

ESTUDO DO CONTROLE QUÍMICO DO *Aspergillus flavus*
E PRODUÇÃO DE AFLATOXINA NO AMENDOIM
(*Arachis hypogaea* L.) NO CAMPO*

HOMERO FONSECA **
ANGELO SAVY FILHO ***
JACIRO SOAVE ****
VICENTE CANECCHIO FILHO*****

RESUMO

No presente trabalho foi estudada a possibilidade de controle da produção de aflatoxina pelo *Aspergillus flavus* em amendoim, pela aplicação de fungicidas sobre as vagens logo após seu arrancamento. Quatro fungicidas eficientes selecionados previamente em testes "in vitro" (Ferbam, Thiram, Ortofenilfenato de sódio e Captafol) foram utilizados em experimentos levados a efeito durante quatro anos nas regiões de Caiabu, Campinas, Marília, Pirapozinho e Ribeirão Preto.

Os resultados levaram à conclusão, dentro do âmbito e condições do experimento, de que nos anos em que houve chuva na colheita, os tratamentos anti-fúngicos foram ineficientes e que em anos secos as próprias condições do tempo se encarregaram de inibir o *A. flavus*.

INTRODUÇÃO

A aflatoxina é um metabólito tóxico do fungo *Aspergillus flavus* LINK ex FRIES, produzido quando este se instala sobre vagens de amendoim, após a colheita, sob condições favoráveis de umidade do amendoim e de temperatura e umidade relativa do ar.

Sua ocorrência em amendoim foi exaustivamente estudada a partir de 1960, ano em que, na Inglaterra, houve grande perda de peruzinhos alimentados com ração em cuja composição entrava torta de amendoim.

* Parte do Projeto n.º 1 CIA-BNDE Contrato Fundepro 42. Executado em colaboração com o Dept.º Tecnologia Rural da ESALQ-USP. Entregue para publicação em 26-11-1976

** Dept.º de Tecnologia Rural

*** Eng.º Agr.º, Seção de Oleaginosas, Instituto Agronômico de Campinas. Bolsista do CNPq

**** Eng.º Agr.º, Seção de Microbiologia Fitotécnica, I.A. Campinas. Bolsista do CNPq

***** Eng.º Agr.º Seção de Oleaginosas, I.A. Campinas

Sabe-se hoje que o fungo e a toxina ocorrem praticamente em todo o mundo e pode crescer e produzir toxina em quase todos os substratos (ADRIAN e JACQUAT, 1968).

A toxina afeta diretamente a qualidade do amendoim e derivados para o consumo alimentar animal e humano (FONSECA, 1968 e FONSECA e DEL NERY, 1970). O fato assume proporção inquietante não só no que diz respeito aos animais como também à saúde humana pois sabe-se que quando ingerida pelos animais em lactação a toxina é parcialmente eliminada através do leite (ALLCROFT e CARNAGHAN, 1962; IONGH *et alii*, 1964; ALLCROFT *et alii*, 1966).

FONSECA (1968) estudou a ocorrência da aflatoxina em tortas e farelos de amendoim no Estado de São Paulo. À luz dos resultados obtidos o Autor extraiu, entre outras, as seguintes conclusões: "as tortas provenientes da safra das "águas" foram muito mais tóxicas que as da "seca". As médias para o Estado de São Paulo foram: "águas" = 4.78ppm e "seca" = 1,88ppm de aflatoxina B. Mesmo o material da "seca" ainda apresentou toxidez na faixa "Muito Alta".

Ainda segundo FONSECA (1969 a) "o lavrador, em anos de safras não muito grandes, é o principal responsável pelo elevado teor de aflatoxina no amendoim e, conseqüentemente, nas tortas e farelos. Em anos de safras abundantes, além do lavrador, o industrial tem grande parcela de responsabilidade pelo aumento do teor de aflatoxina, em virtude das precárias condições em que é mantida a matéria prima que excede sua capacidade de armazenamento".

