

Qualidade sanitária de grãos e frutos de amendoim comercializados no estado de Alagoas e identificação através de características culturais de espécies do gênero *Aspergillus*.

Edna Peixoto da Rocha Amorim¹, Roseane Cristina Trindade Predes¹, Arlinda Pereira Eloy¹, Ícaro Cardoso Bezerra^{1*}, Laís Peixoto da Rocha Soares^{1*}, Julio Cesar da Silva^{**}

¹ Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, Campus Delza Gitaí, BR 104N, KM 87, 57000- Rio Largo-AL, *Aluno de Graduação em Agronomia, ** Aluno de Pós-Graduação em Agronomia

Autor para correspondência: Edna Peixoto da Rocha Amorim

Data de chegada: 29/08/2008. Aceito para publicação em: 20/10/2010.

1611

RESUMO

Amorim, E. P. R.; Predes, R. C. T.; Eloy, A. P.; Bezerra, I.C.; Soares, L. P. R., Silva, J. C. Qualidade sanitária de grãos e frutos de amendoim comercializados no estado de Alagoas e identificação através de características culturais de espécies de *Aspergillus*. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.4, p.309-312, 2010.

A identificação de espécies fúngicas presentes em grãos e frutos de amendoim (*Arachis hypogaea*), bem como a caracterização cultural das espécies de *Aspergillus* detectadas, é um importante passo para a prevenção da presença de micotoxinas no substrato, garantindo a qualidade do produto, tanto para a comercialização *in natura* quanto já processado. A partir de grãos e frutos de amendoim comercializados, *in natura* ou processados, no estado de Alagoas foram isolados os fungos *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*), *F. equiseti*, *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*,

Penicillium italicum e *Colletotrichum* sp. De um modo geral, os grãos processados apresentaram menor incidência de fungos, diferindo estatisticamente dos grãos *in natura*, com destaque para as espécies *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. verticillioides* e *F. equiseti*. As espécies de *Aspergillus* foram identificadas com base nas características culturais, exibidas em meio de Czapek-ágar, e morfológicas, através de microscópio ótico. No oitavo dia de crescimento em meio de BDA, cada espécie apresentou diferenças quanto à taxa de crescimento durante o período de incubação, de acordo com a procedência das amostras dos grãos ou frutos.

Palavras-chave adicionais: Etiologia, pós-colheita, patologia de grãos.

ABSTRACT

Amorim, E. P. R.; Predes, R. C. T.; Eloy, A. P.; Cardoso, I.; Soares, L. P. R., Silva, J. C. Sanitary quality of peanut grains and fruits comercialized in Alagoas state and *Aspergillus* species identification by cultural characteristic. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.4, p.309-312, 2010.

The identification of fungal specie presents in fruits and grains of the peanut (*Arachis hypogaea*) and the cultural characterization of the *Aspergillus* species are important for preventing micotoxin contamination of peanut products comercialized *in natura* or processed. The fungi *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*), *F. equiseti*, *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Colletotrichum* sp. were isolated from fruits and grains from peanut comercialized

in natura or processed in the State of Alagoas, Brazil. The processed grains presented significantly less incidence of fungi than grains *in natura* mainly regarding to the species *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. verticillioides* and *F. equiseti*. *Aspergillus* species were identified based on cultural characteristics on Czapek-agar medium and morphological structures viewed under optical microscope. The development of each fungal species on potato-dextrose-agar (PDA) medium presented differences for colony rate of growth according to the fruits and grains samples from which were obtained.

Keywords: Etiology, postharvest, grains pathology.

O amendoim (*Arachis hypogaea* L) é cultivado em larga escala nas Américas do Norte e do Sul, África e Ásia, para fins de extração de óleo, consumo *in natura*, confecção de doces e farelo/torta. Entre as oleaginosas comestíveis, apresenta um rendimento industrial superado somente pelo girassol, com média de aproveitamento em torno de 40%, para óleo, e 50% para farelo. Predominantemente é usado na indústria de gêneros alimentícios, graças à nobre qualidade de seu óleo (22).

