



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRICOLA
PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DE PRODUTOS AGRICOLAS**

**RESPOSTA DE SEMENTES DE AMENDOIM A DIFERENTES DOSES DE
RADIÇÃO GAMA E CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINAS APÓS
INOCULAÇÃO ARTIFICIAL COM *Aspergillus parasiticus***

TATIANA DA SILVA SANTOS

Campina Grande – Paraíba
Setembro – 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TATIANA DA SILVA SANTOS

**RESPOSTA DE SEMENTES DE AMENDOIM A DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO
GAMA E CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINAS APÓS INOCULAÇÃO
ARTIFICIAL COM *Aspergillus parasiticus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola na Área de concentração: Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas, do Centro de Tecnologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Agrícola.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DE
PRODUTOS AGRICOLAS

ORIENTADORES: FRANCISCO DE ASSIS CARDOSO ALMEIDA
TAÍS DE MORAES FALLEIRO SUASSUNA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

S237r Santos, Tatiana da Silva.
2008 Resposta de sementes de amendoim a diferentes doses de radiação gama e contaminação por aflatoxinas após inoculação artificial com *Aspergillus parasiticus* / Tatiana da Silva Santos. — Campina Grande, 2008.
54 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais.

Referências.

Orientadores: Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso de Almeida, Prof^ª. Dr^ª. Taís de Moraes Falleiro Suassuna.

1. Amendoim. 2. Micotoxinas. 3. Análise Sanitária. I. Título.

CDU - 633.368 (043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

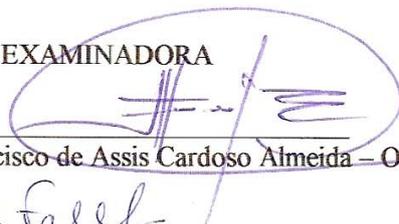


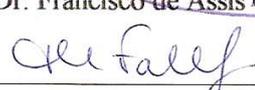
PARECER FINAL DO JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

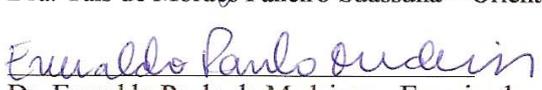
TATIANA DA SILVA SANTOS

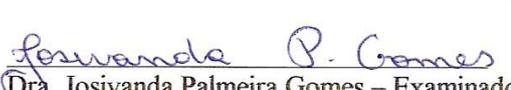
RESPOSTA DE SEMENTES DE AMENDOIM A DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO
GAMA E CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINA APÓS INOCULAÇÃO ARTIFICIAL
POR *Aspergillus parasiticus*.

BANCA EXAMINADORA


Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida – Orientador


Dra. Taís de Moraes Falleiro Suassuna – Orientadora


Dr. Everaldo Paulo de Medeiros – Examinador


Dra. Josivanda Palmeira Gomes – Examinadora

PARECER

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Aprovado

SETEMBRO - 2008

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes de minha vida:

Meus pais, Antonio e Josefa, por serem meu exemplo de vida, sempre me ensinando a superar todas as dificuldades...

Meu marido Élcio, pela compreensão, amor, carinho, companheirismo e paciência durante todos esses anos juntos; sendo um exemplo de marido, de amigo e de homem e por ser meu porto seguro...

“Minha vida é bem melhor por vocês existirem!”

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por tudo que vem realizando em minha vida.

A Coordenação de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, em especial a secretária Rivanilda, pela atenção durante todo o período do mestrado.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora Dr^a Taís de Moraes Falleiro Suassuna, pelos ensinamentos, paciência, amizade e principalmente pela confiança prestada a mim durante todo o período da pós-graduação, que sempre acreditou na minha capacidade para desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador Prof^o Francisco de Assis Cardoso Almeida, pelos ensinamentos transmitidos e valiosas orientações na elaboração deste trabalho.

Ao Prof^o Francisco de Assis Santos e Silva pelos ensinamentos e orientações que foram tão valiosos no meu processo de aprendizagem durante o mestrado.

Ao pesquisador da Embrapa Algodão MSc. Wirton de Macedo Coutinho, pela paciência, dedicação, sugestões, ajuda e principalmente pelos ensinamentos de fitopatologia que foram fundamentais na elaboração e montagem deste do trabalho.

Ao pesquisador da Embrapa Algodão Dr^o Everaldo Paulo de Medeiros, pelos ensinamentos valiosos em química e apoio em todos os momentos de montagem e execução do experimento de aflatoxinas.

A Prof^a Helen Khoury do Departamento de Energia Nuclear – DEN/UFPE, pela atenção e irradiação das amostras de amendoim.

A Dr^a Maria Antonia Domingues Calori, do Laboratório de Micotoxinas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) por ter supervisionado a quantificação das amostras.

Ao Dr^o Guilherme Prado, por ter cedido à cepa toxicogênica de *Aspergillus parasiticus*.

Aos estagiários do laboratório de fitopatologia da Embrapa Algodão: Clarice, Wailda, Daniele, Amanda, Marcelo, Jeferson, pelos laços de amizade construídos ao longo desse período de convivência.

A Pollyne Borborema Alves de Almeida, pela amizade, ensinamentos, incentivo e ajuda que foi fundamental na realização dos experimentos, sendo meu apoio durante toda a execução dos trabalhos e também pelos bons momentos que passamos no laboratório de fitopatologia.

A laboratorista Joseni pela amizade, orações e apoio em todos os momentos, nunca me deixando desanimar com os problemas e o incentivo com palavras de carinho e coragem.

As minhas amigas Eliane Cristina e Morganna Pollyne, por estarem ao meu lado durante todo esse período, sempre me incentivando e me apoiando nos momentos mais difíceis.

A grande amiga que fiz durante este mestrado Cibele Medeiros, pelo incentivo, paciência e por estar sempre me apoiando durante todos os momentos.

Aos amigos que me ajudaram durante todo período do mestrado: Karina Guedes, Júlia Karla, Hervesson, Polliana, Simone, Fernanda, Leandro, Uiara, Rossini, Robi, Marcos Eric.

Aos funcionários da Embrapa: Eliane, Nilda, Idaísio, Napoleão Alves, Mário Brito, Mario, Zé Menezes, Juarez, Joabson, Narciso, Afonso, Gilvan, Maria do Carmo, Henrique, Dione, Amaro e Chicão.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Sumário

Capítulo 1: Resposta de sementes de amendoim a diferentes doses de irradiação gama (^{60}Co)

Resumo.....	2
Abstract.....	3
1. Introdução.....	4
2. Revisão de Literatura.....	6
2.1 Germinação.....	6
2.2 Vigor.....	6
2.3 Micoflora.....	7
2.4. Radiação gama.....	8
3. Materiais e Métodos.....	10
3.1 Local do experimento e origem das sementes.....	10
3.2 Tratamento das sementes com irradiação de ^{60}Co	10
3.3 Teste de Vigor e germinação.....	11
3.4 Micoflora (Teste de sanidade).....	11
3.5 Delineamento experimental e análise estatística.....	12
4. Resultados e Discussão.....	13
4.1 Vigor e germinação.....	13
4.2 Micoflora.....	16
5. Conclusões.....	19
6. Referências Bibliográficas.....	20

Capítulo 2: Contaminação por aflatoxinas em amostras de amendoim de diferentes tamanhos inoculadas artificialmente

Resumo.....	25
Abstract.....	26
1. Introdução.....	27
2. Revisão de Literatura.....	29
2.1 Cultura do amendoim.....	29
2.1.1 Botânica.....	29
2.1.2 Importância econômica.....	29
2.2 Micotoxinas.....	30
2.2.1 Aspectos gerais.....	30
2.2.2. Contaminação do amendoim por Aflatoxinas.....	30
2.3 Condições ambientais para o desenvolvimento do <i>Aspergillus</i>	32
2.4 Amostragem para avaliar a contaminação por aflatoxinas.....	32
3. Materiais e Métodos.....	35
3.1 Local do experimento e origem das sementes.....	35
3.2 Tratamento das sementes com irradiação de ⁶⁰ Co.....	35
3.3 Isolado de <i>Aspergillus parasiticus</i>	36
3.4 Preparo do inóculo em pó.....	36
3.5 Inoculação dos grãos.....	37
3.6 Incubação.....	37
3.7 Teste de sanidade.....	39
3.8 Determinação de aflatoxinas.....	39
3.8.1 Preparo das amostras para análise.....	39
3.8.2 Preparo das soluções padrão.....	39
3.8.3 Extração e limpeza das amostras.....	40
3.8.4 Identificação de aflatoxinas.....	41
3.8.5 Quantificação.....	41
3.9 Amostragem e análise estatística.....	43

4. Resultados e Discussão.....	44
5. Conclusões	50
6. Referências Bibliográficas.....	51

Lista de Figuras

Capítulo 1: Resposta de sementes de amendoim a diferentes doses de irradiação gama (^{60}Co)

- Figura 1- Representação gráfica da Porcentagem da 1^o contagem de germinação (Vigor) em relação a diferentes doses de radiação..... 14
- Figura 2- Representação gráfica da porcentagem de Germinação em relação a diferentes doses de radiação..... 15
- Figura 3- Representação gráfica da porcentagem de *A. flavus* em diferentes doses de irradiação gama..... 17
- Figura 4- Representação gráfica da porcentagem de *A. glaucus* em diferentes doses de irradiação gama..... 17
- Figura 5- Representação gráfica da porcentagem de *A. niger* em diferentes doses de irradiação gama..... 18
- Figura 6- Representação gráfica da porcentagem de *Penicillium sp.* em diferentes doses de irradiação gama..... 18

Capítulo 2: Contaminação por aflatoxinas em amostras de diferentes tamanhos inoculadas artificialmente

- Figura 1- Placas de Petri contendo *Aspergillus Parasiticus* mantidas em câmara BOD, para secagem totalmente do meio Czapeck Dox Agar..... 37
- Figura 2- Amostras de amendoim acondicionadas sobre grade metálica no interior de dessecadores, contendo solução saturada de Nitrato de Potássio, dentro de câmara BOD..... 38

Figura 3- Extração e limpeza das amostras.....	41
Figura 4- Esquema da Cromatofolha (Cromatografia em Camada Delgada).....	41
Figura 5- Representação gráfica da porcentagem de contaminação por <i>Penicillium sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> , <i>A. flavus</i> e <i>A. niger</i> das amostras não inoculadas.....	44
Figura 6- Representação gráfica do desvio padrão em relação média de contaminação de aflatoxina (ppb) nas amostras de diferentes tamanhos.....	47

Lista de Tabelas

Capítulo 1: Resposta de sementes de amendoim a diferentes doses de irradiação gama (^{60}Co)

Tabela 1- Resumo da Análise de Regressão para germinação e vigor, das amostras amendoim BRS Havana irradiadas.....	13
--	----

Capítulo 2: Contaminação por aflatoxinas em amostras de diferentes tamanhos inoculadas artificialmente

Tabela 1- Contaminação com aflatoxina B1 de amostras de amendoim inoculados artificialmente.....	46
--	----

Tabela 2- Estatística das amostras de amendoim inoculadas por <i>Aspergillus parasiticus</i>	47
--	----

Tabela 3- : Média de contaminação (ppb), desvio padrão calculado e desvio padrão estimado para os diferentes tamanhos de amostras.....	49
--	----

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

RESPOSTA DE SEMENTES DE AMENDOIM A DIFERENTES DOSES DE IRRADIAÇÃO GAMA (^{60}Co)

RESUMO

SANTOS, T. S. RESPOSTA DE SEMENTES DE AMENDOIM A DIFERENTES DOSES DE IRRADIAÇÃO GAMA (^{60}Co). In: _____. **RESPOSTA DE SEMENTES DE AMENDOIM A DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO GAMA E CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINAS APÓS INOCULAÇÃO ARTIFICIAL COM *Aspergillus parasiticus***, 2008, Cap. 1, p. 2 – 22. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola – área de concentração de Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande – PB.

A radiação gama, proveniente da fonte de ^{60}Co , é um tipo de onda do espectro eletromagnético, bastante utilizada para esterilização, visando prevenir a decomposição e a toxidez de origem microbiana em diversos produtos. O grau de radiosensibilidade de um embrião vegetal depende da espécie, do estágio de seu desenvolvimento durante a radiação, da dose empregada e do critério usado para medir o efeito biológico, sendo comumente utilizado o teste de germinação. Desta forma, objetivou-se com este trabalho estudar a sensibilidade do amendoim à radiação gama e seus efeitos na germinação, no vigor e na micoflora das sementes da cultivar BRS Havana, irradiadas com uma fonte de ^{60}Co , tipo gammacell, com dose de 12,5 kGy/h. As doses testadas em kGy foram as seguintes: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 18,0; 21,0 e 24,0. Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que as doses acima de 3,0 kGy prejudicaram a viabilidade das sementes, as doses acima de 12 kGy comprometeram totalmente o vigor e a germinação das sementes de amendoim. A radiação a partir da dose 2,0 kGy eliminou os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*, e a partir da dose 3,0 kGy eliminou o *Aspergillus glaucus*. *Penicilium sp.* permaneceu em mais de 30% das sementes em todos os tratamentos com radiação, não sendo eliminado até a dose de 24 kGy.

Palavras-chave: Vigor, germinação e análise sanitária.

