



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



## **DISSERTAÇÃO**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO  
DE PRODUTOS AGRÍCOLAS**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE QUALITATIVA  
E QUANTITATIVA DE AFLATOXINAS EM AMENDOIM**

**PRISCILA SIMONE RIBEIRO AIRES**

**Campina Grande, Paraíba  
Março, 2010**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE QUALITATIVA  
E QUANTITATIVA DE AFLATOXINAS EM AMENDOIM**

**PRISCILA SIMONE RIBEIRO AIRES**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola.**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:** Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas

**ORIENTADORES:** Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida (UFPG)  
Dr. Everaldo Paulo de Medeiros (EMBRAPA ALGODÃO)

**Campina Grande, Paraíba  
Março, 2010**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

A298d Aires, Priscila Simone Ribeiro.

Desenvolvimento de métodos para análise qualitativa e quantitativa de aflatoxinas em amendoim / Priscila Simone Ribeiro Aires. — Campina Grande, 2010.

61 f. : il. col.

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

Referências.

Orientadores: Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida, Dr. Everaldo Paulo de Medeiros.

1. Amendoim. 2. Grãos. 3. Micotoxinas. 4. Espectroscopia VIS e NIR. 5. Análise Multivariada 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

PRISCILA SIMONE RIBEIRO AIRES

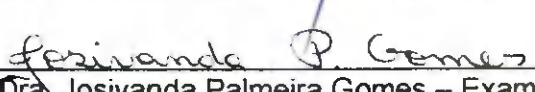
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE  
AFLATOXINAS EM AMENDOIM

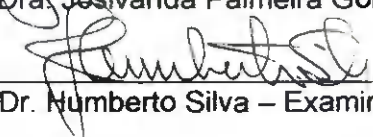
BANCA EXAMINADORA

PARECER

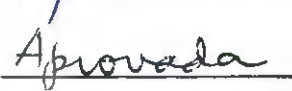
  
Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida – Orientador

  
Dr. Everaldo Paulo de Medeiros – Orientador

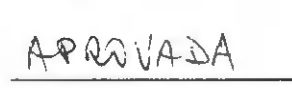
  
Dra. Josivanda Palmeira Gomes – Examinadora

  
Dr. Humberto Silva – Examinador









MARÇO - 2010

*Com carinho,*

*Ao meu Salvador Jesus Cristo, que sempre esteve comigo em todos os momentos, apoiando-me, confortando e me mostrando a cada dia um caminho melhor. Ao meu amado filho Matheus, agradeço todos os dias a Deus por ter sido escolhida para ser tua mãe; meu orgulho; minha vida. Ao meu amor, meu esposo Thiago, que é, sem dúvida, minha inspiração e o meu incentivo para que eu acredite sempre que posso ir além.*

*Dedico.*

## *Agradecimentos*

---

*A Deus, Todo Poderoso, Meu Porto-Seguro, Obrigada Deus! O Teu amor e a Tua força foram a minha maior motivação para a concretização deste trabalho.*

*À Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) pela oportunidade de cursar este mestrado.*

*À Embrapa Algodão, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, e pelo apoio financeiro, essencial para a conclusão desta pesquisa.*

*À CAPES, que durante dois anos me apoiou fielmente para que esta pesquisa fosse concluída com êxito.*

*A todos os professores do mestrado que me instruíram e através dos quais obtive conhecimentos que foram valiosíssimos, que farão parte da minha vida profissional.*

*Ao Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida que, paciente, esteve de prontidão para comigo.*

*Ao Dr. Everaldo Paulo de Medeiros, que me concedeu a grande oportunidade de realizar esta pesquisa, com ensinamentos essenciais para me tornar uma boa profissional.*

*Ao pesquisador Wirton Macedo Coutinho, por sua dedicação e grande incentivo, fundamentais para a realização desta pesquisa.*

*Às minhas amigas Rafaela e Gabriela, pela grande ajuda nos experimentos e pela maravilhosa companhia.*

*Às companheiras da Embrapa, Clébia, Libânea, Alessandra, Lígia, Camila, Geise, Edejane, Lane, Pollyne e Tatiana que, de forma direta ou indireta, me ajudaram na conclusão desta pesquisa.*

*Aos queridos professores Josivanda e Humberto, por terem aceitado gentilmente, o convite para participarem de minha banca.*

*À querida amiga Nara Wanderley, pela fiel amizade; saiba que onde eu estiver nunca a esquecerei e você estará sempre nas minhas orações, minha amiga.*

*A Thaíse, pela atenção, carinho e por ter sido uma grande companheira em todos os momentos.*

*Ao meu esposo, Thiago, por ter tido paciência comigo nas horas de estresse, por me haver auxiliado nos momentos em que mais precisei e por seu amor e companhia incondicional.*

*A meu Pai, João, e minha Mãe Sandra, que sempre estiveram dispostos a cuidar de meu filho durante todo o tempo que eu precisei.*

*A todos vocês, meu afeto e gratidão.*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1. Objetivo geral .....	14
1.2. Objetivos específicos.....	14
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1. A cultura do amendoim .....	15
2.1.1. Importância socioeconômica.....	15
2.1.2. Armazenamento.....	16
2.2. Micotoxinas .....	17
2.2.1. Aspectos gerais.....	17
2.2.2 Contaminação de amendoim por aflatoxinas .....	17
2.3. Espectroscopia eletrônica na região do visível e de vibração molecular no infravermelho próximo.....	19
2.4. Análise multivariada espectral .....	21
2.5. Modelagem por PCA - reconhecimento não supervisionado .....	23
2.6. Calibração multivariada.....	14
2.6.1. Método de regressão linear múltipla (MLR).....	24
2.6.2. Método de regressão por componentes principais (PCR) .....	25
2.6.3. Método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).....	26
2.7. Aplicações da espectroscopia VIS-NIR em grãos para classificação de fungos e predição de micotoxinas.....	27
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
3.1. Local de realização do experimento .....	28
3.2. Origem das sementes de amendoim .....	28
3.3. Tratamentos das sementes com irradiação .....	28
3.4. Isolado de <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	28
3.5. Preparo do inóculo em pó com <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	29
3.6. Inoculação dos grãos .....	30
3.7. Incubação.....	30



3.8. Determinação de umidade em ressonância magnética nuclear de baixo campo (RMN) .....	31
3.9. Determinação de aflatoxinas por CCD.....	31
3.9.1. Preparação dos padrões .....	31
3.9.2. Preparo dos grãos para análise .....	32
3.9.3. Extração das aflatoxinas.....	32
3.9.4. Identificação e quantificação das aflatoxinas .....	33
3.9.5. Obtenção dos espectros de reflectância na região VIS-NIR .....	35
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
4.1. Resultados de aflatoxinas em grãos de amendoim inoculados artificialmente .....	36
4.2. Perfil dos espectros brutos na região VIS-NIR .....	37
4.3. Pré-tratamento dos espectros brutos na região VIS-NIR .....	38
4.4. Análise de componentes principais (PCA).....	40
4.4.1. PCA de grãos inteiros na região do visível .....	40
4.4.2. PCA de grãos inteiros na região do infravermelho próximo.....	41
4.4.3. PCA de grãos triturados na região do visível .....	43
4.4.4. PCA de grãos triturados na região do infravermelho próximo.....	44
4.5. Calibração multivariada para predição não destrutiva de aflatoxinas .....	45
<b>5. CONCLUSÕES E PROPOSTAS FUTURAS.....</b>	<b>50</b>
5.1. Conclusões.....	50
5.2. Propostas futuras .....	50
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>55</b>
APÊNDICE – A: Fotos do processo de incubação do <i>A. parasiticus</i> e extração de aflatoxinas em grãos de amendoim .....	55
APÊNDICE – B: Tabela dos valores de aflatoxinas quantificados das amostras analisadas em relação ao dia de coleta .....	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura molecular das formas mais frequentes de aflatoxinas (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> ).....	18
<b>Figura 2</b> Ilustração do processo de medida por transmitância .....	20
<b>Figura 3.</b> Ilustração do processo de reflectância difusa por uma superfície sólida.....	21
<b>Figura 4.</b> Matriz de dados multivariados.....	22
<b>Figura 5.</b> Primeira e segunda PCs no espaço tridimensional das variáveis.....	23
<b>Figura 6.</b> Discos de papel de filtro contendo esporos de <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	30
<b>Figura 7.</b> A) Amostras de amendoim acondicionadas sobre uma cesta. B) Amostras de amendoim mantidas em câmara incubadora (BOD), contendo um litro de água destilada estéril em cada bandeja.....	31
<b>Figura 8.</b> XDS NIR Rapid Content™ Analyse.....	32
<b>Figura 9.</b> Esquema de uma cromatofolha para eluição bidirecional.....	34
<b>Figura 10.</b> Curva de produção de aflatoxina em relação ao dia de inoculação.....	36
<b>Figura 11.</b> Perfil dos espectros na região de 400 a 2500 nm dos grãos inteiros de amendoim com identificação dos espectros das amostras contaminadas e não contaminadas com <i>A. parasiticus</i> .....	37
<b>Figura 12.</b> Perfil dos espectros na região de 400 a 2500 nm dos grãos triturados de amendoim com identificação dos espectros das amostras contaminadas e não contaminadas com <i>A. parasiticus</i> .....	38
<b>Figura 13.</b> Espectros derivativos de 42 amostras de grãos inteiros de amendoim na região de 400 a 2500 nm após tratamento matemático com algoritmo de Savitzky-Golay e filtro com polinômio de segunda ordem. Nas regiões destacadas dos espectros são identificadas o grupo das amostras controle consideradas não contaminadas.....	39
<b>Figura 14</b> Espectros derivativos de 42 amostras de grãos triturados de amendoim na região de 400 a 2500 nm após tratamento matemático com algoritmo de Savitzky-Golay e filtro com polinômio de segunda ordem. Nas regiões destacadas dos espectros são identificadas o grupo das amostras controle consideradas não contaminadas.....	39
<b>Figura 15.</b> Gráfico dos escores PC1 vs PC2 com pré-tratamento dos espectros na região 400 a 800 nm para amostras de grãos inteiros.....	40
<b>Figura 16.</b> Gráfico dos loadings (pesos) PCA na região 400 a 800 nm para amostras	

de grãos inteiros.....	41
<b>Figura 17.</b> Gráfico dos escores PC1 vs PC2 com pré-tratamento dos espectros na região 1105 a 2494 nm para amostras de grãos inteiros.....	42
<b>Figura 18.</b> Gráfico dos loadings (pesos) PCA na região 1105 a 2494 nm para amostras de grãos inteiros.....	42
<b>Figura 19.</b> Gráfico dos escores PC1 vs PC2 com pré-tratamento dos espectros na região 400 a 800 nm para amostras de grãos triturados.....	43
<b>Figura 20.</b> Gráfico dos loadings (pesos) PCA na região 400 a 800 nm para amostras de grãos triturados.....	44
<b>Figura 21.</b> Gráfico dos escores PC1 vs PC2 com pré-tratamento dos espectros na região 1105 a 2494 nm para amostras de grãos triturados. C = controle, D=dia de amostragem, os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 se referem aos dias de amostragem.....	44
<b>Figura 22.</b> Gráfico dos loadings (pesos) PCA na região 1005 a 2494 nm para amostras de grãos triturados.....	45
<b>Figura 23.</b> Modelo PLS para valores medidos versus valores preditos de aflatoxinas totais (B1, B2, G1 e G2) na região de 400 a 800 nm usando-se 3 PCs com validação cruzada completa de dados. Os valores de unidade do gráfico são equivalentes para ambos os eixos em PPB.....	46
<b>Figura 24.</b> Modelo PLS para valores medidos versus valores preditos de aflatoxinas totais (B1, B2, G1 e G2) na região de 1105 a 2494 nm usando 3 PCs com validação cruzada completa de dados. Os valores de unidade do gráfico são equivalentes para ambos os eixos em ppb.....	46
<b>Figura 25.</b> Coeficientes de regressão em função das variáveis (comprimento de onda) para modelo PLS na região do visível.....	47
<b>Figura 26.</b> Coeficientes de regressão em função das variáveis (comprimento de onda) para modelo PLS do infravermelho próximo.....	48
<b>Figura 27.</b> Variância residual para os dados de referência como função do número de PCs da PLS para a região do visível.....	49
<b>Figura 28.</b> Variância residual para os dados de referência como função do número de PCs da PLS para a região do infravermelho.....	49