Ainda não se encontrou uma técnica ideal para controle do fungo e, portanto, da prevenção da produção da toxina em condições de campo. BELL e DOUPNIK (1971) obtiveram algum resultado com o controle químico, em condições algo artificiais.

Os métodos de destoxificação industrial propostos tais como a autoclavagem úmida (COOMES *et alii*, 1966) e pelo peróxido de hidrogênio (SREENIVASAMURTHY *et alii*, 1967) são ainda anti-econômicos.

Com o presente trabalho procurou-se testar um método de controle da produção de aflatoxina no campo, dentro das nossas condições através do emprego de produtos químicos com ação fungicida.

MATERIAL E MÉTODO

Como o experimento desenvolveu-se em duas fases — a primeira para triagem dos produtos químicos "in vitro" para controle do fungo *A. flavus* e escolha dos quatro melhores produtos e a segunda para teste,

em condições de campo, dos fungicidas selecionados e subsequente análise para determinação da aflatoxina — descreveremos separadamente cada uma destas fases.

Triagem dos fungicidas

Utilizando-se o método de discos de papel de filtro (BIER, 1945; PELCZAR Jr. e REID, 1958 e STEINER *et alii*, 1969) foi testada a sensibilidade do fungo *A. flavus* em dezesseis tratamentos com fungicidas cujas concentrações de princípio ativo e dosagem são apresentadas no QUADRO I.

QUADRO I — Concentrações de princípio ativo e dosagens dos fungicidas utilizados no teste de sensibilidade do *Aspergillus flavus*.

Trat.	Concentração de Princípio Ativo	dosagem g/l.
1	Oxicloreto de cobre — 60%	5,0
2	Dimetil ditiocarbamato de ferro — Ferbam — 76%	3,6
3	Pentacloro nitro benzeno — PCNB — 75%	10,0
4	Etileno bis ditiocarbamato de manganês — Maneb — 80%	1,8
5	Bissulfeto de thiuram — 90%	3,0
6	Oxicloreto de cobre 74% + Zineb 20%	4,0
7	Bissulfeto de tetrametilthiuram-Thiram-TMTD — 65%	1,5
8	Bissulfeto de tetrametilthiuram-Thiram-TMTD — 70%	2,0
9	Etileno bis ditiocarbamato de manganês — Maneb — 80%	2,4
10	Bissulfeto de tetrametilthiuram — Thiram — TMTD — 75%	1,5
11	Etileno bis de ditiocarbamato de zinco — Zineb — 75%	1,5
12	Trifenil hidróxido de estanho — 20%	1,5
13	Blasticidin S benzilamino benzeno sulfonato 4%	1,2
14	Maneb + ion zinco — 80%	2,0
15	Ortofenil fenato de sódio — 97%	20,0
16	Captafol	2,4
17	Testemunha — água esterilizada	—

Foram preparadas, aseticamente, três placas de Petri com o meio de cultura BDA (batata — dextrose — agar) para cada tratamento. A seguir foi preparada uma suspensão contendo 10^5 esporos de *A. flavus* por ml, da qual transferiu-se 1 ml para cada placa de Petri. Cada produto químico foi diluído na respectiva dosagem do seu tratamento e nessa diluição foram embebidos discos de papel de filtro de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. De cada produto foram colocados

quatro discos por placa de Petri, em três placas, que foram mantidas em estufa incubadora a 28°C. A sensibilidade do fungo foi avaliada através da medição do halo de inibição do crescimento aos 2, 3, 7 e 38 dias.

Ensaio de campo

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, em blocos de 5 tratamentos (1, 2, 3, 4 e 5) e 4 repetições (A, B, C e D).

O experimento foi instalado numa área de 1600 m² na qual foram plantadas 65 fileiras de 40 m de comprimento no espaçamento de 0,60 m. Nas fileiras as plantas ficaram distanciadas de 0,10 m. Foram usadas sementes da variedade Tatú tratadas com neantina seca (1,5% de Hg na forma de acetato mercuri-fenílico) na dosagem de 0,20%. Na época da colheita a área foi dividida em 20 parcelas de 78 m² contendo 13 fileiras de 40 m.