PEANUT SEEDS RESPONSE TO DIFFERENT GAMMA RADIATION LEVELS (^{60}Co)

Abstract

The gamma radiation, from (^{60}Co) source, It is a kind of electromagnetic spectrum wavelength, widely used to sterilization, to prevent decomposition and toxicity from microbes in several products. The degree of radiosensibility of a plant embryo depends on Its species, Its development stage during radiation, used doses and the used criteria to measure the biological effect, being commonly used the germination test. This way, this work aims to study the peanut sensibility to gamma radiation and Its effects in the germination, in the vigour and seeds microflora from cultivar BRS Havana, irradiated with (^{60}Co) source, type gammacell with a dose of 12,5 kGY/h. The tested doses in kGY were the following: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 18,0; 21,0 and 24,0. Up to the obtained results, It was concluded that doses over 3,0 kGY damaged the seeds viability, doses over 12,0 kGY totally committed the vigour and the peanut seeds germination. Radiation from doses 2,0 kGY eliminated the fungus *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*, and from doses 3,0 kGY eliminated the *Aspergillus glaucus*. *Penicilium* sp remained in more than 30% of seeds in all treatments with radiation, not being eliminated until doses of 24,0 kGY.

Key words: Vigour, germination and health analysis.

1. INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hipogaea* L.) é uma das mais importantes oleaginosas, sendo a quarta em produção, depois de soja, algodão e canola. Participa com 10% da produção mundial de óleo comestível, com uma produção em torno de 23,5 milhões de toneladas/ano; os principais produtores são Índia, China e Estados Unidos. Atualmente, a produção nacional é de aproximadamente 305,0 mil toneladas/ano, e o estado de São Paulo é o principal produtor (CONAB, 2008).

A importância econômica do amendoim está relacionada ao fato de suas sementes possuírem sabor agradável e serem ricas em óleo (cerca de 50%) e proteína (22 a 30%). Além disso, contêm carboidratos, sais minerais e vitaminas, constituindo-se num alimento altamente energético (585 calorias/100g de sementes). O sabor agradável torna o amendoim um produto destinado também ao consumo "*in natura*" como aperitivos salgados, torrado e preparado de diversas formas; na indústria de doces, como grãos inteiros com diversas coberturas ou grãos moídos na forma de paçocas ou substituindo a castanha de caju em cobertura de sorvetes. Além do consumo "*in natura*", os grãos também podem ser utilizados para extração do óleo, empregado diretamente na alimentação humana, na indústria de conservas como por exemplo de enlatado e em produtos medicinais.

As sementes de amendoim apresentam um tegumento extremamente delicado, por isso o seu manuseio, durante o processamento, o armazenamento e o transporte, causa-lhes sérias injúrias, provocando redução na sua qualidade fisiológica e na capacidade de armazenamento, além de favorecer a entrada de patógenos (SANDRES et. al, 1991).

A utilização da radiação gama nos alimentos é feita para os mais diversos fins, tais como: tempo de vida útil, desinfecção de agentes inibidores de brotamento (germinação), inativação de organismos que os degradam entre outros.

Os efeitos da radiação são influenciados por diversos fatores. Entre eles, podem-se citar a dose de radiação (SANTOS, 1993), as condições de armazenamento depois da irradiação (BROCK e FRANKLIN,1996), o teor de água do material a ser submetido à irradiação (CONGER e CARABIA,1972) e o nível de oxigênio (BUMP et al., 1982).

A radiação gama pode afetar a germinação e o vigor, também pode ser utilizada no controle de microrganismos. Alguns estudos têm utilizado esta técnica para verificar a influência sobre a dose de radiação na eliminação da microbiótica fúngica.

Tendo em vista a influência desses fatores, a falta de trabalhos a respeito da viabilidade das sementes irradiadas com ^{60}Co , principalmente nas sementes de amendoim, estudou-se o efeito de diferentes doses de irradiação gama e seu efeito na germinação, vigor e micoflora de sementes de amendoim, cultivar BRS Havana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Germinação

A germinação de sementes é definida como sendo a emergência e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, manifestando sua capacidade para dar origem a uma planta normal, sob condições ambientais favoráveis (BRASIL, 1992). Portanto, a germinação é o resultado de uma série de acontecimentos metabólicos muito complexos que se sucedem, de forma escalonada, desde que começa a absorção de água por parte dos diferentes tecidos que formam a semente, até o crescimento inicial da radícula (GARCIA, 2006).

Para que ocorra o processo de germinação, determinadas condições devem ser satisfeitas, entre elas, a semente deve ser viável, as condições interna das sementes devem ser favoráveis à germinação, ou seja, deve ser livre de dormência, e as condições ambientais (água, temperatura, oxigênio e luz) devem ser favoráveis (MILLAN,1976).

Do ponto de vista fisiológico, a germinação compreende as fases de embebição de água, alongamento e divisão celular. Outros processos físico-bioquímicos também ocorrem durante a germinação, como aumento da respiração, hidratação, formação de enzimas, digestão enzimática, assimilação metabólica e crescimento da planta (POPINIGIS, 1977).

O teste de germinação tem como objetivo obter informações sobre o valor das sementes para fins de semeadura e fornecer dados que possam ser usados para comparar a qualidade de diferentes lotes de sementes. Nos testes de laboratório, a germinação de sementes corresponde à porcentagem de plântulas obtidas sob as condições e os limites de tempo especificados para espécie em questão (BRASIL,1992).

2.2 Vigor

O vigor é uma característica fisiológica da semente, determinada pelo genótipo e modificada pelo meio, que governa sua capacidade de originar uma plântula no solo, bem como de resistir a uma série de fatores ambientais. A influência do vigor da semente pode persistir durante todo o desenvolvimento da planta e pode afetar, inclusive, a produção (NAKAGAWA, 1987).

A definição do que seja vigor de semente foi um dos aspectos em que mais houve divergências, incluindo o próprio comitê de vigor e tecnologia de sementes do mundo todo, não se tendo chegado a um consenso até hoje, conforme definições dos órgãos abaixo:

ISTA: “Vigor de sementes é a soma daquelas propriedades que determinam o nível potencial de atividades e desempenho de uma semente ou de um lote de sementes durante a germinação e emergência da plântula” (ISTA, 1981).

AOSA: “Vigor de semente compreende aquelas propriedades que determinam o potencial para uma emergência rápida e uniforme de forma que o desenvolvimento de plântulas normais de condições ambientais (AOSA, 1983).

Segundo POPINIGIS (1977), o vigor da semente detecta as modificações mais sutis resultantes da deteriorização das sementes e tem sido estabelecido para definir atributos não revelados pelo teste de germinação.

A primeira contagem do teste de germinação é um dos testes relacionados com a capacidade das sementes em armazenamento e posterior desempenho no campo, que podem ser realizados em laboratório. Esta avaliação do vigor das sementes pode ser feita conjuntamente com o teste normal de germinação.

2.3 Micoflora

Sendo um dos principais obstáculos à produtividade, os fungos podem causar prejuízos consideráveis, quando o controle fitossanitário não é realizado ou é conduzido de maneira precária (SOUZA e REIS, 1981).

De acordo com MORAES (1987), cerca de 150 espécies fúngicas foram detectadas em sementes de amendoim, porém um pequeno número de gêneros também está envolvido com o processo de deteriorização das sementes dessa oleaginosas.

Segundo URBEN et al (1983) e MORAES e MARIOTO (1985), os fungos mais constantes em sementes de amendoim são: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus níger*, *Aspergillus glaucus*, *Rhizopus sp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium oxysparum*, *Fusarium sp.*, *Macrophomina phaseolina*, *Botrytis cinerea*, *Chaetomium sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phomopsis sp.* Entre estes, os que se destacam, pela frequência que ocorrem e pela sua ação sobre as sementes, prejudicando a germinação ou causando tombamento das plântulas após a germinação, são os do gênero *Aspergillus spp.*,

Penicillium spp., *Thisopuz sp.* e *Fusarium spp.*, além das espécies *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*.

ALMEIDA et al. (1997), em estudos com quatro variedades de sementes de amendoim, tipo “crioulas”, armazenadas e submetidas a dois tipos de tratamentos sanitários, verificou a ocorrência dos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp* e *Fusarium sp.* E verificaram, ainda, que houve diferença entre as variedades, o tratamento sanitário e o período de armazenamento, em relação aos fungos encontrados no estudo.

2.4 Radiação Gama

As radiações nucleares são emitidas principalmente nas formas de partículas alfa, partículas beta ou radiação gama. A radiação gama é gerada por um núcleo atômico, quando emite partículas alfa ou beta. Essa liberação é uma forma encontrada pelo núcleo para se "estabilizar", devido restar ainda energia em excesso no núcleo atômico com a emissão de partículas nucleares.

Na irradiação de alimentos, utiliza-se, principalmente como fonte de radiação gama, o isótopo ^{60}Co , obtido pelo bombeamento com nêutrons do metal Cobalto-59 em um reator nuclear. Outros tipos de radiações também podem ser aplicados, como os raios X e processo de elétrons acelerados, contudo, o Cobalto-60 é o mais utilizado comercialmente em todo mundo, por sua disponibilidade, por seu custo, e por apresentar-se na forma metálica e ser insolúvel em água, proporcionando, com isso, maior segurança ambiental (EHLERMANN, 1990).

A radiação gama, proveniente da fonte de ^{60}Co , é um tipo de onda eletromagnética de alta frequência e curto comprimento, motivo pelo qual tem alto poder de penetração.

A determinação das doses de radiação se faz em função da energia absorvida pelo produto irradiado. A unidade de medida utilizada é o Gray (Gy) ou quilogray (kGy); um Gray equivale a um Joule de energia por quilograma de alimento irradiado. Dependendo da dosagem das radiações ionizantes, às quais são submetidos aos alimentos, pode-se chamar o processo de esterelização.

A esterilização é o tratamento do alimento com uma dose de energia ionizante suficiente para prevenir a decomposição e a toxidez de origem microbiana, sejam quais

forem o tempo e as condições de armazenamento do produto, desde que este não seja contaminado novamente. As doses requeridas nesse processo geralmente estão entre 25 e 45 kGy (OMS, 1995; SANTIN, 1997).

A radiação γ tem sido utilizada em diversos trabalhos para avaliar o seu efeito na germinação e vigor das sementes, visando à verificação da dose de radiação que afeta o crescimento da planta. Através de alguns estudos, verificou-se que com o aumento da dose de radiação, há perda da germinação e do vigor das sementes (LUCKEY, 1980).

PRADO et al. (2005) utilizaram a radiação gama na destruição de aflatoxina B1 em amostras de amendoim artificialmente e naturalmente contaminadas; as doses de radiação até 10 kGy não foram suficientes para destruir a aflatoxina em amostras naturalmente contaminadas, enquanto as doses de 15, 20, 25 e 30 kGy . Portanto promoveram uma redução da contaminação de aflatoxina B1 de 49 até 72%. Indicando assim que a utilização de radiação gama não elimina totalmente a aflatoxina B1 até a dose de 30 kGy.

BARROS e ARTHUR (2005) utilizaram diferentes doses de radiação gama para determinar o grau de sensibilidade da soja a dose letal e a redução do crescimento e observaram que houve uma redução do crescimento na dose de 0,30 kGy.

FANARO et al. (2004) estudaram o efeito de diferentes doses de radiação (0 a 2,0 kGy) na germinação de sementes de girassol, e verificaram que doses abaixo de 1,5 kGy não alteram muito a germinação; já as doses acima de 1,5 kGy podem retardar o crescimento das plântulas em aproximadamente 42%.

CREDE et al. (2004) estudaram a influência da radiação ionizante na germinação de sementes de soja e milho; verificaram que as doses acima de 0,5 kGy interferem na germinação e que as sementes de milho são mais resistentes à radiação do que as sementes de soja.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento e origem das sementes

O trabalho foi desenvolvido na Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola (UAEA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). A irradiação das amostras de sementes foi feita no Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, em Recife, Pernambuco. Os ensaios para avaliação do vigor e da germinação foram conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia e Química da Embrapa Algodão, em Campina Grande, Paraíba.

As sementes utilizadas nestes experimentos foram da cultivar BRS Havana e foram produzidas na cidade de Mogeiro, na Paraíba, na safra 2006/2007. Utilizaram todas as recomendações para o cultivo, como adubação conforme análise de solo e controle de pragas e de doenças. As sementes foram armazenadas em casca até a sua utilização, no município de Patos, na Paraíba.

3.2 Tratamento das sementes com irradiação de ^{60}Co

As irradiações das sementes de amendoim, cultivar BRS Havana, para controle da micoflora, foram feitas em um irradiador que emite raios gama a partir de ^{60}Co . As amostras de 300 g de sementes, com teor de umidade de 6,8% correspondentes a cada parcela experimental, foram acondicionadas em sacos de polietileno transparente antes de serem colocadas no irradiador, para evitar a contaminação das sementes após a irradiação por exposição ao ambiente. As doses de radiação gama utilizadas foram 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 6; 9; 12; 15; 18; 21 e 24 kGy. Depois da radiação, as sementes foram transportadas em suas embalagens lacradas para o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Algodão, onde foram realizados os testes de vigor, germinação e determinação da micoflora. Antes e após o tratamento com radiação, determinou-se a umidade das sementes por meio de um equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

3.3 Teste de vigor e germinação

Para avaliar a germinação, foram utilizadas cinco repetições de 50 sementes para cada tratamento. O substrato utilizado foi papel germitest, com duas folhas de papel na base e uma na cobertura, as quais foram umedecidas com água destilada esterilizada, enroladas e, posteriormente, colocadas em recipientes plásticos em BOD, sob temperatura constante de 28° C, de acordo com a regras para análise de sementes. (BRASIL, 1992).

A percentagem de germinação foi determinada somando-se as sementes que germinaram na primeira contagem, realizada no quinto dia após a semeadura, com as sementes que germinaram na segunda contagem, efetuada no décimo dia. As contagens e a apreciação das plântulas seguiram as prescrições oficiais para análise de sementes (BRASIL, 1992).

O teste de vigor foi realizado simultaneamente com o teste de germinação, através do teste indireto da primeira contagem da germinação, conforme descrito por VIEIRA e CARVALHO (1994).