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES**

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**CTRN** - Centro de Tecnologia e Recursos Naturais

**EMBRAPA** - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**UFCG** - Universidade Federal de Campina Grande

**CCD** – Cromatografia de Camada Delgada

**HCA** – Hierarchical Clusters Analysis

**MLR** – Multiple Linear Regression

**NIR** – Espectrometria de Infravermelho Próximo

**PCA** – Principal Components of Analysis

**PCR** – Principal Components Regression

**PLS** – Partial Least Squares

**SIMCA** – Soft Independent Modelling of Class Analogy

## RESUMO

Os fungos da espécie *Aspergillus* não só constituem os principais contaminantes de sementes e grãos de amendoim em condições de armazenamento, Esses fungos se desenvolvem produzindo aflatoxinas que são metabólitos secundários de alta toxicidade. A dificuldade de detecção e quantificação de aflatoxinas diretamente na amostra é um fator limitante em muitas áreas de estudo e também da indústria. Com o avanço tecnológico novos métodos têm sido propostos para superar essa problemática. A espectroscopia de reflectância difusa no visível (VIS) e no infravermelho próximo (NIR) ocupa lugar de destaque por não requerer preparo da amostra e vantagens de ser rápida e não destrutiva. Objetivou-se neste trabalho estudar a incidência de *A. parasiticus* e dos níveis de aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados usando medidas de reflectância de 400 a 2500 nm. Os grãos de amendoim foram previamente irradiados com  $^{60}\text{Co}$  a 25 kGy e inoculados com cepa toxicogênica de *A. parasiticus* na concentração de  $3,0 \times 10^6$  esporos/ g de caulim em pó. Um total de 36 amostras com 200 g cada uma, foram distribuídas em 3 blocos. Para simular as condições ideais à produção de aflatoxinas, as amostras com 11% de umidade foram armazenadas no interior de câmaras incubadoras a temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de 85%, durante 16 dias. A cada dois dias de incubação realizou-se teste de sanidade, determinação do teor de umidade dos grãos, registro dos espectros na região de 400 a 2500 nm nos grãos inteiros e triturados, detecção e quantificação das aflatoxinas por CCD. As aflatoxinas foram detectadas em todas as amostras inoculadas numa faixa de concentração de 180 a 730000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os espectros foram pré-processados por algoritmo de Savitzky-Golay, primeira derivada, polinômio de segunda ordem e janela de 21 pontos. Os modelos de identificação de aflatoxinas em grãos e no material triturado, foram baseados na PCA dos espectros derivativos. A variância explicada foi superior a 98% para três PCs que permitiram identificar os tratamentos contaminados com *A. parasiticus*, como a detecção de aflatoxinas. Os modelos PLS para aflatoxinas totais forneceram coeficiente de correlação e RMSEP de 0,9827 e  $5,2 \times 10^4 \mu\text{g kg}^{-1}$  para a região VIS e 0,9540 e  $8,5 \times 10^4 \mu\text{g kg}^{-1}$  para o NIR. A concentração de aflatoxinas foi três vezes superior ao limite da ANVISA, no sexto dia após a incubação. A espectroscopia VIS-NIR com PCA e PLS permitiram uma rápida e não destrutiva classificação de amostras contaminadas e quantificação de aflatoxinas em grãos de amendoim contaminados artificialmente com *A. parasiticus*.

**Palavras-chave:** grãos, micotoxinas, espectroscopia VIS e NIR, análise multivariada.

## ABSTRACT

Fungi species of *Aspergillus* are the main contaminants of seeds and peanuts in storage conditions. These fungi grow produce aflatoxins are secondary metabolites of high toxicity. The difficulty of detection and quantification of aflatoxins directly in the sample is a limiting factor in many areas of study and also the industry. With technological advances, new methods have been proposed to overcome this problem. The diffuse reflectance spectroscopy of the visible (VIS) and near infrared (NIR) occupies a prominent place not require sample preparation and advantages of nondestructive and rapid. The objective of this work was to study the incidence of *A. parasiticus* and aflatoxin levels in peanuts stored using reflectance measurements of 400 to 2500 nm. The kernels were previously irradiated with  $^{60}\text{Co}$  to 25 kGy and inoculated with toxigenic strain of *A. parasiticus* concentration of  $3.0 \times 10^6$  spores / g of kaolin powder. A total of 36 samples with 200 g each were divided into 3 blocks. To simulate the ideal conditions to produce aflatoxins, samples with 11% moisture content were stored inside the incubator chamber at 30 °C, 12 h photoperiod and relative humidity of 85% for 16 days. Every two days of incubation was held health test, determining the moisture content of grain, record the spectra in the region of 400 to 2500 nm in the whole grain and ground detection and quantification of aflatoxins by DCC. Aflatoxins were detected in all samples inoculated at a concentration range from 180 to 730,000 mg kg<sup>-1</sup>. The spectra were pre-processed by algorithm Savitzky-Golay first derivative, second-order polynomial and a window of 21 points. Models for the identification of aflatoxins in grains and crushed material were based on PCA spectra derivative. The explained variance was above 98% for three PCs in identifying treatments infected with *A. parasiticus* and the presence of aflatoxins. The PLS models for total aflatoxins provided correlation coefficients and RMSEP of 0.9827 and  $5.2 \times 10^4$  g kg<sup>-1</sup> for the VIS region and 0.9540 and  $8.5 \times 10^4$  g kg<sup>-1</sup> for the NIR. The concentration of aflatoxins was three times higher than the limit of ANVISA the sixth day of incubation. The VIS-NIR spectroscopy with PCA and PLS allowed a rapid and non-destructive classification of contaminated samples and quantification of aflatoxins in peanut kernels artificially contaminated with *A. parasiticus*.

**Key-word:** kernel, mycotoxins, spectroscopy VIS and NIR, multivariate analysis

## 1. INTRODUÇÃO

---

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.), originário das Américas Central e do Sul, é uma leguminosa cultivada nas regiões de clima tropical, subtropical e temperada quente. No Brasil, sua produção vem crescendo significativamente, passando de 130 mil toneladas em 1998 para 280 mil em 2009 (CONAB, 2010).

Os grãos dessa oleaginosa são conhecidos e apreciados em todo o mundo pelo incomparável sabor e versatilidade de uso (SUASSUNA et al., 2005). Apesar das suas qualidades nutricionais, o amendoim é susceptível à contaminação por micotoxinas, que são metabólitos de baixa massa molecular, produzidos por fungos filamentosos em condições de ambiente específico, com alta toxicidade e poder carcinogênico ao homem e animais (CAST, 2003).

As aflatoxinas são as principais micotoxinas de maior perigo associado à cadeia produtiva do amendoim. A contaminação de amendoim por aflatoxinas é decorrente, principalmente de falhas no controle da umidade e temperatura, em diversas etapas da sua produção, que favorecem o desenvolvimento de fungos produtores dessas toxinas (SUASSUNA et al., 2005).

A associação de fungos em grãos de amendoim durante o armazenamento acelera o seu processo de deterioração, sendo uma das principais causas de perda qualitativa e quantitativa (AGRIANUAL, 2004). A contaminação fúngica resulta na diminuição da massa do produto estocado e em alterações indesejáveis na composição nutricional e propriedades químicas.

Embora existam muitas estratégias de manejo úteis para reduzir a contaminação por fungos e aflatoxinas em amendoim, a identificação e o controle ainda são as formas mais seguras e confiáveis para garantia de qualidade e maior valorização de seus produtos.

Um dos grandes desafios atuais para superar esses problemas é entender o comportamento dos fungos da espécie *Aspergillus* visando à melhoria das condições de armazenamento, assim como dispor de métodos adequados para garantir a qualidade de forma mais rápida, não destrutiva, *in situ* e de baixo custo.

Nos últimos anos, a espectroscopia de reflectância eletrônica-molecular no visível (VIS) e vibracional no infravermelho próximo (NIR), tem sido uma das técnicas mais empregadas para identificação, classificação de produtos e determinações multicomponentes, sem o uso de reagentes e preservando a constituição da amostra. Além

disso, esta técnica oferece a vantagem de ser rápida não destrutiva e não invasiva (SMALL, 2006).

A espectroscopia VIS-NIR, aliada aos métodos quimiométricos de análise multivariada, tem sido uma das técnicas analíticas mais promissoras para análises qualitativas (identificação e classificação) e quantitativas (determinação de concentração). Isto se justifica pelo grande número de aplicações em produtos agrícolas, alimentos, agricultura de precisão, meio ambiente e combustíveis, entre outras (PASQUINI, 2003).

Em sistemas biológicos para identificação de fungos e contaminações por aflatoxinas, a espectroscopia VIS-NIR tem sido citada como nova ferramenta de aplicação para classificação de fungos endofíticos em gramíneas, predição da concentração de aflatoxina B<sub>1</sub> em pó de pimentão vermelho e em grãos de milho e cevada (PETISCO et al., 2008; TRIPATHI e MISHRA, 2009; FERNÁNDEZ-IBAÑEZ et al., 2009).

Neste contexto, o uso de ferramentas espectroscópicas VIS-NIR de caráter não destrutivo em grãos de amendoim para classificação e quantificação da contaminação por aflatoxinas, não tem sido citado na literatura consultada.

## **1.1 Objetivo geral**

- Estudar a contaminação por aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados, inoculados artificialmente com *Aspergillus parasiticus* usando medidas de reflectância na região de 400 a 2500 nm e análise multivariada.

### **1.1.1 Objetivos Específicos**

- Estudar a produção de aflatoxinas em grãos de amendoim inoculados artificialmente com *Aspergillus parasiticus*, em condições controladas de armazenamento;
- Desenvolver um método não destrutivo e não invasivo aplicando a espectroscopia no visível e no infravermelho próximo e análise multivariada (PCA e PLS) para amendoim contaminado com *Aspergillus parasiticus*.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 A cultura do amendoim

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma leguminosa com processo especial de frutificação, denominado geocarpia, em que a flor aérea, após ser fecundada, produz um fruto subterrâneo. Suas flores são amarelas, agrupadas em número variável ao longo do ramo principal ou também dos ramos secundários, conforme a variedade ou o tipo vegetativo. Todas são potencialmente férteis e hermafroditas, autógamas, com baixa porcentagem de cruzamentos naturais. Seu período de florescimento é bastante dilatado, havendo épocas de aparecimento de maior número delas e seu fruto (vagem), é considerado botanicamente um legume (COOPERBIO, 2009).

A região Nordeste possui grande potencial para a cultura, devido às suas condições edafoclimáticas favoráveis e pela necessidade de diversificação agrícola, sobretudo no preenchimento de áreas de cultivo de cana-de-açúcar e algodão. A cultura tem ciclo curto, é de fácil manejo e possui mercado atraente. Cerca de 70% da área cultivável no Nordeste encontra-se em condições semiáridas, o que torna potencialmente interessante a produção dessa oleaginosa, desde que se tenham variedades adaptadas a essas condições (GODOY et al., 2005).

