 \times 10^4$	$7,9 \times 10^2$	$6,7 \times 10^4$	$2,4 \times 10^3$
TBZ 2	$2,0 \times 10^5$	$5,4 \times 10^2$	$3,5 \times 10^4$	$1,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^5$	$4,9 \times 10^2$
TEST	$2,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10$	$1,7 \times 10^4$	$2,2 \times 10^2$	$3,2 \times 10^6$	$4,2 \times 10^2$

* média da contagem de unidades formadoras de colônias obtidas de duplicatas

Legenda para os tratamentos:

AP1 = ácido propiônico 3.000 mg/kg de amendoim em casca

AP2 = ácido propiônico 5.000 mg/kg de amendoim em casca

GF1 = extrato de semente de "grapefruit" 5.000 mg/kg de amendoim em casca

GF2 = extrato de semente de "grapefruit" 10.000 mg/kg de amendoim em casca

OFS1 = ortofenilfenato de sódio 2.500 mg/kg de amendoim em casca

OFS2 = ortofenilfenato de sódio 5.000 mg/kg de amendoim em casca

TBZ1 = thiabendazole 1.000 mg/kg de amendoim em casca

TBZ2 = thiabendazole 5.000 mg/kg de amendoim em casca

TEST = sem tratamento

Tabela 3. Contagem de fungos* potencialmente aflatoxigênicos (ufc/g) de amendoim em casca reumedecido, após 5 dias a $4 \pm 2^\circ\text{C}$

TRATAMENTO	BLOCO I		BLOCO II		BLOCO III	
	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO
AP 1	-**	-	-	-	-	-
AP 2	$3,5 \times 10$	-	$1,0 \times 10$	-	$1,5 \times 10$	-
GF 1	-	-	$2,0 \times 10$	-	$6,0 \times 10$	-
GF 2	-	-	$5,0 \times 10$	-	$3,5 \times 10$	-
OFS 1	-	-	$1,0 \times 10$	-	$1,0 \times 10$	-
OFS 2	-	-	$2,5 \times 10$	-	$3,0 \times 10$	-
TBZ 1	-	-	$7,0 \times 10$	-	$1,0 \times 10$	-
TBZ 2	-	-	$3,5 \times 10$	-	$4,0 \times 10$	-
TEST.	-	-	$7,0 \times 10$	-	-	-

* média da contagem de unidades formadoras de colônias obtidas de duplicatas

** menor que 10 ufc/g

Tabela 4. Análise de variância das médias observadas¹ na contaminação fúngica do amendoim em casca reumedecido

Causas da variação	G.L.	Q.M.		
		Contaminação inicial		
		total vagem	total grãos	aflatoxigê- nicos vagem
Blocos	2			
Tratamentos	8	$0,9089860^{ns}$	$6,7995262^{ns}$	$3,2740045^{ns}$
Resíduo	16	$3,4992775$	$3,6661595$	$2,1847120$
Total	26			

¹ transformação das observações segundo $\ln(x + 0,5)$

^{ns} = não significativo pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade

média geral :

contagem total de fungos nas vagens = 11,483479

contagem total de fungos nos grãos = 6,782140

contagem de fungos aflatoxigênicos nas vagens = 1,672011

5.3. Avaliação das amostras de amendoim tratadas quimicamente

As Tabelas 5,6,7,8,9,10,11 e 12 mostram os resultados obtidos para cada tratamento em cada período de avaliação da contaminação fúngica. Nas Figuras 1,2,3 e 4 estão representadas as médias de contagem de fungos, totais e aflatoxigênicos, para cada tratamento, ao longo do período avaliado.

As análises estatísticas destes resultados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$ não incluíram aqueles observados no amendoim em casca reumedecido, antes da aplicação dos diferentes tratamentos químicos, de onde se obteve médias gerais de contaminação.

A umidade média (três blocos) das amostras ao longo do período de avaliação manteve-se adequada ao desenvolvimento fúngico. Aos 7 dias esteve entre 17,22% a 18,08%; aos 14 dias entre 15,21% a 17,36%; aos 21 dias entre 14,89% a 17,10%; e aos 28 dias esteve entre 12,60% a 16,55%.

Tabela 5. Contagem total* de fungos (ufc/g), após 7 dias de incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$

TRATAMENTO	BLOCO I		BLOCO II		BLOCO III	
	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO
AP 1	$7,6 \times 10^3$	- **	$1,5 \times 10^3$	$5,2 \times 10^2$	$9,5 \times 10$	$4,8 \times 10^2$
AP 2	$1,6 \times 10^2$	$4,5 \times 10$	$5,6 \times 10^2$	$6,5 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$
GF 1	$3,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	$8,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$
GF 2	$4,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$
OFS 1	$1,4 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$	$8,2 \times 10^3$	$9,1 \times 10^3$	$7,2 \times 10^4$
OFS 2	$4,4 \times 10^2$	$8,8 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$5,7 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$
TBZ 1	$2,7 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	$7,1 \times 10^6$	$8,1 \times 10^5$	$4,5 \times 10^6$	$4,8 \times 10^5$
TBZ 2	$7,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^5$
TEST.	$7,9 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	$8,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	$4,9 \times 10^6$	$3,6 \times 10^4$

* média da contagem de unidades formadoras de colônias obtidas de duplicatas

** menor que 10 ufc/g

Tabela 6. Contagem de fungos* potencialmente aflatoxigênicos (ufc/g), após 7 dias de incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$

TRATAMENTO	BLOCO I		BLOCO II		BLOCO III	
	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO
AP 1	$1,0 \times 10$	- **	$2,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10$	-	$3,0 \times 10$
AP 2	-	$2,5 \times 10$	$4,5 \times 10$	$9,0 \times 10$	-	$2,5 \times 10$
GF 1	$3,8 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$	$8,8 \times 10^3$	$5,0 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$
GF 2	$9,5 \times 10^3$	$4,1 \times 10^3$	$3,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^2$	$8,4 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
OFS 1	$1,8 \times 10^2$	$8,5 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$1,3 \times 10^2$	-	$2,0 \times 10^2$
OFS 2	$3,5 \times 10$	$3,4 \times 10^2$	$1,0 \times 10$	$4,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$4,5 \times 10$
TBZ 1	$7,4 \times 10^3$	$6,7 \times 10^3$	$5,3 \times 10^3$	$9,7 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$
TBZ 2	$1,5 \times 10^3$	$2,7 \times 10^2$	$8,5 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	-	$8,5 \times 10^2$
TEST.	$8,6 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$	$3,4 \times 10^3$	$3,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$

* média da contagem de unidades formadoras de colônias obtidas de duplicatas

** menor que 10 ufc/g

Tabela 7. Contagem total* de fungos (ufc/g), após 14 dias de incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$

TRATAMENTO	BLOCO I		BLOCO II		BLOCO III	
	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO
AP 1	$1,3 \times 10^6$	$5,4 \times 10^3$	$2,1 \times 10^6$	$1,7 \times 10^4$	$1,9 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4$
AP 2	$1,2 \times 10^2$	$5,6 \times 10^3$	$3,1 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$	$7,1 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
GF 1	$6,0 \times 10^6$	$6,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$3,7 \times 10^5$	$3,1 \times 10^6$	$8,5 \times 10^5$
GF 2	$3,5 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	$9,6 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$6,1 \times 10^5$
OFS 1	$5,2 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$5,2 \times 10^5$
OFS 2	$1,7 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$	$8,6 \times 10^3$	$1,3 \times 10^5$
TBZ 1	$5,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$
TBZ 2	$3,6 \times 10^6$	$5,3 \times 10^5$	$5,1 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$	$5,3 \times 10^5$
TEST	$1,2 \times 10^7$	$3,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$5,7 \times 10^6$	$8,7 \times 10^6$	$6,4 \times 10^6$

* média da contagem de unidades formadoras de colônias obtidas de duplicatas

** menor que 10 ufc/g

Tabela 8. Contagem de fungos* potencialmente aflatoxigênicos (ufc/g), após 14 dias de incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$

TRATAMENTO	BLOCO I		BLOCO II		BLOCO III	
	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO
AP 1	-**	-	$1,4 \times 10^2$	$8,5 \times 10$	$3,0 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
AP 2	$3,0 \times 10$	$1,1 \times 10$	$1,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10$	$3,0 \times 10$	$1,0 \times 10$
GF 1	$2,6 \times 10^4$	$3,8 \times 10^3$	$3,3 \times 10^4$	$5,7 \times 10^4$	$6,2 \times 10^4$	$7,4 \times 10^4$
GF 2	$2,4 \times 10^5$	$6,6 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$5,5 \times 10^3$	$3,7 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$
OFS 1	$1,0 \times 10$	$3,2 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$3,8 \times 10^3$	$7,2 \times 10^4$
OFS 2	$3,5 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	$3,8 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$	$1,3 \times 10^2$	$3,0 \times 10^4$
TBZ 1	$4,0 \times 10^3$	$6,4 \times 10^5$	-	$7,6 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$
TBZ 2	$1,8 \times 10^3$	$8,9 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	$5,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	$2,8 \times 10^3$
TEST	$4,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$6,0 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^6$

* média da contagem de unidades formadoras de colônias obtidas de duplicatas

** menor que 10 ufc/g

Tabela 9. Contagem total* de fungos (ufc/g), após 21 dias de incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$

TRATAMENTO	BLOCO I		BLOCO II		BLOCO III	
	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO
AP 1	$3,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$	$4,4 \times 10^6$	$6,8 \times 10^5$
AP 2	$5,2 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$	$3,6 \times 10^2$
GF 1	$1,2 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$	$3,9 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$
GF 2	$8,6 \times 10^5$	$5,1 \times 10^5$	$3,1 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$6,8 \times 10^5$
OFS 1	$8,4 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$	$2,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
OFS 2	$2,7 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4$	$1,6 \times 10^6$	$9,2 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$4,4 \times 10^5$
TBZ 1	$5,7 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$	$6,3 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$
TBZ 2	$1,6 \times 10^6$	$6,5 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$	$9,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^6$
TEST	$8,7 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$7,0 \times 10^6$	$3,9 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$5,1 \times 10^6$

* média da contagem de unidades formadoras de colônias obtidas de duplicatas

Tabela 10. Contagem* de fungos potencialmente aflatoxigênicos (ufc/g), após 21 dias de incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$

TRATAMENTO	BLOCO I		BLOCO II		BLOCO III	
	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO
AP 1	-**	$1,8 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	$4,6 \times 10^4$	$7,5 \times 10^2$
AP 2	$8,0 \times 10$	$1,1 \times 10^2$	$5,0 \times 10$	$6,0 \times 10$	$1,5 \times 10^2$	$5,5 \times 10$
GF 1	$6,8 \times 10^4$	$3,5 \times 10^5$	$6,6 \times 10^4$	$3,0 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4$	$4,5 \times 10^5$
GF 2	$2,7 \times 10^4$	$8,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4$
OFS 1	$3,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$7,2 \times 10^4$	$6,3 \times 10^2$	$6,0 \times 10^4$
OFS 2	$3,0 \times 10^3$	$5,3 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$
TBZ 1	$8,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$	$2,9 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$
TBZ 2	$7,5 \times 10^3$	$1,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$	-	$2,9 \times 10^3$
TEST	$1,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^5$	$3,5 \times 10^6$	$4,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^5$

* média da contagem de unidades formadoras de colônias obtidas de duplicatas

** menor que 10 ufc/g

Tabela 11. Contagem total* de fungos (UFC/g), após 28 dias de incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$

TRATAMENTO	BLOCO I		BLOCO II		BLOCO III	
	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO
AP 1	$1,3 \times 10^6$	$3,1 \times 10^4$	$3,6 \times 10^6$	$7,0 \times 10^5$	$4,7 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$
AP 2	$2,2 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$	$4,1 \times 10^4$	$3,4 \times 10^2$	$2,2 \times 10^3$	$6,5 \times 10$
GF 1	$3,4 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$	$8,1 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$	$8,4 \times 10^6$
GF 2	$3,4 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$	$7,1 \times 10^5$	$3,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
OFS 1	$1,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$8,5 \times 10^5$	$9,8 \times 10^6$	$2,7 \times 10^5$
OFS 2	$4,4 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4$	$8,3 \times 10^4$	$7,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
TBZ 1	$2,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$5,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$
TBZ 2	$2,1 \times 10^6$	$7,2 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$
TEST	$1,2 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	$9,9 \times 10^6$	$9,9 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$

* média da contagem de unidades formadoras de colônias obtidas de duplicatas

** menor que 10 UFC/g

Tabela 12. Contagem de fungos* potencialmente aflatoxigênicos (UFC/g), após 28 dias de incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$

TRATAMENTO	BLOCO I		BLOCO II		BLOCO III	
	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO	VAGEM	GRÃO
AP 1	$1,4 \times 10^2$	$7,5 \times 10$	$5,8 \times 10^3$	$7,8 \times 10^4$	-	$4,0 \times 10$
AP 2	$5,5 \times 10$	$3,5 \times 10$	$2,3 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$	$6,5 \times 10$	$1,0 \times 10$
GF 1	$4,3 \times 10^4$	$5,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$6,9 \times 10^4$	$4,5 \times 10^6$
GF 2	$3,0 \times 10^4$	$7,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$	$7,7 \times 10^4$	$4,7 \times 10^5$
OFS 1	$4,0 \times 10^4$	$8,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$3,3 \times 10^5$	$3,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
OFS 2	$1,7 \times 10^2$	$3,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^2$	$1,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$
TBZ 1	$2,7 \times 10^3$	$5,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^3$	$8,7 \times 10^4$	$2,9 \times 10^3$	$4,9 \times 10^5$
TBZ 2	$3,7 \times 10^3$	$4,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$	$8,1 \times 10^5$	$2,5 \times 10^3$	$7,8 \times 10^5$
TEST	$4,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$	$6,8 \times 10^5$	$3,4 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$

* média da contagem de unidades formadoras de colônias obtidas de duplicatas

** menor que 10 UFC/g

Fig.1. Médias da contagem total de fungos em vagens de amendoim tratadas quimicamente

Fig.2. Médias da contagem total de fungos em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas quimicamente

Fig.3. Médias da contagem de fungos aflatoxigênicos em vagens de amendoim tratadas quimicamente

Fig.4. Médias da contagem de fungos aflatoxigênicos em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas quimicamente

5.3.1. Análise estatística da variável contagem total de fungos presentes nas vagens

Na análise de variância o teste F aplicado foi significativo, ao nível de probabilidade 1% para o efeito de tratamentos químicos, o efeito de tempo de incubação e o efeito da interação entre tratamentos e períodos (tempo) de incubação para as médias de contaminação observadas nas vagens do amendoim em casca tratado quimicamente (Tabela 13).

Tabela 13. Análise de variância geral das médias observadas na contagem total de fungos nas vagens¹

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Tempo	3	35,7660390**
Blocos	2	
Tratamentos	8	86,9809325**
Tempo x Tratamentos	24	5,6186543**
Resíduo	70	1,3058793
Total	107	

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de probabilidade 1%

média geral = 13,131226

5.3.1.1. Análise estatística para o efeito de tratamentos químicos em cada período de incubação

Na análise de variância, o teste F aplicado mostrou que pelo menos um dos tratamentos químicos difere dos demais no controle da contaminação fúngica das vagens ao nível de significância de 1%, em cada um dos períodos de avaliação (Tabela 14).