3.4 Avaliação da micoflora

Na avaliação da micoflora associada às sementes irradiadas empregou-se o método do papel de filtro umedecido (*blotter test*). Neste teste, utilizaram-se 50 sementes (cinco repetições de 10 unidades) para cada tratamento. As sementes, em número de dez, foram distribuídas no interior de placas de Petri de 15 cm de diâmetro, sobre uma camada constituída por três folhas de papel de filtro previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada e esterilizada, e incubadas em BOD com temperatura de 24 ± 2 °C e fotoperíodo de doze horas de luz, durante sete dias. Na identificação e contagem dos fungos, examinaram-se as sementes individualmente ao microscópio estereoscópico, após sete dias de incubação. Em alguns casos, a identificação foi confirmada pela visualização das estruturas morfológicas dos fungos ao microscópio óptico.

3.5 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos de germinação e vigor foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições e sete tratamentos, correspondentes às seguintes doses de radiação, em kGy: $T_1 = 0,0$; $T_2 = 0,5$; $T_3 = 1,5$; $T_4 = 3,0$; $T_5 = 6,0$; $T_6 = 12,0$; $T_7 = 24,0$.

O programa estatístico utilizado foi o SAS (SAS/STAT, 2000). Os dados obtidos foram submetidos ao teste F e, por se tratar de uma variável quantitativa (doses), utilizou-se análise de regressão, de acordo com recomendações de SANTOS et al.(2007).

Para avaliação da micoflora, foram testadas 14 de doses de irradiações ($T_1 = 0,0$; $T_2 = 0,5$; $T_3 = 1,0$; $T_4 = 1,5$; $T_5 = 2,0$; $T_6 = 2,5$; $T_7 = 3,0$; $T_8 = 6,0$; $T_9 = 9,0$; $T_{10} = 12,0$; $T_{11} = 15,0$; $T_{12} = 18,0$; $T_{13} = 21,0$; $T_{14} = 24$ kGy) dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições. Os resultados obtidos foram analisados conforme estatística descritiva da porcentagem de contaminação de cada fungo identificado, em função das doses de radiação.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Vigor e Germinação

Determinou-se nas amostras, antes e após o processo de radiação, a umidade das sementes. Antes de serem irradiadas a umidade média das sementes foi de 6,8% e após o processo, foi de 6,97%, indicando, assim, que o processo de irradiação das amostras não altera a umidade das sementes.

Na Tabela 1, encontra-se o resumo da análise de regressão na análise de variância, representado pelos quadrados médios da germinação e do vigor das sementes de amendoim irradiadas com ^{60}Co .

Os resultados das avaliações de vigor e germinação foram significativos para regressão linear e quadrática com o coeficiente de determinação (R^2) superior a 98%. Pela tabela 1, não houve efeito significativo para as demais regressões testadas (3° e 4° graus). Os tratamentos 12,0 e 24,0 kGy não foram incluídos nesta análise, por terem apresentado resultado zero isto é, as sementes de amendoim não germinaram a partir da dose de 12 kGy; por apresentam média e variância igual a zero e influenciado diretamente a homogeneidade das variâncias dos tratamentos, sendo recomendada a sua omissão da análise de variância (COCHRAN, 1947).

Tabela 1: Resumo da análise de regressão para a germinação e vigor, das amostras de amendoim BRS Havana irradiadas.

F. V.	G.L.	Quadrados Médios		Coeficiente Determinação (R^2)	
		Vigor	Germinação	Vigor	Germinação
Reg. Linear	1	11356,90**	11222,5**	0,952145	0,961319
Reg. Quadrática	1	700,07*	617,78*	0,977974	0,985745
Reg. Cúbica	1	240,10 ^{ns}	160,00 ^{ns}		
Reg. 4° grau	1	4,13 ^{ns}	6,91 ^{ns}		
Tratamentos	4	3075,30	3001,80**		
Resíduo	15	87,80	93,87		
C.V. (%)		23,02	19,45		

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; * significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ns não significativo.

Para estimar a viabilidade (germinação e vigor) das diferentes doses de irradiação elegeu-se a equação de regressão que melhor representa as doses, compreendendo a significância do teste “F” e o coeficiente de determinação (R^2); a representação gráfica de cada variável com a respectiva equação encontra-se nas Figuras 1 e 2.

Os resultados apresentados nas Figuras 1 e 2 tornam evidente o efeito das doses de irradiação gama sobre a viabilidade das sementes de amendoim, evidenciando efeito prejudicial, uma vez que à medida que se elevou a dose de radiação, diminuiu-se a viabilidade das sementes, revelada pela porcentagem de germinação e pela sua primeira contagem (vigor).

Conforme observa-se nestas figuras, que as porcentagens de germinação e de vigor das sementes não radiadas foram 74,5% e 65% respectivamente; a perda de viabilidade aumentou com a dose de radiação e, também, apresentaram semelhança de comportamento dos testes de viabilidade. A perda da germinação e do vigor deve-se à radiosensibilidade do eixo embrionário; a diferença entre os resultados dos testes foi provocada pelo rigor do teste de vigor em relação ao de germinação.

Observa-se, ainda, mediante estas figuras, uma forte diminuição da viabilidade das sementes irradiadas a partir da dose de 3,0 kGy, em que a porcentagem do vigor sofreu redução em 66% e a da germinação, em 55,7% em relação à dose de 0 kGy (testemunha).

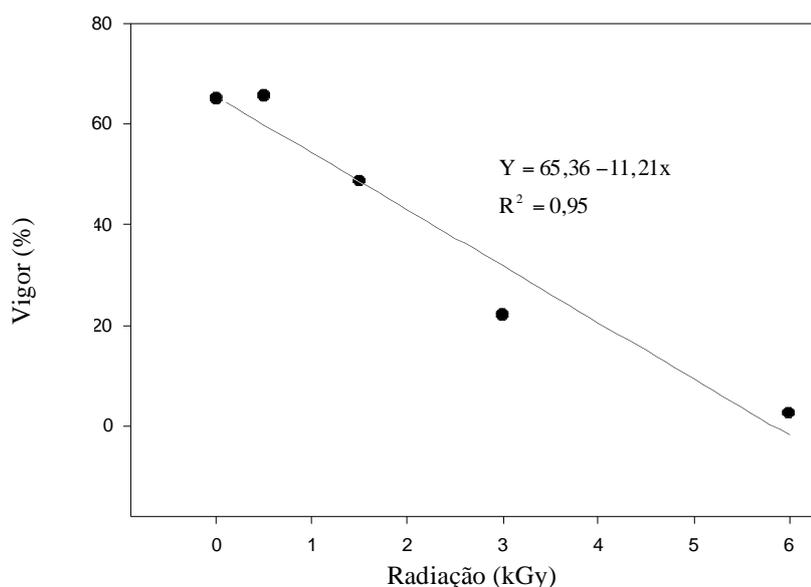


Figura 1: Representação gráfica da porcentagem da 1ª contagem de germinação (vigor) em relação às diferentes doses de radiação.

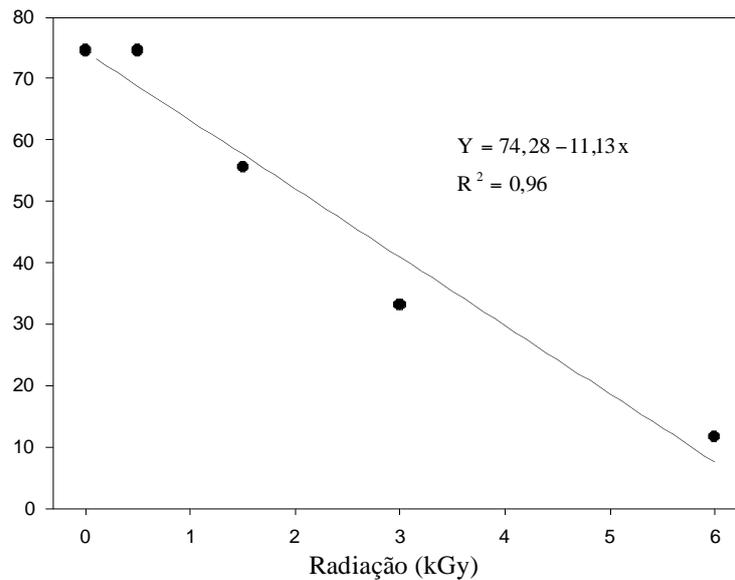


Figura 2: Representação gráfica da porcentagem de germinação em relação às diferentes doses de radiação.

As equações de regressão das Figuras 1 e 2 são importantes por poderem informar o comportamento dos pontos intermediários entre os obtidos experimentalmente relativos às doses de 0 a 3,0 kGy. Estudo sobre o tema revela que baixas doses de radiação apresentam a capacidade de estimular os bio-sistemas, invertendo o efeito com o aumento da dose (LUCKEY,1980). Esta teoria denominada Hormese, ainda não é muito bem compreendida e é muito questionada; o que poderia explicar a mesma porcentagem de germinação e vigor, na testemunha com uma redução desses valores de germinação e vigor em função do aumento da dose de radiação.

Estes resultados são concodantes, em parte, com o princípio de Alara de proteção radiológica (Internacional Commission on Radiológica Protetion, 1990), que considera prejudicial qualquer dose de radiação aos organismos. O mesmo autor relata que com soja, trigo e milho, foram obtidos bons resultados de produtividade com as sementes destes produtos irradiados, usando baixas doses antes da semeadura.

Tornou-se claro, neste estudo, que doses acima de 3,0 kGy, são altamente prejudiciais à viabilidade das sementes de amendoim. O resultado deste experimento está de acordo com outras pesquisas, envolvendo a germinação desementes de outras espécies, como as de milho, soja e girassol, estudadas por CREDE et al. (2004), FANARO et al. (2004), BARROS e ARTHUR (2005). Em ambos os experimentos, o uso da radiação foi prejudicial a germinação.

4.2 Micoflora

De acordo com os exames realizados sob microscópio estereoscópico, os fungos que se desenvolveram sobre as sementes de amendoim irradiadas pertenciam ao gênero *Aspergillus flavus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spp.* (Figuras 3, 4 5 e 6). Devido à ocorrência simultânea desses fungos e a maneira com o micélio se desenvolveu, adotou-se a forma gráfica para representar o percentual de sementes infestadas.

A porcentagem de contaminação por *A. flavus* diminuiu com o aumento da dose de irradiação (Figura 3). Este fungo não foi identificado nas doses de 2,5; 3,0; 15,0 e 21,0 kGy e nas doses de 6,0; 9,0; 12,0; 18,0 e 24,0 kGy, a contaminação foi menor que 1%.

A contaminação por *A. glaucus* foi maior nas doses de 0,5 e 15 kGy, 10% (Figura 4). Nas amostras que receberam 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 e 18,0 kGy a porcentagem de contaminação foi menor que 3,5%.

A contaminação por *A. niger* diminuiu com o aumento da dose de irradiação aplicada (Figura 5). As doses 0; 0,5 e 1,0 kGy foram as que apresentaram a maior contaminação, em média 20%.

A contaminação por *Penicillium sp* foi diferente da observada para os demais fungos identificados (Figura 6). Na testemunha (sem radiação), 60% das sementes estavam contaminadas por *Penicillium sp*. À medida que a dose de radiação foi aumentando, a porcentagem de contaminação foi diminuindo, chegando a 32,5% na dose 24 kGy. Ou seja, não foi possível eliminar este fungo nem com a maior dosagem de radiação utilizada.

PRADO et al. (2006), testaram o efeito de diferentes níveis de radiação sobre a porcentagem fúngica de amendoim *in natura*, com e sem o processo de desinfecção dos grãos, em função do tempo de armazenamento; tendo observado que a radiação gama, em doses acima de 10 kGy, foi capaz de eliminar a contaminação fúngica do amendoim em grãos armazenados por 6 meses, em temperatura ambiente, independentemente do processo de desinfecção.

Entretanto, mais estudos são necessários para se encontrar um equilíbrio entre as doses eficazes para o controle da microbiota fúngica e a utilização destas sementes para a germinação.

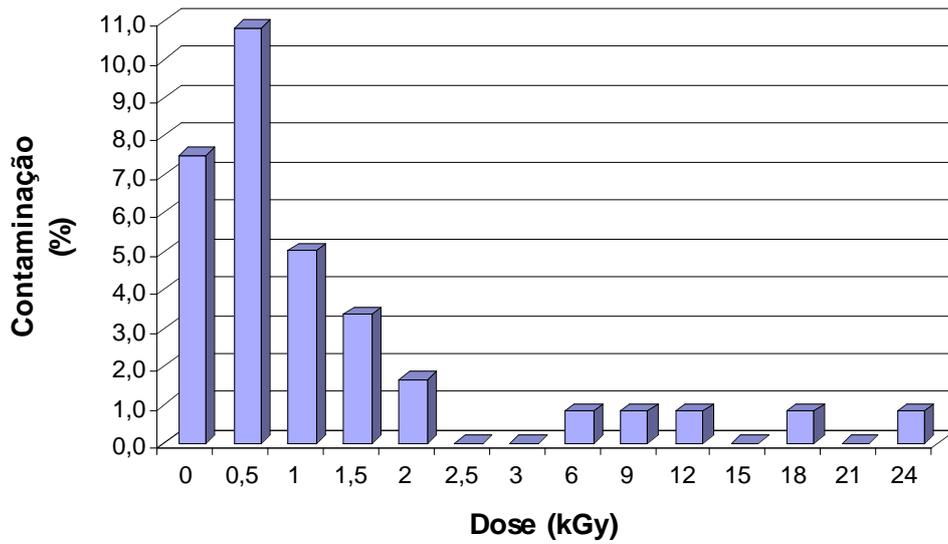


Figura 3: Representação gráfica da porcentagem de *A. flavus* em diferentes doses de radiação gama.

