



AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE *ASPERGILLUS SECTION FLAVI* E AFLATOXINAS EM DOIS CULTIVARES DE AMENDOIM COM ALTO TEOR DE ÁCIDO OLEICO PRODUZIDOS NO ESTADO DE SÃO PAULO.

Tamara Santos de **Oliveira**¹; Ligia Manoel **Martins**²; Beatriz T. **Iamanaka**³; Marta H. **Taniwaki**⁴

Nº 18232

RESUMO – O estado de São Paulo se destaca como maior produtor nacional de amendoim, e nos últimos anos, vem plantando cultivares de amendoim com alto teor de ácido oleico. Estes cultivares apresentam maior estabilidade à oxidação lipídica, resultando em uma vida de prateleira mais prolongada. O objetivo deste trabalho foi analisar a micobiota dos principais cultivares de amendoim com alto teor de ácido oleico plantados no estado de São Paulo (IAC OL3 e IAC 503) e a ocorrência de aflatoxinas. Um total de 48 amostras de amendoim (24 IAC OL3 e 24 IAC 503) foram plaqueadas em agar Dicloran Glicerol 18% (DG18) e incubadas a 25°C por 5 dias. Amostras de solo (seis amostras coletadas antes da plantação e seis coletadas após a plantação) foram analisadas pelo método de diluição. A análise de aflatoxinas foi realizada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras de solo apresentaram maior infecção após o plantio. Foram isolados 127 cepas de *Aspergillus section Flavi*, sendo 80 do cultivar IAC OL3, das quais 26 (34%) foram produtores de aflatoxina B e 24 (31%) produtores de B e G, e 47 isolados do cultivar IAC 503, das quais cinco (11%) foram produtores de aflatoxina B e 26 (57%) produtores de B e G. Apenas uma amostra de amendoim apresentou contaminação por aflatoxinas (0,91 µg/kg). Apesar do baixo nível de contaminação por aflatoxinas encontrada na amostra, o fungo potencialmente produtor estava presente, indicando que qualquer falha no controle de umidade e temperatura poderá resultar na ocorrência desta toxina.

Palavras-chaves: Amendoim alto oleico, aflatoxinas, fungo, *Aspergillus section Flavi*, fungos aflatoxigênicos

1 Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia de Alimentos, UNIFAJ - Jaguariúna-SP; tamara_g12@hotmail.com

2 Colaborador, Doutorado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP.

3 Colaborador, Pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP.

4 Orientador: Pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP.; marta@ital.sp.gov.br



ABSTRACT – *The state of São Paulo stands out as the largest national peanut producer, and in recent years, it has been growing peanut cultivars with high oleic acid content. These cultivars present greater stability to lipid oxidation, resulting in a longer shelf life. The objective of this work was to analyze the mycobiota of the main cultivars of high oleic peanut planted in the state of São Paulo (IAC OL3 and IAC 503) and the occurrence of aflatoxins. A total of 48 peanut samples (24 IAC OL3 and 24 IAC 503) were plated in Dichloran Glycerol 18% agar (DG18) and incubated at 25°C for 5 days. Soil samples (six samples collected before planting and six collected after planting) were analyzed by the dilution method. Aflatoxin analysis was performed using high performance liquid chromatography (HPLC). Soil samples showed higher infection after planting. 127 strains of *Aspergillus* section *Flavi* were isolated, 80 of the IAC OL3, of which 26 (34%) were aflatoxin-producing B and, 24 (31%) producing B and G; 47 isolated from IAC 503, of which 5 (11%) were aflatoxin-producing B and 26 (57%) producing B and G. Only one peanut sample showed aflatoxin contamination (0.91 mg/kg). Despite the low level of aflatoxin found in this sample, species potentially producer of aflatoxin were present, indicating that any failure to control humidity and temperature may result in the occurrence of the toxin.*

Keywords: High oleic Peanut, aflatoxins, fungi, *Aspergillus* section *Flavi*, aflatoxigenic fungi