O amendoim é altamente deteriorável quando atinge o estado de maturação fisiológica, podendo ser afetada por diversas doenças, dentre as quais, encontram-se aquelas causadas por fungos, que podem

ocorrer ainda no armazenamento dos grãos e em todo o ciclo da cultura, alterando a qualidade do alimento, necessitando ser colhido seco o mais rapidamente possível (13). Assim sendo, a colheita deve ser realizada em períodos secos para não prejudicar a qualidade dos frutos e grãos.

Destacam-se as podridões de *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*), o mofo cinzento (*Botrytis cinerea*), o mofo branco (*Sclerotinia minor* e *S. sclerotiorum*), a fusariose (*Fusarium* spp.), a rizoctoniose (*Rhizoctonia solani*), a murcha de sclerotium (*Sclerotium rolfsii*) e a antracnose (*Colletotrichum* spp.), todas consideradas de importância econômica (4).

Os fungos que infectam os frutos e grãos podem produzir micotoxinas, substâncias metabólicas liberadas ou não em substratos nos quais eles crescem como grãos e / ou frutos (17). Destas, as principais são as aflatoxinas, tóxicas ao homem e aos animais, por apresentarem atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica, em condições de umidade (80% a 90%) e temperatura ambiente favorável (> 20°C), o que afeta a aceitação do produto para o consumo (13).

No Brasil, o amendoim é o substrato mais suscetível à contaminação por aflatoxinas (AFTs), produzida por *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. Conforme Caldas et al. (7), amostras de amendoim oriundas de regiões do Estado de São Paulo, apresentaram 90% de contaminações com fungos produtores de micotoxinas, tais como *A. flavus* e *Fusarium* spp., com resultados positivos para aflatoxina de 183 µg/Kg.

Na região Nordeste, o consumo de amendoim *in natura* ou processado (cozido ou torrado) é muito comum, principalmente na região litorânea. Praticamente todo o amendoim consumido nesta região é oriundo do Estado de São Paulo. A identificação de espécies fúngicas presentes em frutos e grãos de amendoim comercializados em Maceió, bem como a caracterização cultural das espécies de *Aspergillus* detectadas, é um importante passo para a prevenção da presença de micotoxinas no substrato, garantindo a qualidade do produto, tanto para a comercialização *in natura* quanto para o processado.

Devido à importância econômica da cultura do amendoim e a necessidade de uma vigilância contínua da condição de sanidade dos grãos destinados ao consumo, a presente pesquisa objetivou isolar e identificar espécies fúngicas em frutos e grãos de amendoim *in natura* e processados, bem como diferenciar as espécies de *Aspergillus* através da caracterização cultural das mesmas.

MATERIALE MÉTODOS

Obtenção e Identificação de fungos em grãos e frutos de amendoim

Os experimentos foram realizados no Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas e constaram de testes de laboratórios. Foram utilizadas amostras de amendoim (fruto *in natura*, ou seja, frutos retirados das vagens, grãos *in natura* e grãos processados, ou seja, torrados), oriundas do Estado de São Paulo e comercializadas no mercado público e Ceasa-AL. As amostras de frutos/grãos foram analisadas para sanidade empregando-se o método do papel de filtro com modificações (14), utilizando-se 200 frutos/grãos de amendoim, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% v/v de cloro ativo por cinco minutos, foram distribuídas em caixas gerbox (20 grãos/gerbox), sobre papel de filtro umedecido com água destilada esterilizada (14, modificado). A incubação foi realizada sob temperatura média de 25° C e sob regime de iluminação com fotoperíodo de 12h₂ durante o período de oito dias. A avaliação consistiu na observação e identificação da presença de fungos na superfície dos frutos e grãos, sob microscópio estereoscópico, quantificando-se a incidência de todos os fungos presentes nas amostras.

Culturas puras dos fungos detectados foram obtidas, mediante a transferência de esporos que colonizavam os grãos, para placa de Petri, contendo meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e incubados sob alternância luminosa e temperatura de 28°C.