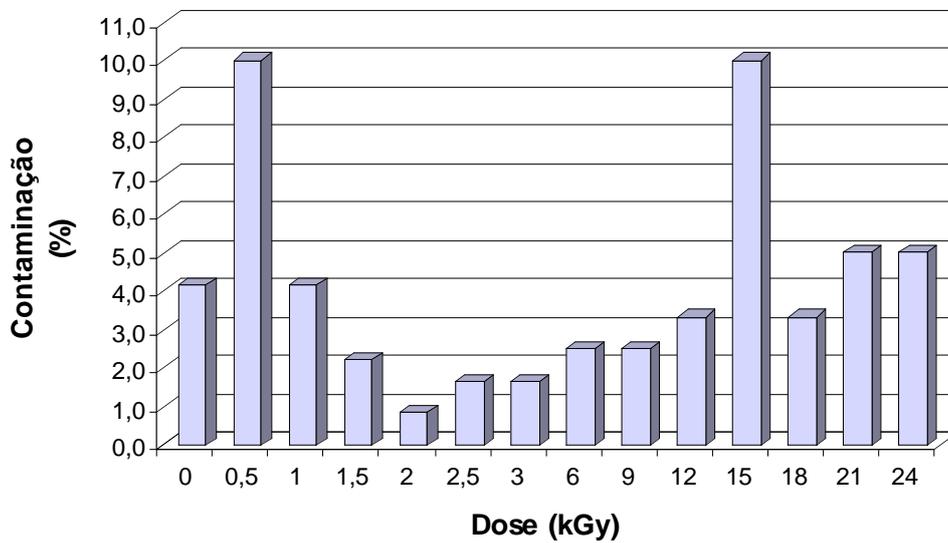


Figura 4: Representação gráfica da porcentagem de *A. glaucus* em diferentes doses de radiação gama.

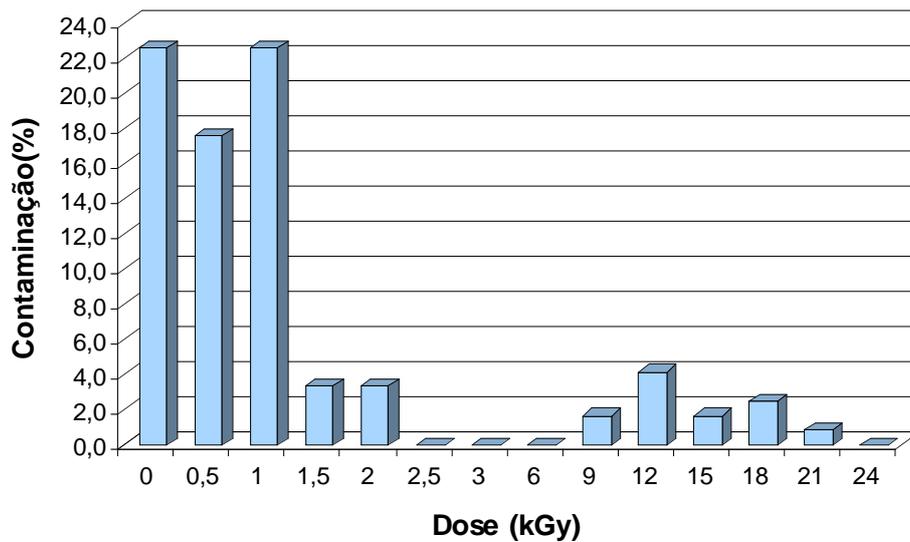


Figura 5: Representação gráfica da porcentagem de *A. niger* em diferentes doses de radiação gama.

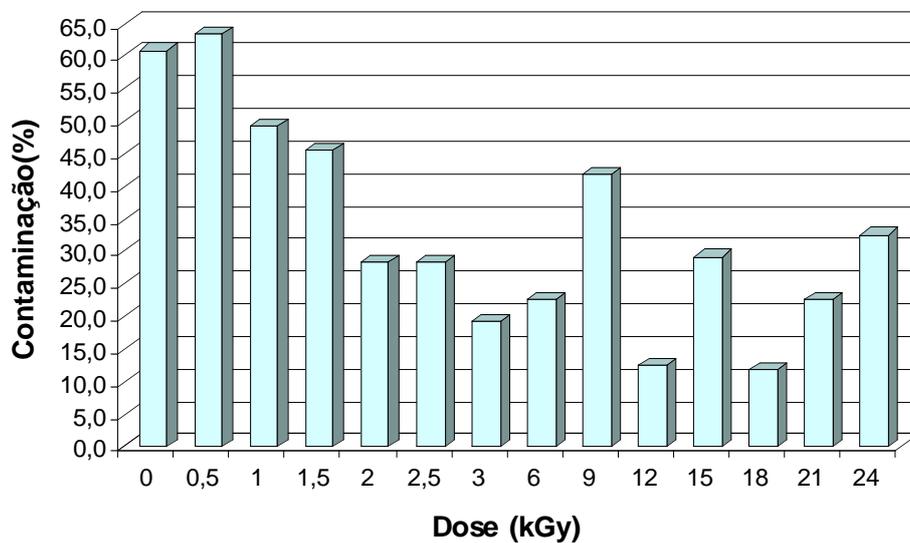


Figura 6: Representação gráfica da porcentagem de *Penicillium sp.* em diferentes doses de radiação gama.

5. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, estabeleceram-se as seguintes conclusões:

- O tratamento com radiação gama afetou negativamente o vigor e a germinação das sementes de amendoim;
- As doses de 0,5 e 1,5 resultaram em redução da germinação e do vigor acima de 50%;
- A dose de 3 kGy inviabiliza a utilização das sementes para o plantio;
- Doses acima de 12 kGy comprometem totalmente o vigor e a germinação das sementes;
- O tratamento com radiação gama afetou negativamente a contaminação por fungos em sementes de amendoim;
- Os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* foram eliminados a partir da dose 2,0 kGy;
- *Aspergillus glaucus* foi eliminado a partir da dose 3,0 kGy;
- *Penicillium sp.* permaneceu em mais de 30% das sementes em todos os tratamentos com radiação, não sendo eliminado nem com a dose de 24 kGy.

6. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, F. A. C.; GURJÃO, K. C. O.; SANTOS, R. C.; QUEIROGA, V. P. Qualidade fisiológica e substâncias de reservas em sementes de amendoim produzidas no semi-árido nordestino. *Revista de Oleaginosas e Fibrosas*, Areia - PB, v. 1, n. 1, 1997.

AOSA – Association of Official Seed Analysts. *Seed vigour testing handbook*. 1983, 93p. (Contribution, 32).

BARROS, A. C. de; ARTHUR, V. Determinação experimental da dose de redução do crescimento (GR_{50}) e da dose letal (LD_{50}) de soja irradiada por raios gama. *Arq. Instituto de Biologia*. São Paulo v. 72, n. 2, p.249-253, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura. *Regras para análise de sementes*. Brasília, 1992. 188p.

BROCK, R.D.; FRANKLIN, I.R. The effect of desiccation, storage and radiation intensity on mutation rate in tomato pollen. *Radiation Botany*, Great Britain, n.6, p.171-179, 1996.

BUMP, E.A.; YU, N.Y.; BROWN, J.M. Radiosensitization of hypoxic tumor cells by depletion of intracellular glutathione. *Science*, Washington, n.217, p.544-545, 1982.

COCHRAN, W.G. Some consequences when the assumptions for the analysis of variance are not satisfied. *Biometrics*, v.3, p.22-38. 1947.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. *Previsão de Safra 2007/2008*. São Paulo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acessado em 19 de agosto de 2008.

CONGER, B.V. e CARABIA, J.V. Modification of the effectiveness of fission neutrons versus ^{60}Co gamma radiation in barley seeds by oxygen and seed water content. *Radiation Botany*, Great Britain, n.12, p.411-420, 1972.

EHLERMANN, D.A.E. Food Irradiation. In: SPIESS, W.E.L.; SCHUBERT, H. (Ed). *Engineering and food: Preservation processes and related techniques*. London: Elsevire Applied Sciense, 1990. v.2, p. 760-773.

FANARO, G. B.; BALDASSO, J. G.; CREDE, R. G.; CLAUDIO, T. B.; SABUNDJIAN, I. T.; GUEDES, R. L.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Teste de germinação em sementes de girassol (*Helianthus annus L.*) irradiadas. *Arq. Instituto de Biologia.São Paulo*, v.71 (supl), p-178-180. 2004.

GARCIA, F. P.; Germinación, vaibilidad, longevidad y vigor de semillas. In: ALMEIDA, F. A. C.; DUARTE, M. E. M.; CAVALCANTI MATA, M. E. R. M. (Ed.). *Tecnologia de armazenagem em sementes*. Campina Grande, UFCG. 2006. p. 47 – 95.

ICRP - International Commission on Radiological Protection (ICRP-60). Oxford: Pergamon Press, 1990. 201p. Princípio da otimização, p.28.

ISTA – International Seed Testing Association. *Handbook of vigour test methods*. Zurich, Switzerland, ISTA, 1981. 72p.

LUCKEY, T. D. *Hormesis with ionizing radiation*. Flórida: CRC Press, 1980.

MILLAN, A. J. Herança da velocidade de germinação e tolerância à salinidade na variedade de milho (*Zea mays L.*) “Piranão”. Viçosa: UFV. 1976, 63p. Dissertação de Mestrado.

MORAES, S. A. Testes de sanidades de sementes de amendoim. IN: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V. da cords. *Patologia de Sementes*. Campinas: Fundação Cargill, 1987, p. 347-357.

MORAES, S. A.; MARIOTTO, P.R. Diagnóstico da patologia de sementes de amendoim no Brasil. Revista Brasileira de Sementes, v.7, n.1, p. 41-44. 1985

NAKAGAWA, J. Qualidade da semente. Produção de semente. Curso por tutoria a distancia. ABEAS, 1987, módulo 2, p.20-21.

OMS - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Inocuidad e idoneidad nutricional de los alimentos irradiados. Genebra, 1995. 172p.

POPINIGIS, F. Preservação da qualidade fisiológica da semente durante o armazenamento. In: seminário nacional de armazenagem, 2, Anais, Brasília, 1977.

SANDERS, T. H.; HILL, R. A.; COLE, R. J.;BLANKENSHIP, P. D. Effect of drought on occurrence of *Aspergillus flavus* in maturing peanuts. Journal of the American Oil Chemistry Society, Champaign, v. 58,p. 966-970, 1981.

PRADO, G., CARVALHO, E. P., OLIVEIRA, M. S., GAZZINELLI, J. E. C. M., MORAES, V. D., CORRÊA, R. F., CARDOSO, V. N., SOARES, T. V. Influência da radiação gama (^{60}Co) na destruição de aflatoxina B1 em amendoim (*Arachis hypogaea* L). Revista do Instituto Adolf Lutz, v.64, n. 2, p.186 – 192, 2005.

PRADO, G.; CARVALHO, E.P de; MADEIRA, J. E. G. C.; MORAIS, V. A D.; OLIVEIRA, M. S.; CORRÊA, R. F.; CARDOSO, V. N. Efeito da irradiação gama (^{60}Co) na frequência fúngica de amendoim *in natura* em função do tempo de prateleira. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.30, n.5, p.930-93,. 2006.

SATIN, M. La irradiación de los alimentos. Zaragoza: Acribia. 1997. 175 p.

SANTOS, J. W.; ALMEIDA, F. A. C.; BELTRÃO, N. E.; CAVALCANTI, F. B. Estatística Experimental aplicada . 2. ed. Campina Grande: Embrapa Algodão / UFCG. 2007.

SANTOS, M.V.F.D.L. Resposta à radiação gama em sementes de milho (*Zea mays* L.) sob a influência de agentes físicos e químicos. Viçosa, 1993. 131p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - UFV, 1993.

SAS/STAT User's Guide. In: SAS INSTITUTE. SAS Onlinedoc: Version 8.2, Cary, 2000.

SOUZA, J. C.; REIS, P.R. Reconhecimento e controle das pragas do amendoim. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 1981, v.7, n.82, p.67-71.

URBEN, A. F.; WETZEL, M. M. V. S.; VALLS, J. F. M.; Ocorrência de fungos em germoplasma/ sementes do gênero *Arachis*. In: 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES. Campinas. 1983. 91 p.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. Teste de vigor em sementes. FUMEP, 1994, 164p.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

Contaminação por aflatoxinas em amostras de amendoim de diferentes tamanhos inoculadas artificialmente

RESUMO

SANTOS, T. S. CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINAS EM AMOSTRAS DE AMENDOIM DE DIFERENTES TAMANHOS INOCULADAS ARTIFICIALMENTE. In: _____. **RESPOSTA DE SEMENTES DE AMENDOIM A DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO GAMA E CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINAS APÓS INOCULAÇÃO ARTIFICIAL COM *Aspergillus parasiticus***, 2008, Cap. 2, p. 24 – 51. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola – área de concentração de Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande – PB.