Os grãos de amendoim possuem um tegumento delicado, por isso o seu manuseio, durante o processamento, o armazenamento e o transporte, lhes causam sérias injúrias, provocando redução na qualidade fisiológica e na capacidade de armazenamento, além de favorecer a entrada de patógenos (SANDERS, 1995).

#### 2.1.1 Importância socioeconômica

A importância econômica do amendoim está relacionada, sobretudo, ao fato de seus grãos possuírem sabor agradável e alto teor protéico de 22 a 30%. O sabor agradável torna o amendoim um produto destinado também ao consumo *in natura*. Além do seu consumo, os grãos também podem ser utilizados para extração de óleo, empregado diretamente na alimentação humana, na indústria de conservas e em produtos medicinais (COOPERBIO, 2009).

Até o início dos anos 1970, o Brasil foi importante produtor de amendoim, com destaque expressivo tanto no suprimento interno de óleo vegetal quanto na exportação de

coprodutos. A maior produção ocorreu em 1972, com 970 mil toneladas, sendo que o principal produto era o óleo, muito utilizado na culinária. A partir de 1974, devido entre outros fatores, à contaminação por aflatoxina e a maior disponibilidade de óleo de soja, o preço do produto foi reduzido nos mercados interno e externo, desestimulando o plantio. A redução da área cultivada e de produção, no País perdurou fortemente até 1990 (SUASSUNA et al., 2006).

A produção total do amendoim brasileiro em 2009 foi de 295.704 t oriunda, em maior escala, da região Sudeste (82,8 %) seguida pela Sul (7,4 %), Centro-Oeste (6,0 %) e Nordeste (3,8 %). A primeira safra representa 82,7% da produção total com plantios realizados nos meses de outubro e novembro, principalmente nas regiões Sudeste e Sul. A segunda safra (17,3%) contempla os plantios realizados no mês de março nas regiões Sudeste e Nordeste (IBGE, 2009).

### 2.1.2 Armazenamento

No armazenamento do amendoim deve-se dar importância à adoção de práticas que possibilitem manter a qualidade dos grãos de um ano agrícola para outro, podendo o mesmo ser armazenado no próprio fruto ou como grãos e/ou, ainda, sementes (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

As condições ideais para a conservação de grãos e sementes são aquelas em que as suas atividades metabólicas são reduzidas ao mínimo, mantendo-se baixa umidade relativa e temperatura no ambiente de armazenamento (PEDROZA et al., 1999). Desta forma, a armazenagem adequada dos grãos evita perdas tanto no aspecto qualitativo como no quantitativo.

Neste contexto, a embalagem se constitui um dos fatores mais importantes durante o armazenamento em virtude de possuir maior proteção contra a umidade, insetos, roedores e danos no manuseio, além de oferecer facilidades de identificação, comercialização, manejo e tornar prático o transporte (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

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

## 2.2 Micotoxinas

### 2.2.1 Aspectos gerais

As micotoxinas são metabólitos secundários de baixa massa molecular, produzidos por alguns fungos filamentosos, que podem ser liberados ou não nos substratos nos quais eles se desenvolvem. Muitas micotoxinas possuem efeitos tóxicos e degenerativos ao consumidor, sendo nefrotóxicas e, possivelmente, carcinogênicas e teratogênicas. As aflatoxinas são as mais importantes micotoxinas encontradas em amendoim (DHINGRA e COELHO NETTO, 1998).

### 2.2.2 Contaminação de amendoim por aflatoxinas

As principais espécies fúngicas associadas com a contaminação por aflatoxinas em amendoim, são *Aspergillus flavus* Link e *Aspergillus parasiticus* Speare (RICHARD e PAYNE, 2003). Esses fungos possuem comportamento ecológico e biológico distintos durante o seu desenvolvimento em um substrato favorável à sua produção.

O *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 e COELHO NETTO, 1998). A nomenclatura B (cor azul: do inglês, blue) e G (cor verde: do inglês, green) refere-se à fluorescência que emitem quando expostas à radiação ultravioleta. A principal diferença entre essas formas de aflatoxinas está na toxidez de cada uma, sendo a aflatoxina B<sub>1</sub> a mais tóxica e a mais comum de se encontrar em grãos contaminados.

A associação de fungos toxicogênicos e grãos de amendoim pode ser um indicador da contaminação por aflatoxinas nos substratos podendo, muitas vezes, ser utilizado como método preventivo (FARIAS et al., 2000). Entretanto, a detecção de fungos toxicogênicos no produto analisado não significa necessariamente que serão detectadas micotoxinas, uma vez que existem cepas dentro de uma mesma espécie que não possuem a capacidade de produção de metabólitos tóxicos (RANJAN e SINHA, 1991).

No armazenamento o crescimento de *A. parasiticus* e *A. flavus* depende quase que exclusivamente do teor de água dos grãos em equilíbrio com a umidade relativa do ar, sendo que a temperatura interfere na velocidade de crescimento desses fungos. Assim, mantendo-se baixa a umidade relativa do ar, pode-se evitar o desenvolvimento de fungos

toxicogênicos e, em consequência, a produção de aflatoxinas (VÁZQUEZ-BARRIOS et al., 2001).

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 permitido, 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 possuir no máximo concentração de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  (ppb) para o somatório das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (Figura 1) (BRASIL, 2002).

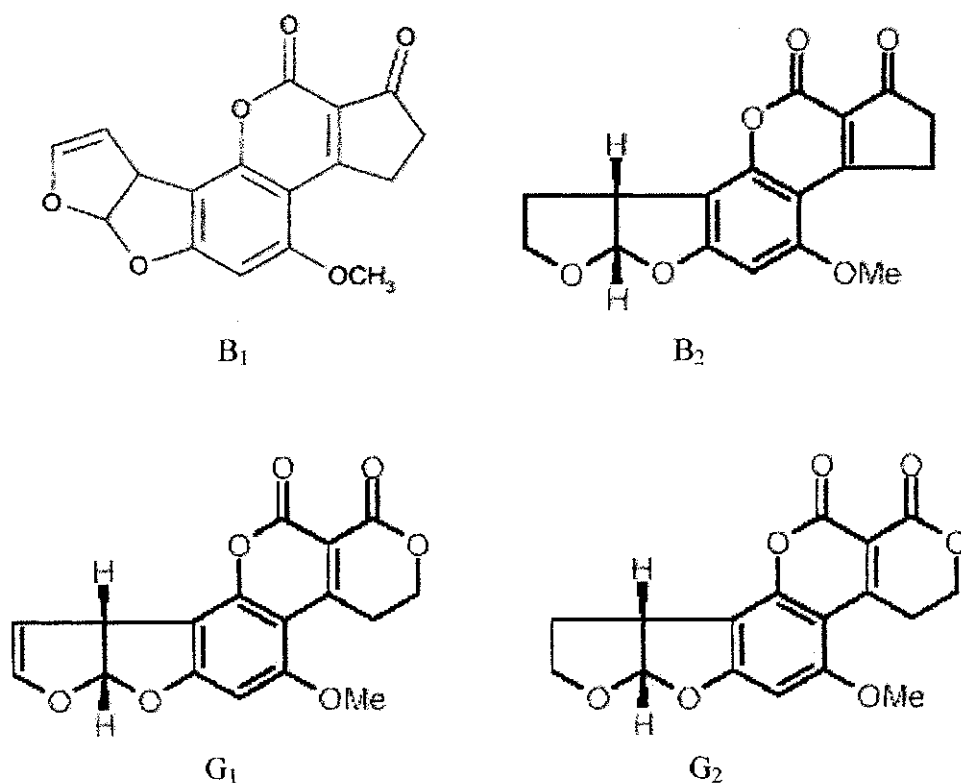


Figura 1. Estrutura molecular das formas mais frequentes de aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>).

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 *A. flavus* e/ou *A. parasiticus* nos grãos e, em consequência, a contaminação por aflatoxinas (DHINGRA e COELHO NETTO, 1998).

A contaminação de 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 desses poucos grãos ser elevada. 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 (FONSECA, 2002; WHITAKER, 2003).

A prevenção da contaminação por aflatoxina em grãos de amendoim pode ocorrer com a adoção de algumas práticas de produção, tais como: rotação de culturas, irrigação, suplementação de minerais e adoção de procedimentos adequados de colheita e secagem. Uma outra alternativa à prevenção da contaminação por aflatoxinas, principalmente durante o armazenamento, é o monitoramento do lote através de técnicas espectroscópicas, as quais usam processos não destrutivos e não invasivos na região do visível ou do infravermelho próximo, por meio de medidas de transmitância ou de reflectância difusa na determinação dos níveis de contaminação por aflatoxinas.

### **2.3 Espectroscopia eletrônica na região do visível e de vibração molecular no infravermelho próximo**

A espectroscopia é a ciência que estuda a interação da radiação eletromagnética (raios gama, raios X, ultravioleta, visível, infravermelho, microondas e ondas de rádio, entre outras) com a matéria em diferentes estados: gasoso, líquido e sólido (PAVIA et al., 2001).

No espectro eletromagnético, a região do visível (VIS) compreende uma estreita faixa espectral de 400 a 800 nm. Nessa região espectral observam-se os compostos ou materiais que interagem com a luz, os quais possuem cores características (violeta, azul, verde, amarelo, laranja, vermelha e púrpura) devido, em geral, a grupos cromóforos de alta densidade eletrônica. Os espectros gerados possuem bandas de absorção largas e sobrepostas. Alguns métodos analíticos bastante difundidos usam este princípio para análises colorimétricas em que o olho humano é o detector. Assim, essas medições são denominadas visuais e, em muitos casos, são dependentes da acuidade visual do observador. Atualmente, em decorrência do alto nível de instrumentação disponível, é possível empregar espectrômetros em substituição a análises visuais, de forma rápida, precisa e não destrutiva (SKOOG e ROLLER, 2005).

A região do infravermelho próximo (NIR) abrange a faixa espectral de 800 a 2500 nm em que ocorrem bandas de absorção correspondentes a sobretons e combinações das vibrações fundamentais de ligações C – H, O – H e N – H. Dentre as vantagens dessa

técnica, pode-se destacar: simplicidade no preparo das amostras, natureza não-invasiva e não-destrutiva com alta penetração da radiação na amostra, as medidas são rápidas, pode-se utilizar caminhos ópticos de tamanhos variáveis, além da simplicidade e robustez dos instrumentos quando comparados aqueles da região do infravermelho médio – MID, permitindo a monitoração em linha de processos de produção (KIM et al., 2007).

A região do visível, no entanto, possui algumas vantagens em relação ao infravermelho próximo. Destaca-se o baixo custo dos instrumentos, as medidas são mais simples, há grande viabilidade de desenvolvimento de instrumentos baseados em dispositivos de fácil aquisição. Como exemplo convincente, o uso de LEDs e de fototransistores para desenvolvimento de instrumentos fotométricos simples e de baixo custo (GAIAO et al., 2005).

Os processos não destrutivos e não invasivos que empregam a região do visível ou do infravermelho próximo, usam, em sua maioria, medidas de transmitância ou de reflectância difusa (SKOOG e HOLLER, 2005).

As medidas de transmitância estão baseadas na lei de Beer entre a potência da radiação transmitida através da amostra pela potência da radiação incidente (Figura 2). A transmitância é definida pela expressão  $T=P/P_0$  e por definição a absorbância da amostra é obtida pela expressão:  $A= - \log T$ . A absorbância é a entidade que é diretamente proporcional à concentração da espécie avaliada na amostra, sendo que  $A=\epsilon bC$ , em que  $\epsilon$  é o coeficiente de absorvidade molar da espécie química,  $b$  o caminho óptico e  $C$ , a concentração; referidas medidas requerem geralmente que a amostra esteja em solução líquida ou que permita a passagem do feixe radiação.