Para identificação, com bases culturais, morfológica e morfométricas das colônias, foram preparadas microculturas em blocos de BDA (1cm²) inoculados lateralmente em quatro pontos, com estruturas fúngicas e, em seguida, cobertos com lâmina. As

microculturas foram incubadas em câmara úmida por um período de 24 horas a 48 horas, em condições de laboratório, sob temperatura média de 28°C. Após a incubação, as laminulas foram transferidas para lâminas coradas com azul de Amann e examinadas ao microscópio óptico comum, para observação das características macro e micromorfológicas e identificação segundo os critérios estabelecidos por Ellis (11, 12), Sutton (21) Burgess et al. (6), Schipper (19) e Barnett & Hunter (3).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com três tratamentos e oito repetições de 200 grãos cada, totalizando 1600 frutos/grãos por tratamento. Foi realizada análise de variância para as incidências de fungos, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Caracterização cultural de espécies de *Aspergillus*

A partir de colônias do gênero *Aspergillus*, discos de micélio de aproximadamente 3mm foram retirados e, em seguida, plaqueados em meio de Czapeck-ágar. As placas assim preparadas foram incubadas sob alternância luminosa e temperatura de 28°C. Os estudos das características culturais e morfológicas das espécies de *Aspergillus* foram confrontadas com aquelas descritas por Raper & Fennel (17) e Singh et al.(20). Para cada espécie identificada, repicou-se discos de 3mm, contendo micélio, para o centro de uma placa contendo BDA. Foram empregadas quatro repetições por isolado e a incubação permaneceu a mesma citada anteriormente. A partir do segundo até o oitavo dia de incubação, foram realizadas medições dos diâmetros das colônias, com auxílio de uma régua milimetrada, em dois sentidos diametralmente opostos. Foram consideradas as seguintes variáveis: diâmetro da colônia no oitavo dia de incubação e a taxa de crescimento micelial, correspondendo esta última ao coeficiente de regressão (b) obtido da equação $y = a + bx$, relativos ao diâmetro (y) plotados durante os oito dias de incubação (x), sendo “a” o diâmetro inicial. Na análise estatística (delineamento inteiramente casualizado) as médias das variáveis foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ocorrência de fungos em grãos *in natura* e processados e frutos *in natura* de amendoim

Os resultados obtidos em relação à incidência dos fungos presentes nos grãos *in natura* e processado e frutos *in natura* de amendoim são apresentados na Tabela 1.

Observa-se um total de dez espécies fúngicas distribuídas em seis gêneros, dos quais destacaram-se pela maior incidência: *Fusarium* (51,42%), *Aspergillus* (42,56%) e *Rhizopus* (4,87%), perfazendo 98,85% do total obtido nos grãos *in natura*; *Fusarium* (31,03%) e *Aspergillus* (25,32%) correspondendo a 56,35% do total obtido em frutos *in natura*; *Aspergillus* (3,99%) e *Fusarium* (4,0%), ou seja 7,99% do total obtido em grãos processados. Em geral, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são freqüentes em sementes, sendo considerados fungos de armazenamento e podem contribuir para a degradação das sementes, durante o período de armazenamento, em condições desfavoráveis à manutenção da boa qualidade das sementes, além de estarem envolvidos na produção de micotoxinas- AFLt (8).

Com relação ao gênero *Aspergillus* (Tabela 1), foram detectadas quatro espécies deste fungo, já reportadas em sementes de amendoim, feijão, girassol e outras plantas: *A. flavus* Link (5, 9, 15), *A. niger* van Tieghem (9, 15) *A. parasiticus* Speare (20) e *A. ochraceus* Wilhelm (15). Dentre estas, destacaram-se *A. flavus* (25,44%) e *A. niger* (9,5%)

Tabela 1- Incidência de fungos em grãos *in natura* e processados e frutos *in natura* de amendoim oriundos do estado de São Paulo e comercializados em Maceió-AL.