Após a operação de arrancamento das plantas estas foram enleiradas ao longo das linhas, seguindo prática usual, e em seguida as suas vagens foram pulverizadas com os fungicidas previamente selecionados. Foram utilizados pulverizadores do tipo costal com bico comum, em cone.

Após a pulverização as vagens ficaram 3 dias no campo para secagem a pleno sol.

Após a batadura em balaio para destacar as vagens, estas foram ensacadas separadamente por parcela e armazenadas em condições naturais de temperatura e umidade por um período de 30 dias, em armazem da Seção de Oleaginosas, em Campinas.

Os fungicidas selecionados e aplicados foram (tratamento):

1. Ferbam a 76%, dosagem de 3,6 g por litro
2. Thiram a 70%, dosagem de 2,0 g por litro
3. Ortofenil-fenato de sodio 97%, dosagem de 20 g por litro
4. Captafol, dosagem de 2,4 g por litro
5. Testemunha

De acordo com o plano descrito, conduziram-se na safra das "águas" 5 experimentos em áreas de Latossolo Roxo e Podzolizados de Lins e Marília, conforme a classificação da COMISSÃO DE SOLOS (1960). Os experimentos foram instalados em 1970/71 (Marília), 1971/72 (Ribeirão Preto, Caiabu e Pirapozinho) em 1972/73 (Marília, Campinas e Ribeirão Preto) e 1973/74 (Ribeirão Preto).

Análise da aflatoxina

Para análise da aflatoxina, cada parcela foi totalmente colhida, homogeneizada e considerada como uma amostra. O amendoim foi descascado, triturado e peneirado em peneiras com crivo de 1680 micra (10 "mesh"), e uma amostra de cerca de 60 g representativa de todo o material foi desengordurada em Soxhlet com éter de petróleo conforme FONSECA (1969 b). A extração da toxina foi feita de acordo com a técnica de LEE (1965) e a dosagem conforme COOMES e FEUELL (1965).

RESULTADOS

Triagem dos fungicidas

Os resultados obtidos podem ser observados no QUADRO II, onde estão registrados os diâmetros, em mm, dos halos de inibição de crescimento do fungo aos 2, 3, 7 e 38 dias do plaqueamento da suspensão de esporos e aplicação dos discos com os respectivos fungicidas.

QUADRO II — Inibição de crescimento de *A. flavus* em placas de Petri, em presença de discos de papel de filtro embebido nos diferentes produtos químicos. Dados médios de 3 repetições, em milímetros de halo de inibição aos 2, 3, 7 e 38 dias após a aplicação dos respectivos produtos.

N.º	Tratamento Princípio Ativo	%	Dosagem g/l	Dias após a aplicação do produto			
				2	3	7	38
1	Oxicloreto de cobre	60	5,0	0	0	0	0
2	Ferbam	76	3,6	5	5	0	0
3	PCNB	75	10,0	0	0	0	0
4	Methiram	90	3,0	2	2	2	0
5	Maneb	80	1,8	2	2	2	0
6	Oxicl. cobre + Zineb	74 + 20	4,0	2	0	0	0
7	Thiram-TMTD	65	1,5	5	5	0	0
8	Thiram-TMTD	70	2,0	10	5	5	0
9	Maneb	80	2,4	3	3	3	0
10	Thiram-TMTD	75	1,5	7	7	7	0
11	Zineb	75	3,5	1	0	0	0
12	Trif. Hidrox. estanho	20	1,5	10	10	10	0
13	Blasticidin-S	4	1,2	0	0	0	0
14	Maneb + zinco	80	2,0	2	2	2	0
15	Ortof. Fenato sódio	97	20,0	>10	>10	>10	>10
16	Captafol		2,4	3	3	3	3
17	Testemunha-água			0	0	0	0

Na FIGURA I pode-se visualizar o efeito de cada tratamento pela fotografia das placas de Petri. Esta mostra a sensibilidade do *A. flavus* aos fungicidas, que é representada pelo halo de inibição formado, após dois dias e meio de tratamento. Os maiores halos e os efeitos mais prolongados de inibição ao crescimento do *A. flavus* foram obtidos com o Ferbam 76%, Thiram 70%, Ortofenilfenato de sodio 97% e Captafol, nas dosagens indicadas em Material e Método.