Tabela 14. Análise de variância da contagem total de fungos nas vagens¹ após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

Causas da variação	G.L.	Q.M. Períodos de incubação (dias)			
		7	14	21	28
Blocos	2				
Tratamentos	8	43,5289989**	26,9968986**	15,3406712**	17,9704368**
Resíduo	16	1,7767434	1,4857398	1,3098662	1,0183072
Total	26				

¹ transformação das observações segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de propabilidade 1%

média geral :

7 dias = 11,445980

14 dias = 13,352702

21 dias = 13,945545

28 dias = 13,780675

O teste de Tukey foi empregado para comparar médias de tratamentos em cada período de avaliação.

a) Após 7 dias de incubação:

Os melhores tratamentos (menores médias de contagem total de fungos) foram o AP2 e AP1. Entretanto, estes tratamentos não diferiram do OFS2 e OFS1, ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 15).

Tabela 15. Teste de Tukey para médias¹ de tratamentos da contagem total de fungos nas vagens, após 7 dias de incubação

Tratamentos	nº repetições	Médias	5%	1%
TEST	3	15,727357	a	A
TBZ1	3	15,301318	a	A
GF1	3	14,173162	a	AB
TBZ2	3	13,951731	a	AB
GF2	3	12,954746	ab	ABC
OFS1	3	9,761424	bc	BCD
OFS2	3	8,837156	cd	CD
AP1	3	6,936217	cd	D
AP2	3	5,370713	d	D

¹ dados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

D.M.S. 5% = 3,87097 - D.M.S. 1% = 4,78677

b) Após 14 dias de avaliação:

Os melhores tratamentos (menores médias de contagem de fungos presentes nas vagens) foram AP2 e OFS2 (Tabela 16).

Tabela 16. Teste de Tukey para médias¹ de tratamentos da contagem total de fungos nas vagens, após 14 dias de incubação

Tratamentos	nº repetições	Médias	5%	1%
TEST	3	16,219903	a	A
TBZ1	3	15,568342	ab	A
TBZ2	3	15,388332	ab	A
GF1	3	14,821668	ab	A
AP1	3	14,364230	ab	A
GF2	3	14,280265	ab	A
OFS1	3	12,475274	bc	AB
OFS2	3	9,223181	cd	BC
AP2	3	7,233126	d	C

¹ dados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

D.M.S. 5% = 3,53980 - D.M.S. 1% = 4,37725

c) Após 21 dias de incubação:

O melhor tratamento químico foi o AP2 ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 17).

Tabela 17. Teste de Tukey para médias¹ de tratamentos da contagem total de fungos nas vagens, após 21 dias de incubação

Tratamentos	nº repetições	Médias	5%	1%
TEST	3	16,040238	a	A
TBZ1	3	15,683066	a	A
AP1	3	15,208038	ab	A
GF1	3	14,808304	ab	A
GF2	3	14,434193	ab	A
TBZ2	3	14,246903	ab	A
OFS1	3	14,188054	ab	A
OFS2	3	12,231735	b	AB
AP2	3	8,669377	c	B

¹ dados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

D.M.S. 5% = 3,32369 - D.M.S. 1% = 4,11001

d) Após 28 dias de incubação:

Os melhores tratamentos (menores médias de contagem) foram o AP2 e OFS2, diferindo dos demais tratamentos ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 18).

Tabela 18. Teste de Tukey para médias¹ de tratamentos da contagem total de fungos nas vagens, após 28 dias de incubação

Tratamentos	nº repetições	Médias	5%	1%
TEST	3	15,468765	a	A
GF1	3	15,177313	a	A
GF2	3	15,120743	a	A
AP1	3	14,845798	a	A
TBZ2	3	14,836953	a	A
OFS1	3	14,804004	a	A
TBZ1	3	14,659653	a	A
OFS2	3	10,441438	b	B
AP2	3	8,671406	b	B

¹ dados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

D.M.S. 5% = 2,93053 - D.M.S. 1% = 3,62384

5.3.1.2. Análise estatística para o efeito da interação entre tratamentos e períodos de incubação

O teste F, na análise da variância da regressão polinomial, não foi significativo para médias ajustadas pelas equações de regressão linear e quadrática, bem como para os desvios da regressão nos casos de vagens tratadas com GF1, TBZ1 e TBZ2, comportando-se igualmente ao que ocorreu às vagens das amostras sem tratamento.

Para os tratamentos onde houve significância, segue-se apresentação:

- a) Vagens tratadas com ácido propiônico nas doses de 3.000 e 5.000 mg/kg de amendoim em casca.

O teste F, na análise de variância da regressão polinomial, mostrou que os resultados obtidos para vagens tratadas com esta substância química, nas duas doses, dependeu do período de incubação uma vez que foram significativas as regressões ao nível de 1% de probabilidade (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos¹ em vagens tratadas com ácido propiônico 3000 mg/kg de amendoim em casca.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	90,5715483**
Regressão quadrática	1	45,5160370**
Desvios de regressão	1	4,3386956
Resíduo	70	1,3058793

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de probabilidade 1%

coeficiente de determinação da regressão quadrática = 0,9691

Tabela 20. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos¹ em vagens tratadas com ácido propiônico 5000 mg/kg de amendoim em casca.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	19,2836670**
Regressão quadrática	1	2,5957710
Desvios de regressão	1	0,1524278
Resíduo	70	1,3058793

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de probabilidade 1%

coeficiente de determinação = 0,8753

O efeito do tratamento, ácido propiônico, ao longo do período de incubação foi diferente, dependendo da dose aplicada. Aos 7 dias de incubação o controle sobre a contagem total de fungos, para ambas as doses, existiu uma vez que as médias observadas estiveram abaixo da inicial. Contudo, o ácido propiônico na dose de 3.000 mg/kg não manteve este efeito aos 14, 21 e 28 dias de incubação enquanto que, na dose de 5.000 mg/kg este efeito foi mantido até 28 dias, embora tenha havido aumento (Figuras 5 e 6).

Fig.5. Médias de contaminação em vagens de amendoim tratadas com ácido propiônico na dose de 3.000 mg/kg

Fig.6. Médias de contaminação em vagens de amendoim tratadas com ácido propiônico na dose de 5.000 mg/kg

- b) Vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit"
10.000 mg do p.a./kg de amendoim em casca

O teste F, na análise de variância da regressão polinomial, foi significativo ao nível de 5% de probabilidade para regressão linear (Tabela 21).

Tabela 21. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos¹ em vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit" 10.000 mg/kg de amendoim em casca.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	6,6372060*
Regressão quadrática	1	0,3062117
Desvios de regressão	1	0,4356507
Resíduo	70	1,3058793

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

* nível de probabilidade 5%

coeficiente de determinação = 0,8995

A equação de regressão linear mostra que houve um aumento na contagem de fungos nas vagens a partir do 7º dia de incubação, apresentando-se as médias de contagem sempre acima da média geral obtida das vagens de amendoim em casca reumedecido, antes da aplicação do tratamento químico (Figura 7).

Fig.7. Médias de contaminação em vagens de amendoim tratadas com extrato de semente de "grapefruit" na dose de 10.000 mg/kg

c) Vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio 2.500 e 5.000 mg do p.a./kg de amendoim em casca.

O teste F, na análise de variância da regressão polinomial, mostrou que os resultados obtidos para vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio, nas duas doses, dependeu do período de incubação pois, foram significativas as regressões linear e quadrática,

respectivamente para dose de 2.500 e 5.000 mg/kg (Tabelas 22 e 23).

Tabela 22. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos¹ em vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio 2.500 mg do p.a./kg de amendoim em casca

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	42,5404650**
Regressão quadrática	1	3,3008895
Desvios de regressão	1	0,0013756
Resíduo	70	1,3058793

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de probabilidade 1%

coeficiente de determinação = 0,9280

Tabela 23. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos¹ em vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio 5000 mg/kg de amendoim em casca.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	7,8222957*
Regressão quadrática	1	5,7809698*
Desvios de regressão	1	4,7399902
Resíduo	70	1,3058793

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

* nível de probabilidade 5%

coeficiente de determinação = 0,7416

As médias ajustadas pelas equações de regressão linear e quadrática mostram que houve uma tendência ao aumento da contagem total de fungos acima da contagem inicial a partir do 7º dia para dose de 2.500 mg/kg e 14º dia para dose de 5.000 mg/kg (Figuras 8 e 9).

Fig.8. Médias de contaminação em vagens de amendoim tratadas com ortofenilfenato de sódio na dose de 2.500 mg/kg

Fig.9. Médias de contaminação em vagens de amendoim tratadas com ortofenilfenato de sódio na dose de 5.000 mg/kg

5.3.2. Análise estatística para variável contagem total de fungos nos grãos

O teste F, na análise de variância, revelou que houve efeitos significativamente diferentes com probabilidade ao nível de 1%, entre tratamentos químicos, entre períodos de incubação e na interação entre tratamentos e tempos de incubação para as médias observadas nos grãos de amendoim em casca tratados quimicamente (Tabela 24).

Tabela 24. Análise de variância geral das médias observadas na contagem total¹ de fungos nos grãos

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Tempo	3	70,5487278**
Blocos	2	
Tratamentos	8	96,3352403**
Tempo x Tratamentos	24	3,9508818**
Resíduo	70	1,2571154
Total	107	

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de probabilidade 1%

média geral = 12,192422

5.3.2.1. Análise estatística para o efeito de tratamentos químicos em cada período de incubação

Na análise de variância, o teste F demonstrou que pelo menos um dos tratamentos químicos aplicados ao amendoim em casca atuou diferentemente nos grãos ao nível de probabilidade de 1%, para cada um dos períodos de incubação avaliado (Tabela 25).

Tabela 25. Análise de variância da contagem total¹ de fungos nos grãos, após 7, 14, 21 e 28 dias de incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$

Causas da variação	G.L.	Q.M. Períodos de incubação (dias)			
		7	14	21	28
Blocos	2				
Tratamentos	8	30,3537871**	24,3286993**	19,2282726**	34,2771269**
Resíduo	16	2,1834348	0,9224582	0,9543635	1,0602124
Total	26				

¹ transformação das observações segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de probabilidade 1%

média geral :

7 dias = 9,915790

14 dias = 12,172589

21 dias = 13,436623

28 dias = 13,244688

O teste de Tukey foi empregado para comparar médias de tratamentos em cada período de avaliação.

a) Após 7 dias de incubação:

Os melhores tratamentos químicos foram o AP1 e AP2 ao nível de probabilidade de 1% (Tabela 26).

Tabela 26. Teste de Tukey para médias¹ de tratamentos da contagem total de fungos nos grãos, após 7 dias de incubação

Tratamentos	nº repetições	Médias	5%	1%
TBZ1	3	12,909963	a	A
GF1	3	12,114158	a	A
TBZ2	3	11,887905	a	A
GF2	3	11,847696	a	A
TEST	3	11,461415	a	A
OFS1	3	10,351796	a	AB
OFS2	3	9,381725	ab	AB
AP2	3	5,375290	bc	BC
AP1	3	3,912157	c	C

¹ dados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

D.M.S. 5% = 4,29119 - D.M.S. 1% = 5,30640

b) Após 14 dias de incubação:

As menores médias de contagem de fungos foram observadas nos grãos de vagens tratadas com AP2 e AP1 (Tabela 27).

Tabela 27. Teste de Tukey para médias¹ de tratamentos da contagem total de fungos nos grãos, após 14 dias de incubação

Tratamentos	nº repetições	Médias	5%	1%
TEST	3	15,391566	a	A
TBZ1	3	14,822644	a	A
TBZ2	3	13,800185	a	AB
GF1	3	13,306233	ab	AB
GF2	3	12,900749	ab	AB
OFS1	3	12,724190	ab	AB
OFS2	3	10,893638	bc	BC
AP1	3	9,242650	cd	CD
AP2	3	6,471451	d	D

¹ dados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

D.M.S. 5% = 2,78921 - D.M.S. 1% = 3,44908

c) Após 21 dias de incubação:

O melhor tratamento químico foi o AP2

(Tabela 28).

Tabela 28. Teste de Tukey para médias¹ de tratamentos da contagem total de fungos nos grãos, após 21 dias de incubação

Tratamentos	nº repetições	Médias	5%	1%
TEST	3	16,434761	a	A
TBZ1	3	15,032881	ab	AB
GF1	3	14,789898	ab	AB
TBZ2	3	14,764298	ab	AB
GF2	3	13,725328	abc	AB
OFS1	3	13,509748	bc	AB
AP1	3	13,194154	bc	AB
OFS2	3	11,819659	c	B
AP2	3	7,658874	d	C

¹ dados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

D.M.S. 5% = 2,83703 - D.M.S. 1% = 3,50822

d) Após 28 dias de incubação:

O melhor tratamento químico foi AP2 (Tabela 29).

Tabela 29. Teste de Tukey para médias¹ de tratamentos da contagem total de fungos nos grãos, após 28 dias de incubação a $30 \pm 2^\circ\text{C}$

Tratamentos	nº repetições	Médias	5%	1%
TEST	3	16,351577	a	A
GF1	3	15,765289	a	A
TBZ2	3	15,616259	a	A
TBZ1	3	15,180292	a	AB
GF2	3	13,878224	ab	AB
OFS1	3	13,412349	ab	AB
AP1	3	11,802945	b	B
OFS2	3	11,785899	b	B
AP2	3	5,409359	c	C

¹ dados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

D.M.S. 5% = 2,99022 - D.M.S. 1% = 3,69765

5.3.2.2. Análise estatística para o efeito da interação entre tratamentos e períodos de incubação

- a) Grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com ácido propiônico nas doses de 3.000 e 5.000 mg/kg de amendoim em casca.

Na análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação nos grãos de vagens tratadas com ácido propiônico, nas duas doses testadas, o teste F mostrou que os resultados obtidos dependeram do período de incubação uma vez que foram significativas as regressões quadráticas (Tabelas 30 e 31).

Tabela 30. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos¹ em grãos de vagens tratadas com ácido propiônico 3.000 mg/kg de amendoim em casca.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	114,4617208**
Regressão quadrática	1	33,8859643**
Desvios de regressão	1	2,3566686
Resíduo	70	1,2571154

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de probabilidade 1%

coeficiente de determinação = 0,9844

Tabela 31. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos¹ em grãos de vagens tratadas com ácido propiônico 5.000 mg/kg de amendoim em casca.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	0,2494704
Regressão quadrática	1	8,3951682*
Desvios de regressão	1	1,8672297
Resíduo	70	1,2571154

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

* nível de probabilidade 5%

coeficiente de determinação = 0,8224

As equações de regressão quadrática mostram que houve um aumento na contagem total de fungos ao longo do período de incubação, para ambas as doses. Quando a dose foi de 3.000 mg/kg os aumentos na contagem total de fungos estiveram acima daquela média inicial dos grãos de amendoim em casca reumedecido, exceto no 7º dia. Quando a dose foi de 5.000 mg/kg os aumentos observados estiveram abaixo da média inicial, exceto no 21º dia (Figuras 10 e 11).

Fig.10. Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com ácido propiônico na dose de 3.000 mg/kg

Fig.11. Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com ácido propiônico na dose de 6.000 mg/kg

- b) Grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit" nas doses de 5.000 e 10.000 mg/kg de amendoim em casca.

Na análise de variância da regressão polinomial o teste F mostrou significância para regressão linear, nas duas doses testadas (Tabelas 32 e 33).

Tabela 32. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos¹ em grãos de vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit" 5.000 mg/kg de amendoim em casca.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	23,2020634**
Regressão quadrática	1	0,0352138
Desvios de regressão	1	0,0959669
Resíduo	70	1,2571154

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de probabilidade 1%

coeficiente de determinação = 0,9944

Tabela 33. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos¹ em grãos de vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit" 10.000 mg/kg de amendoim em casca.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	7,1749975*
Regressão quadrática	1	0,6077119
Desvios de regressão	1	0,0294652
Resíduo	70	1,2571154

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

* nível de probabilidade 5%

coeficiente de determinação = 0,9184

As equações de regressão linear mostram que houve um aumento na contagem total de fungos ao longo do período de incubação e que estes estiveram sempre acima daquela média geral observada na contaminação inicial (Figuras 12 e 13).