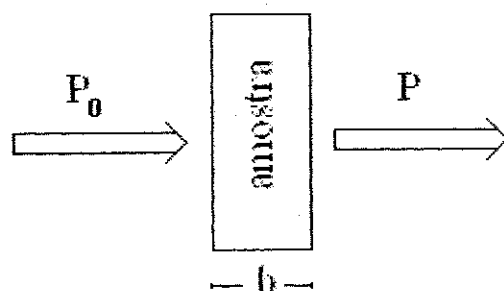


Figura 2. Ilustração do processo de medida por transmitância

Em medidas de sólidos, como sementes e grãos, o processo mais utilizado é por reflectância difusa para determinações não destrutivas e não invasivas. O fenômeno da reflectância é observado quando uma fração da radiação incidente sobre uma superfície de um sólido é refletida e a fração complementar é absorvida pela amostra. Na Figura 3, ilustra-se a ocorrência do processo de reflectância difusa causada pelo feixe F1.

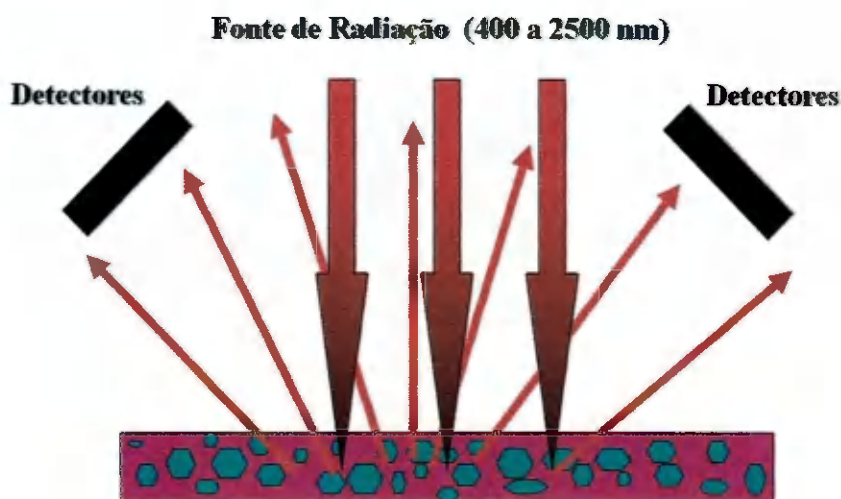


Figura 3. Ilustração do processo de reflectância difusa por uma superfície sólida

Para este fenômeno emprega-se o modelo proposto por Kubelka – Munk (KESSLER et al., 2009). Uma função de R é obtida para estabelecer uma relação entre a radiação incidente e a radiação absorvida.

#### 2.4 Análise multivariada espectral

Um espectro de uma amostra pode ser avaliado de forma univariada usando um único comprimento de onda, ou de forma multivariada, com todos os comprimentos de onda. A vantagem da análise multivariada é gerar um conjunto maior de informação sobre a constituição da amostra. A avaliação de um espectro de varredura do visível ao infravermelho próximo de 400 a 2500 nm, em um espectrômetro de resolução igual a 0,5 nm, produz um conjunto de 4200 variáveis contínuas que podem estar associadas a pigmentos coloridos e/ou grupos químicos funcionais característicos. Importantes estratégias podem ser desenvolvidas para classificação ou identificação de padrões. A modelagem de um elevado número de variáveis deve ser realizada por técnicas estatísticas e matemáticas (BEEBE et al., 1998).

Uma matriz para distribuir as variáveis dependentes e independentes, é sempre requisitada. A formatação das matrizes segue um formato análogo ao da Figura 4, em que cada amostra, por exemplo, é representada pelas linhas e suas variáveis (comprimentos de onda) distribuídas ao longo de colunas. Em medidas espectrais, as absorbâncias ou transmitâncias obtidas para cada comprimento de onda.

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}_1 \\ \mathbf{X}_2 \\ \vdots \\ \mathbf{X}_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}_{11} & \mathbf{X}_{12} & \dots & \mathbf{X}_{1m} \\ \mathbf{X}_{21} & \mathbf{X}_{22} & \dots & \mathbf{X}_{2m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \mathbf{X}_{n1} & \mathbf{X}_{2n} & \dots & \mathbf{X}_{nm} \end{bmatrix}$$

Figura 4. Matriz de dados espectrais multivariados

As principais ferramentas usadas na análise multivariada para reconhecimento de padrão, são: Análise de Componentes Principais (Principal Components of Analysis - PCA) e HCA (Hierarchical Cluster Analysis) para análise não supervisionada; e o SIMCA, que é a principal técnica para o desenvolvimento de modelos supervisionados (SMALL, 2006).

Na construção dos modelos de calibração multivariada usam-se, com frequência, as técnicas de Regressão Linear Múltipla (MLR), Regressão em Componentes Principais (PCR) e Regressão em Mínimos Quadrados Parciais (PLS) (BRERETON, 2003). A validação desses modelos é realizada a partir da capacidade preditiva do modelo pelo erro médio quadrático de predição (RMSEP). Em geral, faz-se necessário um conjunto de validação externa para verificar o erro relativo obtido da comparação dos resultados de outras medidas realizadas.



## 2.5. Modelagem por PCA – reconhecimento não supervisionado

A PCA é uma técnica de reconhecimento de padrão não-supervisionado, cujo princípio é modelar matematicamente um conjunto de dados de natureza multivariada, objetivando-se a redução da dimensionalidade das variáveis e representação das variações existentes na forma de componentes principais (PCs) (Figura 5) (BEEBE et al., 1998).

As PCs são as representações dos novos eixos formados a partir da combinação linear das variáveis originais e nelas estão contidas as informações mais relevantes dos dados. Elas são sempre ortogonais (perpendiculares) umas às outras, e sucessivas PCs descrevem quantidades decrescentes da variância explicada dos dados. Em geral, poucas PCs são necessárias para que toda ou a maior parte da variância dos dados seja explicada (FERREIRA et. al., 1999).

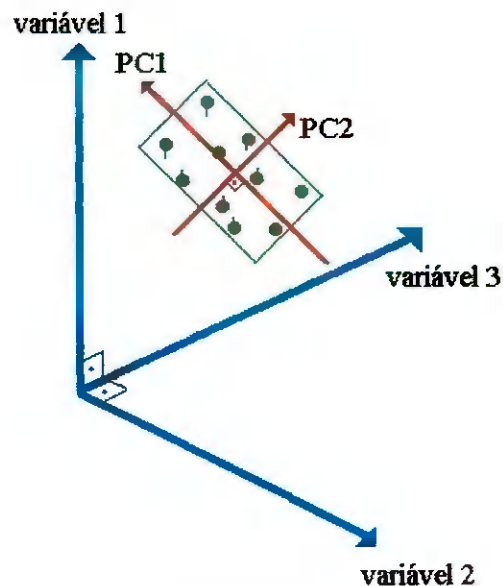


Figura 5. Primeira e segunda PCs no espaço tridimensional das variáveis

Da mesma forma que as amostras têm coordenadas definidas pelas variáveis originais, elas também as possuem em relação aos novos eixos (PCs) e são denominadas escores. A contribuição que cada variável original exerce sobre uma PC, é denominada peso (do inglês: *loading*) que, matematicamente, pode ser definida como sendo o cosseno do ângulo entre o eixo da variável e o eixo da PC. Se determinado número de PCs não conseguir descrever toda a variância dos dados, então essa parte não descrita será representada em uma nova matriz chamada resíduos (BEEBE et al., 1998).

PCA é uma técnica bastante utilizada como base para outras técnicas quimiométricas multivariadas como, por exemplo, o SIMCA, que é uma técnica de reconhecimento de padrão supervisionado.

## 2.6 Calibração multivariada

O uso dos métodos espectroscópicos em análise quantitativa, geralmente está associado ao uso de ferramentas quimiométricas. Modelos de calibração por PLS (*Partial Least-Square Regression* - regressão por mínimos quadrados parciais) são os mais utilizados e estão intimamente relacionados a outros modelos de calibração multivariada, tais como o MLR (Multiple Linear Regression), o PCR (Principal Components Regression).

Em sistemas químicos a concentração de uma ou mais espécies pode ser estimada a partir da medida das propriedades deste sistema, tal como a absorção de radiação eletromagnética, que possui relação linear entre o espectro e a concentração da amostra, conhecida como lei de Beer-Lambert que, matematicamente, pode ser descrita como:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} b C$$

em que  $A_{\lambda}$  corresponde ao valor da absorvância em um comprimento de onda específico,  $\epsilon_{\lambda}$  corresponde à absorvância molar do material nesse comprimento de onda,  $b$  é o caminho óptico e  $C$ , a concentração da amostra.

### 2.6.1. Método de regressão linear múltipla (MLR)

Neste método deve-se atentar para algumas observações:

- Será necessário um número de amostras (variável dependente - linhas) maior que as variáveis independentes (colunas),
- A variável independente não deve possuir colinearidade, duas colunas ou duas linhas linearmente independentes.

O processo matemático consiste em obter os coeficientes para elaborar as equações de regressão. Desta forma:

$$\begin{aligned} X\hat{b} &= y \\ X^T X\hat{b} &= X^T y \\ \hat{b} &= (X^T X)^{-1} X^T y \end{aligned}$$

Os modelos MLR usam toda a informação disponível na sua elaboração razão por que possuem menor erro, devido a desvios tendenciosos, o que lhes poderá fornecer maior intensidade de ruído.

Uma das principais ferramentas de diagnóstico é o RMSEP, empregado para avaliar sua capacidade preditiva.

Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Predição (RMSEP) – tem a dimensão de desvio padrão e define a incerteza na curva de regressão; dada pela expressão:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{amostras}} (C_{i,cal} - \hat{C}_{i,cal})^2}{n_{amostras} - (n_{variáveis} + 1)}}$$

em que:  $C_{i, cal}$  é a propriedade medida (variável dependente) da  $i$ -ésima amostra de calibração;  $\hat{C}_{i,cal}$  é a propriedade ajustada para a  $i$ -ésima amostra,  $n_{amostras}$  e  $n_{variáveis}$  do conjunto de calibração (BRERETON, 2003).

### 2.6.2. Método de regressão por componentes principais (PCR)

O método da regressão dos componentes principais utiliza as variações espectrais para calcular as equações de calibração. Como as variações mais significativas no conjunto de calibração são as mudanças no espectro relacionadas às diferentes concentrações das amostras, é possível calcular um conjunto que represente as mudanças nas absorvâncias em todo o espectro. Essas variações são conhecidas como autovetores (componentes principais ou fatores) e as constantes utilizadas para multiplicar os espectros são conhecidas como *scores*.

Uma das formas de se calcular os autovetores do espectro, é através do método de análise dos componentes principais (PCA). O PCA possui como vantagens, a detecção de *outliers* (amostras que não respondem bem ao modelo de calibração) e a possibilidade de classificação e predição de resultados.

O PCA é, basicamente, um processo de eliminação que permite criar um conjunto de autovetores que representem as mudanças comuns a todos; geralmente os dados são centrados na média. Quando os dados são processados pelo método, são criadas duas matrizes principais, os autovetores e os *scores*. A expressão para a matriz se reduz a:

$$A = SF + E_A$$

Em que  $A$  é a matriz ( $n \times p$ ) de absorvâncias espectrais,  $S$  é a matriz ( $n \times f$ ) dos valores de *score* para cada espectro e  $F$  uma matriz ( $f \times p$ ) dos autovetores.  $E_A$  é a matriz de resíduos espectrais. Neste caso,  $n$  = número de espectros,  $p$  = número de comprimentos de onda selecionados para a calibração e  $f$  = número de fatores

A principal vantagem da regressão dos componentes principais (PCR) é não requerer seleção do comprimento de onda e sua desvantagem é requerer um grande número de amostras para um modelo robusto.