Os demais tratamentos não apresentaram halo de inibição ou apresentaram-no muito pequeno ou por curto espaço de tempo.

Ensaio de campo

1. *Experimento de 1970/71*

O experimento foi instalado em Marília, na fazenda Sta. Helena. A colheita transcorreu em condições climáticas normais, isto é, sem chuvas. A análise do teor de aflatoxina revelou os seguintes resultados:

<i>Tratamento</i>		<i>Teor de aflatoxina B₁ (ppb)</i>
1 — Ferbam	(1 amostra)	80
4 — Captafol	(1 amostra)	80
5 — Testemunha	(1 amostra)	80

2. *Experimento de 1971/72*

A colheita dos experimentos instalados nas regiões de Ribeirão Preto, Caiabú e Pirapozinho transcorreu sob condições climáticas adversas, com chuvas especialmente na última região. Os resultados da análise de aflatoxina são os constantes do QUADRO III.

3. *Experimento de 1972/73*

Neste ano a colheita e secagem dos experimentos instalados em Campinas e Marília transcorreram em condições climáticas secas ao passo que em Ribeirão Preto houve precipitação de 5,4 mm de chuva. Os resultados das análises são os do QUADRO IV abaixo, visto que apenas quatro amostras de Marília apresentaram aflatoxina. Nenhuma amostra de Campinas e Ribeirão Preto se apresentou tóxica.