Fig.12. Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit" na dose de 6.000 mg/kg

Fig.13. Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit" na dose de 10.000 mg/kg

- c) Grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio nas doses de 2.500 e 5.000 mg/kg de amendoim em casca.

Na análise de variância da regressão polinomial, o teste F mostrou significância para regressão linear, nas duas doses testadas (Tabelas 34 e 35).

Tabela 34. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos¹ em grãos de vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio 2.500 mg/kg de amendoim em casca.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	14,9018116**
Regressão quadrática	1	4,5749081
Desvios de regressão	1	0,07433175
Resíduo	70	1,2571154

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de probabilidade 1%

coeficiente de determinação = 0,7622

Tabela 35. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos¹ em grãos de vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio 5.000 mg/kg de amendoim em casca

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	9,9353857**
Regressão quadrática	1	1,7918289
Desvios de regressão	1	0,0209689
Resíduo	70	1,2571154

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de probabilidade 1%

coeficiente de determinação = 0,8457

As equações de regressão linear mostram que houve um aumento na contagem total de fungos ao longo do período de incubação e, que este esteve sempre acima daquela contagem média geral observada na contaminação inicial (Figuras 14 e 15).

Fig.14. Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio na dose de 2.500 mg/kg

Fig.16. Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio na dose de 5.000 mg/kg

- d) Grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com thiabendazole nas doses de 1.000 e 5.000 mg/kg de amendoim em casca

Na análise de variância da regressão polinomial, o teste F mostrou significância para regressão linear, nas duas doses testadas (Tabelas 36 e 37).

Tabela 36. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos¹ em grãos de vagens tratadas com thiabendazole 1.000 mg/kg de amendoim em casca.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	7,3946367*
Regressão quadrática	1	2,3371334
Desvios de regressão	1	0,4032506
Resíduo	70	1,2571154

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

* nível de probabilidade 5%

coeficiente de determinação = 0,7296

Tabela 37. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos¹ em grãos de vagens tratadas com thiabendazole 5.000 mg/kg de amendoim em casca.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	22,1403634**
Regressão quadrática	1	0,8432067
Desvios de regressão	1	0,1048379
Resíduo	70	1,2571154

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de probabilidade 1%

coeficiente de determinação = 0,9589

As equações de regressão linear mostram que houve um aumento na contagem total de fungos ao longo do período de incubação e que este esteve sempre acima daquela contagem média geral observada na contaminação inicial (Figuras 16 e 17).

Fig.16. Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com thiabendazole na dose de 1.000 mg/kg

Fig.17. Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens tratadas com thiabendazole na dose de 5.000 mg/kg

e) Grãos de amendoim em casca das amostras sem tratamento (testemunha)

Na análise de variância da regressão polinomial o teste F mostrou significância para equação de regressão quadrática ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 38).

Tabela 38. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem total de fungos¹ em grãos de vagens das amostras sem tratamento (testemunha).

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	37,0379741**
Regressão quadrática	1	12,0801390**
Desvios de regressão	1	0,4649443
Resíduo	70	1,2571154

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de probabilidade 1%

coeficiente de determinação = 0,9906

A equação de regressão quadrática mostra que houve um aumento na contagem total de fungos ao longo do período de incubação e que este esteve sempre acima daquela contagem média geral observada na contaminação inicial (Figura 18).

Fig.18. Médias de contaminação em grãos de amendoim obtidos de vagens das amostras sem tratamento (testemunha)

5.3.3. Análise estatística da variável contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos nas vagens e grãos

Na análise de variância, o teste F foi significativo ao nível de 1% de probabilidade para efeito de tratamentos químicos, tanto nas vagens quanto nos grãos; para o efeito de períodos de incubação (tempo) foi significativo ao nível de 5% e 1%, para vagens e grãos, respectivamente. Mas, como efeito da interação entre tratamentos e períodos (tempo) de incubação para as médias observadas nas vagens de amendoim em casca tratados quimicamente e seus grãos não foi significativo (Tabelas 39 e 40), não se efetuou o desdobramento da análise estatística de tratamentos químicos dentro de cada período de avaliação.

Tabela 39. Análise de variância geral das médias¹ observadas da variável contagem total de fungos potencialmente aflatoxigênicos nas vagens.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Tempo	3	19,7356417*
Blocos	2	
Tratamentos	8	115,3324668**
Tempo x Tratamentos	24	4,2176155
Resíduo	70	6,4216185
Total	107	

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

* nível de probabilidade 5%

** nível de probabilidade 1%

Média geral = 7,4943370

Tabela 40. Análise de variância geral das médias¹ observadas na contagem total de fungos potencialmente aflatoxigênicos nos grãos.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Tempo	3	94,4547599**
Blocos	2	
Tratamentos	8	133,4369985**
Tempo x Tratamentos	24	4,1093168
Resíduo	70	3,8950859
Total	107	

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de probabilidade 1%

Média geral = 8,9496520

Nas vagens, o teste de Tukey mostrou que ao longo do período avaliado, as menores médias de contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos foram observadas naquelas tratadas com AP2 e AP1. Contudo, o efeito deste tratamento só diferiu daquele observado nas amostras sem tratamento (TEST), GF1, GF2 e TBZ1 ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 41).

Nos grãos, também as menores médias de contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos foram observadas nos grãos de vagens tratadas AP2 e AP1. Neste caso, o efeito destes tratamentos diferiu daqueles observados em todos os outros, ao nível de probabilidade 1% (Tabela 42).

Tabela 41. Teste de Tukey para médias¹ de tratamentos da contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos nas vagens.

Tratamentos	nº repetições	Médias	5%	1%
TEST	12	11,942316	a	A
GF1	12	11,037747	ab	AB
GF2	12	10,658744	ab	AB
TBZ1	12	7,267772	bc	BC
TBZ2	12	6,539635	cd	CD
OFS2	12	6,051512	cd	CD
OFS1	12	5,999387	cd	CD
AP1	12	3,735231	d	D
AP2	12	3,616698	d	D

¹ dados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

D.M.S. 5% = 3,31383 - D.M.S. 1% = 3,89356

Tabela 42. Teste de Tukey para médias¹ de tratamentos da contagem de fungos potencialmente aflatoxigênicos nos grãos

Tratamentos	nº repetições	Médias	5%	1%
TEST	12	13,077480	a	A
GF1	12	11,744910	ab	AB
TBZ1	12	11,622789	ab	AB
TBZ2	12	10,291349	bc	ABC
GF2	12	10,016351	bcd	BC
OFS1	12	8,462710	cd	C
OFS2	12	7,604112	d	C
AP1	12	4,208648	e	D
AP2	12	3,518520	e	D

¹ dados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

D.M.S. 5% = 2,58087 - D.M.S. 1% = 3,03238

O teste F, na análise de variância da regressão polinomial, foi significativo ao nível de 1% de probabilidade para médias ajustadas pela equação de regressão linear para as médias de contagem das vagens e, para aquelas dos grãos pela equação de regressão quadrática (Tabelas 43 e 44).

Tabela 43. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem de fungos¹ potencialmente aflatoxigênicos presentes nas vagens de amendoim em casca tratadas quimicamente.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	51,2046539**
Regressão quadrática	1	6,8914115
Desvios de regressão	1	1,1208597
Resíduo	70	6,4216185

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

** nível de probabilidade 1%

coeficiente de determinação = 0,8648

Tabela 44. Análise de variância da regressão polinomial para períodos de incubação, da contagem de fungos¹ potencialmente aflatoxigênicos presentes nos grãos de amendoim em casca tratado quimicamente.

Causas da variação	G.L.	Q.M.
Regressão linear	1	264,2373984**
Regressão quadrática	1	15,1998623*
Desvios de regressão	1	3,9270190
Resíduo	70	3,8950859

¹ dados observados transformados segundo $\ln(x + 0,5)$

* nível de probabilidade 5%

** nível de probabilidade 1%

coeficiente de determinação = 0,9861

As equações de regressão linear e quadrática mostram que para a variável contagem de fungos aflatoxigênicos nas vagens e nos grãos, respectivamente, houve, no geral, uma tendência a aumento nas médias de tratamentos ao longo do período de avaliado (Figuras 19 e 20).

Fig.19. Médias gerais de contaminação por fungos potencialmente aflatoxigênicos em vagens de amendoim

Fig.20. Médias gerais de contaminação por fungos potencialmente aflatoxigênicos em grãos de amendoim

5.3.4. Avaliação qualitativa dos fungos presentes nas vagens e grãos isolados do meio DRBC

5.3.4.1. Fungos presentes em vagens de amendoim e seus grãos antes e após reumedecimento

Os gêneros de fungos prevalecentes foram *Penicillium* spp. nas vagens tanto no 2º quanto no 3º bloco, e nos grãos em apenas uma amostra no 2º bloco. No 3º bloco, as leveduras predominaram nas três amostras avaliadas (Tabelas 45 e 46).

Tabela 45. Fungos presentes em vagens de amendoim e seus grãos isolados do meio DRBC no 2º bloco

GÊNEROS ISOLADOS	Presença nas 3 amostras avaliadas	
	vagem	grão
<i>Absidia</i> sp.	+	-
<i>Aspergillus terreus</i>	+	+
<i>Aspergillus</i> spp.	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	+	+
<i>Eurotium</i> sp.	+	-
<i>Eupenicillium</i> sp.	+	+
<i>Paecilomyces</i> spp.	+	+
<i>Penicillium</i> spp. *	+	+
<i>Syncephalastrum</i> sp.	+	+
leveduras	+	+

Obs.: total de isolados = 36; total de isolados não identificados = 3 (8,33%)

- ausente

+ presença em uma amostra (total de amostras avaliadas = 3)

* representou mais de 50% da contagem de fungos presentes em uma amostra

Tabela 46. Fungos presentes em vagens de amendoim e seus grãos isolados do meio DRBC no 3º bloco

GÊNEROS ISOLADOS	Presença nas 3 amostras avaliadas	
	vagem	grão
<i>Aspergillus terreus</i>	+	+
<i>Aspergillus spp.</i>	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	+	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	+
<i>Eurotium sp.</i>	+	+
<i>Eupenicillium sp.</i>	+	+
<i>Humicola sp.</i>	+	-
<i>Penicillium spp. *</i>	*	+
<i>Syncephalastrum spp</i>	+	+
leveduras *	+	*

Obs.: total de isolados = 22; total de isolados não identificados = 1 (4,54%)

- ausente

+ presença em uma amostra (total de amostras avaliadas = 3 amostras)

* representou mais de 50% da contagem de fungos presentes em uma amostra

Nas Tabelas 47 e 48, as amostras referem-se àquelas avaliadas no tempo zero, onde as vagens de amendoim foram acrescidas de água e postas sob refrigeração, no propósito de elevar-se o teor de umidade. Desta forma, estão somente identificadas pelos tratamentos e representam todas a contaminação inicial, antes da aplicação dos tratamentos químicos.

Após o reumedecimento as leveduras predominaram nas amostras avaliadas, tanto nas vagens quanto nos grãos. O gênero de fungo de maior presença nas amostras avaliadas

foi *Penicillium* spp., sendo predominante em três amostras de grãos (Tabelas 47 e 48).

Tabela 47. Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) nas vagens de amendoim em casca reumedecido isolados do meio DRBC

GÊNEROS ISOLADOS	Presença no 2º e 3º blocos (duas amostras, referente a cada tratamento no tempo zero)									
	VAGEM									
	AP1	AP2	GF1	GF2	OFS1	OFS2	TBZ1	TBZ2	TEST	
<i>Aspergillus</i> spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
<i>Aspergillus niger</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	+	
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
<i>Eurotium</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
<i>Fusarium</i> spp.	++	-	-	-	+	-	++	-	-	
<i>Humicola</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>Myrothecium</i> sp.	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
<i>Penicillium</i> spp.	++	+	++	++	+	++	++	++	++	
<i>Pullularia</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
leveduras *	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

Obs.: total de isolados = 60; total de isolados não identificados = 8 (13.33%); observou-se presença de bactérias.

- ausente

+ presença em uma amostra

* representou mais de 50% da contagem total de fungos presentes em uma amostra

Tabela 48. Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) nos grãos de amendoim em casca reumedecido isolados do meio DRBC

GÊNEROS ISOLADOS	Presença no 2º e 3º blocos (duas amostras, referente a cada tratamento no tempo zero)								
	GRÃO								
	AP1	AP2	GF1	GF2	OFS1	OFS2	TBZ1	TBZ2	TEST
<i>Aspergillus</i> spp.	+	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>Eurotium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Epicoccum</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Fusarium</i> spp.	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paecilomyces</i> sp.	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> spp. *	+	++	**	-	-	*+	-	+	-
leveduras *	**	**	-	**	**	+*	**	**	**

Obs.: total de isolados = 19; total de isolados não identificados = 6 (31,57%);
presença de bactérias

- ausente em uma amostra

+ presença em uma amostra

* representou mais de 50% da contagem total de fungos presentes em uma amostra

5.3.4.2. Fungos presentes em vagens de amendoim e seus grãos após tratamentos químicos

No decorrer do 2º e 3º blocos observou-se que houve prevalência de determinados gêneros de fungos para os tratamentos: ácido propiônico, ortofenilfenato de sódio e thiabendazole.

O gênero de fungo prevalecente nas vagens de amendoim tratadas com ácido propiônico foi *Eurotium* sp., presente tanto nas vagens (externamente) quanto nos grãos. Entretanto, este fato ocorreu com maior frequência quando

a dose foi de 3.000 mg/kg (Tabelas 49 e 50). O gênero de fungo observado (isolado e preservado) no decorrer do 1º bloco foi o mesmo constatado no 2º e 3º blocos.

Tabela 49. Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com ácido propiônico na dose de 3.000 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação

GÊNEROS ISOLADOS	Presença no 2º e 3º blocos (duas amostras)							
	vagem				grão			
	período de avaliação (dias)				período de avaliação (dias)			
	7	14	21	28	7	14	21	28
<i>Absidia</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>Aspergillus</i> spp.	+	-	-	+	+	++	++	-
<i>Aspergillus flavus</i>	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Aspergillus niger</i>	-	+	+	-	+	-	-	+
<i>Cephalosporium</i> sp.	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eupenicillium</i> sp.	-	-	+	++	-	-	+	++
<i>Eurotium</i> sp. *	**	**	**	**	++	**	**	*+
<i>Monascus</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Nigrospora</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Paecilomyces</i> spp.	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> spp. *	++	+	-	+	**	++	++	+
<i>Rhizopus</i> sp.	-	-	-	-	-	+	-	-

Obs.: total de isolados = 84; total de isolados não identificados = 7 (8,33%)

- ausente

+ presença em uma amostra

* representou mais de 50% da contagem de fungos presentes em uma amostra

Tabela 50. Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com ácido propiônico na dose de 5.000 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação

GÊNEROS ISOLADOS	Presença no 2º e 3º blocos (duas amostras)							
	vagem				grão			
	período de avaliação (dias)				período de avaliação (dias)			
	7	14	21	28	7	14	21	28
<i>Absidia</i> sp.	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Aspergillus terreus</i>	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>Aspergillus</i> spp.	++	++	-	++	++	++	+	++
<i>Aspergillus flavus</i> ‡	++	++	++	++	++	+	++	+
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	++	+	+	++	++
<i>Cephalosporium</i> sp.	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>Cladosporium</i> sp.	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Eupenicillium</i> sp.	-	++	+	++	+	+	++	+
<i>Eurotium</i> sp. *	++	++	+	+	+	+	++	+
<i>Helminthosporium</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Paecilomyces</i> spp.	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>Penicillium</i> sp. *	+	-	*	+	++	+	+	+
<i>Rhizopus</i> sp.	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>Syncephalastrum</i> sp.	-	++	+	++	++	+	++	++

Obs.: total de isolados = 94; total de isolados não identificados = 6 (6,38)

- ausente em uma amostra

+ presença em uma amostra

* representou mais de 50% da contagem de fungos presentes em uma amostra

Quando o tratamento químico foi o extrato de semente de "grapefruit" observou-se que embora não tenha havido prevalência de um gênero específico houve contudo, uma tendência quanto à maior presença de determinados gêneros de fungos, a saber: *Aspergillus flavus*, *A. niger* e

Eurotium sp, tanto nas vagens quanto nos grãos (Tabelas 51 e 52).