FUNGOS	Grão <i>in natura</i>	Grão processado	Fruto <i>in natura</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	25,44 d C	0,37 a A	6,50 b B
<i>Aspergillus niger</i>	9,50 c B	3,50 b A	16,50 c C
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,00 a A	0,00 a A	1,20 a A
<i>Aspergillus parasiticus</i>	7,62 bc B	0,12 a A	1,12 a A
TOTAL	42,56	3,99	25,32
<i>Fusarium verticillioides</i>	48,85 e C	3,50 b A	29,50 d B
<i>Fusarium equiseti</i>	2,57 b A	0,50 a A	1,53 a A
TOTAL	51,42	4,00	31,03
<i>Rhizopus stolonifer</i>	4,87 b B	0,75 a A	1,00 a A
<i>Botrytis cinerea</i>	0,00 a A	0,20 a A	0,38 a A
<i>Penicillium italicum</i>	1,15 a A	0,00 a A	1,00 a A
<i>Colletotrichum</i> spp.	0,00 a A	0,00 a A	0,20 a A
TOTAL	6,02	0,95	2,58
TOTAL GERAL	100,00	8,94	58,93

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si (P= 0,05) pelo teste de Tukey.

em grãos *in natura*; *A. flavus* (0,37%), *A. niger* (3,5%) e *A. parasiticus* (0,12%) em grãos processados e *A. flavus* (6,5%), *A. niger* (16,5%), *A. parasiticus* (1,12%) e *A. ochraceus* (1,2%) em frutos *in natura* do total de fungos isolados em cada tratamento. A presença de *A. flavus* e *A. parasiticus*, que causam o mofo amarelo do amendoim, apesar de ser considerada uma doença de pequena importância, constitui um dos mais sérios problemas para o consumo do amendoim, devido à possibilidade de produção de aflatoxinas (4), que provocam alterações orgânicas que levam a hemorragias e câncer hepático se ingeridas por longo período, mesmo em baixas quantidades (2).

No gênero *Fusarium* foram detectadas duas espécies, *F. verticillioides* (= *F. moniliforme* Sheld.) e *F. equiseti* (Corda) Sacc., reconhecidas patógenos de amendoim (Frank e Bem Yephet, 1997, citados por Santos, 2005 (18), que mostraram uma incidência de 48,85% e 2,57% em grãos *in natura*, 3,50% e 0,50% em grãos processados e 29,5% e 1,53% em frutos *in natura*, respectivamente, do total de fungos isolados. As espécies de *Fusarium* são comumente relatadas em grãos de várias culturas, sem sintomas aparentes. De acordo com Champion (8), algumas espécies de *Fusarium* podem atuar tanto como saprófitas, quanto como parasitas importantes, depreciando a qualidade do produto. Com relação às espécies de *Fusarium* detectadas neste trabalho, estas foram relatadas por Paz Junior & Menezes (15) em sementes de girassol, sem causar sintomas.

Dentre os demais fungos detectados, *Rhizopus stolonifer* se apresentou com incidência de 4,87%, 0,75% e 1,0%, respectivamente em grãos *in natura*, grãos processados e frutos *in natura*, *Penicillium italicum* (1,15% e 1,0%) em grãos e frutos *in natura* e *Botrytis cinerea* (0,2% e 0,38%) em grãos processados e frutos *in natura*.

As espécies *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* que ocorreram em maior incidência em grãos *in natura*, comparando-se

com os frutos *in natura* e grãos processados, e que podem estar envolvidos na produção de micotoxinas (aflatoxinas) em amendoim, é bastante preocupante, considerando o alto consumo nas praias do estado de Alagoas. Neste trabalho os frutos e grãos de amendoim eram adquiridos no mercado local, mas foram oriundos do estado de São Paulo, onde a incidência de aflatoxinas tem sido um problema constante nos últimos anos (18).

Essa maior incidência de *A. flavus* e *F. verticillioides* nos grãos *in natura* e frutos *in natura* pode estar relacionada ao modo como esses grãos foram formados desde a condução no campo, colheita, secagem, transporte e armazenamento, reduzindo, dessa maneira sua qualidade sanitária. Em São Paulo, o amendoim é colhido durante os meses de alta precipitação pluviométrica. As altas temperatura e umidade dificultam a secagem após o arrancamento e o armazenamento, podendo favorecer o aparecimento de fungos produtores de toxinas (13).