1. INTRODUÇÃO

A produção de amendoim no Brasil tem apresentado um aumento considerável de produtividade nos últimos anos, devido ao avanço das tecnologias e desenvolvimento de novas sementes (Conab, 2015). Este aumento na produção aliado ao aumento do incentivo ao consumo de amendoim tem levado ao maior cuidado com a qualidade do produto. Medidas de controle de qualidade estão sendo tomadas, como por exemplo, a resolução RDC 172 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2003), que dispõe sobre boas práticas de fabricação e o programa “pró-amendoim”, criado pela Associação Brasileira de Chocolate, Cacau, Amendoim, Bala e Derivados (ABICAB, 2015). Este programa visa o controle e monitoramento das aflatoxinas, que são metabólitos tóxicos produzidos principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Segundo Pitt et al. (2013), dentre os fatores que podem favorecer a produção de aflatoxinas estão: danos causados por insetos e estresse hídrico na etapa de pré-colheita, secagem lenta na pós-colheita e uma estocagem precária. Os pontos críticos para formação de aflatoxinas nas etapas pós-colheita podem ser facilmente controlados com a secagem rápida e uma estocagem com controle de



temperatura e umidade. Na etapa de pré-colheita, a produção de aflatoxinas pode ser minimizada garantindo condições ideais no solo. A temperatura e umidade do solo durante as etapas de maturação do amendoim influenciam na produção de aflatoxinas. Quando a umidade do solo é controlada, a atividade de água do grão se mantém constante, e a produção de fitoalexinas, substâncias de defesa da planta, é maior. Em casos de estresse hídrico, a produção de fitoalexinas é menor. Somado ao aumento da temperatura, essas condições favorecem a infecção do amendoim e consequente produção da toxina (Doner et al., 1989). No Brasil, o amendoim é plantado como rotação de cultura com a cana-de-açúcar e não é aplicado o sistema de irrigação, prejudicando o controle de umidade do solo, podendo ocorrer estresse hídrico.

Nos últimos anos, a produção de amendoim no estado de São Paulo teve uma mudança significativa com a substituição dos cultivares do tipo Valência pelas variedades do grupo Virgínia Runner, especialmente o cultivar Runner IAC 886, que apresenta grande potencial produtivo e rendimento industrial (Suassuna & Ferreira, 2014). A partir de 2009 o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) lançou cultivares de amendoim com alto teor de ácido oleico. Estes cultivares apresentam uma maior estabilidade à oxidação, resultando em maior tempo de vida de prateleira. Além disso, apresentam maior resistência à determinadas doenças, sendo possível inferir que apresentam, possivelmente, menor susceptibilidade de infecção por fungos aflatoxigênicos e consequente produção de aflatoxinas. Contudo, poucos estudos têm investigado se estes cultivares com alto teor de ácido oleico têm alguma influência na ocorrência de fungos e produção de aflatoxinas. O objetivo deste trabalho foi analisar a microbiota dos principais cultivares de amendoim alto oleico plantados no estado de São Paulo (IAC OL3 e IAC 503) e a ocorrência de aflatoxinas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foram analisadas 48 amostras de amendoim IAC OL3 (24) e IAC 503 (24) com alto teor de ácido oleico e 12 amostras de solo de um experimento de campo realizado na região de Araraquara - SP. As amostras de solo foram coletadas antes e após a plantação. Cada cultivar foi plantado em seis canteiros com oito linhas de 10 metros cada e 90 cm de espaçamento entre elas. As duas linhas da extremidade foram eliminadas e cada linha interna foi considerada uma amostra. A amostragem de amendoim seguiu a recomendação da União Européia (178/2010), que variou de acordo com a quantidade colhida.



2.2 Medição de atividade de água do amendoim e do solo

A análise de atividade de água das amostras de amendoim e dos solos foi determinada no aparelho Aqualab, modelo 3TE (Decagon, USA). As leituras foram realizadas em triplicatas a 25°C ±1°C.

2.3 Análise micológica

As análises micológicas foram realizadas segundo Pitt & Hocking (2009). As amostras de amendoim foram desinfetadas em solução de hipoclorito 0,4% por 2 minutos, sob agitação. A seguir foi realizado o plaqueamento direto de 50 grãos, distribuídos em 10 placas (5 grãos por placa) contendo ágar Dicloran 18% glicerol (DG18). As placas de amendoim foram incubadas a 25°C por 5 dias. O resultado foi expresso em porcentagem de amendoim infectado. Para o isolamento dos fungos presentes nas amostras de solo, foi utilizado o método de diluição em placas (Pitt & Hocking, 2009). Pesou-se aproximadamente, 25 gramas de solo, acrescentando 225 ml de água peptonada. Cada amostra foi homogeneizada em *stomacher* por um período de 30 segundos. Foi realizada a diluição sucessiva de 10¹, 10² e 10³. Em seguida as diluições foram distribuídas em placas com meio de cultura DG18. As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias.