Tabela 51. Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com extrato de semente de "grapefruit" na dose de 5.000 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação

Gêneros ISOLADOS	Presença no 2º e 3º blocos (duas amostras)							
	vagem				grão			
	período de avaliação (dias)				período de avaliação (dias)			
	7	14	21	28	7	14	21	28
<i>Absidia</i> spp.	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	+	-	+	+	-	-	+	-
<i>Aspergillus</i> spp.	++	++	+	++	++	++	+	-
<i>Aspergillus flavus</i> †	*+	++	++	++	++	++	++	**
<i>Aspergillus niger</i>	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Cephalosporium</i> sp.	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Eupenicillium</i> sp.	+	-	++	++	-	+	++	+
<i>Eurotium</i> sp.	++	++	++	++	++	++	++	-
<i>Humicola</i> sp.	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>Penicillium</i> spp.	++	+	++	++	-	+	+	+
<i>Rhizopus</i> sp.	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Syncephalastrum</i> sp.	++	++	+	++	+	+	+	-

Obs.: total de isolados = 81; total de isolados não identificados = 1 (1,23%)

- ausente

+ presença em uma amostra

* representou mais de 50% da contagem de fungos presentes em uma amostra

Tabela 52. Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com extrato de semente de "grapefruit" na dose de 10.000 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação

GÊNEROS ISOLADOS	Presença no 2º e 3º blocos (duas amostras)							
	vagem				grão			
	período de avaliação (dias)				período de avaliação (dias)			
	7	14	21	28	7	14	21	28
<i>Absidia</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Aspergillus</i> spp.	++	-	++	+	++	+	-	+
<i>Aspergillus flavus</i> *	++	++	++	++	++	++	+ *	++
<i>Aspergillus niger</i>	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Cladosporium</i> sp.	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Eupenicillium</i> sp.	+	+	++	++	+	+	-	+
<i>Eurotium</i> sp.	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Humicola</i> sp.	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>Paecilomyces</i> spp.	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Penicillium</i> spp.	+	+	++	+	+	+	-	+
<i>Rhizopus</i> sp.	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Syncephalastrum</i> sp.	-	++	+	-	+	++	-	-

Obs.: total de isolados = 86; total de isolados não identificados = 5 (5,81%)

- ausente

+ presença em uma amostra

* representou mais de 50% da contagem de fungos presentes em uma amostra

Quando o tratamento químico foi o ortofenilfenato de sódio observou-se no decorrer do 1º bloco uma alternância entre os períodos de avaliação quanto aos gêneros que se apresentaram predominantes nas vagens (externamente). Os fungos isolados foram identificados ao

nível de gênero como sendo *Humicola* sp. e fungos do grupo *Aspergillus terreus*.

Este fato pôde ser confirmado no decorrer do 2º e 3º blocos. Nos grãos a prevalência mostrou uma tendência para os fungos do grupo *A. flavus*, nas duas doses aplicadas. (Tabelas 53 e 54).

Tabela 53. Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com ortofenilfenato de sódio na dose de 2.500 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação

GÊNEROS ISOLADOS	Presença no 2º e 3º blocos (duas amostras)							
	vagem				grão			
	período de avaliação (dias)				período de avaliação (dias)			
	7	14	21	28	7	14	21	28
<i>Absidia</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i> *	++	+ *	* *	* *	++	++	++	+ *
<i>Aspergillus</i> spp.	-	+	-	-	++	-	++	-
<i>Aspergillus flavus</i> *	++	++	++	++	++	+ *	* *	* +
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	-	-	+	++	+	+
<i>Eupenicillium</i> sp.	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Eurotium</i> sp.	-	-	-	-	++	++	-	+
<i>Humicola</i> sp. *	++	* +	++	++	++	++	+	++
<i>Paecilomyces</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Penicillium</i> spp.	+	-	-	+	++	-	-	+
<i>Phoma</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizopus</i> sp.	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>Syncephalastrum</i> sp.	-	-	-	-	+	++	-	-

Obs.: total de isolados = 67; total de isolados não identificados = 2 (2,98%)

- ausente

+ presença em uma amostra

* representou mais de 50% da contagem de fungos presentes em uma amostra

Tabela 54. Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com ortofenilfenato de sódio na dose de 5.000 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação

GÊNEROS ISOLADOS	Presença no 2º e 3º blocos (duas amostras)							
	vagem				grão			
	período de avaliação (dias)				período de avaliação (dias)			
	7	14	21	28	7	14	21	28
<i>Absidia</i> sp.	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Aspergillus terreus</i> *	+	+ *	++	+ *	+	-	++	++
<i>Aspergillus</i> spp.	-	+	+	+	+	++	++	-
<i>Aspergillus flavus</i> †	++	++	++	+	++	* +	+	* *
<i>Aspergillus niger</i>	++	+	-	+	++	++	+	+
<i>Cladosporium</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Eupenicillium</i> sp.	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Eurotium</i> sp.	+	++	+	-	++	-	-	-
<i>Humicola</i> sp. *	* +	++	+ *	++	+	++	+	+
<i>Penicillium</i> spp. †	++	+	+	-	+ *	-	-	-
<i>Syncephalastrum</i> sp.	+	-	-	-	++	++	* +	++
leveduras	+	-	-	-	-	-	-	-

Obs.: total de isolados = 70; total de isolados não identificados = 1 (1,42%)

- ausente em uma amostra

+ presença em uma amostra

* representou mais de 50% da contagem de fungos presentes em uma amostra

Para as vagens de amendoim tratadas com thiabendazole, nas duas doses aplicadas, os gêneros de fungos prevalentes foram: *Syncephalastrum* sp. nas vagens (externamente) e fungos do grupo *A. flavus* nos grãos (Tabelas 55 e 56).

No decorrer do 1º bloco *Syncephalastrum* sp. foi o gênero isolado e identificado como prevalecente nas vagens (externamente), no meio DRBC.

Tabela 55. Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com thiabendazole na dose de 1.000 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação

GÊNEROS ISOLADOS	Presença no 2º e 3º blocos (duas amostras)							
	vagem				grão			
	período de avaliação (dias)				período de avaliação (dias)			
	7	14	21	28	7	14	21	28
<i>Absidia</i> sp.	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-	++	-	-	++	+
<i>Aspergillus</i> spp.	+	-	-	+	-	+	++	+
<i>Aspergillus flavus</i> *	++	++	++	++	++	**	*+	**
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	++	++	++	++	++	+
<i>Eupenicillium</i> sp	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>Eurotium</i> sp.	+	-	-	-	++	+	+	++
<i>Humicola</i> sp.	++	-	-	-	-	-	-	+
<i>Penicillium</i> spp.	+	+	+	-	++	-	-	-
<i>Phoma</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Rhizopus</i> sp.	-	-	-	-	-	++	-	-
<i>Syncephalastrum</i> sp. *	**	**	**	**	++	+	++	++
leveduras	+	-	-	-	-	-	-	-

Obs.: total de isolados = 62; total de isolados não identificados = 1 (1,61%)

- ausente

+ presença em uma amostra

* representou mais de 50% da contagem de fungos presentes em uma amostra

Tabela 56. Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca tratado com thiabendazole na dose de 5.000 mg/kg isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação

GÊNEROS ISOLADOS	Presença no 2º e 3º blocos (duas amostras)							
	vagem				grão			
	período de avaliação (dias)				período de avaliação (dias)			
	7	14	21	28	7	14	21	28
<i>Absidia</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>Aspergillus</i> spp.	+	+	-	+	+	+	++	+
<i>Aspergillus flavus</i> *	++	++	++	+	++	*+	*+	++
<i>Aspergillus niger</i>	++	++	++	++	+	++	++	+
<i>Cephalosporium</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eupenicillium</i> sp.	-	+	+	++	+	+	++	++
<i>Eurotium</i> sp.	+	+	+	++	+	+	++	+
<i>Humicola</i> sp.	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Paecilomyces</i> spp.	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Penicillium</i> spp.	++	+	+	+	+	-	+	+
<i>Rhizopus</i> sp.	-	++	-	-	-	+	-	-
<i>Syncephalastrum</i> sp. *	**	*+	**	**	*+	+	++	++

Obs.: total de isolados = 76; total de isolados não identificados = 1 (1,32%)

- ausente

+ presença em uma amostra

* representou mais de 50% da contagem de fungos presentes em uma amostra

Nas amostras sem tratamento (testemunha) constatou-se uma tendência de fungos do grupo *A. flavus* a prevalecer, no decorrer do período de avaliação, tanto nas vagens quanto nos grãos (Tabela 57).

Tabela 57. Fungos presentes nas amostras (2º e 3º blocos) de amendoim em casca sem tratamento (testemunha) isolados do meio DRBC ao longo do período de avaliação

GÊNEROS ISOLADOS	Presença no 2º e 3º blocos (duas amostras)							
	vagem				grão			
	período de avaliação (dias)				período de avaliação (dias)			
	7	14	21	28	7	14	21	28
<i>Absidia</i> sp.	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>Aspergillus terreus</i>	-	++	++	+	-	-	+	-
<i>Aspergillus</i> spp.	++	++	++	++	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i> *	*+	++	*+	*+	++	+*	*+	*+
<i>Aspergillus niger</i>	++	++	++	++	++	++	+	+
<i>Cladosporium</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eupenicillium</i> sp.	+	+	++	+	-	+	++	++
<i>Eurotium</i> sp.	++	+	+	-	+	++	+	+
<i>Humicola</i> sp.	-	-	++	-	-	+	-	+
<i>Penicillium</i> spp.	++	++	++	++	+	+	+	-
<i>Rhizopus</i> sp.	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>Syncephalastrum</i> sp.	++	++	++	+	++	+	+	+
leveduras	-	+	-	-	-	-	-	+

Obs.: total de isolados = 99; total de isolados não identificados = 4 (4,05%)

- ausente

+ presença em uma amostra

* representou mais de 50% da contagem de fungos presentes em uma amostra

6. DISCUSSÃO

6.1. Contaminação fúngica do amendoim em casca seco e do amendoim reumedecido

A ordem de contaminação tem sido determinada em alimentos com o objetivo de se estabelecer padrões ou índices que mostrem as condições de sanidade, manejo e práticas de estocagem. Para o caso específico de fungos a ordem de contaminação (propágulos/g) está em função de seu perigo, expresso como crescimento e multiplicação fúngica, produção de micotoxinas e deterioração de nutrientes (GIRALT PONT et al., s.d.).

A ordem de contaminação dos amendoins em casca secos (com umidade média entre 7,42% - 8,10%) na contagem total de fungos, nas vagens e em seus grãos, foi praticamente a mesma, 10^3 ufc/g (unidades formadoras de colônias por grama de amendoim) como pode ser observado na Tabela 1. Estes dados estão de acordo com aqueles aceitos como seguros.

Segundo GIRALT PONT et al.(s.d.) e HOBBS et al. (1984), o perfil microbiológico normal para fungos está entre 10^2 e 10^4 propágulos/g em cereais como milho, cevada, sorgo, trigo, aveia e outros. Uma contaminação muito alta

tem números maiores que $1,5 \times 10^5$ propágulos/g. Em tortas de amendoim valores menores ou iguais a $2,0 \times 10^4$ propágulos/g são considerados como ordem normal de contaminação, uma contaminação muito alta tem valores maiores que $7,0 \times 10^4$ propágulos/g (GIRALT PONT et al.,s.d.).

Após o reumedecimento, observou-se, como consequência, o aumento da contaminação fúngica total e uma maior variação na contagem total de fungos entre as amostras, principalmente nos grãos. A presença de bactérias, tanto nas vagens quanto nos grãos foi notada.

Este aumento da contaminação fúngica total nas vagens e grãos após o reumedecimento e abaixamento da temperatura (4 a 5 dias, a $4 \pm 2^\circ\text{C}$), foi consequência da elevação da umidade para teores médios que variaram de 16,28% a 17,32%. A ordem de contaminação da contagem total de fungos nas vagens foi de $10^3 - 10^6$ ufc/g de amendoim, enquanto nos grãos foi menor ou igual a 10^4 ufc/g (Tabela 2).

Diener (1960)¹, citado por DIENER & DAVIS (1977), correlacionou mais frequentemente altas contagens de fungos em grãos de amendoim estocados que apresentavam umidade inicial ao redor de 12,5%. Amostras que entraram com umidade entre 9% e 12,4% apresentaram contagens médias entre 117 e 20436 colônias/g e, amostras com umidade de

¹ Diener, U.L. The mycoflora of peanuts in storage. *Phytopathology*, Lancaster, 50:220-23, 1960.

12,9%, 13,1%, 13,4% e 15,4% apresentaram contagens médias de 29683, 73100, 149417 e 140167 colônias/g, respectivamente.

GARREN & PORTER (1970) observaram que após a hidratação de vagens de amendoim por 5 dias a 10°C, oriundas da Virgínia e de Porto Rico, 40% e 85% dos grãos, respectivamente, foram invadidos por fungos. Antes da hidratação 97% e 98% dos grãos apresentaram-se sem fungos.

A variação obtida nas contagens totais de fungos, entre as amostras de amendoim em casca reumedecidas, pode ser explicada pelo próprio teor de umidade que variou, considerando os 3 blocos.

De acordo com CHRISTENSEN & KAUFFMAN (1965), a variação de umidade que ocorre entre sementes de um suposto lote uniforme com umidade média próxima ao limite mínimo necessário para o crescimento de fungos, determina a variação na contaminação uma vez que se observa grãos altamente contaminados enquanto outros apresentam-se sadios.

GARCIA-AGUIRRE et al. (1988), ao estudarem a distribuição do gênero *Aspergillus* em grãos de milho armazenados, concluíram que as populações destes fungos nas 90 amostras se ajustam à distribuição binomial negativa uma vez que a distribuição destas populações foi agregada. A mesma distribuição constatada por WHITAKER et al. (1972) para aflatoxinas em grãos de amendoim.

Neste estudo, após o reumedecimento e abaixamento da temperatura, obteve-se resultados de contagem para fungos potencialmente aflatoxigênicos, nas vagens e grãos, menores que aqueles observados no amendoim antes do reumedecimento (Tabela 3). Nos grãos reumedecidos as contagens foram menores que 10 ufc/grama onde observou-se alta contaminação nos três blocos, nas diluições 1:10 e 1:100, por bactérias (bastonetes).

A contaminação de grãos de amendoim por bactérias foi estudada por PETTIT et al. (1968). Os autores observaram que grãos de amendoim colhidos com alto teor de umidade e submetidos a estocagem refrigerada por 4 dias foram 100% invadidos por *Bacillus subtilis* o que não ocorreu quando as amostras foram secas na planta invertida ou em sacos no campo, quando o percentual de grãos infestados esteve entre 1,7% a 8,5%. Esta bactéria foi encontrada tanto em tecidos intercelulares como intracelulares da subepiderme dos cotilédones. Estes autores observaram também que o crescimento destas bactérias preveniu o crescimento de alguns gêneros de fungos presentes nas amostras. Os metabólitos produzidos por esta bactéria foram considerados antifúngicos podendo controlar patógenos em potencial. Em meio de cultura inibiram o crescimento de *Macrophomina*, *Chaetomium*, *Choanephora* e *Penicillium*.