### 2.6.3 Método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS)

O método da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) vem ganhando destaque nos últimos anos, pois apresenta muitos benefícios que os demais métodos de regressão multivariada. Os algoritmos PCR e PLS são parecidos, visto que ambos utilizam técnicas de decomposição espectral mas no PLS a decomposição espectral é realizada de outra forma, uma vez que este método considera a informação das concentrações das amostras de calibração na decomposição, o que resulta em pesos maiores para espectros com concentrações do analito mais altas e dois conjuntos de vetores e *scores*, um para os dados espectrais e outro para as concentrações. Os passos de decomposição ocorrem simultaneamente e, como resultado, as equações do modelo são mais complexas que as de PCR (GELADI e KOWALSKI, 1986)

Nos modelos PLS as componentes principais são obtidas pela modelagem das matrizes das variáveis X e Y. Em relação ao modelo PCR, o PLS requer menor número de PCs para definir um modelo. Existem dois tipos de modelo PLS: o PLS 1, utilizado para uma variável dependente, e o PLS 2, para mais variáveis, respectivamente.

As matrizes X e Y são decompostas simultaneamente em uma soma de “h” variáveis latentes ou fatores, como nas equações a seguir:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} = \mathbf{S} \mathbf{t}_h \mathbf{p}'_h + \mathbf{E}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} = \mathbf{S} \mathbf{u}_h \mathbf{q}'_h + \mathbf{F}$$

Os termos T e U correspondem aos escores das matrizes X e Y. P e Q são as matrizes de loadings das matrizes X e Y; E e F são os resíduos. Entre as matrizes X e Y são obtidos os parâmetros de regressão que empregam algoritmos. A complexidade desses cálculos pode ser minimizada com o uso de softwares quimiométricos.

## **2.7 Aplicações da espectroscopia VIS-NIR em grãos para classificação de fungos e predição de micotoxinas**

Nos últimos anos novos métodos têm sido propostos na literatura científica para classificação de fungos e quantificação de micotoxinas diretamente em grãos, sem destruir a amostra. Algumas estratégias vêm sendo estudadas com este propósito, as quais têm combinado medidas espectrais na região VIS-NIR e análise multivariada (PETTERSSON e ABERG, 2003; BERARDO et al., 2005; PETISCO et al., 2008; FERNÁNDEZ-IBAÑEZ et al., 2009; JIN et al., 2009).

Na literatura consultada o primeiro registro de classificação de fungos morfológicamente semelhantes por medidas espectrais e análise multivariada foi desenvolvido empregando a região de 400 a 2500 nm e a técnica de reconhecimento de padrão SIMCA (PETISCO et al., 2008). Mais recentemente, se propôs uma nova maneira de classificação e identificação de linhagens tóxicas de *A. flavus* com imagem hiperespectral e PCA, além de seleção de variáveis pelo algoritmo genético (JIN et al., 2009).

O potencial da espectroscopia VIS-NIR também vem sendo estudada com maior predominância na predição de micotoxinas em diversos tipos de grãos. Como exemplos de aplicações, a predição de deoxinivalenol (DON) em grãos de trigo infectados artificialmente com *Fusarium culmorum* (PETTERSSON e ABERG, 2003) e a detecção de aflatoxina B<sub>1</sub> em grãos mofados de milho (BERARDO et al., 2005). Mais recentemente, a espectroscopia VIS-NIR foi aplicada como ferramenta de detecção não destrutiva e rápida de aflatoxina B<sub>1</sub> em grãos de milho e cevada (FERNÁNDEZ-IBAÑEZ et al., 2009).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 3.1 Local de realização do experimento

O trabalho foi desenvolvido na Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola (UAEA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), no Laboratório de Fitopatologia e no Laboratório Avançado de Tecnologia Química (LATECQ), da Embrapa Algodão, em Campina Grande, Paraíba.

#### 3.2 Origem das sementes de amendoim

Utilizaram-se sementes de amendoim cedidas pela Embrapa Algodão, da cultivar BRS Havana (safra 2006/ 2007), produzidas em área experimental no município de Mogeiro, PB.

#### 3.3 Tratamento das sementes com irradiação

As sementes foram descascadas manualmente, para evitar danos; posteriormente, o lote de 7.200 g de sementes de amendoim foi dividido em porções de 200 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.

Cada porção de 200 g foi tratada com radiação gama de 25 kGy (Kilogray) no irradiador de cobalto 60 ( $^{60}\text{Co}$ ) do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, para eliminar todos os microrganismos associados aos grãos.

Os grãos de amendoim utilizados neste estudo, foram previamente analisados quanto à contaminação por aflatoxinas.

#### 3.4 Isolado de *Aspergillus parasiticus*

Utilizou-se uma cepa toxicogênica de *A. parasiticus* (#IM1242625) oriunda do International Mycological Institute, Inglaterra, produtora das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, a qual foi isolada de pistache (*Pistacia vera* L.).

### 3.5 Preparo do inóculo em pó com *Aspergillus parasiticus*

O fungo foi repicado em meio Czapeck-Agar e incubado em câmara tipo BOD (temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h) durante sete dias. Após este período, uma suspensão foi preparada contendo 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-Ágar com uma alça de Drigalski e a suspensão resultante filtrada em uma camada dupla de gaze esterilizada. A suspensão de conídios foi adicionada em meio Czapeck-Ágar fundido (temperatura de 45 °C) e homogeneizado; em seguida, discos de papel de filtro de 3,0 cm de diâmetro previamente esterilizados, foram mergulhados na suspensão de esporos ao meio de cultura e distribuídos em placas de Petri esterilizadas de 9,0 cm de diâmetro.

As placas foram mantidas em câmaras incubadoras na temperatura de 28 °C, durante 10 dias, período necessário para secar totalmente o meio de cultura sobre o papel de filtro e ocorrer abundante esporulação do fungo. Após esse período, foram escolhidos dois discos de papel de filtro com esporulação semelhante de *A. parasiticus* sobre o papel; um desses discos foi utilizado para preparar a suspensão de conídios em 5,0 g de água destilada esterilizada, contida em um béquer e o outro disco utilizado para preparar o inóculo em pó do fungo (Figura 6).

No disco de papel de filtro utilizado para preparar o inóculo em pó, os esporos foram liberados das colônias contidas na superfície do papel, com uma escova esterilizada para 5,0 g de caulim (produto inerte), previamente esterilizado. Em um 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 caulim (estimativa indireta). A concentração de conídios neste produto foi ajustada para  $30 \times 10^5$  esporos/g caulim em pó.



**Figura 6.** Discos de papel de filtro contendo esporos de *Aspergillus parasiticus*

### **3.6 Inoculação dos grãos**

Na inoculação dos grãos foi utilizado 1,0 g do inóculo em pó de *A. parasiticus* com  $30 \times 10^5$  esporos/g de caulim para cada 1,0 kg de grãos de amendoim. O inóculo em pó de *A. parasiticus*, foi adicionado aos grãos de amendoim contidos em sacos plásticos e homogeneizados até total cobertura dos grãos pelo produto.

### **3.7 Incubação**

Os grãos de amendoim foram incubados em três câmaras tipo BOD com condições de umidade e temperatura ótimas para a produção de micotoxinas. Para isto, foram ajustados a umidade relativa do ambiente superior a 85% e a temperatura de  $30 \pm 2$  °C. As amostras com 800 g de grãos, fracionados em porções de 200 g, foram acondicionadas sobre uma cesta de polietileno trançado, de modo a não permitir seu contato com a bandeja que foi disposta abaixo de cada cesta, contendo um litro de água destilada e previamente esterilizada (Figura 7).





**Figura 7.** A) Amostras de amendoim acondicionadas sobre uma cesta. B) Amostras de amendoim mantidas em câmara incubadora (BOD)

As condições adequadas de umidade foram alcançadas quatro dias após a incubação; após esse período, 200 g dos grãos foram retirados de cada cesta, totalizando seis amostragens por dia com frequência de 2 dias, até o décimo sexto dia após a incubação, para avaliação da sanidade, detecção e quantificação das aflatoxinas associadas aos grãos.

### **3.8 Determinação de umidade em ressonância magnética nuclear $^1\text{H}$ de baixo campo**

Realizou-se a determinação da umidade por RMN  $^1\text{H}$  nas amostras de grãos inoculados desde o primeiro dia de incubação dos grãos e cada amostragem para avaliação da sanidade, detecção e quantificação das aflatoxinas associadas aos grãos.

Nos dias de amostragem retiravam-se duas frações dos grãos (50 g) de cada câmara incubadora tipo BOD e determinava-se a umidade, totalizando seis porções de amendoim.

### **3.9 Determinação de aflatoxinas por Cromatografia de Camada Delgada**

#### *3.9.1 Preparação dos padrões*

Os padrões de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> na forma de cristais utilizados neste trabalho, foram adquiridos da marca Sigma (Sigma Co, USA). A dissolução dos padrões foi feita em solução 10% (v/v) de acetonitrila em tolueno prepara a cada dia de

quantificação. As concentrações das soluções dos padrões B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> eram 0,015 µg/ kg<sup>-1</sup> e de B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> de 0,010 µg/ kg<sup>-1</sup>. Todos os reagentes eram de grau analítico.

### 3.9.2 Preparo dos grãos para análise

Para cada câmara tipo BOD foram retiradas duas porções de 200 g de grãos de amendoim, aleatoriamente, em que cada porção era medido o espectro de reflectância na região de 400 a 2500 nm no XDS NIR Rapid Content™ Analyse (Figura 8). Para a amostra foram realizadas cinco repetições autênticas; posteriormente, os grãos foram triturados e peneirados em malha de 14 mesh; depois de peneirados, foi retirada de cada tratamento, uma porção de 50,0 g para a realização da extração e quantificação de aflatoxinas; o restante da amostra triturada foi analisado novamente na região de 400 a 2500 nm, com cinco repetições para efeito de comparação dos resultados nos grãos inteiros.



Figura 8. XDS NIR Rapid Content™ Analyse, 2010

### 3.9.3 Extração das aflatoxinas

Para as extrações das aflatoxinas adotou-se a metodologia descrita em Brasil (2000) modificada (IN n.º. 09, de 24 de março de 2000, DOU Seção 1, p. 35-41, 30 mar. 2000). Utilizaram-se 50,0 g de grãos triturados e peneirados, retirados das porções de 200 g de grãos preparadas conforme metodologia descrita no item 3.9.2, deste trabalho; aos 50,0 g foram adicionados 30 mL de solução aquosa a 4% (m/v) de KCl e 270 mL de metanol. A mistura foi agitada em um liquidificador, em velocidade baixa, durante 5 min; após este

período, a mistura foi filtrada em papel de filtro qualitativo pregueado, e uma amostra de 150,0 mL do filtrado foi transferida para um recipiente de 600,0 mL. Realizado este procedimento, adicionaram-se 150,0 mL da solução a 30% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e cinco minutos depois, 5 g de ceite.

A solução obtida foi filtrada em papel de filtro qualitativo pregueado, e 150,0 mL do filtrado foi transferido para um funil de separação de 500,0 mL, adicionando-se 150,0 mL de água destilada e 50,0 mL de hexano. O funil com a solução foi agitado durante um minuto.