Neste trabalho foi possível notar uma variação na incidência de fungos nos grãos e frutos de amendoim em função do tipo comercializado, processado ou *in natura*, onde se verifica maior incidência de fungos nos grãos e frutos *in natura* (100% e 58,93%, respectivamente). Este fato pode ter sido decorrente de que, ao torrar os grãos, a temperatura do processamento diminuiu a proliferação de microrganismos, como também, o grão tornou-se mais seco e, portanto, mais propício ao armazenamento.

Caracterização cultural de espécies de *Aspergillus*

Os resultados da caracterização cultural das espécies de *Aspergillus* mostraram que para algumas das espécies de *Aspergillus* identificadas foram verificadas tendências diferentes de crescimento micelial (Figura 1). No oitavo dia de incubação o fungo *A. flavus* ocupou toda a superfície da placa, enquanto que os fungos *A. niger*, *A. ochraceus* e *A.*

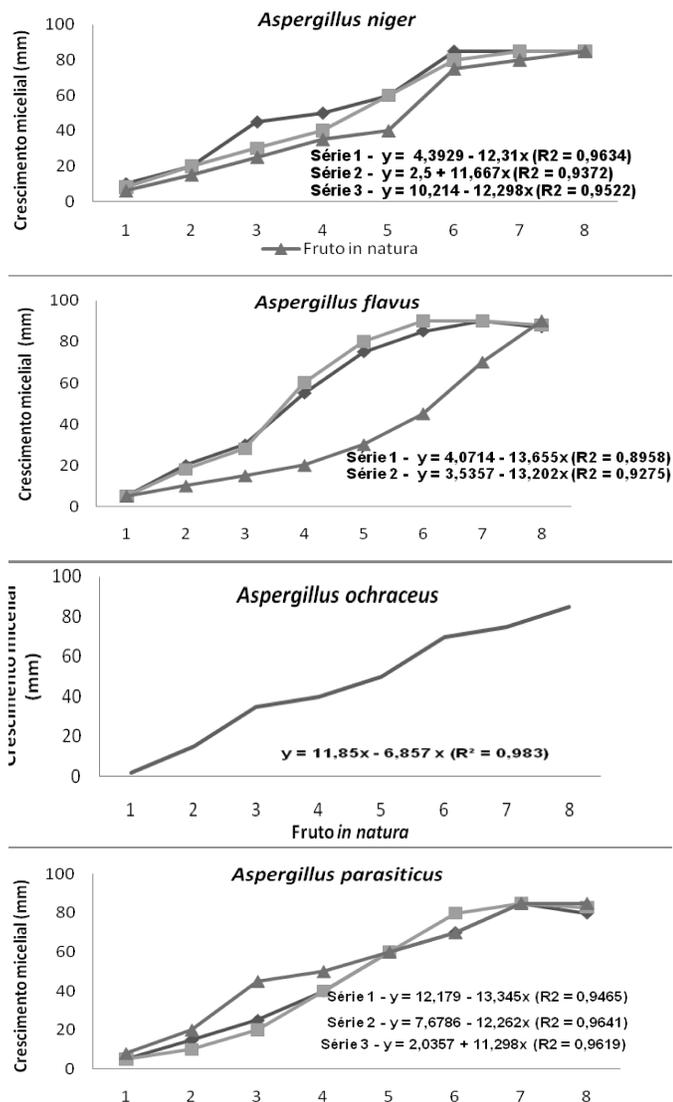


Figura 1-Curvas de crescimento micelial de espécies de *Aspergillus* isoladas de grãos *in natura* e processados e frutos *in natura* de amendoim.

parasiticus não ocuparam. As taxas de crescimento micelial das espécies apresentaram diferenças significativas entre os isolados, sendo o observado decorrente das diferentes tendências de crescimento. Provavelmente, as diferenças observadas nas taxas de crescimento micelial das espécies se devem à variabilidade das espécies, que é um fenômeno genético comum. Resultados semelhantes foram observados por Araújo et al. (1) ao estudarem a associação de fungos a sementes de feijão e por Benicio et al. (5) ao identificarem e caracterizarem espécies do gênero *Aspergillus* em sementes de feijão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araújo, E.; Alcântara, R. L.; Souza, F. A.; Almeida, F. A. C.; Carvalho, J. L.; Lima, A. A. A.; Lima, A. L.; Menezes Neto, J.; Pontes, V. A. Fungos associados a sementes de feijão obtidas em diferentes municípios da Paraíba. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 2, p. 109-115, 1980.