Em estudos posteriores com plantas de amendoim axênicas, bactérias foram isoladas de tecidos em

desenvolvimento, bem como da subepiderme de cotilédones, contudo, aparentemente, sem interferir no crescimento de *A. flavus* inoculado (LINDSEY, 1970; WELLS et al., 1972).

PORTER & GARREN (1968), estudando a microbiota endogeocárpica de amendoim, observaram que a densidade média de isolamento de bactérias de vagens e grãos foi a mesma e esteve ao redor de 13,8%. Todavia, os resultados mostraram que à medida que o fruto amadurece a densidade diminui.

WELLS et al. (1972) concluem que as evidências indicam que a bactéria está associada internamente à planta do amendoim.

PITT et al. (1983) encontraram crescimento bacteriano nas primeiras diluições (1:10 e 1:100) quando amostras de solo úmido foram avaliados em AFPA (*Aspergillus flavus parasiticus* Ágar), segundo os autores aparentemente sem diminuir a eficácia do meio na detecção e contagem de aflatoxigênicos.

Contudo, KIMURA & HIRANO (1988), ao estudarem o efeito de três linhagens de *Bacillus subtilis* sobre o crescimento e a produção de aflatoxinas de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 e *A. flavus* NRRL 3357, verificaram que duas das linhagens testadas de *Bacillus subtilis* puderam inibir o crescimento e a produção de aflatoxinas em grãos de amendoim e milho previamente esterilizados e inoculados, durante os 23 dias de incubação

avaliados. O efeito da inibição sobre o fungo, concluem, está vinculado à linhagem da bactéria presente.

Resultados semelhantes quanto à inibição do crescimento e prevenção da formação de aflatoxinas foram observados por CUERO et al. (1991) quando espigas de milho em desenvolvimento foram inoculadas com *A. flavus* e *Bacillus subtilis*. Na colheita, os grãos não apresentaram aflatoxinas e o isolamento de *A. flavus* foi menor do que no controle.

No presente estudo, embora as bactérias observadas não tenham sido identificadas podem ter sido a causa da diminuição na detecção destes fungos em AFPA.

O abaixamento da temperatura para $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 5 dias também é um outro fator a ser considerado como consequência nas menores contagens de aflatoxigênicos em vagens e grãos, uma vez que a temperatura mínima para o crescimento do micélio de *A. flavus* LINK e *A. parasiticus* SPEARE é de 6°C e a temperatura para esporulação é maior, porém próxima da mínima para o crescimento (LACEY, 1989).

Resultados semelhantes foram obtidos por GARREN & PORTER (1970). Os autores observaram que a invasão de grãos por *A. flavus*, obtidos de vagens de amendoim reumedecidas, dependeu do tempo e da temperatura de incubação. Após 5 dias a 27°C a frequência de isolamento destes fungos foi de 15% contra 5% a 21°C e, zero a 10°C .

Consequente ao abaixamento da temperatura,

a menor detecção e contagem desses fungos nas vagens pode também, estar relacionada à competição fúngica, uma vez que as contagens totais de fungos aumentaram, principalmente devido à presença de maior número de leveduras.

De acordo com CHRISTENSEN (1987), alguns fungos filamentosos e leveduras que invadem ou contaminam os grãos antes da colheita podem continuar a crescer a atividade de água menor que 0,85 (principalmente a baixa temperatura) e são considerados um grupo intermediário do ponto de vista de sucessão ecológica de microrganismos inerentes à grãos.

Ainda, LINDSEY (1970) concluiu que não somente a microbiota endogeocárpica normal associada com as cascas é antagonista a *A. flavus* como, também, fungos de crescimento mais rápido poderiam mascarar *A. flavus* quando os frutos são colocados em ágar.

Um outro aspecto relacionado à competição microbiana diz respeito à presença de *Penicillium* spp. que neste estudo foi uma constante, em vagens e grãos, antes e após o reumedecimento e abaixamento da temperatura, sendo predominantes em algumas amostras de vagens e grãos (Tabelas 45,46,47 e 48).

Penicillium spp. têm sido isolados frequentemente de vagens e grãos de amendoim estocados e apontados como fungos prevaletentes (JACKSON, 1965; HANLIN, 1969; PORTER & GARREN, 1968;1970; EL-MAGRABY & EL-MARAGHY, 1988). CHRISTENSEN & KAUFMANN (1965) apontam espécies de

Penicillium capazes de crescer em lotes de grãos estocados a baixas temperaturas e com teor de umidade acima de 16%.

Embora neste estudo a identificação à nível de espécies não tenha sido feita, tem sido relatado que algumas espécies de *Penicillium* como *P. funiculosum* e *P. rubrum* exercem efeito antagônico sobre *Aspergillus flavus* e, estas espécies foram isolados com frequência alta em grãos de amendoim frescos e estocados, em Israel (JOFFE, 1969a; JOFFE, 1969b).

Destes dados conclue-se que a não detecção de fungos potencialmente aflatoxigênicos nos grãos e nas vagens (1º bloco), nas diluições empregadas após o reumedecimento, não significou sua ausência, apenas demonstrou seu estado de dormência durante o reumedecimento a baixa temperatura.

Em decorrência deste fato a análise estatística dos dados obtidos após os tratamentos químicos não incluiu os resultados da contagem total de fungos e daqueles potencialmente aflatoxigênicos nas vagens e grãos após reumedecimento e sim, considerou-os como médias gerais da contaminação inicial.

6.2. Efeito dos tratamentos químicos no controle da microbiota fúngica total presente no amendoim em casca

As menores médias de contagem total de fungos foram obtidas das amostras de amendoim em casca

tratadas com ácido propiônico 5.000 mg/kg de amendoim em casca, tanto nas vagens como nos grãos, em cada um dos períodos de avaliação, exceto aos 7 dias quando o ácido propiônico 3.000 mg/kg de amendoim em casca apresentou melhor desempenho no controle de fungos presentes nos grãos (Tabela 26).

Este fato mostra que a eficiência das doses, em um primeiro momento, não foi diferente uma vez que também nas vagens o efeito das doses foi semelhante, mas aos 14, 21 e 28 dias apenas vagens de amendoim em casca tratadas com ácido propiônico na dose de 5.000 mg /kg de amendoim em casca mantiveram as menores médias de contaminação como pode ser observado nas Tabelas 15,16,17 e 18. Nas Figuras 5 e 6 pode-se verificar que aos 7 dias de incubação vagens tratadas com ácido propiônico 5.000 e 3.000 mg /kg de amendoim em casca, apresentaram médias de contaminação abaixo da média geral inicial (amostras de amendoim reumedecido); a partir do 7º dia de incubação apenas vagens tratadas com ácido propiônico 5.000 mg /kg de amendoim em casca mantiveram as menores médias de contaminação e, embora, estas tenham permanecido abaixo da média geral inicial conclui-se que a eficiência deste tratamento diminuiu ao longo do período de incubação uma vez que se observou uma tendência linear no aumento da contagem total de fungos até o 28º dia.

Na contaminação dos grãos, as menores médias de contagem foram mantidas pelo ácido propiônico

5.000 e 3.000 mg/kg de amendoim em casca, tanto aos 7 como aos 14 dias de incubação (Tabelas 26 e 27). Mas, somente os grãos obtidos das amostras de amendoim em casca tratados com ácido propiônico 5.000 mg/kg de amendoim em casca mantiveram as menores médias de contagem aos 21 e 28 dias (Tabelas 28 e 29). Nas Figuras 10 e 11 pode-se avaliar a evolução da contaminação nos grãos obtida das amostras tratadas com esta substância química. Observou-se que a contaminação dos grãos provenientes de amostras tratadas com ácido propiônico 3.000 mg/kg esteve somente aos 7 dias abaixo da média geral de contaminação inicial (grãos de amendoim em casca reumedecido) demonstrando um aumento real aos 14, 21 e 28 dias. Para as amostras tratadas com ácido propiônico 5.000 m/kg conclue-se que houve uma tendência das médias observadas aos 7 dias de incubação serem mantidas até os 28 dias considerados; o aumento constatado no 21º dia, embora não estatisticamente comprovado em relação aos outros tratamentos (Tabela 28), pode ter sido decorrente das diferenças no grau de contaminação das amostras, uma vez que se trabalhou com contaminação natural, como pode estar associado a uma distribuição não homogênea da substância química sobre as amostras.

LEITÃO (1989) atenta para o fato de que a eficiência de conservadores depende fundamentalmente dos níveis de contaminação de um dado substrato; as evidências indicam que quando o grau de contaminação é muito elevado a atividade do conservador torna-se restrita.

Conclue-se, portanto, que a dose de 3.000 mg/kg de ácido propiônico, neste estudo, não foi eficiente no controle da contaminação fúngica total.

De acordo com SMITH & MOSS (1985), o ácido propiônico exerce seu efeito antimicrobiano mais precisamente como agente inibidor da germinação mas, se a germinação ocorrer o ácido pode ser prontamente metabolizado pela maioria dos fungos presentes. Doses subinibitórias e inadequada distribuição da substância química podem permitir o crescimento de fungos sobre o material a partir de um pequeno foco inicial, podendo levar a uma modificação na sequência dos fungos presentes encorajando uma espécie ou grupos de espécies tolerantes ao tratamento (SMITH & MOSS, 1985; LACEY, 1989).

No presente estudo pôde-se verificar que o ácido propiônico modificou a sequência dos fungos presentes, tanto nas vagens quanto nos grãos, e encorajou *Eurotium* sp. a predominar nas contagens totais, principalmente quando a dose foi de 3.000 mg/kg (Tabelas 49 e 50).

O gênero *Eurotium* Link indica o teleomorfo dos membros do grupo *Aspergillus glaucus* (RAPER & FENNEL, 1965) e neste estudo adotou-se o nome do teleomorfo de acordo com recomendação de PITT & HOCKING (1985), pois é a fase sexuada que contribui para o genoma do fungo e que lhe confere maior longevidade e maior resistência às condições adversas como aplicação de calor e tratamentos químicos.

A prevalência deste fungo também foi observada por SAUER & BURROUGHS (1974) quando testaram o ácido propiônico e seus sais em milho e sorgo com 18% a 24% de umidade. Os principais fungos que cresceram em grãos de milho com umidade de 18% quando a dose foi inadequada (propionato de cálcio a 1%) foram *Aspegillus glaucus*, *A. candidus* e *Penicillium* spp. Com o aumento da umidade *A. flavus*, *A. niger*, *Mucor* spp., *Fusarium* spp., *Monascus* sp. e *A. versicolor* adicionaram-se àqueles observados em grãos com 18% de umidade. Também em triticales armazenados a 85% de umidade relativa, depois de tratados com propionato de sódio na concentração de 3.000 mg/kg, OLIVERAS & ZEVEDA (1976/1982), observaram após 60 dias de armazenamento uma invasão de 63% destes grãos por fungos do grupo *A. glaucus*.

O efeito do ácido propiônico, na forma de propionato de amônio, sobre *Aspergillus* spp., foi testado *in vitro* por MAGAN & LACEY (1986). As três espécies testadas do grupo *A. glaucus* (*A. amstelodami*, *A. repens* e *A. sejunctus*) mostraram-se menos sensíveis ao ácido propiônico que *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger* e *A. versicolor*.

Os fungos do gênero *Eurotium* Link são chamados fungos de armazenamento xerofílicos (CHRISTENSEN & KAUFFMAN, 1965; PANASENKO, 1967), portanto adaptados a crescer em grãos com teor de umidade em equilíbrio com uma

atividade de água de 0,68 a 0,75, ou seja, em grãos de amendoim com umidade entre 8% a 9% (CHRISTENSEN, 1987).

Todavia, neste estudo, a umidade média das amostras de amendoim tratadas com ácido propiônico manteve-se alta durante todo o período de avaliação, onde a variação média, nas duas doses estudadas esteve entre 12,60% a 17,82%. LACEY (1980; 1989) explica que quando preservativos são aplicados em quantidade insuficiente, os microrganismos tolerantes tornam-se abundantes e, algumas vezes em grãos tratados com propionatos os fungos do grupo *A. glaucus* frequentemente predominam em atividade de água mais altas do naquelas em que usualmente ocorreriam. Outros fungos como *Paecilomyces variotii* e *Fusarium* podem também ser favorecidos. Como consequência, o preservativo químico pode ser metabolizado permitindo subsequente invasão por outras espécies menos tolerantes.

As médias de contaminação observadas em vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio 5.000 e 2.500 mg/kg de amendoim em casca, aos 7 dias, foram semelhantes àquelas observadas em vagens tratadas com ácido propiônico 5.000 e 3.000 mg/kg como pode ser constatado na Tabela 15. Mas, aos 14, 21 e 28 dias de incubação apenas as vagens de amendoim em casca tratado com ortofenilfenato de sódio 5.000 mg/kg mantiveram médias de contaminação tão baixas quanto as obtidas em vagens tratadas com ácido propiônico 5.000 mg/kg (Tabelas 16, 17 e 18).

A eficiência relativa do ortofenilfenato de sódio na dose de 2.500 mg/kg só pôde ser comprovada aos 7 dias de incubação quando suas médias de contaminação nas vagens esteve abaixo daquela média geral inicial de contaminação (amostras de amendoim reumedecido). A partir do 7º dia observou-se que houve um aumento linear nas médias de contaminação e, que estas se mantiveram sempre acima da média geral inicial (Figura 8). Este fato não ocorreu quando a dose desta substância foi aumentada para 5.000 mg/kg, como mostra a Figura 9. Neste caso apenas aos 21 dias a média de contaminação esteve acima da média geral inicial.

O desempenho do ortofenilfenato de sódio no controle da contaminação dos grãos foi diferente daquele observado nas vagens pois, as médias de contagem total de fungos, nas duas doses empregadas, não foram em nenhum dos períodos de incubação avaliados diferentes entre si ($P < 0,01$) (Tabelas 26, 27, 28 e 29). Pode-se ainda observar, nas Figuras 14 e 15, que as médias de contagem total nos grãos de amendoim em casca tratados com esta substância estiveram sempre acima da média geral inicial e que houve uma tendência de aumento linear até o 28º dia de incubação.

Destes resultados conclui-se que embora o desempenho do ortofenilfenato de sódio na dose de 5.000 mg/kg no controle da contaminação das vagens assemelhe-se àquele do ácido propiônico na dose de 5.000 mg/kg, este mesmo desempenho não foi mantido ao nível dos grãos, o que

demonstra que esta substância não pôde ultrapassar os limites da casca. Este fato pôde ser confirmado quando constatou-se que as espécies de fungos predominantes na vagem (externamente), espécies do grupo *Aspergillus terreus* e *Humicola* sp, não o foram nos grãos (internamente) quando aquelas do grupo *A. flavus* tenderam a prevalecer (Tabelas 53 e 54).

O controle da contaminação fúngica pelo emprego do ortofenilfenato era esperado pois, a eficiência dos difenil e o-fenilfenol tem sido comprovada no controle da contaminação fúngica de frutas cítricas, principalmente contra espécies de *Penicillium* e bactérias (KIMATI, 1978; SMITH & MOSS, 1985; SALUNKE & DESAI, 1986). Sua eficiência também foi comprovada *in vitro* contra *Aspergillus flavus* na dose de 20 g/litro (FONSECA et al., 1976).

Portanto, o melhor tratamento foi o ácido propiônico na dose de 5.000 mg/kg, onde obteve-se as menores médias de contagem total de fungos, e que foram mantidas ao longo de todo o período avaliado, tanto nas vagens como, principalmente, a nível de grãos.

Esta ação inibitória do ácido propiônico sobre o crescimento de fungos têm sido demonstrada em grãos e sementes a serem armazenados com teor de umidade acima dos valores mínimos necessários ao desenvolvimento fúngico.