Após a separação das fases, foi recolhida a amostra e o hexano separadamente, sendo esse processo repetido por mais duas vezes. Realizado esse procedimento foram adicionados 10,0 mL de clorofórmio ao funil de separação, agitando-o vigorosamente durante três minutos; após a separação das fases (mínimo de cinco minutos de tempo decorrido), recolheu-se toda a fase clorofórmica para um frasco de 50 mL, procedimento repetido mais uma vez. A fase clorofórmica foi homogeneizada e, com uma pipeta volumétrica, retirou-se uma alíquota de 10,0 mL, a qual foi transferida para um frasco de 15 mL. Para concentração das aflatoxinas, o solvente utilizado foi evaporado utilizando-se um sistema confeccionado em laboratório de secagem por jato de ar em banho controlado a 60 °C, durante 30 minutos.

Após a pré-concentração as amostras foram mantidas sob refrigeração em refrigerador até o momento da análise cromatográfica, quando o concentrado foi ressuspenso em 200 µL de solução a 10% (v/v) de acetonitrila em tolueno, agitando-se durante 30 s em equipamento Vortex.

#### *3.9.4 Identificação e quantificação das aflatoxinas*

A análise de aflatoxinas nos grãos foi realizada por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se cromatofolhas de alumínio da marca Merck (KIESEL GEL-60/1.05553), com comprimento e largura de 10 cm e espessura de 0,2 mm.

As cromatofolhas foram marcadas a 1,5 cm da margem (ponto de partida - PP), distanciando-se 7 cm da linha de chegada da fase móvel (LC) e a separação de 1 cm para a aplicação dos padrões e das amostras (Figura 9).

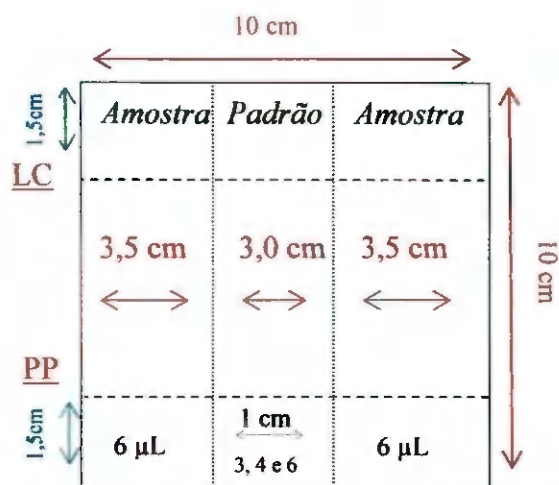


Figura 9. Esquema de uma cromatofolha para eluição bidirecional

Nas cromatofolhas foram aplicados 6 µL das amostras e 3, 4 e 6 µL dos padrões B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> (15 µg mL<sup>-1</sup>), B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> (10 µg mL<sup>-1</sup>), distribuídos em pontos previamente marcados nas cromatoplas. Após a aplicação dos padrões e das amostras, realizou-se a eluição bidirecional utilizando-se para isto uma cuba de vidro com solução 10% (v/v) de acetona em clorofórmio e, em seguida, outra cuba contendo o eluente tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (5:4:1). Feita a eluição, a cromatofolha foi retirada da cuba e, após a evaporação da solução, a mesma foi colocada na câmara com luz ultravioleta de 366 nm para observação da presença de manchas fluorescentes indicativas de aflatoxinas.

A concentração de cada aflatoxina detectada foi calculada 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<sup>-1</sup>)

S - volume em µL do padrão de aflatoxina 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

### *3.9.5 Obtenção dos espectros de reflectância na região VIS-NIR*

Os espectros de transição eletrônica (VIS) e vibracionais (NIR) foram obtidos em condições otimizadas de: i) quantidade mínima de amostra 150,0 g; ii) região espectral (400 a 2500 nm); iii) resolução de medida 0,5 nm ; iv) cinco repetições de espectros por amostra e v) temperatura 25 °C.

Para o pré-tratamento dos espectros foram aplicadas técnicas para correção de linha de base e de alisamento para remoção de ruído espectral empregando-se o algoritmo Savitzky-Golay e derivada de primeira ordem.

Para o desenvolvimento dos métodos de identificação, classificação e seleção, foram aplicadas técnicas de reconhecimento usado análise exploratória com base nos espectros das amostras. Neste propósito, foi empregou-se a análise de Componentes Principais (PCA).

A construção do modelo de calibração multivariada empregou os valores de referência de aflatoxinas por CCD em conjunto com os espectros e regressão em mínimos quadrados parciais (BRERETON, 2003).

O tratamento e os cálculos quimiométricos (estatísticos e matemáticos) de modelagem foram realizados com o software comercial Unscrambler® 9.8 (CAMO S.A, 2007).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Resultados de aflatoxinas em grãos de amendoim inoculados artificialmente

Os resultados de aflatoxinas em grãos de amendoim foram obtidos por CCD nas amostras coletadas após seis dias de incubação do *A. parasiticus*. Os valores quantificados das amostras analisadas em relação ao dia de amostragem, estão detalhados no Apêndice B.

O alto valor da concentração de aflatoxinas detectadas ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  e  $G_2$ ) se deve à elevada esporulação do *A. parasiticus* nas condições ideais para seu desenvolvimento, as quais foram de 85% umidade relativa, umidade do grão superior a 11% e temperatura de  $30 \pm 2$  °C.

Nas condições de estudo dos grãos armazenados com inoculação artificial verificou-se que, a partir do sexto dia, ocorreu produção de aflatoxina em 97% das amostras com nível superior a  $180 \mu\text{g kg}^{-1}$  (ppb) para o somatório das quatro aflatoxinas detectadas. De acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2002), o limite de tolerância para aflatoxinas em grãos de amendoim a serem consumidos e comercializados, é de 20 ppb considerando-se a concentração total de aflatoxinas.

Um comportamento exponencial foi observado na concentração média de aflatoxina gerada ao longo do período de inoculação do fungo (Figura 10).

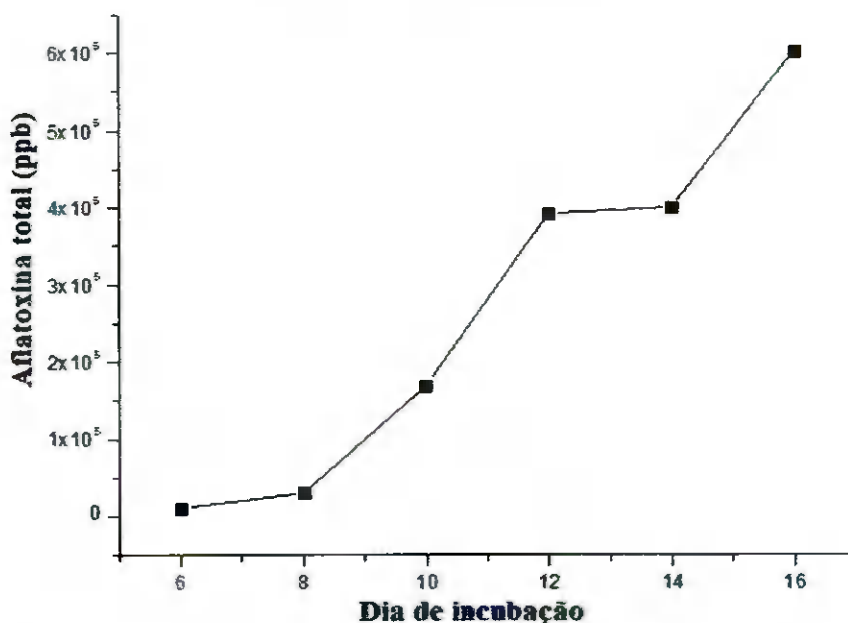


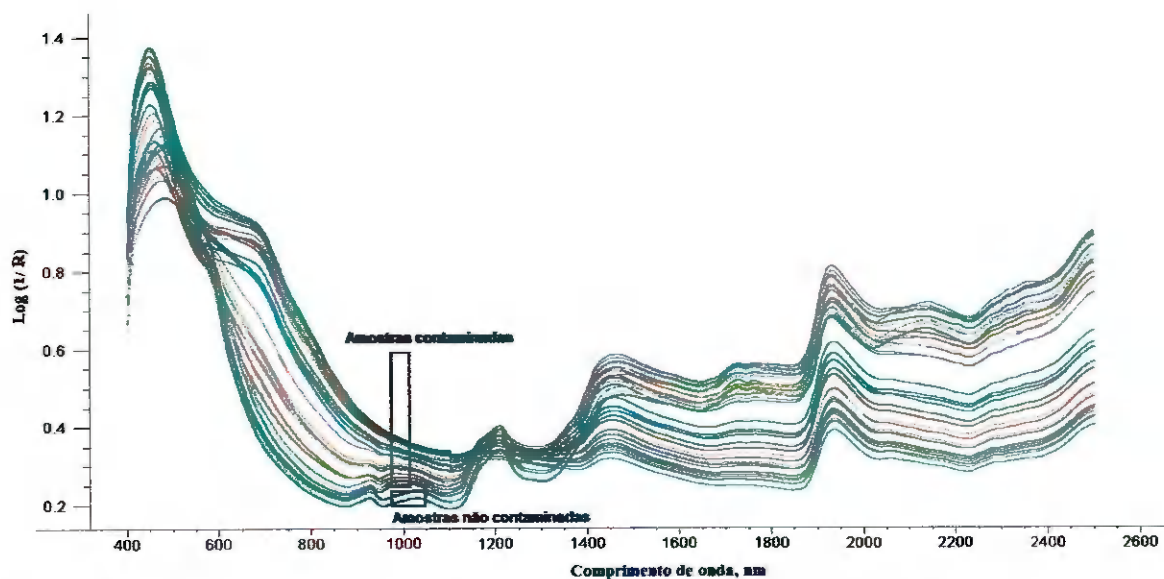
Figura 10. Curva de produção de aflatoxina em relação ao dia de inoculação

#### 4.2. Perfil dos espectros brutos na região VIS-NIR

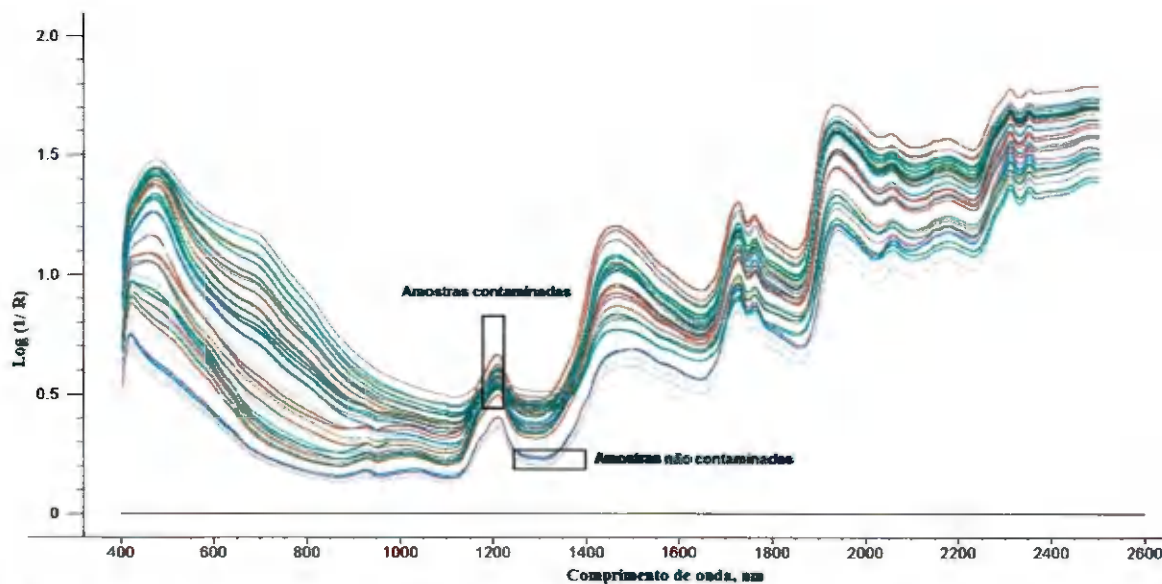
Os espectros brutos VIS-NIR obtidos das amostras de grãos inteiros de amendoim, são observados nas Figuras 11 e 12. Os espectros brutos dos grãos triturados foram obtidos com granulometria de 14 mesh. O total de variáveis independentes obtidas foi de 4200 para a faixa de 400 a 2500 nm com resolução de 0,5 nm.