A variabilidade da contaminação por aflatoxinas em amostras obtidas em lotes comerciais de amendoim tem sido um tema muito investigado, visando determinar planos de amostragem adequados. No entanto, a variabilidade observada em trabalhos experimentais tem dificultado a avaliação dos tratamentos, em função da distribuição heterogênea da contaminação. Este trabalho investigou a influência de diferentes tamanhos de amostras, retiradas de um pequeno lote de amendoim descascado e inoculado artificialmente com *Aspergillus parasiticus*, na variância, desvio padrão e coeficiente de variação relativos à contaminação por aflatoxinas. Um lote de amendoim com 4,7 kg foi irradiado na dose 25 kGy e inoculado artificialmente com *Aspergillus parasiticus* utilizando inóculo em pó. A incubação foi feita em sete dessecadores, contendo 800g de sementes cada um e solução salina saturada de nitrato de potássio (93,58% UR) na temperatura de 30°C, durante 21 dias. A umidade de equilíbrio da semente foi 12,9% b.s. A média geral de contaminação foi 37,73 µg/kg, desvio padrão 99,20µg/kg e coeficiente de variação 262,97%. A contaminação do amendoim por aflatoxina B1 variou com o tamanho das amostras. o tamanho da amostra, diminuiu o valor do coeficiente de variação a partir da amostras de 300g. Portanto, observou-se uma tendência de redução do desvio padrão com o aumento do tamanho da amostra.

Palavras-chave: *Aspergillus*, variabilidade e micotoxinas.

Contamination by Aflatoxins in peanut samples of different sizes artificially inoculated

Abstract

The variability of contamination by aflatoxins in samples obtained in peanut commercial lots have been a very investigated theme, to determine adequate sample plans. However, the observed variability in experimental works have difficult the treatments evaluation, because the heterogeneous distribution of contamination. This study has investigated the influence of different sample sizes, taken from a small peeled peanut lot and artificially inoculated with *Aspergillus parasiticus*, in variance, standard deviation, and coefficient of relative variation to contamination by aflatoxins. A peanut lot with 4,7 kg was irradiated in the dose of 25,0 kGy and artificially inoculated with *Aspergillus parasiticus* using powder inoculum. The incubation was done in seven dessecators, containing 800 g of seeds each one in saturated saline solution of potassium nitrate (93,58 % RU) in the temperature of 30 C, during 21 days. The humidity of seed balance was 12,9 % b.s. The general media of contamination was 37,73 ug/kg, standard deviation 99,20 ug/kg and coefficient of variation 262,97%. The peanut contamination by aflatoxin B1 ranged with the sample sizes. When increased the sample size, decreased the value of the variation coefficient from samples of 300 g. Therefore, it was observed a reduction tendency of the standard deviation with the increase of the sample sizes.

Key words: *Aspergillus*, variability and micotoxins.

1. INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma cultura agrícola única, cuja fertilização ocorre no ambiente aéreo e frutificação, no subterrâneo pois, pelo alongamento do ginóforo, o embrião é empurrado em direção ao solo, onde a vagem completa o seu desenvolvimento (NOGUEIRA & TÁVORA, 2005).

A infecção dos futos por fungos toxicogênicos pode ocorrer por vias sistêmicas, através da flor, ou, diretamente, via parede dos frutos, sendo esta última, a mais importante (DHINGRA & COELHO NETTO, 1998). As micotoxinas são metabólitos secundários de alguns fungos, liberados ou não nos substratos nos quais eles crescem. Muitas delas apresentam efeitos tóxicos e degenerativos ao consumidor, sendo nefrotóxicas e possivelmente carcinogênicas e teratogênicas. Dentre as micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas são as mais importantes encontradas no amendoim (DHINGRA & COELHO NETTO, 1998).

O termo aflatoxinas é utilizado para denominar um grupo de substâncias tóxicas produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que se desenvolvem sobre muitos produtos agrícolas e alimentos, quando as condições de umidade do produto, umidade relativa do ar e temperatura ambiente são favoráveis (CAST, 2003).

Altos níveis de contaminação ocorrem quando o amendoim é produzido sob déficit hídrico no período que antecede a colheita e também quando armazenado sob condições inadequadas, de umidade e temperatura, proporcionando, assim, condições favoráveis para o desenvolvimento de *Aspergillus* nos grãos e, em consequência, a contaminação por aflatoxinas (DHINGRA & COELHO NETTO, 1998).

A contaminação de um determinado lote de amendoim por aflatoxinas ocorre de maneira muito heterogênea, ou seja, apenas uma pequena porcentagem dos grãos pode estar contaminada e a contaminação destes poucos grãos pode ser elevada (WHITAKER & WISER, 1969). Por este motivo, a contaminação detectada em diferentes amostras retiradas de lotes contaminados é muito variável e esta variação depende do tamanho da amostra avaliada e do valor médio da contaminação do lote (WHITAKER & WISER, 1997, WHITAKER et al., 1994a).

A variância associada aos resultados obtidos a partir de amostras de maior tamanho é menor do que a obtida com amostras menores. Quanto maior o valor médio da contaminação do lote, maior a variância e menor o coeficiente de variação (CV). Em

consequência, a amostragem para determinar a contaminação por aflatoxinas de lotes de amendoim em casca ou descascado é mais complexa do que a utilizada para determinar outras características, como umidade dos grãos e rendimento, entre outras (WHITAKER & DOWELL,1995; WHITAKER et al., 1994b;FAO 1993).

A distribuição da contaminação por aflatoxinas em amendoim tem sido investigada em lotes de maior porte, refletindo a preocupação de amostrar e determinar o nível de aflatoxinas produtos nos comercializados e consumo. No entanto, a distribuição da contaminação em lotes menores, como as parcelas experimentais, tem sido pouco estudada. Esta é uma fonte de variação muito expressiva, em função da desuniformidade da contaminação, que pode comprometer a correta avaliação dos tratamentos. É muito comum a ocorrência de coeficientes de variação (CV) altos na avaliação de dados experimentais, quando a contaminação por aflatoxinas é a característica avaliada. Por outro lado, é importante pesquisar e comprovar o efeito de tratamentos e práticas agrícolas que previnam esta contaminação.

O tamanho da amostra e o grau de contaminação são fatores que influenciam a variância, quando são feitas amostragens em grandes lotes. No entanto, não se sabe qual o efeito da amostragem na determinação da contaminação por aflatoxinas em trabalhos experimentais. O tamanho das parcelas, utilizado para avaliar a contaminação por aflatoxinas em função de diversos tratamentos, tem sido determinado sem considerar a variação intrínseca desta variável (MEHAN et al., 1986; PRADO et al., 1996). WHITAKER et al., (2004) estudaram a variabilidade em amostras de amendoim obtidas de parcelas experimentais no campo, de diferentes tamanhos, cultivadas sob déficit hídrico, tendo verificado que o desvio padrão associado aos diferentes tamanhos de parcela testados foi reduzido consideravelmente ao se aumentar o tamanho da parcela até o comprimento de 6 m.

Este trabalho investigou a influência de diferentes tamanhos de amostras, obtidas de um pequeno lote de amendoim descascado e inoculado artificialmente com *Aspergillus parasiticus*, sobre variância, desvio padrão e coeficiente de variação relativos à contaminação por aflatoxinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura do amendoim

2.1.1 Botânica

O amendoim cultivado, *Arachis hypogaea* L., pertence à família Leguminosae, subfamília Faboideae, gênero *Arachis*, seção *Axonomorphae* e série Amphiploide. É subdividida em duas espécies, *Arachis hypogaea* L. subespécie *hypogaea* cujos genótipos pertencem ao grupo Virgínia e *Arachis hypogaea*, subespécie *fastigiata* cujos genótipos pertencem ao grupo Valência ou Spanish (KRAPOVICKAS & GREGORY, 1994).

A planta do amendoim é herbácea, ereta ou prostada, anual, com ciclo de 90 a 160 dias, com altura da haste principal entre 50 e 60 cm. Apresenta raízes pivotantes e laterais (NOGUEIRA & TÁVORA, 2005). A floração do amendoim tem início entre 20 e 35 dias após a sementeira, período que se estende da quarta à décima segunda semana e sua duração varia com o tipo de cultivar e as condições ambientais.

Na base do ovário desenvolve-se uma região meristemática, após a fertilização, semelhante a uma haste, denominada ginóforo. Tal estrutura é dotada de geotropismo positivo e conduz o ovário para o interior do solo, onde a vagem é desenvolvida (ARAÚJO, 1986).

2.1.2 Importância Econômica

O amendoim é uma das mais importantes oleaginosas, sendo a quarta mais produzida, perdendo apenas para a soja, o algodão e a canola. Participa com 10% da produção mundial de óleo comestível, com uma produção em torno de 23,5 milhões de toneladas/ano, sendo os principais produtores a Índia, a China e os Estados Unidos. Atualmente, a produção nacional é de aproximadamente de 305,0 mil toneladas/ano e o estado de São Paulo é o principal produtor (CONAB, 2008).

A importância econômica do amendoim está baseada no seu valor protéico e no alto teor de óleo encontrado em suas sementes. Cerca de 90% da produção mundial do amendoim é utilizada na fabricação de óleo, originando um subproduto denominado torta de amendoim, utilizado na alimentação de animais domésticos bovinos, suínos, caprinos, entre outros (ARAÚJO, 1986; PUZZI, 2000).

2.2 Micotoxinas

2.2.1 Aspectos Gerais

As micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por algumas espécies de fungos, principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Muitas delas provocam efeitos tóxicos e degenerativos ao consumidor, sendo nefrotóxicas e, possivelmente, carcinogênicas e teratogênicas (DHINGRA & COELHO NETO, 1998).

A produção de micotoxinas depende de uma série de fatores, incluindo a suscetibilidade do substrato à colonização do fungo produtor; fatores físicos como temperatura do ambiente, umidade do substrato, umidade relativa do ar durante o armazenamento, aeração, danos mecânicos e tempo de armazenamento; fatores biológicos como capacidade genética do fungo em produzir micotoxinas, quantidade de esporos viáveis, interação entre diferentes fungos existentes no mesmo substrato e entre as micotoxinas produzidas, bem como presença de insetos.

Aflatoxinas é um termo coletivo para um grupo de toxinas produzidas por cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que apresentam comportamento ecológico e biológico bem distintos, durante o seu desenvolvimento em um substrato favorável à sua produção. *A. parasiticus* é bem adaptado ao ambiente terrestre e produz aflatoxinas dos tipos B e G, enquanto *A. flavus* é mais adaptado ao ambiente aéreo e produz aflatoxinas do tipo B (DHINGRA & COELHO NETTO, 1998). A principal diferença entre as duas principais formas de aflatoxinas, B e G, está na toxidez de cada uma, sendo a aflatoxina B₁ a mais tóxica e a mais comum (DHINGRA & COELHO NETO, 1998). Apesar do comportamento ecológico distinto, *A. flavus* e *A. parasiticus* desenvolvem-se em grãos com umidade alta (10,5%), umidade relativa superior a 85% e temperatura ambiente próxima a 30°C (CAST, 2003; FREIRE, et al., 2005).

2.2.2 Contaminação do amendoim por aflatoxinas

O primeiro relato de contaminação por aflatoxinas ocorreu em 1960, quando houve grande mortalidade de perus, aproximadamente 100.000, na Inglaterra, que apresentaram sintomas típicos de ingurgitamento e congestão renal com hemorragia ou necrose do

fígado. Verificou-se que o fator comum era a ingestão de rações, contendo farelo de amendoim de procedência brasileira (FONSECA, 1999). No Brasil, os primeiros estudos foram realizados em 1961, com relatos de toxidez em farelos de amendoim utilizada na alimentação de suínos e comprovada em testes com cobaias. Desde então os efeitos das aflatoxinas na saúde animal foram estudados também na criação de aves e bovinos (FONSECA, 1999).

O efeito que as aflatoxinas podem causar no organismo depende da dose e da frequência com que ela é ingerida. Sabe-se que as aflatoxinas podem provocar cirrose, necrose do fígado, proliferação dos canais biliares, síndrome de Reye, hemorragia nos rins e sérias lesões na pele. Há também o risco de desenvolvimento do câncer primário no fígado (CAST, 2003). Além do amendoim, outros produtos apresentam alto risco de contaminação por aflatoxinas, como milho, sementes de algodão, castanha-do-brasil, pistaches, pimenta e figo (CAST, 2003).

Em função dos danos que podem causar à saúde humana e animal, a contaminação por aflatoxinas em amendoim para consumo e comercialização deve ser determinada e, se for superior ao limite tolerado, o produto é considerado impróprio para o consumo. No Brasil, as aflatoxinas são as únicas toxinas regulamentadas pelo Ministério da Saúde, o qual determina que, para consumo humano, o amendoim pode apresentar no máximo 20 ppb para o somatório de B1, B2, G1 e G2 (BRASIL, 2002).

Prado et al. (1996) estudaram a resistência de dois genótipos de amendoim inoculados artificialmente com *A flavus*, e constataram diferenças na contaminação média entre os genótipos (41836 e 144032 ppb). Neste estudo, o preparo do inóculo foi feito em água e a concentração de conídios foi ajustada para 10^3 esporos/mL. Estes autores também determinaram que a produção de aflatoxinas foi maior no 14º dia de incubação e que houve diminuição do crescimento fúngico nestes genótipos.

Prado et al. (1999), avaliaram a resistência de quatro genótipos de amendoim (Tatu Vermelho, VRR-245, 2117 e 2155) à produção de aflatoxina B1 por *A flavus* inoculado artificialmente (inoculação com água e a concentração de conídios ajustada para 10^3 esporos/mL), com dois tratamentos de sementes (autoclavadas e *in natura*). Houve diferença significativa entre os genótipos, tendo ocorrido no genótipo 2117, os menores valores de contaminação, independente do tratamento utilizado nas sementes.

2.3. Condições ambientais para o desenvolvimento do *Aspergillus*

Os produtos agrícolas têm a capacidade de absorver ou perder água para o ambiente, até atingir um equilíbrio entre o teor de umidade dos grãos e o ambiente. A umidade de equilíbrio é alcançada quando a pressão de vapor de água do produto é igual à pressão de vapor do ambiente. Esta relação entre teor de umidade do produto e a umidade relativa do ar, a uma dada temperatura, pode ser expressa por um modelo matemático, denominado isotermas de sorção (adsorção ou dessorção).