2.4 Identificação dos fungos

Os fungos foram identificados de acordo com as características macroscópicas e microscópicas utilizando a chave de classificação de Pitt & Hocking (2009) e Samson et al. (2010).

2.5 Teste de produção de toxina dos isolados

Os isolados de *A. section Flavi* foram inoculados em ágar extrato de levedura sacarose (YESA) e incubados a 25°C por 7 dias. Em seguida, foi aplicada a técnica de ágar plug associada a cromatografia de camada delgada (CCD), segundo Filtenborg et al. (1983) para testes de produção de aflatoxinas.



2.6 Determinação de aflatoxinas nas amostras de amendoim

A análise de aflatoxina nas amostras de amendoim foi realizada segundo Stroka et al. (2000), com modificações. Aproximadamente 100 g de amendoim foram triturados e 25 g da amostra foi adicionada de 2,5 g de NaCl e 100 mL de metanol:água (8:2 v/v). Esta solução foi homogeneizada em shaker por 30 minutos. Em seguida, foi duplamente filtrada em papel filtro qualitativo e membrana de vidro, respectivamente, e 10 mL do filtrado final diluído em 60 mL de solução tampão fosfato (PBS). O conteúdo total foi passado em coluna de imunoafinidade, com fluxo de 1 – 2 gotas por segundo, seguido de lavagem da coluna com 30 mL de água destilada. A aflatoxina contida na coluna foi eluída com 1250 µL de metanol grau HPLC e 1750 µL de água ultrapura. Para detecção da toxina foi utilizado cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector de fluorescência, comprimento de onda de excitação e emissão de 362 e 455 nm, e sistema Kobracell para derivatização pós-coluna das aflatoxinas B e G. A fase móvel foi água:acetoneitrila:metanol (6:2:3, v/v/v), adicionada de 119 mg de KBr e 350 µL de ácido nítrico 4 M por litro, em um fluxo de 1 mL/min., com volume de injeção de 20 µL.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Contagem total dos fungos isolados do amendoim e solo

A Tabela 1 apresenta a porcentagem de infecção por *A. section Flavi* isolados das amostras de amendoim IAC OL3 e IAC 503. Foram isolados um total de 127 cepas de *A. section Flavi* com maior frequência nas amostras do cultivar IAC OL3 (80 cepas) quando comparado ao cultivar IAC 503 (47 cepas). A atividade de água das amostras de amendoim variou de 0,468 a 0,795. A contagem fúngica nas amostras do solo podem ser observadas na Figura 1. A atividade de água das amostras de solo variou de 0,993 a 1,000. Pode-se observar uma maior contaminação do solo após o plantio, com aumento de aproximadamente 8% de ocorrência de *A. section Flavi* nas amostras de solo onde foram plantados amendoim IAC OL3 e de aproximadamente 11 % no solo do amendoim IAC 503.

Tabela 1. Porcentagem de Infecção e número de isolados de *A. section Flavi* das amostras de amendoim.

Amostras Canteiro	Linha	IAC OL3		IAC 503	
		% infecção A. section Flavi	Nº isolados	% infecção A. section Flavi	Nº isolados
1	1	2	1	2	1
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	2	1
2	1	2	1	2	1
	2	2	1	2	1
	3	0	0	0	0
	4	6	3	16	8
3	1	0	0	2	1
	2	6	3	2	1
	3	4	2	8	4
	4	4	2	0	0
4	1	0	0	8	4
	2	4	2	2	1
	3	0	0	0	0
	4	6	3	8	4
5	1	6	3	0	0
	2	36	18	0	0
	3	72	32	0	0
	4	0	0	0	0
6	1	10	5	8	4
	2	8	4	22	10
	3	0	0	10	5
	4	0	0	0	0