Em grãos de milho armazenados com alto teor de umidade (36%), previamente inoculados com esporos de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e

Penicillium viridicatum e tratados com ácido propiônico a 1%, VANDEGRAFF et al.(1975) comprovaram sua eficácia após 29 semanas de armazenamento. Em sorgo e milho com umidade entre 18% a 24%, estocados a 27°C, o controle do crescimento fúngico foi observado por mais de 17 semanas após tratamento com ácido propiônico nas doses de 0.5% e 1.0% (SAUER & BURROUGHS, 1974).

A ação caracteristicamente fungistática do ácido propiônico e seus sais sobre crescimento de fungos têm sido demonstrada *in vitro*. As doses inibitórias empregadas variaram de 0,03% a 1.31%, conforme modo e parâmetros de avaliação empregados em meio de cultura, substância química liberadora do ácido e espécies de fungos testados (MILWARD, 1976; AZZOUZ & BULLERMAN, 1982; LENNOX & McELROY, 1984; MAGAN & LACEY, 1986; FIORENTIN & BARIONI, 1991). Os estudos *in vitro* têm demonstrado ainda, que as doses são dependentes do pH, ou seja, o efeito inibidor do ácido é maior à medida que o pH decresce (TSAI et al., 1984; MAGAN & LACEY, 1986; MARSHALL & BULLERMAN, 1986; RUSUL et al., 1987). Isto ocorre porque em valores abaixo de pH 4.5 maiores concentrações de ácido propiônico não-dissociado, cerca de 71%, forma ativa de ação, estão presentes (SMITH & MOSS, 1985; RUSUL et al., 1987; LEITÃO, 1989).

No controle da contaminação natural a ação inibitória do ácido propiônico mostrou-se dependente da umidade ao redor do produto tratado.

OLIVERAS & ZEVADA (1976/1982) observaram que quando grãos de triticales, com 15% a 15.5% de umidade em equilíbrio com 75% de umidade relativa, foram tratados com propionato de sódio na dose de 3.000 mg/kg estes permaneceram protegidos do crescimento fúngico por um período de 4 meses, a 27°C. A 85% de umidade relativa (grãos com 18% de umidade) esta proteção foi efetiva apenas por 30 dias.

De acordo com LACEY (1989), a dose de ácido propiônico deve ser adequada à atividade de água do produto a ser tratado. Em feno, cerca de 1,3 g de ácido propiônico por 100 g de água são necessárias e, conclue que em grãos as doses devam ser similares.

O efeito do ácido propiônico observado neste experimento, sobre os grãos de amendoim obtidos das vagens tratadas, pode ser explicado dado à sua volatilidade que garantiu sua capacidade de ultrapassar os limites da casca. Esta é apontada por SMITH & MOSS (1985) como sendo vantajosa na distribuição do preservativo sobre os grãos mas, pode, por outro lado, ser desvantajosa pois, a volatilidade pode levar a perdas do ácido em até 70% na aplicação. Nas condições deste experimento sua ação sobre os grãos foi favorecida e as possíveis perdas podem ter sido compensadas pelo modo de acondicionamento das amostras tratadas.

Com relação aos outros tratamentos, thiabendazole e extrato de semente de "grapefruit", nas

duas doses aplicadas, pôde-se concluir que não foram efetivos no controle da contaminação uma vez que as médias observadas, tanto nas vagens quanto nos grãos, não diferiram daquelas obtidas das amostras sem tratamento (testemunha)($P > 0,01$), em todos os períodos de avaliação (Tabelas 15,16,17,18,26,27,28 e 29).

No caso das vagens (externamente) tratadas com thiabendazole, embora ineficiente, este tratamento foi seletivo pois, *Syncephalastrum* sp. prevaleceu sobre os outros fungos presentes, o que não ocorreu nos grãos (Tabelas 55 e 56). *Syncephalastrum* sp. pertencente à classe dos Zygomycetes, como mucoráceo é um fungo de crescimento rápido, presente em grãos armazenados, especialmente em alimentos com alta atividade de água (BENEKE & STEVENSON, 1987). De acordo com PITT & HOCKING (1985), uma outra característica dos Zygomycetes é a falta de resistência ao calor e a tratamentos químicos. Neste estudo *Syncephalastrum* sp. foi resistente ao fungicida thiabendazole, nas duas doses testadas.

Para vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit" 5.000 mg/kg e thiabendazole, nas duas doses estudadas, o tempo ou período de incubação não alterou as médias observadas no 7º dia de incubação, comportando-se igualmente às amostras testemunha. Deste modo, estes tratamentos não foram eficientes em nenhum momento, ou seja, as médias de contaminação permaneceram altas e praticamente as mesmas até o 28º dia de avaliação. Para

vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit" 10.000 mg/kg o período de incubação (tempo) alterou o desempenho deste tratamento, levando a um aumento linear das médias de contagem (Figura 7). Isto ocorreu porque aos 7 dias e 14 dias de incubação as médias de contagem, embora não estatisticamente diferentes das obtidas nas vagens sem tratamento, foram médias menores sendo semelhantes àquelas observadas em vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio 2.500 mg/kg (Tabelas 15 e 16).

Nos grãos, o tempo ou período de incubação foi significativo e a tendência de aumento da contaminação de grãos obtidos de amendoim em casca tratados com estas substâncias foi linear (Figuras 12, 13, 16 e 17). O mesmo aumento linear não foi observado em grãos de amendoim em casca sem tratamento quando a maior média de contaminação esteve aos 21 dias declinando aos 28. (Figura 18), embora neste caso específico este comportamento possa estar refletindo diferenças na contaminação inicial das amostras e/ou diminuição dos esporos fúngicos viáveis devido à competição por nutrientes.

O efeito do tempo de incubação sobre a microbiota fúngica total presente nos grãos foi consequente das condições de umidade e temperatura mantidas ideais para o desenvolvimento de fungos e a ineficiência dos tratamentos; os grãos apresentaram-se com contaminação inicial menor que as observadas nas vagens e, um aumento gradual ocorreu, provavelmente, devido também à invasão

destes pelos fungos presentes na casca (externamente). Este fenômeno foi mais evidente nas amostras tratadas com extrato de semente de "grapefruit", pois a microbiota fúngica externa foi semelhante à encontrada nos grãos (Tabelas 51 e 52), principalmente quanto às espécies do grupo *Aspergillus niger* e *A. flavus* e *Eurotium* sp.

Os resultados obtidos neste experimento estão em desacordo com os resultados apresentados por outros estudos sobre o efeito do thiabendazole e do extrato de semente de "grapefruit" no controle da contaminação fúngica, onde doses menores ou iguais às utilizadas no presente estudo foram empregadas.

O extrato semente de "grapefruit", *in vitro*, controlou várias espécies de fungos, bactérias e leveduras, as doses mínimas inibitórias variaram de 7 a 100 mg/kg. Entre as espécies de fungos inibidas estão aquelas do grupo *A. flavus* e *A. niger*, com doses mínimas inibitórias de 90 e 100 mg /kg, respectivamente (TRUJILLO & TRUJILLO, 1981). AGUIAR & BASTOS (1983) encontraram necessidade de doses maiores, 5.000 e 10.000 mg/kg, para controle do crescimento de *A. flavus* e *A. ochraceous*, respectivamente. Estes dados estão em descordo com os resultados encontrados neste experimento quando, especificamente nas vagens tratadas (e seus grãos) com esta substância, houve crescimento de *A. flavus* e *A. niger* em todas as amostras avaliadas.

Quanto ao thiabendazole, seu efeito sobre fungos de armazenamento têm sido estudado visando a manutenção da integridade de sementes (potencial de germinação) armazenadas com alto teor de umidade.

Em sementes de milho e triticales armazenados a 97.5% de umidade relativa e tratados com 1.700 mg/kg de thiabendazole em pó, após 30 dias, observou-se total inibição de fungos do gênero *Aspergillus* mas não do gênero *Penicillium* quando as sementes foram 100% invadidas. Também espécies de *Alternaria* foram resistentes (OLIVERAS & ZEVADA, 1976/1982).

Em sementes de sorgo armazenados a 75% e 85% de umidade relativa a 27°C e tratados com thiabendazole na dose de 1500 mg/kg, observou-se controle parcial do crescimento fúngico uma vez que, após 120 dias, 10% das sementes apresentaram-se invadidas por *A. versicolor* porém, nenhum crescimento de espécies do grupo *A. glaucus* foi encontrado, contra 85% de grãos invadidos nas amostras testemunha (MORENO-MARTINEZ & HEREDIA-ABARCA, 1983).

6.3. Efeito de tratamentos químicos no controle de fungos aflatoxigênicos presentes no amendoim em casca

As menores médias gerais de contaminação por fungos potencialmente aflatoxigênicos, obtidas ao longo de todo período avaliado, foram para vagens de amendoim e

seus grãos, tratadas com ácido propiônico nas duas doses testadas (Tabelas 41 e 42).

Nas vagens (externamente), estas médias de contaminação não diferiram daquelas observadas em vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio nas doses de 2.500 e 5.000 mg/kg de amendoim em casca e com o thiabendazole 5.000 mg/kg. Para o ortofenilfenato de sódio 2.500 mg/kg e thiabendazole 5.000 mg/kg a menor contagem de aflatoxigênicos pode ter sido relativa pois, houve aumentos nas contagens totais de fungos, ao longo de todo período avaliado, não diferindo estes aumentos daqueles observados nas contagens das amostras testemunha, aos 21 e 28 dias para ortofenilfenato de sódio e, em cada período de avaliação para o thiabendazole (Tabelas 15, 16, 17 e 18). Nas Tabelas 53, 54, 55 e 56 pode-se constatar que houve prevalência de determinados gêneros de fungos quando as amostras foram tratadas com ortofenilfenato de sódio 2.500 e 5.000 mg/kg e thiabendazole 1.000 e 5.000 mg/kg de amendoim em casca. Este ocorrido pode sugerir uma seletividade da eficiência desses agentes químicos sobre a microbiota indígena externa e competição das espécies predominantes com aquelas do grupo *Aspergillus flavus* presentes. Desta forma, estas menores médias não indicam um resultado efetivo de controle.

No caso das vagens tratadas com ácido propiônico 3.000 mg/kg e de seus grãos, observou-se um aumento das contagens totais de fungos. Mas, nas vagens

(externamente) estas contagens não diferiram estatisticamente das amostras testemunha, aos 14, 21 e 28 dias de avaliação (Tabelas 16,17 e 18). Constatou-se também que mais de 50% dos fungos presentes eram *Eurotium* sp., tanto nas vagens quanto nos grãos (Tabela 49). Na literatura, estes fungos de armazenamento não competem com espécies de *A. flavus* pelo substrato por atuarem em atividades de água diferentes. *Eurotium* spp. estão adaptados a crescer em teores de umidade em equilíbrio com atividade de água de 0,65 a 0,75 e *A. flavus* em atividade de água acima de 0,80 (CHRISTENSEN, 1987). Todavia, como já discutido anteriormente, as espécies de *Eurotium* são mais resistentes ao tratamento com ácido propiônico e crescem, na presença de doses subinibitórias do preservativo, em atividade de água não característica. Portanto, as espécies de *A. flavus* podem ter sido temporariamente inibidas devido a infestação observada nas condições deste experimento. Conclui-se que esta dosagem de ácido propiônico foi subinibitória.

Na dose de 5.000 mg de ácido propiônico/ kg de amendoim em casca a eficiência do preservativo, nas condições deste experimento, foi evidente pois, este tratamento além de manter as menores médias de aflatoxigênicos por todo período avaliado, nas vagens e seus grãos, também manteve as menores médias de contagem total de fungos (Figuras 6 e 11). Entretanto, esse controle pode ser temporário, quando se considera que houve, no

geral, uma tendência de aumento de fungos aflatoxigênicos, nas vagens e grãos, embora para um mesmo tratamento esses aumentos não tenham sido estatisticamente significativos no período avaliado (Figuras 19 e 20).

Essa observação pode ser constatada nas Figuras 3 e 4 que mostram que em relação à média de contagem inicial de aflatoxigênicos (tempo zero) houve aumentos da ordem de 10 a 10^3 ufc/g para as vagens tratadas com ácido propiônico 5.000 mg/kg, e para seus grãos da ordem de 10 ufc/g. Este fato, contudo, pode refletir o modo de reumedecimento que interferiu na detecção desses fungos no tempo zero (vagens reumedecidas). Considerando-se a contaminação por aflatoxigênicos observadas no amendoim antes do reumedecimento, conclui-se que a ordem de contaminação neste tratamento manteve-se a mesma encontrada no amendoim seco, que foi de 10^2 e 10 ufc/g para vagens e grãos, respectivamente.

Esse grau de contaminação por fungos potencialmente aflatoxigênicos, obtidos de vagens (e seus grãos) tratadas com ácido propiônico na dose de 5.000 mg/kg pode ser considerado baixo se comparado às contagens obtidas por PITT et al. (1983) quando 90 amostras de grãos de amendoim foram analisadas em AFPA (*Aspergillus flavus parasiticus* Agar) e o grau de contaminação variou de 50 a 10^4 ufc/grama de amendoim.

A inibição do crescimento e produção de aflatoxinas por espécies do grupo *A. flavus* pela ação de

ácido propiônico a 1% foi constatada por VANDEGRAFT (1975), em grãos de milho previamente reumedecidos (36% de umidade) e inoculados com estes fungos, após 29 semanas da aplicação do tratamento.

SHOTWELL et al. (1984) não obtiveram os mesmos resultados quando utilizaram ácido propiônico nas concentrações de 2,5%, 1,0% e 0,5%, para tratar amostras de milho com alto teor de umidade. Após 6 semanas da aplicação dos tratamentos as amostras, em todas as concentrações do preservativo, apresentavam-se contaminadas com aflatoxinas. Todavia, este resultado pode ter sido consequente do modo de aplicação do ácido uma vez que o preservativo utilizado, o "monoprob", não é líquido e constituiu-se de uma parte de ácido propiônico e uma parte de vermiculita, podendo ter havido, então, má distribuição do ácido sobre os grãos.

No campo, BELL & DOUPNIK (1972), ao testarem a eficiência de várias substâncias químicas no controle da contaminação de grãos de amendoim por aflatoxinas, constataram que os grãos obtidos das vagens tratadas com ácido propiônico a 5% estavam contaminados por aflatoxinas após 6 dias do tratamento. Neste estudo, as vagens recém arrancadas e enleiradas invertidas foram umedecidas e cobertas com plástico por 24 horas, após o que foram tratadas com as substâncias em teste e, novamente cobertas.

MADAAN & CHOHAN (1978) obtiveram resultados diferentes de BELL & DOUPNIK (1972), ao estudarem o efeito

do ácido propiônico na mesma dosagem aplicado à vagens de amendoim recém arrancadas e enleiradas invertidas, sem adição de água. Após 12 dias do tratamento e, a descoberto, *A. flavus* não foi encontrado nas vagens (externamente), nem tão pouco em seus grãos, estando presentes nas amostras sem tratamento. Os pesquisadores concluíram que *A. flavus* pode ser eliminado por esse tratamento pós-colheita desde que o amendoim seja colhido na época certa de maturidade para o cultivar, as vagens sejam invertidas nas leiras e pulverizadas imediatamente.

O efeito do ácido propiônico, em condições naturais de armazenamento e secagem do amendoim no campo, está associado, além da dose e substância liberadora do ácido e perfeita distribuição sobre os grãos e/ou vagens, também ao teor de umidade do material tratado e/ou à sua capacidade de perda de umidade após tratamento, atuando como coadjuvante quando a secagem das vagens de amendoim não puder ser alcançada em 4 a 5 dias, no campo.