Nos espectros das amostras dos grãos inteiros (Figura 11) na região de 1100 nm, as amostras de controle sem contaminação por *A. parasiticus* se separam com maior destaque das contaminadas.

Pode-se, observar, na Figura 12 pode-se observar que os grãos triturados oferecem uma nitidez maior das absorções com aumento de intensidade de sinal; neste particular, também merece destacar a maior separação entre as amostras não contaminadas e contaminadas.



**Figura 11.** Perfil dos espectros na região de 400 a 2500 nm dos grãos inteiros de amendoim com identificação dos espectros das amostras contaminadas e não contaminadas com *A. parasiticus*



**Figura 12.** Perfil dos espectros na região de 400 a 2500 nm dos grãos triturados de amendoim com identificação dos espectros das amostras contaminadas e não contaminadas com *A. parasiticus*

Na região de 400 a 800 nm é possível inferir que as intensidades de absorção das amostras contaminadas aumentam com o desenvolvimento do fungo do primeiro dia de amostragem dos grãos (sexto dia de incubação) do experimento ao último dia (16<sup>o</sup> dia de incubação) (APÊNDICE B). A maior intensidade dos espectros de absorção ocorreu em 455 nm nas amostras de grãos inteiros e em 473 nm nas amostras trituradas.

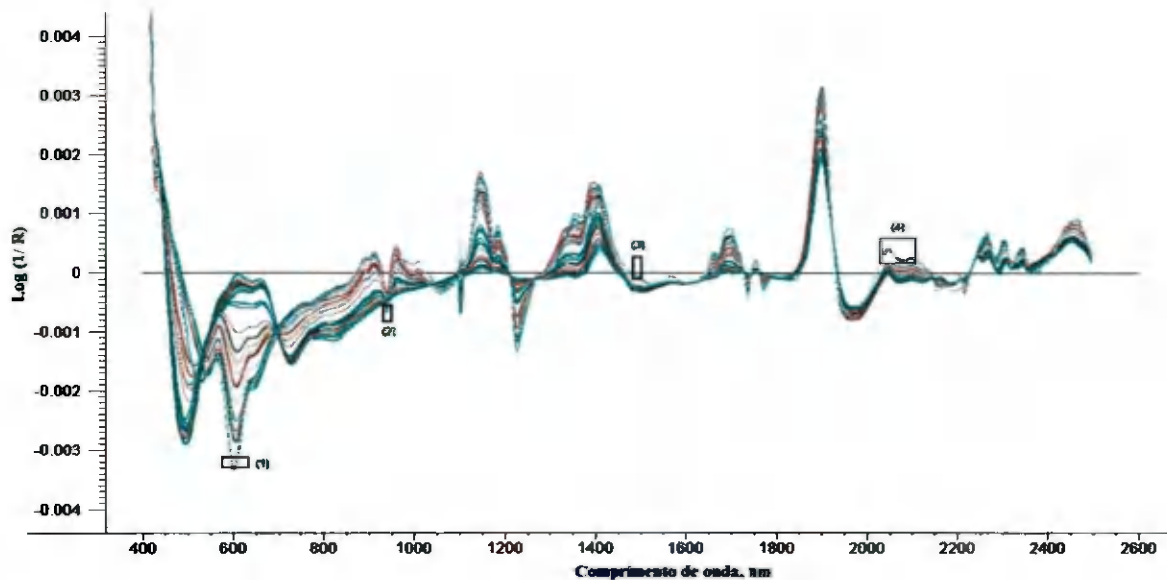
#### 4.3. Pré-tratamento dos espectros brutos na região VIS-NIR

Os espectros de reflectância difusa na região de 400 a 2500 geraram alterações na linha de base, espalhamento de radiação e conseqüente variação de caminho óptico (Figuras 11 e 12), o que gera modelos, tanto de discriminação como de calibração com baixa capacidade preditiva e exatidão.

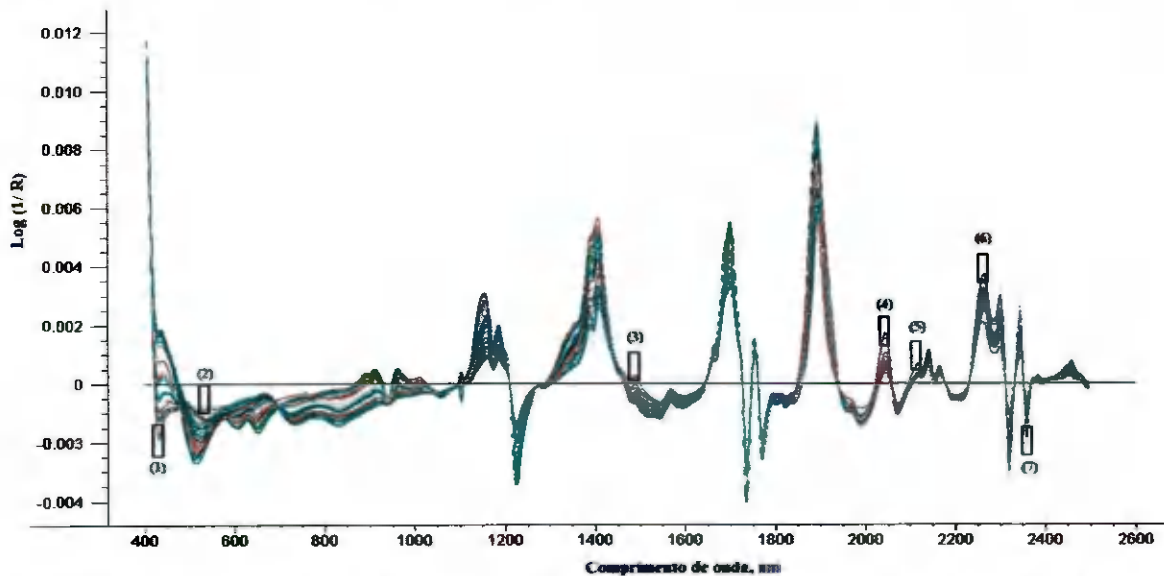
O pré-tratamento dos espectros é requerido para a correção desses efeitos, os quais estão baseados no uso de algoritmos e modelos matemáticos. Dentre esses recursos o algoritmo de Savitzky-Golay tem sido bastante empregado na espectroscopia de reflectância NIR devido à facilidade de implementação e vantagem de remover ruído, corrigir efeito de espalhamento da radiação e ajuste de linha de base dos espectros. Em geral, o fenômeno ocorre em virtude da variação no tamanho de partículas dos sólidos medidos e da alteração espectral no caminho óptico, causado por mudança de densidade da amostra (PONTES et al., 2006).



Os espectros tratados com algoritmo de Savitzky-Golay (remoção de ruído) usando primeira derivada e filtro com polinômio de segunda ordem e janela de 21 pontos (correção de linha de base) das amostras de grãos inteiros e triturados, são observados nas Figuras 13 e 14.



**Figura 13.** Espectros derivativos de 42 amostras de grãos inteiros de amendoim na região de 400 a 2500 nm após tratamento matemático com algoritmo de Savitzky-Golay e filtro com polinômio de segunda ordem. Nas regiões destacadas (1, 2, 3 e 4) dos espectros foi identificado o grupo das amostras controle consideradas não contaminadas.



**Figura 14.** Espectros derivativos de 42 amostras de grãos triturados de amendoim na região de 400 a 2500 nm após tratamento matemático com algoritmo de Savitzky-Golay e filtro com polinômio de segunda ordem. Nas regiões destacadas (1, 2, 3 e 4) dos espectros foi identificado o grupo das amostras controle consideradas não contaminadas.

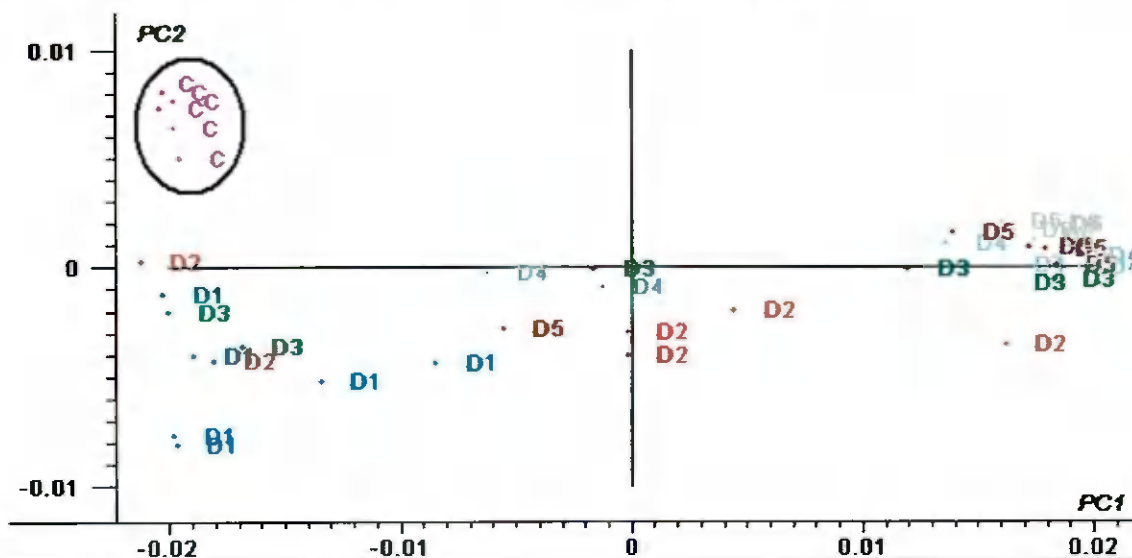
#### 4.4. Análise de componentes principais (PCA)

Para melhor entendimento da análise multivariada ressalta-se que a PCA foi realizada em dois conjuntos de amostras constituídas de grãos inteiros e triturados; além disso, a análise exploratória foi realizada por região espectral VIS e NIR.

Nesta etapa foram utilizadas 36 amostras contaminadas e 6 amostras de grãos não contaminadas, as quais foram consideradas de amostras com controle negativo. É importante ressaltar que toda a análise multivariada (PCA e PLS) foi realizada nos espectros derivativos empregando o tratamento prévio por Savitzky-Golay e filtro com polinômio de segunda ordem e janela de 21 pontos.

##### 4.4.1 PCA de grãos inteiros na região do visível

Na PCA de grãos inteiros na região de 400 a 800 nm foi observada uma separação das amostras contaminadas daquelas não contaminadas com a inoculação de *A. parasiticus* (Figura 15). Com duas PCs (componentes principais) obteve-se uma variância explicada de 98%. Na PC1 os tratamentos de inoculação durante os dias de avaliação são distribuídos no sentido dos escores positivos com 95% de variância explicada. O agrupamento das amostras não contaminadas (grupo controle) identificadas com a letra C destacam-se das demais amostras contaminadas. As amostras contaminadas se distribuem ao longo da PC1 conforme o nível de contaminação e de concentração de aflatoxinas.