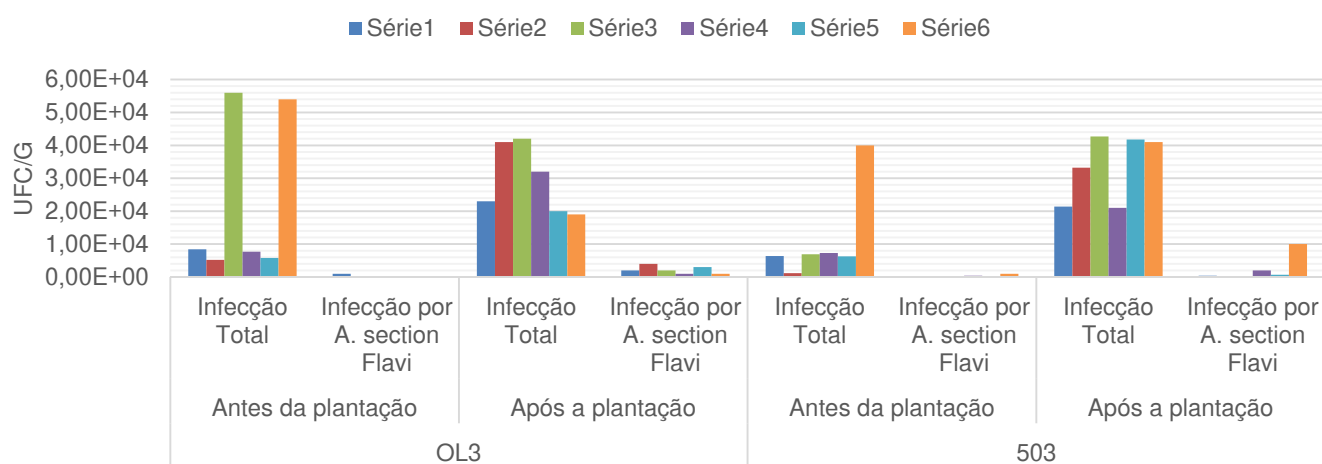


Figura 1. Infecção total e por *A. section Flavi* nas amostras de solo coletadas antes e após a plantação dos cultivares IAC OL3 e IAC 503.

3.2 Teste de produção de aflatoxinas pelos isolados

A Figura 2 apresenta a produção de aflatoxinas B e G por *A. section Flavi* isolados dos amendoins IAC OL3 e IAC 503. De 80 cepas de *A. section Flavi* isolados do amendoim IAC OL3, 27 (34%) não eram produtoras de aflatoxinas, 26 (32%) produziram aflatoxinas do tipo B, 24 (30%) cepas eram produtoras de aflatoxinas B e G e 3 (4%) não foram testadas. No amendoim IAC 503, das 47 cepas isoladas de *A. section Flavi*, 15 (32%) não apresentaram potencial de produção, 5 (11%) produziram aflatoxina tipo B, 26 (55%) eram produtoras de aflatoxinas B e G e 1 (2%) não foram testadas. Os resultados mostram que apesar do cultivar IAC OL3 apresentar maior porcentagem de infecção e maior número de isolados, o cultivar IAC 503 apresentou maior porcentagem de isolados com capacidade de produção de aflatoxinas.