As isotermas de sorção de umidade constituem parte essencial da teoria de secagem e fornecem informações úteis para o desenho de equipamentos de secagem e para o estudo de armazenamento de produtos .

CORRÊA et al. (2007) testaram alguns modelos matemáticos para estimar a umidade de equilíbrio do amendoim em vagem, dos grãos e das cascas, separadamente. Eles verificaram que há uma diferença de adsorção de umidade entre estes produtos. O conteúdo de umidade de equilíbrio de amendoim em vagem, dos grãos e das cascas aumentam com a diminuição da temperatura, em uma umidade relativa de equilíbrio constante. Os modelos de Henderson modificado e Chung – Post foram os que melhor representaram o fenômeno de adsorção de umidade do amendoim.

Considerando as condições ideais para o desenvolvimento de *A. parasiticus*, o grão deverá ter 11% de umidade e a umidade relativa de 85% (CAST, 2003). Esta umidade pode ser alcançada quando o grão entrar em equilíbrio com a umidade relativa de 93,58 % (GREENSPAN,1977).

Uma das formas de controle de umidade em condições experimentais é empregar soluções salinas saturadas. Em estudos de armazenagem com grãos, GREENSPAN (1977) determinou a umidade de equilíbrio de diversas soluções salinas para temperaturas entre de 0 a 100°C, objetivando as melhores condições ambientais para o desenvolvimento de *Aspergillus*. Os sais recomendados para esse propósito são cloreto de potássio (KCl); nitrato de potássio (KNO₃) e sulfato de potássio (K₂SO₄).

2.4 Amostragem para avaliar a contaminação por aflatoxinas

A contaminação por aflatoxinas no amendoim ocorre de maneira muito heterogênea, dificultando a amostragem para a determinação desta contaminação. É difícil

estimar exatamente a concentração de aflatoxinas em um grande lote devido à grande variabilidade associada à análise da contaminação por aflatoxinas. Há uma variabilidade associada à cada uma das etapas de amostragem, preparo da amostra e análise; a variabilidade aumenta com a concentração da toxina no lote. A principal fonte de variabilidade associada a este procedimento está na etapa de amostragem (CAST, 2003).

Na amostragem, a variabilidade da contaminação é grande, porque uma pequena porcentagem dos grãos está contaminada e a contaminação em um único grão pode ser muito alta. WHITAKER et al. (1994a) estudaram a variabilidade neste procedimento e verificaram que a amostragem é responsável por 90% da variabilidade associada à determinação da contaminação de um lote.

Por haver uma grande heterogeneidade, a distribuição da contaminação de aflatoxinas em lotes possui um comportamento matemático diferente (WHITAKER e WISER 1969). Este comportamento é explicado por uma distribuição binomial negativa. WHITAKER et al. (1996) estudaram a adaptabilidade de 10 modelos de distribuições estatísticas para descrever a contaminação de amendoim por aflatoxinas e observaram que a Distribuição Binomial Negativa foi a distribuição que melhor descreveu o comportamento da contaminação.

Os métodos empregados para amostrar produtos agrícolas têm-se mostrado inadequados para avaliação da contaminação por aflatoxinas.

FONSECA (2002) determinou o tamanho destas amostras para grandes lotes de amendoim com casca e sem casca a granel, a partir do número mínimo de pontos dos quais devem ser retiradas as subamostras para se constituir a amostragem.

Quanto maior o valor médio da contaminação de um lote, maior a variância e menor o coeficiente de variação (CV) associado à amostragem. WHITAKER et al. (1994 a) estudaram o efeito de diferentes tamanhos de amostras de amendoim armazenado, de lotes contaminados, e verificaram que a variância está associada à média de contaminação nos lotes, ou seja, há um aumento da variância com o aumento da concentração da contaminação.

É importante determinar corretamente a contaminação por aflatoxinas em condições experimentais para determinar o efeito dos tratamentos na redução de contaminação. No entanto, a avaliação do efeito dos tratamentos é comprometida devido à variabilidade da contaminação por aflatoxinas entre as repetições. Considerando que a etapa de amostragem é a responsável pela maior parte da variabilidade associada à

determinação de contaminação por aflatoxinas, é recomendável não subamostrar as parcelas experimentais para não introduzir nova fonte de variabilidade neste processo.

O efeito do tratamento de parcela na variabilidade associada à contaminação por aflatoxinas em condições experimentais de campo foi avaliada e verificou-se que, quando se aumenta o tamanho das parcelas de 1,5m para 6m, o desvio padrão foi reduzido pela metade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do Experimento e origem das sementes.

O trabalho foi desenvolvido na Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola (UAEA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Os ensaios para avaliação da contaminação por aflatoxinas foram conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia e Química da Embrapa Algodão, em Campina Grande, Paraíba. A identificação e quantificação das aflatoxinas foram feitas no Laboratório de Micotoxinas da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, em Piracicaba, São Paulo.

As sementes utilizadas nestes experimentos foram da cultivar BRS Havana, produzidas em Mogeiro, na Paraíba, na safra 2006/2007. Utilizando-se todas as recomendações para o cultivo, como adubação conforme análise de solo e controle de pragas e de doenças. As sementes foram armazenadas em casca até a sua utilização, no município de Patos, na Paraíba.

3.2 Tratamento dos grãos com irradiação de ^{60}Co

As irradiações dos grãos de amendoim, cultivar BRS Havana, para controle da microflora, foram feitas em um irradiador que emite raios γ a partir de cobalto-60, tipo gammacell com dose de 12,5 kGy/h. O lote de 5875 g de grãos de amendoim foi dividido em porções de 300 g, acondicionadas em sacos de polietileno transparente antes de serem colocadas no irradiador, para evitar a contaminação dos grãos após a irradiação por exposição ao ambiente. A dose de radiação gama utilizada foi 25 kGy, a mesma para a eliminação dos microrganismos associados aos grãos (PRADO et al., 2005). Depois da radiação, os grãos foram transportados em embalagens vedadas para os Laboratórios de Fitopatologia e Química da Embrapa Algodão.

3.3 Isolado de *Aspergillus parasiticus*

Neste estudo, utilizou-se uma cepa toxicogênica de *A. parasiticus* (#IMI242625) oriunda do International Mycological Institute, Inglaterra, a qual foi isolada de pistache (*Pistacia vera* L.), produtora das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, gentilmente cedida pelo Dr. Guilherme Prado, pesquisador da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais.

3.4 Preparo do inóculo em pó

O isolado de *A. parasiticus* (#IMI242625) foi repicado em meio Czapeck Dox Agar (Himedia Laboratories Pvt Ltd.) e incubado em câmara BOD, a uma temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Após esse período, foi preparada uma suspensão de esporos adicionando-se 20 mL de água destilada esterilizada por placa de Petri. Os conídios foram liberados das colônias fúngicas cultivadas sobre o meio de cultura Czapeck Dox Agar, com uma alça de Drigalski, e a suspensão resultante, filtrada em uma camada dupla de gaze esterilizada. A suspensão de conídios foi adicionada ao meio Czapeck Dox Ágar fundido (temperatura aproximada de 45 °C) e homogeneizado. Em seguida, discos de papel de filtro de 9,0 cm de diâmetro, previamente esterilizados, foram mergulhados na suspensão de esporos e o meio de cultura e distribuídos em placas de Petri de igual diâmetro. As placas foram mantidas em câmara BOD, por um período de 20 dias, à temperatura de 28 °C tempo e temperatura necessários para secagem total do meio de cultura e para o patógeno produzir abundante esporulação sobre o papel de filtro, conforme Figura 1.

Após esse período, foram recortadas duas peças de papel de filtro com *A. parasiticus* esporulado, com área de 1,5 cm² cada, e os esporos em uma dessas peças liberados em 10 g de água destilada esterilizada, contida em um béquer, e os da outra, utilizados para preparar o inóculo em pó do fungo. No papel de filtro utilizado para preparar o inóculo em pó, os esporos foram liberados, com uma escova esterilizada das colônias contidas na superfície do papel para 10 g de caolim (produto inerte, previamente esterilizado). Em hemacitômetro, contou-se o número de esporos na suspensão preparada com água destilada, a qual foi utilizada para estimar a quantidade de esporos contida no

caolim (estimativa indireta). A concentração de conídios nesse produto foi ajustada para 30×10^5 esporos/g.

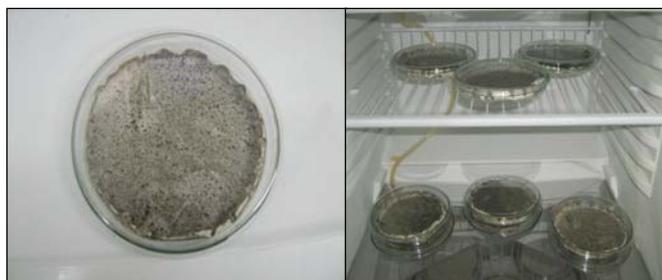


Figura 1. Placas de Petri contendo *A.s parasiticus* mantidas em câmara BOD, para secagem total do meio Czapeck Dox Ágar.

3.5 Inoculação dos grãos

Na inoculação dos grãos, utilizou-se 1 g do inoculo em pó de *A. parasiticus* ajustado para 30×10^5 esporos/g para cada 1 kg de grãos de amendoim. No tratamento controle (testemunha), foi aplicado 1 g de caolim esterilizado por quilo de grãos de amendoim. Inóculo em pó de *A. parasiticus* ou caolim foi adicionado aos grãos de amendoim, contidos em sacos plásticos, procedeu-se a uma homogeneização até a total cobertura de todos os grãos pelos produtos. Todos os procedimentos foram feitos em câmara de fluxo laminar, onde há todo controle de assepsia, para não haver contaminação por outros tipos de microrganismos.

3.6. Incubação

Foram utilizados 5.875g de grãos de amendoim previamente irradiados. Posteriormente, formaram-se dois lotes: um, com 4.700g e outro, com 1.175g de amendoim, ambos inoculados com *A. parasiticus*. O primeiro lote foi subdividido em seis pequenos lotes de 800g que foram postos dentro dedessecadores em estufas de BOD. O outrolote de 1175g de amendoim inoculado, também recebeu o mesmo tratamento para armazenamento (dessecador e BOD).

Antes da incubação, a umidade de equilíbrio dos grãos foi estimada, utilizando-se os conceitos de isotermas de sorção de equilíbrio higroscópico e a equação matemática de Henderson modificada (CORRÊA et al., 2007). Os grãos foram mantidos nos dessecadores por mais 14 dias para o desenvolvimento do fungo (PRADO et al., 1996). O período de incubação grãos de amendoim foi 21 dias, em condições de umidade relativa e temperatura ótimas para produção de micotoxinas, ou seja, umidade superior a 85% e temperatura de 30 ± 1 °C. Adotou-se, neste estudo, tempo de permanência (21 dias) em função de já ter sido determinado experimentalmente que se necessitam de 7 dias para se atingir o equilíbrio e de mais 14 dias para o desenvolvimento do fungo, conforme recomendação de PRADO et al. (1996). Essas condições foram obtidas colocando-se as amostras de 800 g de grãos de amendoim sobre uma grade metálica, contendo 250 mL de solução saturada de nitrato de potássio – KNO_3 (45,8 g para 100 mL de água destilada), suspensa por tubos de PVC acima da placa do dessecador de modo que tanto a placa metálica quanto os grãos previamente esterilizados não tivessem contato com a solução salina. Os dessecadores foram fechados a vácuo e mantidos em câmara BOD com temperatura de 30 ± 1 °C (Figura 2).



Figura 2. Amostras de amendoim acondicionadas sobre grade metálica no interior de dessecadores, contendo solução saturada de nitrato de potássio, dentro de câmara BOD

Como já mencionado, o tempo necessário para os grãos alcançarem o equilíbrio com a umidade relativa no interior do dessecador (93,58%) foi estimado experimentalmente em sete dias. Aos 21 dias após a incubação, os grãos foram retirados dos dessecadores e homogeneizados, em seguida, coletaram-se amostras de 50, 75, 150, 300 e 600 g para determinação das aflatoxinas. Do lote foram retirados 120 grãos para

avaliação referente à sanidade. Antes e após a incubação, a umidade dos grãos foi determinada, utilizando-se o aparelho de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que consiste em um método não destrutivo de determinação de umidade. As amostras, após a determinação da umidade, foram devolvidas ao lote amostrado.

3.7. Teste de sanidade dos grãos

Para avaliação da sanidade, os grãos foram distribuídos em placas de Petri esterilizadas, de 9,0 cm de diâmetro (10 grãos/placa de Petri), contendo 20 ml de meio Czapeck Dox Agar, previamente esterilizado. Os grãos foram incubados em câmara com temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Após esse período, realizaram-se a identificação e a contagem de *A. parasiticus*, examinando-se individualmente as sementes ao microscópio estereoscópico.

3.8. Determinação de aflatoxinas

3.8.1 Preparo das amostras para análise

Cada amostra de 50, 75, 150, 300 e 600 g de grãos de amendoim foi integralmente moída e homogeneizada até que estivesse com o tamanho de partículas correspondente à granulometria 14 mesh, evitando, assim, introduzir erro devido à sub-amostragem.

Depois de peneirada, cada amostra foi acondicionada em embalagem hermeticamente fechada e colocada em câmara fria, onde foram mantidas até a realização da extração.

3.8.2 Preparação dos padrões

Os padrões de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, na forma de cristais, utilizados no ensaio, foram adquiridos nos Laboratórios Sigma Co U.S.A.