Para o presente estudo pode-se concluir que o ácido propiônico na dose de 5.000 mg/kg, dose dez vezes menor que a empregada por MADAAN & CHOHAN (1978), pôde controlar o crescimento de fungos, provavelmente devido ao modo de acondicionamento das amostras, pelo menos no período avaliado. Contudo, maiores estudos devem ser considerados quanto à possibilidade dos propágulos de fungos potencialmente aflatoxigênicos presentes, mesmo em baixas

quantidades, estarem sendo inibidos ou não quanto à capacidade de produzir aflatoxinas.

Experiências de campo têm demonstrado que a contaminação por estes fungos, a despeito de seu nível, pode levar a problemas de toxidez uma vez que a produção de aflatoxinas está relacionada, principalmente, a umidade e temperatura, tanto no campo como durante a estocagem, se ideais para seu crescimento (DIENER & DAVIS, 1977; SANDERS et al., 1981; HILL et al., 1983).

A baixa densidade de inóculo de *A. flavus*/*A. parasiticus*, também, tem sido correlacionada, por estudos *in vitro*, à maior produção de aflatoxinas contudo, este efeito foi dependente da temperatura (SHARMA et al., 1980; KARANARATNE & BULLERMAN, 1990).

Na presença de ácido propiônico, estudos *in vitro* com espécies de *A. flavus* toxigênicas, têm demonstrado que o efeito deste preservativo é fungistático, estendendo a lag fase de crescimento desses fungos, estando o tempo de inibição diretamente relacionado à concentração do ácido aplicado (ALL-HILLI & SMITH, 1979; RUSUL et al., 1987).

ALL HILLI & SMITH (1979) demonstraram que este preservativo químico embora exerça um efeito inibitório na germinação dos esporos de *A. flavus*, estes não perdem a capacidade de metabolizá-lo. Assim, quando quantidades suficientes de ácido foram metabolizadas a germinação ocorreu e a produção de aflatoxinas aconteceu

paralela ao período de rápida produção vegetativa, o que não se observou na ausência do ácido propiônico quando a produção máxima se deu próxima ao período estacionário de crescimento do organismo produtor.

Esta habilidade de *A. flavus*/*A. parasiticus* de sobrepujar a inibição inicial exercida pelo ácido propiônico e, então, produzir grandes quantidades de aflatoxinas tem sido relatada por outros pesquisadores (MARSHALL & BULLERMAN, 1986; RUSUL et al., 1987). Concentrações iguais a 0,65 a 1,31% de propionato de cálcio foram recomendadas por FIORENTIN & BARIONI (1991). Em doses subinibitórias (0,1% e 0,3%) de propionato de cálcio, MARSHALL & BULLERMAN (1986), observaram um aumento na produção de aflatoxinas e uma mudança na razão de aflatoxinas B₁ e G₁ de 1:1 para 1:8, em relação ao controle.

Embora estes dados acima mencionados tenham sido obtidos com culturas puras de fungos aflatoxigênicos, cuidados devem ser tomados com relação à doses subinibitórias a serem aplicadas em produtos agrícolas, pois, observou-se que outros fungos sobreviveram ao tratamento com ácido propiônico, neste estudo, que também têm capacidade de metabolizar o ácido, como as espécies de *Eurotium*, também presentes na concentração de 5.000 mg/kg (Tabela 50).

Entretanto, estudos complementares, sob condições naturais, quanto à presença de aflatoxinas, devem também ser considerados devido à constações de interações

inibitórias entre fungos crescendo em um mesmo substrato (MOSS & FRANK, 1987; ROY & CHOURASIA, 1990). Um exemplo desta possibilidade foi demonstrado por BOLLER & SCHROEDER (1973), quando observaram em arroz em casca inoculado simultaneamente com *Aspergillus chevaliere* (espécie de *Eurotium* comum na microbiota natural deste produto) e *A. parasiticus*, uma redução na produção de aflatoxina B₁ de 99% a 25°C, 100% a 30°C e 95% a 35°C após 14 a 21 dias de armazenamento a 100% de umidade relativa, sem contudo reduzir materialmente o percentual de grãos invadidos por *A. parasiticus*. Dentre as possíveis explicações dadas pelos pesquisadores para este fenômeno estão a competição por nutrientes essenciais à produção de aflatoxinas e à capacidade de *A. chevaliere* estar metabolizando as aflatoxinas produzidas.

Neste estudo, embora *Eurotium* sp. não tenha sido identificado a nível de espécie, deve-se considerar também a possibilidade desta interação inibitória estar ocorrendo. A presença de espécies do grupo *A. glaucus* em amendoim tem sido constatada em vários trabalhos, embora, normalmente, não identificados a nível de espécie. JOFFE (1969a), encontrou *A. chevaliere* como contaminante normal de grãos frescos e armazenados, em Israel.

As maiores médias de contaminação por aflatoxigênicos foram observadas nas vagens (externamente) tratadas com extrato de semente de "grapefruit" nas doses de 5.000 e 10.000 mg/kg de amendoim em casca que não

diferiram da média das amostras sem tratamento (testemunha) ($P > 0,01$). Aquelas tratadas com thiabendazole na dose de 1.000 mg/kg apresentaram uma média de contaminação intermediária (Tabela 41).

Nos grãos, as maiores médias de contagem de aflatoxigênicos, foram observadas naqueles obtidos de vagens tratadas com extrato de semente de "grapefruit" 5.000 mg/kg, thiabendazole 1.000 e 5.000 mg/kg que não diferiram da média de contaminação obtida de grãos das amostras sem tratamento (testemunha) ($P < 0,01$). Os tratamentos que apresentaram médias de contaminação intermediárias foram o ortofenilfenato nas duas doses e o extrato de semente de "grapefruit" 10.000 mg/kg (Tabela 42).

A média intermediária da contaminação obtida pelo thiabendazole 5.000 mg/kg no controle de aflatoxigênicos observada externamente, pode ser decorrente também de sua ação inibitória sobre *Aspergillus* spp. pois, essa foi comprovada por outros estudos. Em grãos de milho tratados com esta substância, OLIVERAS & ZEVEDA (1976/1982) constataram a inibição de *A. flavus*, *A. glaucus*, *A. versicolor*, *A. ruber* e *A. tamaraii* mas, não sobre o crescimento de *Penicillium* spp.. Em grãos de amendoim a dose de 100 mg/kg de thiabendazole foi citada por BLANC (1981) como sendo suficiente para inibir o desenvolvimento de *A. flavus*. AGUIAR & BASTOS (1982) encontraram necessidade de 200 mg/kg para retardar por 20 dias o

crescimento de *A. parasiticus* e diminuir ao máximo a produção de aflatoxinas, em milho autoclavado e inoculado, armazenado por 30 dias a 28°C.

Nos grãos, dada a ineficiência deste produto químico em ultrapassar os limites da casca, não houve controle de aflatoxigênicos, quando as médias de contaminação, nas duas doses aplicadas, não diferiram estatisticamente ($P > 0,01$) daquela observada nas amostras sem tratamento (Tabela 42).

O extrato de semente de "grapefruit", nas duas doses aplicadas, não controlou o crescimento de aflatoxigênicos como esperado pois, em teste *in vitro*, doses de 5.000 e 10.000 mg/kg inibiram o crescimento de *A. flavus* e *A. ochraceus*, bem como a inibição total da produção de aflatoxinas e parcial de ocratoxinas, respectivamente. Nas condições deste experimento, onde conservou-se a microbiota fúngica do amendoim em casca, o desempenho desta substância não foi satisfatório. A despeito da inibição *in vitro* outras substâncias, também, quando testadas em produtos agrícolas, apresentaram pouca ou nenhuma atividade contra fungos de campo como contra os de armazenamento (LACEY, 1989).

O efeito do ortofenilfenato de sódio, nas duas doses testadas, também foi diferenciado quanto à ação sobre os fungos aflatoxigênicos presentes nas vagens (externamente) e nos grãos (internamente). Nas vagens, a contaminação foi semelhante àquela observada em vagens

tratadas com ácido propiônico, não havendo diferenças entre elas (Tabela 41). Esse relativo controle de aflatoxigênicos, nas duas doses, foi esperado pois, FONSECA et al. (1976), constataram, *in vitro*, inibição do crescimento radial de *A. flavus* por 38 dias, utilizando o método de discos de papel de filtro embebidos em solução de ortofenilfenato de sódio na concentração de 20 g/litro.

Contudo, este efeito não foi mantido no controle da contaminação dos grãos, quando se observou uma tendência à predominância de fungos do grupo *A. flavus*, nas duas doses testadas (Tabelas 53 e 54), embora tenha sido estatisticamente mais baixo que a média obtida nas amostras testemunha ($P < 0,01$) (Tabela 42). Essa menor contaminação por aflatoxigênicos pelo ortofenilfenato de sódio 5.000 mg/kg, pode ser consequente do controle observado sobre a microbiota fúngica total presente externamente (nas vagens) quando esta, se em desenvolvimento, poderia invadir a casca e contaminar os grãos; essas médias de contaminação intermediária, nos grãos, também sugerem que os fungos do grupo *A. flavus* presentes sejam inerentes às contaminações iniciais das vagens em desenvolvimento.

O monitoramento das espécies e/ou gêneros presentes nas vagens e grãos, antes e após os tratamentos químicos mostrou-se relevante, principalmente no que concerne ao ácido propiônico na dose de 5.000 mg/kg, o melhor tratamento testado nas condições deste experimento. Neste tratamento observou-se que *Eurotium* sp. sobreviveram

a esta dosagem, ainda que as contagens totais de fungos tenham permanecido baixas durante o período avaliado.

Novos estudos, no campo e no armazenamento, devem incluir além do controle da presença de aflatoxinas o monitoramento desses fungos uma vez que espécies do grupo *A. glaucus* têm capacidade de degradar o preservativo em questão e, este tratamento não eliminou os aflatoxigênicos presentes, além do que uma tendência a aumento nas contagens durante o período avaliado foi observada.

CORRY (1987) sugere, que além do teor de umidade, a contagem de fungos xerotolerantes seja incluída no monitoramento da qualidade de produtos estocados. De acordo com JARVIS & WILLIAMS (1987), precisar quanto ao número específico de propágulos fúngicos que possa ser aceitável em alimentos seja impossível, uma mudança na micoflora dominante pode ser um indicativo de deterioração em curso.

Outros fatores a serem considerados quanto ao emprego do ácido propiônico no campo dizem respeito ao modo de aplicação, viabilidade econômica, resíduo do ácido no amendoim e possíveis modificações nas qualidades organolépticas dos grãos de amendoim.

7. CONCLUSÕES

Considerando o período avaliado e as condições deste experimento, pode-se concluir que:

1. O reumedecimento à baixa temperatura levou a perda dos parâmetros reais de contaminação inicial por fungos potencialmente aflatoxigênicos, implicando na exclusão dessas médias da análise conjunta dos dados pelo modelo estatístico adotado;

2. O total de gêneros isolados foi igual a 19. Os gêneros de fungos predominantes após tratamentos químicos foram: *Eurotium* sp. em vagens e grãos no tratamento ácido propiônico; *Syncephalatum* sp. em vagens tratadas com thiabendazole; *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *Eurotium* sp. em vagens e grãos, no tratamento extrato de semente de "grapefruit"; e *A. terreus* e *Humicola* sp. nas vagens tratadas com ortofenilfenato de sódio;

3. Os tratamentos ácido propiônico na dose de 3.000 mg/kg de amendoim em casca, extrato de semente de "grapefruit" nas doses de 5.000 e 10.000 mg/kg, ortofenilfenato de sódio na dose de 2.500 mg/kg e thiabendazole nas doses de 1.000 e 5.000 mg/ foram

ineficientes no controle da microbiota fúngica total presente nas vagens (externamente) e grãos (internamente), durante todo o período avaliado;

4. O extrato de semente de "grapefruit" (vagens e grãos) e thiabendazole (grãos), nas duas doses avaliadas, apresentaram-se ineficientes no controle de fungos potencialmente aflatoxigênicos;

5. A baixa detecção de fungos potencialmente aflatoxigênicos nas vagens tratadas com ácido propiônico na dose de 3.000 mg/kg e nas vagens tratadas com thiabendazole, nas duas doses testadas, deveu-se, provavelmente, à ação seletiva destes tratamentos;

6. O ortofenilfenato de sódio na dose de 5.000 mg/kg controlou o desenvolvimento de fungos e daquelas potencialmente aflatoxigênicos nas vagens (externamente) mas, esse efeito não foi mantido nos grãos (internamente);

7. O melhor tratamento foi o ácido propiônico na dose de 5.000 mg/kg onde observou-se, nas vagens e grãos, não somente as menores médias de contagem total de fungos, como também a ordem da média de contaminação por aqueles potencialmente aflatoxigênicos manteve-se a mesma encontrada no amendoim antes do reumedecimento;

8. A utilização do ácido propiônico na dose de 5.000 mg/kg, na forma de propionato de amônio, como coadjuvante nos processos mais lentos de secagem do

amendoim nas condições de campo e/ou armazenamento deve ser considerada possível de ser estudada;

9. Trabalhos subsequentes com o ácido propiônico devem incluir o controle da presença de aflatoxinas bem como o monitoramento de espécies de *Eurotium* capazes de metabolizar esta substância.

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, 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.530-37.
- 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.
- ALLEN, P.M. & GOTTLIED, D. Mechanism of action of fungicide thiabendazole, 2-(4'-thiazolyl) bezimidazole. *Applied Microbiology*, Baltimore, 20(6): 916-26, 1970.
- ALL-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.; SCHROEDER, H. W.; LANGLEY, B.C. Aflatoxins: environmental factors governing occurrence in spanish peanuts. *Science*, Washigton, 148: 1228-9, May 1965.
- ASSANTE, G.; CAMARDA, L.; LOCCI, R.; MERLINI, L.; NASINI, G.; PAPADOULOS, E. Isolation and structure of red pigments from *Aspergillus flavus* and related species, growth on a differential medium. *Journal Agriculture of Food Chemistry*, Easton, 29: 785-7, 1981.
- AUSTWICK, P.K.C. & AYERST, G. Groundnut microflora and toxicity. *Chemistry and Industry*, London. p. 55-61, Jan. 1963.

- AZZOUZ, M.A. & BULLERMAN, L.B. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *Journal of Food Protection*, Ames, 45(14): 1298-301, Dec. 1982.
- BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publ., 1972. 241p.
- BARRON, G.L. *The genera of hyphomycetes from soil*. New York, Robert and Krieger Publ., 1972. 364p.
- 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.
- BENEKE, E.S. & STEVENSON, K.E. Classification of food and beverage fungi. In: BEUCHAT, L.R., ed. *Food and beverages mycology*. 2.ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1987. cap. 1, p. 1-48.
- 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. p. 1-10. (Synthese Bibliographique Publiée dans le Patronage de la MIDIST, 27).
- BOLLER, R.A. & SHROEDER, H.W. Influence of *Aspergillus chevaliere* on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus*. *Phytopathology*, Lancaster, 63:1507-10, Dec. 1973.
- BOTHAST, R.J. & FENNELL, D.I. A medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related groups. *Mycologia*, Lancaster, 66: 365-9, 1974.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. *Regras para análise de sementes*. Brasília, Depto Nacional de Produção Vegetal, 1976. 188 p.
- 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).
- CHRISTENSEN, C.M. Field and storage fungi. In: BEUCHAT, L.R., ed. *Food and beverages mycology*. 2.ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1987. cap. 7, p. 211-32.