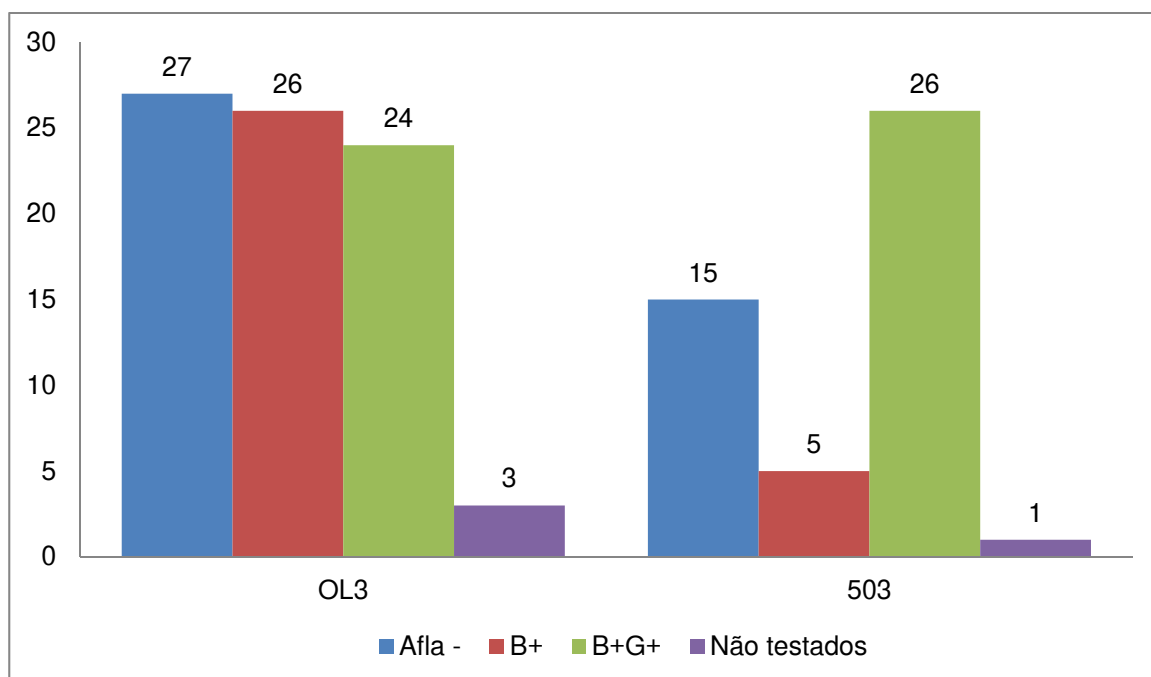


Figura 2. Produção de aflatoxinas nas amostras de amendoim.

Dentre as 48 amostras de amendoim analisadas quanto a presença de aflatoxinas, apenas uma amostra (2%), pertencente ao cultivar IAC OL3, apresentou contaminação de 0,91 µg/kg. Este valor está abaixo do limite máximo estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 20 µg/kg (Brasil, 2011). Este resultado indica que apesar da infecção por fungos potencialmente produtores, não houve condições ideais para a produção de aflatoxinas no amendoim. Estudos mostram que enquanto houver umidade suficiente para a planta crescer, se não



houver estresse hídrico, será difícil a produção de aflatoxinas, mesmo que o fungo esteja presente no amendoim (Pitt et al., 2013).

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo conclui-se que houve a presença de *A. section Flavi* nos dois cultivares de amendoim analisados e ambos apresentaram cepas com potencial de produção de aflatoxinas. Estes dados ressaltam a importância dos estudos de monitoramento de ocorrência de fungos e aflatoxinas, uma vez que apesar de apresentar baixa contaminação por aflatoxinas, os dois cultivares apresentaram fungos aflatoxigênicos e qualquer falha no controle de umidade e temperatura poderá resultar na sua produção.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq/PIBIC pela bolsa concedida.

6. REFERÊNCIAS

ABICAB – Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados 2015. *Programa pró-amendoim*. Available in: <http://www.abicab.org.br/amendoim/pro-amendoim/selo-de-qualidade>. Acesso em Julho, 2015.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário oficial da União. Seção 1. Nº 46, 2011.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 172, de 4 de julho de 2003. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Amendoins Processados e Derivados e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Amendoins Processados e Derivados, 2003. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RDC_n_172.pdf/89e81129-5a83-4b38-a677-11eca66a2acc. Acesso em 28/06/2018.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira Grãos. Vol.2. Safra 2014/2015. Nono Levantamento, Brasília, p. 1-104, 2015.



12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018
01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-145-5

DONER, J. W.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; BLANKENSHIP, P. D. Interrelationship of kernel water activity, soil temperature, maturity, and phytoalexin production in preharvest aflatoxin contamination of drought-stressed peanuts. **Mycopathol** v. 105, p. 117-128, 1989.

EUROPEAN COMMISSION. Commission regulation (EC) No. 178/2010. Amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards groundnuts (peanuts), other oilseeds, tree nuts, apricot kernels, liquorice and vegetable oil. *Offic J Eur Union*, L52, p. 32-42, 2006.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; SVENDENSEN, J. A. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Appl Environ Microbiol** v. 45, p. 581-585, 1983.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**, 3rd ed. New York: Springer, 2009. 519p.

Pitt, J. I.; Taniwaki, M. H.; Cole, M. B. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. **Food Control** v.32, p. 205-215, 2013.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. **Food and Indoor Fungi**. Utrecht: CBS-KNAW, 2010.

STROKA, J.; ANKLAM, E.; JORISSEN, U.; GILBERT, J. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-Column Bromination for Determination of Aflatoxins in Peanuts Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder: Collaborative Study. **J Assoc Offic Anal Chem** v. 83, p. 320-340, 2000.

SUASSUNA, T. M. F.; FERREIRA, D. S. **Cultivares de amendoim registradas no Brasil. Sistema de Produção de Amendoim**. Embrapa Algodão. Sistema de produção, 7, 2014.