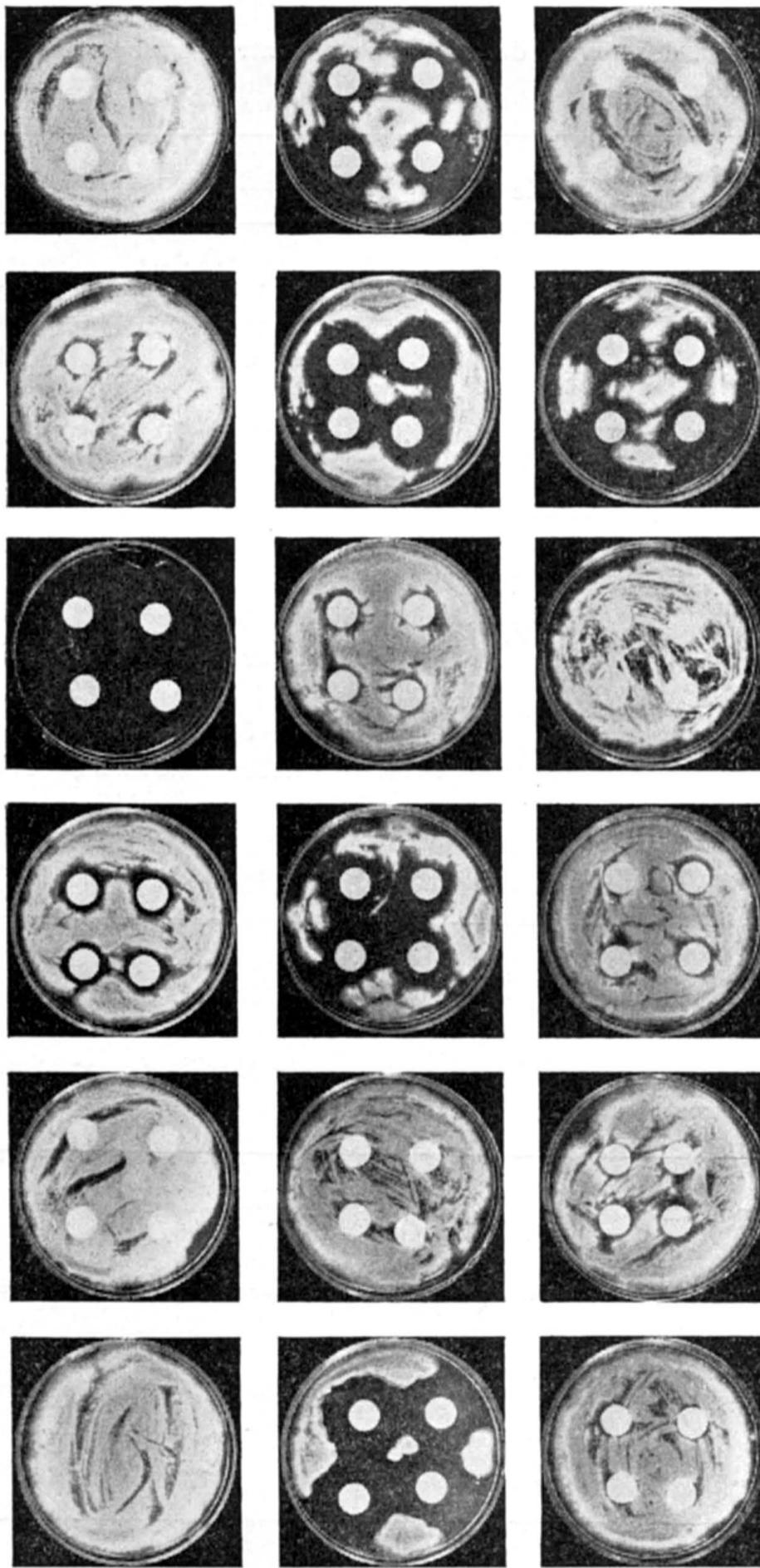


FIGURA 1 — Halo de inibição de crescimento apresentado por *A. flavus* aos 2 dias e meio após o tratamento com diferentes produtos químicos: Da esquerda para a direita — série superior: Oxidoreto de cobre 60%; Ferbam 76%; PCNB 75%; Maneb 80%; Methiram 90%; Oxidoreto de cobre 74% + Zineb 20% — série do meio: TMTD 65%; TMTD 70%; Maneb 80%; TMTD 75%; Zineb 75%; Trifenil hidróxido de estanho 20% — série inferior: Blastocidin 4%; Maneb + zinco 80%; Ortofenil fenato de sódio; Captafol; Testemunha, discos tratados com água esterilizada; cultura do *A. flavus* sem tratamento.

QUADRO III — Resumo e soma dos teores de aflatoxina encontrados no experimento de 1971/72 (em ppb).

Tratamento	Campo	N.º de amostras tóxicas	Aflatoxinas			
			B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1	Ribeirão Preto	2	450	64	1.350	450
	Caiabu	2	150	30	112	18
	Pirapozinho	5	48.000	16.996	79.348	10.860
2	Ribeirão Preto	3	91	0	97	9
	Caiabu	2	74	0	56	0
	Pirapozinho	5	49.400	5.070	41.699	11.605
3	Ribeirão Preto	3	1.575	275	167	36
	Caiabu	1	600	64	225	75
	Pirapozinho	5	42.750	2.330	26.435	5.322
4	Ribeirão Preto	0	0	0	0	0
	Caiabu	2	300	30	224	36
	Pirapozinho	5	61.800	4.288	45.450	6.134
5 (Test.)	Ribeirão Preto	1	37	0	112	37
	Caiabu	1	37	0	56	18
	Pirapozinho	5	110.250	19.189	76.349	11.948

QUADRO IV — Teor de aflatoxina encontrado nas amostras de Marília do experimento de 1972/73 (em ppb)

Tratamento	N.º de amostras tóxicas	Aflatoxinas			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1	0	0	0	0	0
2	2	75	0	0	0
3	1	900	0	225	0
4	1	300	0	700	75
5	0	0	0	0	0

4. Experimento de 1973/74

A colheita e secagem do único campo instalado em Ribeirão Preto decorreu em tempo seco, sem chuvas. Os resultados são os constantes do QUADRO V.