2. Baldissera, M. A.; Santurio, J. M.; Canto, S. H.; Pranke, P. H.; Almeida, C. A. A.; Schmidt, C. Aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona em alimentos para consumo animal no sul do Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 53, n. 42, p. 6, 1993.

3. Barnett, H. L.; Hunter, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4th ed. New York: MacMillan, 1998. 218 p.

4. Barreto, M. Doenças do amendoim (*Arachis hypogaea*). In: Kimati et al. (Ed) **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**: 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 63-77.

5. Benicio, V.; Araújo, E.; Souto, F. M.; Benicio, M. J.; Felismino, D. Identificação e características culturais de espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de sementes de feijão no estado da Paraíba. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 28, n.2, p. 180-183, 2003.

6. Burgess, L. W.; Liddell, C. M.; Summerell, B. S. **Laboratory manual for Fusarium research**. Sydney: University of Sydney, 1988. 156 p.

7. Caldas, E. D.; Silva, S. C.; Oliveira, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, Campinas, v.36, n. 3, p. 319-323, 2002.

8. Champin, R. **Identifier les champignons transmis par les semences**. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1997. 398 p.

9. Chisholm, F. V.; Coates-Beckford, P. L. Fungi associated with seeds of three legumes in Jamaica and seed germination at harvest and after storage. **Tropical Agriculture**, v. 74, p. 121-127, 1997.

10. Dhingra, O. D. Patologia pós-colheita. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n. 122, p. 46-50, 1985.

11. Ellis, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew: CAB, 1971. 608 p.

12. Ellis, M. B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Kew: CAB, 1976. 505 p.

13. Godoy, I. J.; Savy Filho, A. Tango, J. S.; Ungaro, M. R. G.; Marioto, P. R. **Programa integrado de pesquisas oleaginosas**. Campinas: IAC, 1985. 33 p.

14. Neergaard, P. **Seed Pathology**. 2. ed. London: McMillan. 1979. 162p.

15. Paz Junior, F. B.; Menezes, M. Fungos endofíticos em sementes de girassol e diferenciação morfológica e enzimática de espécies de *Fusarium*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.31, n.1, p. 87-93, 2005.

16. Prado, G.; Oliveira, M. S. Efeito do forno de microondas na destruição de aflatoxinas em amendoim. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 21-24, 1996.

17. Raper, K. B.; Fennel, D. I. **The genus Aspergillus**. Baltimore: Williams & Wilkinson, 1965. 205 p.

18. Santos R. C. **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 451p.

19. Schipper, M. A. A. **A revision of the genus Rhizopus I. The Rhizopus stolonifer- group and Rhizopus oryzae**. Baarn: Centraal bureau voor Schimmelcultures, 1984. 34 p.

20. Singh, K.; Frisvad, J.C.; Thrane, U.; Mathur, S.B. **An illustrated manual on identification of some seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their micotoxins**. Copenhagen: Danish government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, 1981. 178p.

21. Sutton, B. C. **Coelomycetes**. Kew: CAB, 1980. 324 p.

22. Tasso Junior, L. C.; Marques, M. O.; Nogueira, G. A. **A cultura do amendoim**. Jaboticabal, 2004. 218p. Disponível em: <http://www.criar eplantar.com.br/agricultura/amendoim.php. Acesso em: 17 jan. 2004.

23. Toledo, P. M. E.; Fonseca, H.; Oetterer, M. Contaminação e distribuição de aflatoxinas nos produtos e subprodutos do processamento via seca e via úmida do milho. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 31, n. 1, p.77-80, 1997.