- CHRISTENSEN, C. M. & KAUFMANN, H.H. Deterioration of stored grains by fungi. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 3:69-84, 1965.
- COLE, R.J.; HILL, R.A.; BLANKENSHIP, P.D.; SANDERS, T.H. Color mutants of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in a study of preharvest invasion of peanuts. *Applied and Environmental microbiology*, Washington, 52(5): 1128-31, Nov. 1986.
- CORRY, J.E.L. Relationships of water activity to fungal growth. In: BEUCHAT, L.R., ed. *Food and beverage mycology*. 2.ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1987. cap. 2, p. 51-99.
- CUERO, R.G.; DUFFUS, E.; OSUJI, G.; PETTIT, R. Aflatoxin control in preharvest maize: effects of chitosan and two microbial agents. *Journal of Agriculture Science*, Cambridge, 117:165-9, 1991.
- DIENER, U.L. & DAVIS, D. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. In: GODBLATT, L.A. ed. *Aflatoxin*. New York, Academic Press, 1969. cap.2, p. 20-36. (Food Science and Technology - a series of monographs)
- 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.; JACKSON, C.R.; COOPER, W.E.; STIPES, R.J.; DAVIS, N.D. Invasion of peanut pods in the soil by *Aspergillus flavus*. *Plant Disease Reporter*, Washington, 49(11): 931-5, 1965.
- 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 Phytopathology*, Palo Alto, 25: 249-70, 1987.
- EL-MAGRABY, O. M. O. & EL-MARAGHY, S. S. M. Mycoflora and mycotoxins of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds in Egypt. III. cellulose - decomposing and mycotoxin - producing fungi. *Mycopathologia*, Den Haag, 104: 19-24, 1988.
- FIorentin, L. & BARIONI Jr., W. Ação antifúngica do propionato de cálcio contra amostras de *Aspergillus* (grupo *flavus*) isolados de ingredientes e rações avícolas em Santa Catarina. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 22(2): 141-46, 1991.

- 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. Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia; Piracicaba, FEALQ, 1982. p. 39-45. (Extensão Agroindustrial,3).
- FONSECA, H.; MARTINELLI FILHO, A.; NERY, H.D.; RONCATTO, E. Espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxinas, na região araraquarense, SP. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, 31: 519-36, 1974.
- FONSECA, H.; SAVY, A.; SOAVE, J.; CANECHIO, 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.
- GAONA, G.V. & ZEVADA, M.Z. Micoflora del cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) destinado para consumo humano. **Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México. Série Botánica**, México, (47/53): 229-38, 1976/1982.
- GARCIA-AGUIRRE, G. Uso de fungicidas en el almacenamiento de arroz: dosis minima efectiva de thiabendazole. **Revista Mexicana de Microbiologia**, México, 1: 201-10, 1985.
- GARCIA-AGUIRRE, G. & MARTÍNEZ-FLORES, R. Ajuste de la binomial negativa a la distribución del género *Aspergillus* aislado de granos de maíz. **Revista Mexicana de Microbiologia**, México, 4: 201-4, 1988.
- GARREN, K.H. & PORTER, D.M. Quiescent endocarpic floral communities in cured peanuts from Virginia and Puerto Rico. **Phytopathology**, Lancaster, 60: 1635-38, Nov. 1970.
- GILMAN, J.C. **A manual of soil fungi**. 2.ed. London, Constable, 1957. 450p.

- GIRALT PONT, J.; JAVIERRE, J.J.; PINÖL, J.C.; RAMALHO, T.A.
El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos. s.l.p., Division de Zootecnia, Lucta S.A., s.d. 119 p.
- GODOY, O.P.; MARCOS FILHO, J.; CÂMARA, G.M.S.; FONSECA, H.
Tecnologia de produção. In: CÂMARA, G.M.S.; GODOY, O.P.; MARCOS FILHO, J.; FONSECA, H. *Amendoim*; produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. São Paulo, Sec. Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia; Piracicaba, FEALQ, 1982, p. 1-38. (Extensão Agroindustrial,3).
- GRIFFIN, G.J. Conidial germination and population of *Aspergillus flavus* in geocarposphere of peanut. *Phytopathology*, Lancaster, 62: 1387-91, Dec. 1972.
- GRIFFIN, G.J. & GARREN, K.H. Population levels of *Aspergillus flavus* and *A. niger* group in Virginia peanut fields. *Phytopathology*, Lancaster, 64: 22-5, March 1974.
- GRIFFIN, G.J. & GARREN, K.H. Colonization of aerial peanut pegs by *Aspergillus flavus* and *A. niger* group fungi under field condition. *Phytopathology*, Lancaster, 66: 1161-2, 1976.
- HANLIN, R.R. Fungi in developing peanut fruits. *Mycophatologia et Mycologia Applicata*, Den Haag, 38(1/2): 93-100, 1969.
- 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 Microbiology*, Baltimore, 45(2): 628-33, Feb. 1983.
- HOBBS, W.E. & GREENE, V. W. Cereal and cereal products. In: SPECK, L.M. ed. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2.ed., Washington, American Public Health Association, 1984. cap. 51, p.690-9.
- HOLMQUIST, G.U.; WALKER, H.W.; STAHR, H.M. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Food Science*, Champaign, 48: 778-82, 1983.
- HORN, B.W. & WICKLOW, D.T. Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, 29: 1087-91, 1983.

- 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. Peanut-pod mycoflora and kernel infection. **Plant and Soil**, Dordrecht, 23(2): 203-11, 1965.
- JARVIS, B. & WILLIAMS, A.P. Methods for detecting fungi in foods and beverages. In: BEUCHAT, L.R., ed. **Food and beverage mycology**. 2.ed. New York, Van Nostrand Reinhold, 1987. cap. 17, p. 599-635.
- JOFFE, A.Z. The mycoflora of groundnut rhizosphere, soil and geocarphosphere on light, medium and heavy soils and its relations to *Aspergillus flavus*. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, Den Haag, 37: 150-160, 1968.
- JOFFE, A.Z. Relationships between *Aspergillus flavus*, *A. niger* and some other fungi in the mycoflora of groundnut kernels. **Plant and Soil**, Dordrecht, 31(1): 57-63, 1969a.
- JOFFE, A.Z. The mycoflora of fresh and stored groundnut kernels in Israel. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, Den Haag, 39: 255-64, 1969b.
- KARANARATNE, A. & BULLERMAN, L.B. Interactive effects of spore load and temperature on aflatoxin production. **Journal of Food Protection**, Ames, 53(3): 227-9, March 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.
- KIMURA, N. & HIRANO, S. Inhibitory strains of *Bacillus subtilis* for growth and aflatoxin-production of aflatoxigenic fungi. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, 52(5): 1173-9, 1988.
- KING JR., A. D.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 37(5): 959-64, May 1979.
- KOBURGER, J.A. & NORDEN, A.P. Fungi in foods; VII: A comparison of the surface, pour plate, and the most probable number methods for enumeration of yeasts and molds. **Journal of Milk and Food Technology**, Orange, 38(12): 745-76, Dec. 1975.
- LACEY, J. Water availability and occurrence of toxigenic fungi and mycotoxin in stored products. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND

- PHYCOTOXINS, 7.; INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 6., Tokyo; Kyoto, 1988. **Proceedings**. Tokyo, Japanese Association of Mycotoxicology, 1988. p.186-88.
- 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 Natori and others. Amsterdam, Elsevier Science, 1989. p.161-9. (Bioactive Molecules, 10).
- LACEY, J.; HILL, S.T.; EDWARDS, M.A. Micro-organisms in stored grains: their enumeration and significance. **Tropical Stored Product Information**, Slough, 39:19-33, 1980.
- 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.
- LENNOX, J.E. & McELROY, L.J. Inhibition of growth and patulin synthesis in *Penicillium expansum* by potassium sorbate and propionate in culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 48(2): 1031-3, 1984.
- LINDSEY, D.L. Effect of *Aspergillus flavus* on peanuts grown under gnotobiotic conditions. **Phytopathology**, Lancaster, 60: 208-211, Feb. 1970.
- MADAAN, S.L. & CHOHAN, J.S. Efficacy of antimicrobial chemicals to control post-harvest occurrence of *Aspergillus flavus* in groundnut kernels. **Indian Phytopathology**, New Delhi, 31: 57-9, 1978.
- MAGAN, N. & LACEY, J. The effects of two ammonium propionate formulations on growth *in vitro* of *Aspergillus* species isolated from hay. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, 60(3): 221-5, March 1986.
- 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 *Aspegillus parasiticus*. **Journal of Food Protection**, Ames, 49(5): 378-82, May 1986.

- MEHAN, V.K.; McDONALD, D.; RAMAKRISHNA, N. Effects of adding inoculum of *Aspergillus flavus* to pod-zone soil on seed infection and aflatoxin contamination of peanuts genotypes. *Oléagineux*, Montpellier, 43(1): 21-8, 1988.
- 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, 1991.
- MILWARD, Z. Further experiments to determine the toxicity of propionic acid to fungi infesting stored grain. *Transaction British Mycological Society*, London, 66(2): 319-24, 1976.
- MOREAU, C. Aflatoxicosis. In: _____. **Molds, toxins and food**. Chichester, John Wiley & Sons, 1979. cap.3, p. 63-76.
- MORENO-MARTÍNEZ, E. & HEREDIA-ABARCA, G. Efecto del fungicida tiabendazole sobre la preservación de la semilla de sorgo en el almacén. *Anales Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Série Botanica*, México, 54: 189-94, 1983.
- MOROZUMI, S.; WAUKE, T.; KUDOH, Y.; HITOKOTO, H. Antifungal effects of commercial foods and spices, and their components. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 7., Tokio, 1988. **Mycotoxins and phycotoxins'88**, edited by Natori and others. Amsterdam, Elsevier Science, 1989. p.155-9. (Bioactive Molecules, 10)
- MOSS, M.O & FRANK, M. Prevention: effects of biocides and other agents on mycotoxin production. In: WATSON, D.H. ed. **Natural toxicans in food; progress and prospects**. New York, VCH; Chichester, Horwood, 1987. cap.8, p. 231-51.
- MUJICA, M.T. & BRACALENTI, B.J.C. Eliminación de aflatoxina B₁ *in vitro* por crecimiento de hongos competitivos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, México, 27(2): 169-73, 1985.
- NORTHOLD, M.D. & BULLERMAN, L.B. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. *Journal of Food Protection*, Ames, 45:519-26, April 1982.

- OKE, O.L.; SMITH, R.H.; WOODHAM, A.A. Groundnut. In: PIRIE, N.W. ed. **Food protein sources**. Cambridge University Press, Cambridge, 1975. p.105-16. (International Biological Programme, 4)
- OLIVERAS, P.L. & ZEVADA, M.Z. Acción de algunos fungicidas in la conservación de maíz y triticales. **Anales Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Série Botanica, México, (47/53): 239-65, 1976/1982.**
- PANASENKO, V.T. Ecology of microfungi. **The Botanical Review, Lancaster, 33(3): 189-215, July/Sept. 1967.**
- PASTER, N. & MENASHERON, N. Inhibitory effect of *Aspergillus niger* on mycotoxigenic fungi. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 7; INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 6., Tokio; Kyoto, 1988. **Proceedings**. Tokio, Japanese Association of Mycotoxicology, 1988. p. 89-90.
- PETTIT, R.E.; TABER, R.A.; FOSTER, B.G. Occurrence of *Bacillus subtilis* in peanut kernels. **Phytopathology, Lancaster, 58: 254-55, Feb. 1968.**
- 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. 412p. (Food science and technology - a series of monographs)
- PITT, J.I. & HOCKING, A.D.; GLENN, D.R. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Journal Applied Bacteriology, Reading, 53: 109-14, 1983.**
- PORTER, D.M. & GARREN, K.H. An analysis of endogeocarpic microflora of peanuts in Virginia. **Tropical Science, London, 10(2): 99-108, 1968.**
- PORTER, D.M. & GARREN, K.H. Endocarpic microorganisms of two types of windrow-dried peanut fruit (*Arachis hypogaea* L.). **Applied Microbiology, Washington, 20(1): 133-8, Jul. 1970.**
- RAPER, K.B. & FENNELL, D.I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore, Williams & Wilkins Company, 1965. p.13-34, p.35-55, p.129-35, p.147-96, p.293-344, p.357-404, p.567-77.

- 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 interation. *Journal of General and Applied Microbiology*, Tokyo, 36: 59-62, 1990.
- RUSUL, G. & MARTH, E.H. Food addtives and plants control growth and aflatoxin production by toxigenic aspergilli; a review. *Mycopathologia*, Den Haag, 101: 13-23, 1988.
- RUSUL, G.; EL-GAZZAR, F.E.; MARTH, E.H. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of acetic or propionic acid and at different inicial pH values. *Journal of Food Protection*, Ames, 50(11): 909-14, 1987.
- SALUNKE, D.K. & DESAI, B.B. In:_____. *Postharvest biotechnology of fruits*. 2.ed. Boca Raton, CRC Press, 1986. v.1, p.36-8, p.69-72.
- SANDERS, T.H.; HILL, R.A.; COLE, R.J.; BLANKENSHIP, P.D. Effect of drought on ocurrence of *Aspergillus flavus* in maturing peanuts. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, New York, 58(12): 966A-970A, Dec. 1981.
- SANDERS, T.H.; BLANKENSHIP, P.D.; COLE, R.J.; HILL, R.A. Effect of soil temperature and drought on peanut pod and stem temperatures relative to *Aspergillus flavus* invasion and aflatoxin contamination. *Mycopathologia*, Den Haag, 86: 51-4, 1984.
- SAUER, O.B. & BURROUGHS, R. Efficacy of various chemicals as grain mold inhibitors. *Transactions of the ASAE*, St. Joseph, 17: 557-9, 1974.
- SCHMITH, F.R. & ESSER, K. Aflatoxins: medical, economic impact, and prospects for control. *Process Biochemistry*, London, 167-74, Dec. 1985.
- 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 Natori and others, Amsterdam, Elsevier Science, 1989. v.10, p.127-34 (Bioactive Molecules).
- SHARMA, A.; BEHERE, A.G.; PADWAL-DESAI, 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.

- SHOTWELL, O.L.; BENETT, G.A.; KWOLEK, W.F.; HESSELTINE, C.W. Effect of propionic acid on aflatoxin levels of stored Georgia 1981 dent corn samples. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, New York, 61(3): 526-8, March 1984.
- SMITH, J.E. & MOSS, M.O. Control of mycotoxins. In: SMITH, J.E. & MOSS, M.O. *Mycotoxin; formation, analysis and significance*. Chichester, John Wiley & Sons, 1985. cap.8, p.127-142.
- STARON, T. & ALLARD, C. Propriétés antifongiques du 2-(4-thyazoly1) benzimidazole ou thiabendazole. *Phytiatrie-Phytopharmacie*, Paris, 13: 163-8, 1964.
- STEWART, R.G; WYATT, R.D.; ASHMORE, M.O. The effect of various antifungal agents on aflatoxin production and growth characteristics of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in liquid medium. *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 Tecnología de Alimentos*, Bogota, 2(3): 17-22, sept./dec. 1981.
- TSAI, W.Y.J.; SHAO, K.P.P.; BULLERMAN, L.B. Effects of sorbate and propionate on growth and aflatoxin production of sublethally injured *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Science*, Chicago, 49: 86-90, 1984.
- 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.
- WELLS, T. R. & KREUTZER, W. A. Aerial invasion of peanut flower tissue by *Aspergillus flavus* under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, Lancaster, 62: 797, 1972. (Annual Meeting Abstracts)
- WELLS, T. R.; KREUTZER, W. A.; LINDSEY, D. L. Colonization of gnotobiotically grown peanuts by *Aspergillus flavus* and selected interacting fungi. *Phytopathology*, Lancaster, 62: 1238-72, Nov. 1972.
- WHITAKER, T.B. & DICKENS, J.W. Comparison of the observed distribution of aflatoxin in shelled peanuts to the negative binomial distribution. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, New York, 49: 590-3, Oct. 1972.

WICKLOW, D.T.; HESSELTINE, C.W.; SHOTWELL, O.L.; ADAMS, G.L.
Interference competition and aflatoxin levels in corn.
Phytopathology, Lancaster, 70(8): 761-4, 1980.

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 (3/4): 422-32,
1977.