QUADRO V — Teor de aflatoxina encontrado nas amostras de Ribeirão Preto no experimento de 1973/74 (em ppb)

Tratamento	N.º de amostras tóxicas	Aflatoxinas			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1	3	3750	130	450	225
2	2	900	0	110	0
3	1	1200	64	0	0
4	1	600	30	110	37
5	2	1800	64	675	75

DISCUSSÃO

Como pode-se observar pelos quadros de resultados, embora os fungicidas escolhidos tenham se mostrado eficientes no controle do *A. flavus* "in vitro", não se pôde chegar a uma conclusão segura sobre a eficácia dos mesmos em situação de campo. Na safra de 70/71 as condições do tempo durante a colheita e secagem no campo foram excelentes e praticamente não houve produção de aflatoxina. Na safra de 1971/72 nos três campos, as condições foram adversas, com chuvas especialmente em Pirapozinho em que todas as parcelas, representando todos os tratamentos e todas as repetições revelaram a presença da aflatoxina em elevadas proporções.

Todavia, no caso de Pirapozinho, pode-se perceber que o tratamento testemunha (n.º 5) apresentou concentrações mais elevadas de aflatoxina que os tratamentos com fungicidas. Dentre estes, o que se mostrou mais eficiente foi o ortofenilfenato de sódio (tratamento n.º 3), confirmando os testes "in vitro".

Quanto aos testes realizados em 1972/73 e 1973/74, ambos foram inconclusivos como pode-se observar pelos QUADROS IV e V. As condições meteorológicas foram favoráveis e quase não houve produção de aflatoxina embora no último experimento tenham sido constatados teores mais elevados. Todavia em todos os tratamentos constatou-se

ocorrência de aflatoxina, verificando-se teores mais elevados no tratamento com Ferbam (n.º 1) situando-se em nível mais elevado que no Testemunha (n.º 5).

Estes resultados não estão completamente de acordo com os de BELL e DOUPNIK (1971) porém, como foi frisado anteriormente, estes autores conduziram o seu experimento em condições algo artificiais pois, 24 horas após pulverizarem as vagens com os fungicidas, fizeram uma inoculação com uma suspensão de esporos de *A. flavus*.

Além disso, mantiveram o amendoim coberto com um lençol de polietileno durante todo o tempo e 6 dias após a aplicação dos fungicidas analisaram o amendoim, tendo obtido êxito na contenção do *A. flavus*. As condições experimentais deste trabalho foram absolutamente iguais às usualmente empregadas pelos lavradores das regiões produtoras. Desta forma os autores são de opinião que, a tentativa de controle químico do *A. flavus* nas nossas condições de clima e operações pós-colheita visando inibir ou minimizar a ocorrência de aflatoxina, requer melhores estudos. Dentro do âmbito e condições deste experimento conclui-se que nos anos em que a colheita decorre em tempo seco, o uso de fungicidas seria dispensado pois as próprias condições do tempo concorrem para o não desenvolvimento do *A. flavus*, e nos anos ou ocasiões em que há excesso de chuvas na colheita parece haver lavagem dos fungicidas o que abre as portas aos fungos.

SUMMARY

CHEMICAL CONTROL OF *ASPERGILLUS FLAVUS* TO PREVENT PRODUCTION OF AFLATOXIN IN PEANUTS IN THE WINDROW

In the present work the possibility of chemical control of *Aspergillus flavus* to prevent the production of aflatoxin in peanuts, by spraying fungicides to the freshly-dug kernels in the windrow was studied.

Four efficient fungicides (Ferbam, Thiram, Sodium Ortophenilfenate and Captafol) screened by tests "in vitro" were used in experiments run for four years in the regions of Caiabú, Campinas, Marília, Pirapozinho and Ribeirão Preto.