Realizou-se a preparação dos padrões de acordo com a metodologia descrita por Scott (1990). A dissolução dos padrões foi feita em metanol e a absorbância registrada em

360 nm em um espectrofotômetro, no qual foram obtidos os valores necessários para realização do cálculo de concentração:

$$\mu\text{g (aflatoxina)}/\text{mL} = \frac{A * CF * MM * 1000}{\epsilon}$$

Em que:

A = absorbância

CF = fator de calibração do espectrofotômetro

MM = massa molecular da aflatoxina

ϵ = absortividade molar $\left(\text{cm}^{-1} \frac{\text{L}}{\text{mol}} \right)$

3.8.3 Extração e limpeza das amostras

Para as extrações, da aflatoxina, adotou-se a metodologia descrita por SOARES & RODRIGUES-AMAYA (1989), descrita abaixo.

Pesaram-se 50 g da amostra e adicionou-se uma solução de 30 mL de KCl 4% (m/v) e 270 mL de metanol. Em seguida, homogeneizou-se em liquidificador durante cinco minutos em velocidade baixa. O conteúdo homogeneizado foi filtrado (Figura 3) em papel de filtro qualitativo (1ª filtração), retirando-se, em seguida, 150 mL do filtrado, ao qual foram adicionado 150 mL de CuSO₄ a 10% (m/v) e, depois, 5 g de celite; transferiu-se para um béquer de 600 mL, agitando-se manualmente com um bastão de vidro e filtrando-se (Figura 3) em papel de filtro (2ª filtração). Em seguida, retiraram-se 150 mL do filtrado, que foi transferido para um funil de separação de 500 mL, ao qual se adicionaram 150 mL de água destilada e 50 mL de hexano, agitando-se por um minuto; após a separação das fases, descartou-se o hexano, repetindo-se esta operação mais 3 vezes. Adicionaram 20 mL de clorofórmio, agitando-se por três minutos; após a separação das fases, retiraram-se 5 mL da solução, repetindo-se este processo mais uma vez. As amostras foram colocadas em vidro âmbar e guardadas sob refrigeração até o momento da evaporação em banho maria a 60°C.



1ª Filtração (metanol e KCL 4%)



2ª Filtração (CuSO₄ 10% e celite)



Fase Hexano



Fase Clorofórmica

Figura 3. Extração e limpeza das amostras

Após a extração, as amostras foram mantidas sob refrigeração em freezer até o momento da análise cromatográfica.

A cromatografia foi realizada com as amostras em cromatofolhas de alumínio com 10 x 10 cm, espessura de 0,2 mm, da marca Merck (KIESEL GEL-60 / 1.05553).

As cromatofolhas foram marcadas a 1,5 cm da margem (ponto de partida - start), distanciando-se 10 cm da linha de chegada da fase móvel (Front) e a separação de 1 cm para a aplicação dos padrões e das amostras, como pode ser observado no esquema da Figura 4.

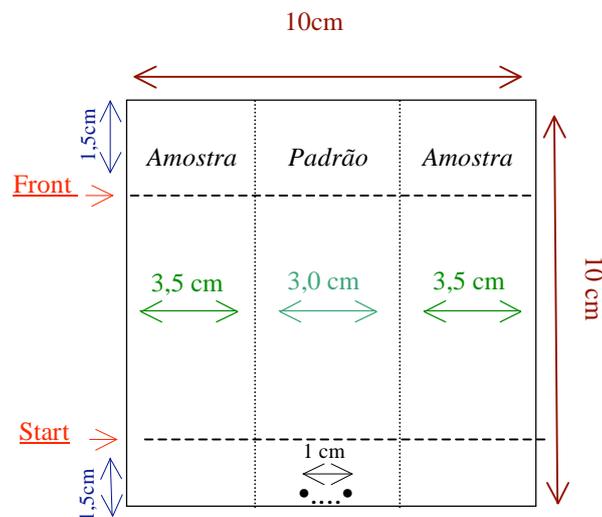


Figura 4. Esquema das cromatofolhas na identificação das aflatoxinas.

3.8.4 Identificação das aflatoxinas

A triagem das aflatoxinas nas amostras foi realizada por meio de cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatofolhas de alumínio, que foram colocadas previamente na estufa a 105°C por 30 min.

Nas cromatofolhas, foram aplicados 10 µL das amostras e 10 µL dos padrões B₁, B₂, G₁ e G₂, distribuídos individualmente em pontos marcados nas folhas. Após a aplicação dos padrões e amostras, as placas foram colocadas em uma cuba que continha a fase móvel (mistura clorofórmio e acetona na proporção de 9:1). Após a eluição, a cromatofolha foi retirada da cuba e, após a evaporação da solução, colocada na câmara com luz ultravioleta de 366 nm para visualização das marcas.

3.8.5 Quantificação

Os extratos secos foram diluídos em 200 µL de tolueno acetonitrila 9:1 (v/v) e alíquotas de 3, 4 e 6 µl do extrato da amostra e 3, 4, 5 e 6 µL dos padrões de aflatoxina B₁ (0,0872 µg/ml) foram aplicadas em uma placa de sílica gel G 60 (Merck). Os cromatogramas foram realizados em câmara saturada com clorofórmio - acetona (9:1) e, após a eluição, as placas foram retiradas da cuba e secas naturalmente ao ar. As quantificações foram então realizadas visualmente. As placas foram examinadas sob luz ultravioleta (366 nm), para observar a presença de manchas fluorescentes indicativas de aflatoxina B₁.

Por último, as concentrações das aflatoxinas foram calculadas de acordo com a fórmula:

$$\text{Concentração (} \mu\text{g/kg)} = \frac{(Y * S * V)}{(X * W)}$$

Em que:

Y = concentração do padrão de aflatoxina (µg/mL)

S = volume em µL do padrão da toxina com fluorescência equivalente à amostra

V = volume final do extrato da amostra em μL

X = volume aplicado do extrato (amostra) em μL

W = massa da amostra em gramas no extrato final

Quando necessário, foram feitos ajustes na concentração dos extratos das amostras através de diluição e concentração, para melhor quantificação.

3.9 Amostragem e análise estatística

A amostragem realizada foi aleatória simples, resultando na coleta de amostras de 50, 75, 150, 300 e 600 g, com quatro repetições cada. Para cada tamanho de amostra inoculada, foi retirada uma amostra não inoculada.

Os resultados obtidos foram analisados, conforme estatística descritiva da quantificação das aflatoxinas, em função dos diferentes tamanhos de amostras do lote.

O desvio padrão foi utilizado como medida de variabilidade associada entre a contaminação das amostras de diferentes tamanhos por aflatoxinas em amendoim.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os grãos de amendoim apresentaram inicialmente teor de umidade de 6,5% b.s., quando foram inoculados artificialmente com *Aspergillus parasiticus*. Após alcançarem o equilíbrio com o ambiente (30°C e 93,58% UR), a umidade se elevou para 12,9% b.s., considerado apropriado para o desenvolvimento deste fungo e para a produção de aflatoxinas (CAST, 2003). Em outros estudos, PRADO et al. (1996, 1999), utilizando a inoculação artificial por meio de inóculo líquido, não mediram a umidade dos grãos antes ou após o processo de inoculação.

Após o período de incubação, verificou-se mediante o teste de sanidade, que todas as amostras inoculadas continham apenas o *A. parasiticus* e que o inóculo em pó permitiu a esporulação do fungo. De acordo com estes resultados, pode-se verificar que as condições de temperatura, umidade relativa e umidade dos grãos durante a incubação foram favoráveis para o desenvolvimento do fungo produtor de aflatoxinas.

Nas amostras que não receberam o inóculo, foram identificados os fungos *A. flavus*, *A. niger*, *Fusarium sp.* e *Penicillium sp* (Figura5).

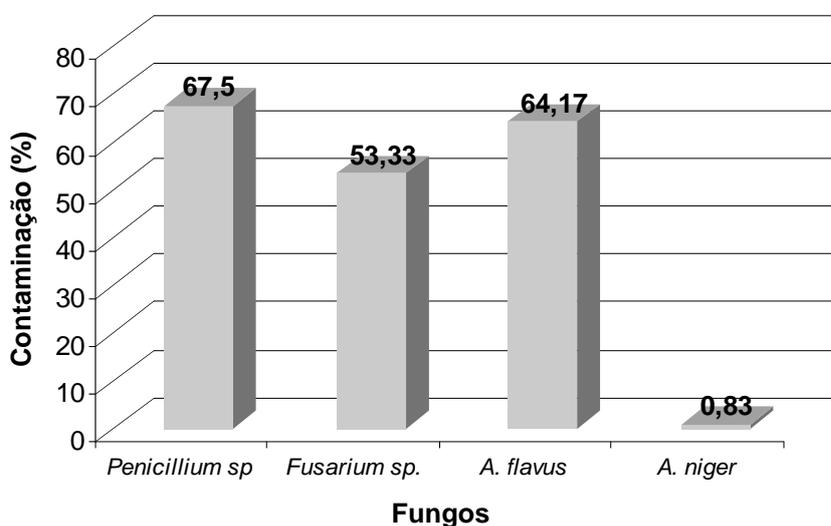


Figura 5: Representação gráfica da porcentagem de contaminação por *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.*, *A. flavus* e *A. niger* das amostras não inoculadas.

Na Figura 5, pode-se observar que os fungos que tiveram maior frequência foram *Penicillium sp.* e *A. flavus*, presentes em mais de 65% das amostras, enquanto que *Fusarium sp.* ocorreu em metade das amostras (53%). Menos de 1% das amostras

continham *A. niger*. Observa-se, ainda, que a irradiação na dose de 25 kGy não eliminou totalmente a micoflora fúngica dos grãos, ou seja, que o fato pode ter ocorrido devido à contaminação no campo, quando as sementes estavam com a umidade elevada. PRADO et al. (2005) utilizaram a irradiação gama na destruição de aflatoxina B1 em amostras de amendoim artificialmente e naturalmente contaminadas. Constataram que as doses de 1, 5 e 10 kGy reduziram em cerca de 20 % os níveis de aflatoxina B1 nas amostras artificialmente contaminadas; as doses de radiação até 10 kGy não foram suficientes para destruir a aflatoxina B1, em amostras naturalmente contaminadas, e que doses de 15, 20, 25 e 30 kGy reduziram a contaminação por aflatoxina B1, de maneira variável (49 a 72%).

Nas amostras inoculadas artificialmente com *A. parasiticus*, produtor dos quatro tipos de aflatoxinas, foram identificadas aflatoxinas do tipo B1 e B2, mas a quantificação foi realizada apenas para a aflatoxina B1, a mais tóxica e mais comum de todas (DHINGRA & COELHO NETTO, 1998).

Na Tabela 1, apresentam-se os resultados das concentrações de aflatoxina por cada repetição, a média e a variância de cada amostra. Estes valores estão em ordem crescente de contaminação, na linha e na coluna, para melhor visualização dos resultados. Em apenas duas amostras não inoculadas (50 e 75 g) houve contaminação, que pode ter sido decorrente do crescimento de *A. flavus*, pois o teste de sanidade revelou a ocorrência deste fungo em mais 60% das amostras.

A contaminação média das amostras de diferentes tamanhos variou de 6,7 a 115,7 e a variância de 37,0 a 46813,9 (Tabela 1). A média geral do lote, estimada pela média geral do experimento, foi 37,73 µg/kg e média das amostras não inoculadas, 1,06 µg/kg. A média das amostras de 150 g foi a mais elevada (115,7 µg/kg), enquanto a menor média foi obtida entre as amostras de 600 g (6,7 µg/kg). Esta diferença entre as médias de contaminação das amostras de diferentes tamanhos pode ser devida à variabilidade da contaminação entre os grãos, ou seja, a amostragem refletiu a contaminação desigual do lote. Estes resultados encontram apoio parcialmente em trabalhos de Whitaker et al. (1994a, 1994b, 2004) que relataram que o nível de contaminação em um único grão pode ser muito alto, por que neste procedimento (amostragem e tamanho de amostra) é responsável por 90% da variabilidade associada à determinação da contaminação de um lote.

Tabela 1. Contaminação com aflatoxina B1 de amostras de amendoim inoculados artificialmente

Tamanho	Repetição				Média	Variância	Amostras não inoculadas
	1	2	3	4			
50	1,9	1,9	1,9	94,3	25,0	2134,4	3,1
75	1,9	1,9	3,8	100	26,9	2375,7	2,2
150	1,9	1,9	18,9	440	115,7	46813,9	0
300	0	4,7	5,7	47,1	14,4	482,1	0
600	0	3,1	11,0	12,6	6,7	37,0	0
Média geral					37,73		1,06
Desvio Padrão					99,20		1,49
C.V. (%)					262,97		140,18

Os resultados do teste de aflatoxina B1 são em µg/kg e os valores foram ordenados de acordo com concentração de aflatoxina

A maior variância foi observada nos resultados obtidos a partir da amostragem de 150g, (46813,9) e o menor valor nas amostras de 600 g, (37,0).

No presente trabalho, o máximo de contaminação encontrado foi 440 ppb, no entanto, o preparo do inóculo foi feito em pó, para não alterar a umidade do grão e a concentração ajustada para 10^5 esporos/g, o que, em parte, explica a diferença de contaminação deste experimento frente ao do PRADO et al. (1996); eles, estudando a resistência de dois genótipos de amendoim inoculados artificialmente com *A. flavus*, determinaram 41836 e 144032 ppb, como sendo o máximo de contaminação por aflatoxina para estes genótipos. Nesse estudo, o preparo do inóculo foi feito em água e a concentração de conídios foi ajustada para 10^3 esporos/mL e, a partir do 14º dia de incubação, houve uma diminuição do crescimento fúngico nesses genótipos. No entanto, deve-se levar em consideração, também, o tempo que não deve ter sido suficiente para que todos os lotes se mostrassem uniforme quanto ao crescimento fúngico, comprometendo assim, o desenvolvimento da aflatoxina.