From the results the Authors concluded, within the range and conditions of this experiment, that when the harvest is carried in rainy periods the fungicides seem to be inefficient, and when rains are absent, the weather condition by itself seems to inhibit the growth of *A. flavus* and prevent the occurrence of aflatoxin.

Nevertheless, the Authors suggest more studies on the subject.

LITERATURA CITADA

- ADRIAN, J. e R. JACQUAT, 1968. Les aflatoxines on les risques de toxicité de l'arachide. *In: Valeur Alimentaire de l'Arachide et des ses Derivées*. G. P. Maisonneuve & Larousse, Paris, 263 p.
- ALLCROFT, R. e R.B.A. CARNAGHAN, 1962. Groundnut toxicity. *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products: preliminary communications. *Vet. Rec.*, **74**(31): 863-4.
- ALLCROFT, R., H. ROGERS; G. LEWIS, J. NABNEY, e P.E. BEST, 1966. Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the "milk toxin". *Nature*, **209**:154-5.
- BELL, O.K. e B. DOUPNIK Jr.; 1971. Chemical treatment of peanuts in the windrow to control *Aspergillus flavus* and aflatoxins. *Journal APREA*, **3**(1):31-2.
- BIER, O., 1945. *Bacteriologia e Imunologia*. 2.^a ed. São Paulo. Edições Melhoramentos. 672 p.
- COMISSÃO DE SOLOS, 1960 Levantamento de Reconhecimento de Solos do Estado de São Paulo. Min. Agric. Serv. Nac. de Pesq. Agron., Rio de Janeiro. Bol. n.º 12.
- COOMES, T.J. e A.J. FEUELL, 1965. Recommended procedures for the detection of aflatoxin B₁ in groundnuts and groundnut materials. Tropical Products Institute, Report G13, Ministry of Overseas Development, Londres.
- COOMES, T.J., P.C. CROWTHER, A.J. FEUELL, e B.J. FRANCIS, 1966. Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxin. *Nature*, **209**: 406-7.
- FONSECA, H., 1968. Contribuição ao Estudo da Ocorrência de Aflatoxina em Tortas, Farelos e Farinhas de Amendoim (*Arachis hypogaea* L.) no Estado de São Paulo. ESALQ/USP, 64 p. Tese de Doutorado.
- FONSECA, H., 1969 a. Contribuição ao Estudo da Aflatoxina no Amendoim (*Arachis hypogaea* L.) da Colheita à Industrialização. ESALQ/USP, 98 p. Tese de Livre-Docência.
- FONSECA, H., 1969 b. Determinação físico-química da aflatoxina em amendoim e subprodutos. Bol. Tecn. Cient. n.º 34, ESALQ/USP, 9 p.
- FONSECA, H. e H. DEL NERY, 1970. Ocorrência de aflatoxina em pastas de amendoim. Anais da E.S.A.L.Q., Piracicaba, XXVII: 181-190.
- IONGH, H. de, R.O. VLES e J.G. Van PELT, 1964. Milk of mammals fed and aflatoxin — containing diet. *Nature*, **202**: 466-7.
- LEE, W. V., 1965. Quantitative determination of aflatoxin in groundnut products. *Analyst.*, **90**: 305-7.
- PELCZAR Jr., M.J. e R.D. REID., 1968. *Microbiology*. Mc Graw — Hill Book Co. Inc., New York. 564 p.
- SREENIVASAMURTHY, V. H.A.B. PARPIA, S. SRIKANTA e A. SHANKAR-MURTI, 1967. Detoxification of aflatoxin in peanut meal by hydrogen peroxide. *J. AOAC.*, **50**(2):350-4.
- STEINER, R. Y., M. DUODOROFF e E.A. ADELBERG, 1969. *Mundo dos Micróbios*. Ed. Edgar Blücher Ltda. São Paulo, 741 p.