Analisando os dados contidos na Tabela 2, observa-se, à exceção da amostra de 150 g, tendência de igualdade estatística para as amostras de 50 e 75 g e diminuição na concentração média de contaminação e, conseqüentemente, da variância. Este resultado está de acordo com estudos feitos por WHITAKER et al. (1994 a, 1994b), que estudaram o efeito de diferentes tamanhos de amostras de um lote contaminado e verificaram que o desvio padrão é uma função da média de contaminação.

Tabela 2: Estatística das amostras de amendoim inoculadas por *A. parasiticus*

Tamanho	Média (g)	Desvio Padrão	Variância	C.V.(%)	Min (g)	Max (g)
50	25,00	46,20	2134,44	184,80	1,90	94,30
75	26,90	48,74	2375,74	181,20	1,90	100,00
150	115,68	216,37	46813,87	187,05	1,90	440,00
300	14,38	21,96	482,14	152,75	0,00	47,10
600	6,68	6,09	37,05	91,19	0,00	12,60

Os resultados do teste de aflatoxina B1 são em µg/kg (parte por bilhão).

Entre as amostras de diferentes tamanhos, o menor coeficiente de variação ocorreu na amostra de 600 g (91,19%) e, o maior na amostra de 150 g (187,05%). Em geral, há uma tendência de diminuição da contaminação com o aumento do tamanho da amostra, com exceção da amostra de 150 g. Em estudos de diferentes tamanhos de amostras, WHITAKER et al. (1994 a) observaram que a variância é uma função da contaminação, ou seja, a variância diminui com a diminuição da concentração de aflatoxinas.

WHITAKER et al. (1994a), ao amostrarem lotes de amendoim contaminados por aflatoxinas, verificaram que a variabilidade dos resultados está associada à média de contaminação nos lotes e ao tamanho da amostra. O efeito do tamanho de parcelas experimentais na variabilidade associada à contaminação por aflatoxinas foi estudado por WHITAKER et al. (2004). O desvio padrão associado às parcelas de maior tamanho é menor do que o das parcelas menores, como predito na inferência estatística.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, a redução do desvio padrão ao retirar amostras de maior tamanho foi semelhante ao relatado por Whitaker et al. (2004). O desvio padrão associado às amostras de 50 g foi 46,2, já as amostras de 600g apresentaram um desvio padrão de 6,09. Ao se retirarem amostras doze vezes maiores que 50 g (600 g) há uma redução, da ordem 7,59 vezes, no valor do desvio padrão (6,09), quando as amostras retiradas são oito vezes maiores que as de 75 g (600g), há uma redução de oito vezes no valor do desvio padrão (6,09), e quando são quatro vezes maiores que as de 75 g (300 g), verifica-se uma redução de, aproximadamente, duas vezes no valor do desvio padrão (21,96). O efeito do aumento do tamanho da amostra na redução do desvio padrão, ao se compararem as amostras de 75 e 300 g, é o que mais se ajusta ao predito pela inferência estatística.

Neste estudo, a variabilidade da contaminação está fortemente relacionada com a média, conforme estudos realizados previamente por WHITAKER et al. (1994a). A relação entre o desvio padrão e a média da contaminação das amostras de diferentes tamanhos

pode ser expressa pela equação linear ($y = 1,9134x - 4,3179$) com o coeficiente de determinação superior a 99% (Figura 6).

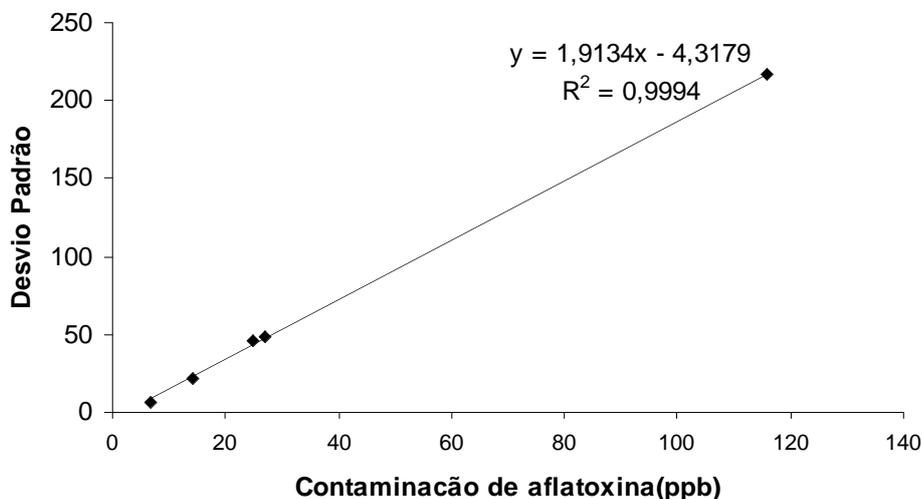


Figura 6. Representação gráfica do desvio padrão em relação à média de contaminação de aflatoxina (ppb) nas amostras de diferentes tamanhos.

WHITAKER et al. (2004), em estudos prévios que mediram a variabilidade associada da contaminação de lotes com o tamanho da amostra, verificaram que o desvio padrão era uma função da concentração de aflatoxinas. O desvio padrão e a média entre as 50 amostras, pesando cada uma 2,27 kg, poderia ser descrito como:

$$S_N = \frac{66,04 \times 2,27}{N} \times C^{0,5999}$$

Em que, N é a tamanho da amostra em kg e C, a concentração de aflatoxina.

Neste estudo, usando a fórmula descrita por WHITAKER et al. (2004) para verificar a relação existente entre o tamanho da amostra e a contaminação de aflatoxinas, e que o desvio padrão estimado está em função da contaminação (Tabela 3). Pode-se observar que os valores obtidos nos desvios padrões estimados foram superiores aos desvios padrões calculados, com exceção da amostra de 150 g, onde os valores do desvio padrão estimado foi muito próximo ao desvio padrão calculado. O fato de o desvio padrão calculado ser inferior ao estimado, pode ter ocorrido devido à utilização de inoculação

artificial dos grãos ou ao tempo de incubação ter sido insuficiente para a uniformização da contaminação por aflatoxinas nos grãos.

Tabela 3. Média de contaminação (ppb), desvio padrão calculado e desvio padrão estimado para os diferentes tamanhos de amostras.

<i>Amostra (kg)</i>	<i>Média (ppb)</i>	<i>Desvio Padrão Calculado</i>	<i>Desvio Padrão Estimado</i>
0,050	25,00	46,20	411,11
0,075	26,90	48,74	335,67
0,150	115,70	216,37	237,35
0,300	14,40	21,96	167,84
0,600	6,70	6,09	118,68

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, estabeleceram-se as seguintes conclusões:

- O método de inoculação em pó foi eficaz na distribuição dos esporos de *Aspergillus parasiticus* nos grãos do lote;
- os fungos predominantes nas amostras irradiadas e não inoculadas foram *Penicilium sp.* e *Aspergillus flavus*;
- o *Aspergillus parasiticus* foi detectado em todas as amostras irradiadas com ^{60}Co , inoculadas artificialmente com ele;
- a contaminação do amendoim por aflatoxina variou com o tamanho das amostras;
- ao se aumentar o tamanho da amostra diminui-se o valor do coeficiente de variação, a partir da amostra de 300 g;
- houve tendência de redução do desvio padrão com o aumento do tamanho da amostra.

6 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, G. A. **Culturas temporárias: cana, algodão, fumo, mandioca, feijão e outros cereais**. Rio de Janeiro: EDIOURO DO CAMPO, 1986.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução RDC n. 274, de 15 de outubro de 2002**. Diário Oficial da União, Brasília, Outubro - 2002.

Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. **Previsão de Safra 2007/2008**. São Paulo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acessado em 19 de agosto de 2008.

CAST - Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins: Risks in plant, Animal and Human**. Report No. 116. Ames, Iowa. 2003. 217 p.

CORRÊA, P.C.; GONELI, A.L.D.; JAREN, C.; RIBEIRO, D.M.; RESENDE, O. **Sorption isotherms and isosteric heat of peanut pods, kernels and hulls**. Food Science and Technology International, v. 13, n.3, p.231 – 238. 2007

DHINGRA, O. D. ; COELHO NETTO, R. A . **Micotoxinas em grãos**. Viçosa: RAPP, 1998. v. 6, p.51-101

DIENER, U. L.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; PAYER, G. A.; LEE, L. S.; KLICH, M. A. **Epidemiology of aflatoxin formation by Aspergillus flavus**. Annual Review of Phytopathology, v. 25, p. 249-270, 1987.

FAO. **Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn**. FAO: Rome, 1993. 75p. (Food and Nutrition Paper #55).

FONSECA, H. **Pequeno histórico das micotoxinas no mundo e no Brasil**. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M.L. (Ed.). Simpósio sobre micotoxinas em grãos. São Paulo: Fundação Cargill e Fundação ABC, 1999b. p. 1-9.

FONSECA, H. **Sampling plan for the analysis of aflatoxin in peanut and corn: an update.** Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 33, n. 2. 2002.

FREIRE, R. M. M; NARAIN, N.; MIGUEL, A. M. R de O.; SANTOS, R. C. dos.. **Aspectos nutricionais de amendoim e seus derivados.** In: SANTOS, R. C. dos. (Ed). O agronegócio do amendoim no Brasil. Ed. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. cap 9, p.391-420.

GREENSPAN, L. **Humidity fixed points of binary saturated an aqueous solution.** Journal of Research National Bureau of Standard A. Physical and Chemistry, v. 81(A), p.89-96. 1977

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. **Taxonomia del gênero *Arachis* (legminosae).** Bonplandia 8 (1-4). 1994. 186p.

MEHAN, V.K.; McDONALD, D; RAMAKRISHNA, N. **Varietal resistance in peanut to aflatoxin production.** Peaunt Science, v.13 p. 10-14.1986.

NEERGARD, P. **Seed pathology.** London: Mac Millan Press, 1979, v.2.

NOGUEIRA, R. J. M. C., TÁVORA, F. J. A. F. **Ecofisiologia do amendoim (*Arachis hypogaea* L).** In: SANTOS, R. C. dos. (Ed). O agronegócio do amendoim no Brasil. Ed. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. cap 3, p.73-122.

PRADO, G.; GODOY, I. J.; OLIVEIRA, M. S.; GAZZINELLI-MADEIRA, J. E.; JUNQUEIRA, R.G.; FERREIRA, S.O. **Teste preliminar de resistência de dois genótipos de amendoim, 2117 e tatu vermelho, com relação à produção de aflatoxina B₁ por uma espécie toxigenica de *Aspergillus flavus* Link.** Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, n.56, v.2, p. 71-74, 1996.

PRADO, G., OLIVEIRA, M. S., GAZZINELLI-MADEIRA, J. E. C., GODOY, I. J., CORRÊA, B., JUNQUEIRA, R. G., FERREIRA, S. O. Resistência de quatro genótipos de amendoim à produção de aflatoxina B₁ após inoculação com *Aspergillus flavus* link. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, n. 1, v.19, 1999.

PRADO, G., CARVALHO, E. P., OLIVEIRA, M. S., GAZZINELLI, J. E. C. M., MORAES, V. D., CORRÊA, R. F., CARDOSO, V. N., SOARES, T. V. Influência da radiação gama (^{60}Co) na destruição de aflatoxina B1 em amendoim (*Arachis hypogaea* L). Revista do Instituto Adolf Lutz, v.64, n. 2, p.186 – 192, 2005.

PUZZI, D. **Conservação dos grãos armazenados: armazéns e silos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 2000. p. 217.

SCOTT, P.M. Natural poisons. In: HELRICH, K. Official methods of analysis of the association analytical chemists food composition, additives, natural contaminants. 15 ed. Arlington: AOAC, 1990. v.2, p.1184-1213.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUES-AMAYA, D.B. **Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A., Zearalenone and Sterigmatocystin in Some Brazilian Foods by Using Multi-toxin Thin-Layer Chromatographic Method**. Journal Ass. Of Analytical Chemical. v.. 72, n.1, p. 22-26, 1989.

WHITAKER, T. B., DOWELL, F. E. Sampling methods to measure aflatoxin and grade factors of peanut. In: PATEE, H.E.; STALKER, H.T.(Eds.). Advances in Peanut Science. Stillwater, OK, USA. American Peanut Research and Education Society, Inc. 614p. 1995

WHITAKER, T. B, WISER, E. H. **Theoretical investigations into the accuracy of sampling shelled peanuts for aflatoxin**. Journal of the American Oil Chemist Society. v. 46, p. 377-379, 1969.

WHITAKER, T. B., DOWELL, F. E., GIESBRECHT, F. G., WU, J. **Variability Associated with Sampling, Sample Preparation, and Chemical Testing for Aflatoxin in Farmers' Stock Peanuts**. Journal of AOAC International. v 77, n° 1. p 107-116. 1994a.

WHITAKER, T. B., GIESBRECHT, F. G., WU, J., DOWELL, F. E. **Predicting the Distribution of Aflatoxin Test Results from Farmers' Stock Peanuts**. Journal of AOAC International. v. 77, n. 3. p 659-666, 1994b.

WHITAKER, T. B., GIESBRECHT, F. G., WU, J. **Suitability of several statistical models to simulate observed distribution of sample test results in inspections of aflatoxin-contaminated peanut lots.** Journal of AOAC International. v. 79, n. 4. p 981-988, 1996.

WHITAKER, T. B., DORNER, J.W.; GIESBRECHT, F. G; SLATE, A. B. **Variability among aflatoxin test results on runner peanuts harvested from small field plots.** Peanut Science. v. 31, p. 59-63. 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)