PCA - Vis Varia..., X-expl: 93%,5%

**Figura 15.** Gráfico dos escores PC1 vs PC2 com pré-tratamento dos espectros na região 400 a 800 nm para amostras de grãos inteiros. C = controle, D=dia de amostragem, os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 se referem aos dias de amostragem

No gráfico dos loadings, também denominados pesos (Figura 16) estão distribuídas as variáveis conforme sua contribuição para a modelagem PCA. As variáveis mais significativas para esta modelagem, são aquelas com os maiores valores de mínimos ou máximos. As variáveis 477 e 602 nm são as que possuem maiores loadings ou pesos e estão atribuídas a mudanças de cor do fungo nos grãos de amendoim (FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ et al., 2009).

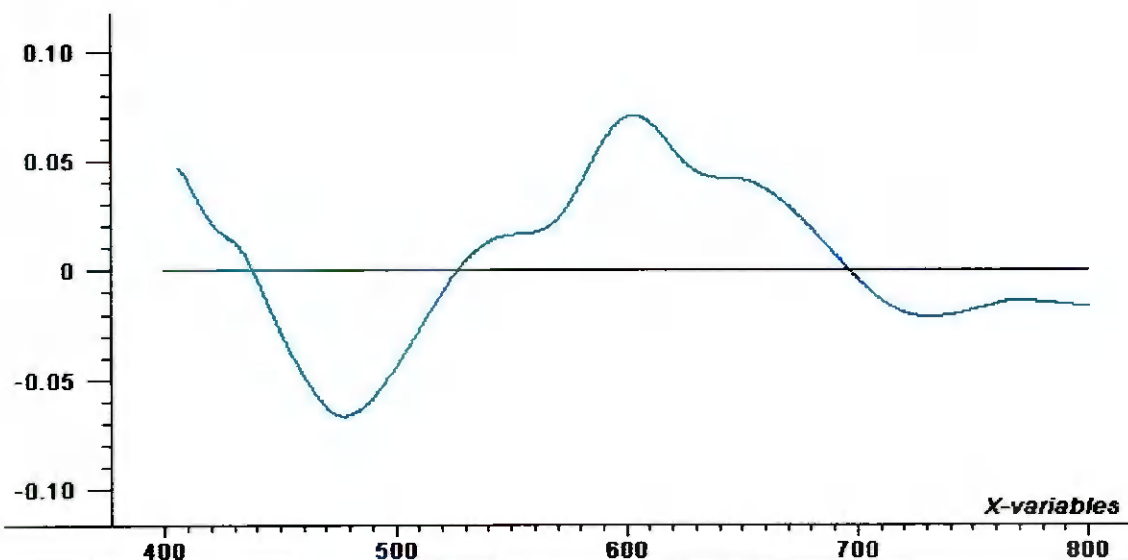
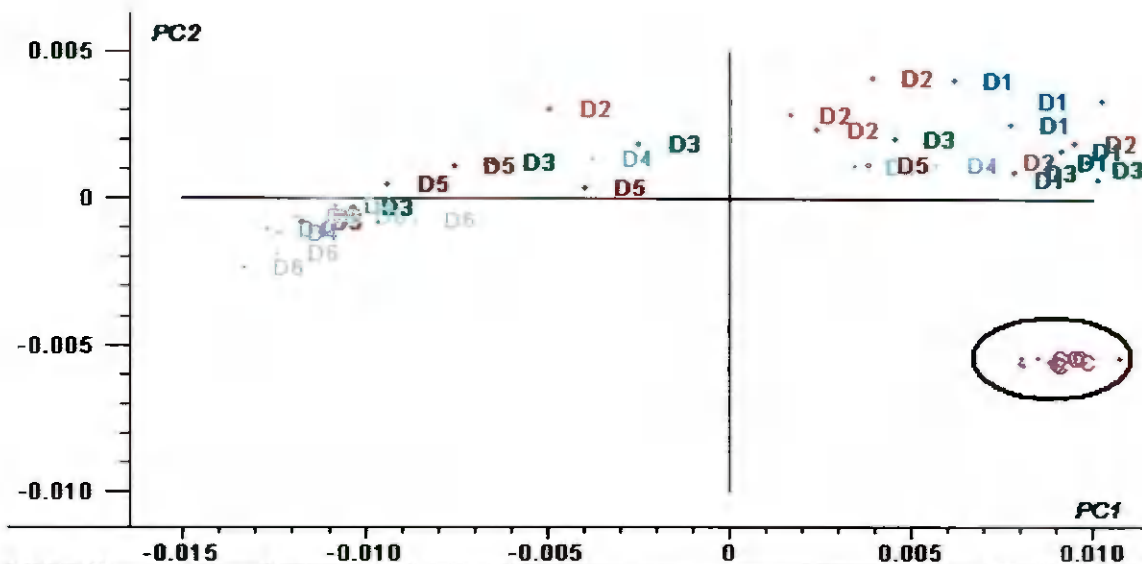


Figura 16. Gráfico dos loadings (pesos) PCA na região 400 a 800 nm para amostras de grãos inteiros.

#### 4.4.2 PCA de grãos inteiros na região do infravermelho próximo

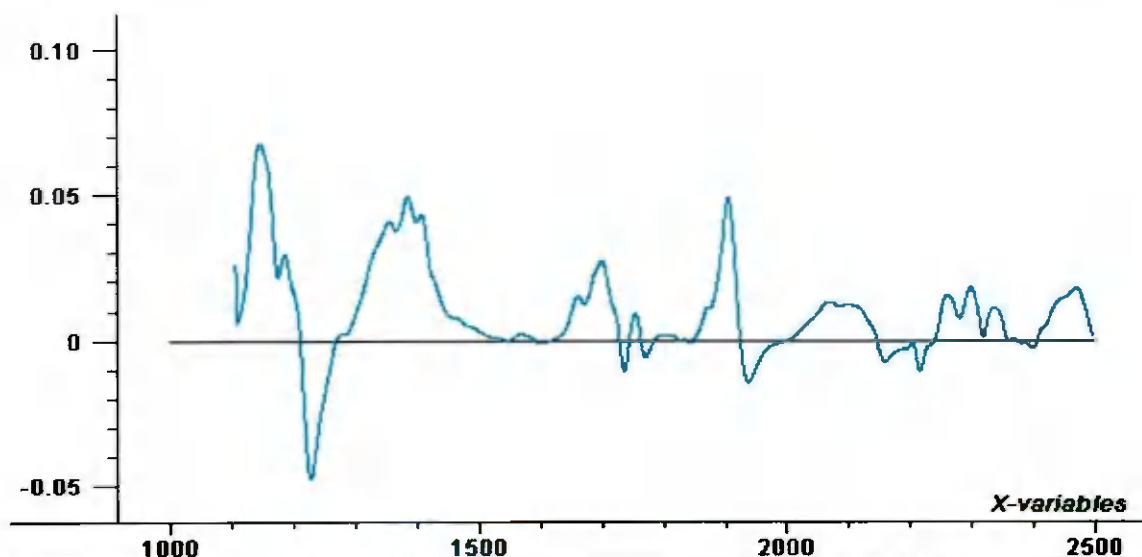
Com a PCA dos espectros derivativos na região de 1105 a 2494 nm, notou-se comportamento análogo ao do item 4.4.1 para as amostras contaminadas e não contaminadas, com nível de 99% de variância explicada para as duas primeiras PCs (Figura 16); observa-se, também, uma distribuição das amostras ao longo da PC1 com 90% de informação explicada no sentido dos escores negativos.



PCA - NIR (1105..., X-expl: 90%,9%

Figura 17. Gráfico dos escores PC1 vs PC2 com pré-tratamento dos espectros na região 1105 a 2494 nm para amostras de grãos inteiros. C = controle, D=dia de amostragem; os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 se referem aos dias de amostragem

No gráfico dos loadings para a PCA (Figura 18) destacam-se as variáveis 1152, 1228, 1389, 1703 e 1900 nm como as de maior peso na modelagem exploratória. Na região 1200 nm as absorções são prováveis de ligações NH oriundas de grupos aminoácidos e anéis aromáticos, os quais constituem estruturas de células presentes como compostos furânicos e fenólicos (FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ et al., 2009). As demais variáveis podem ser influenciadas por ligações OH, CH<sub>2</sub> e NH produzidas ou consumidas pelo *A. parasiticus*.



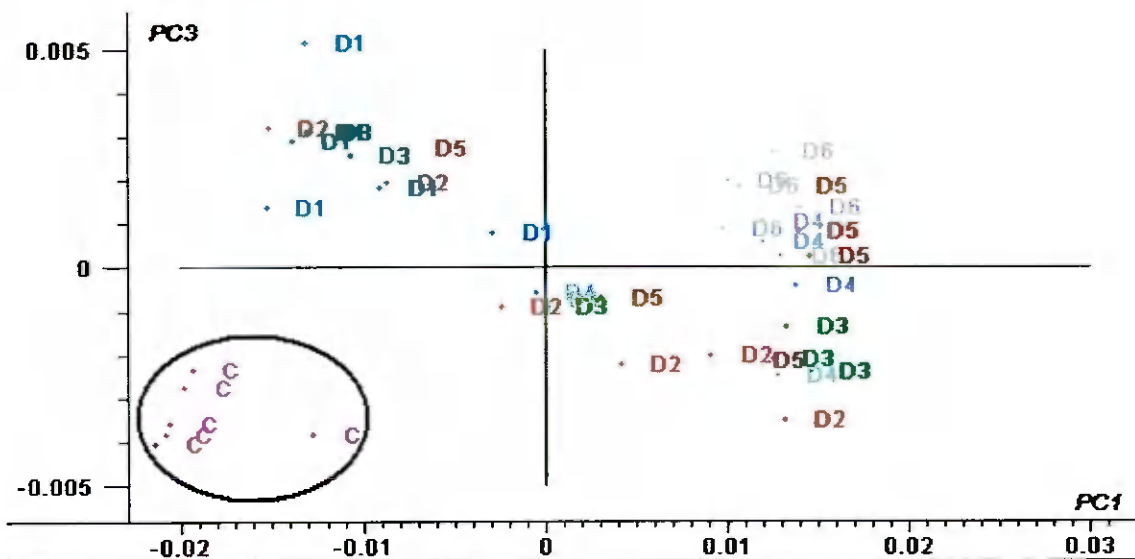
PCA - NIR (1105..., PC(X-expl): 1(90%)

Figura 18. Gráfico dos loadings (pesos) PCA na região 1105 a 2494 nm para amostras de grãos inteiros

#### 4.4.3 PCA de grãos triturados na região do visível

Na PCA dos espectros derivativos das amostras trituradas, foi possível identificar a separação das amostras contaminadas daquelas não contaminadas. No gráfico dos escores da PC1 versus PC3, a classe das amostras não contaminadas se destaca das demais amostras que foram inoculadas com o *A. parasiticus*. A PC1 descreve 85 % e a PC3 3% da variância explicada. Com as três primeiras PCs, a PCA calculada descreve 98,7% da informação dos dados espectrais obtidos, significando que a combinação das 801 variáveis originais pode ser resumida em três PCs com alto nível de confiança.

No gráfico da Figura 19 ocorreu que uma amostra não contaminada separou de seu grupo, a qual pode ser considerado uma amostra anômala; entretanto, em relação à classe das amostras contaminadas, ocorreu uma separação mais evidente; assim, essa amostra foi considerada dentro do agrupamento das amostras não contaminadas permitindo que haja maior variabilidade de amostras para esta classe.



PCA VIS Variave..., X-expl: 85%,3%

**Figura 19.** Gráfico dos escores PC1 vs PC2 com pré-tratamento dos espectros na região 400 a 800 nm para amostras de grãos triturados. C = controle, D=dia de amostragem, os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 se referem aos dias de amostragem

No gráfico dos loadings (Figura 20), a variável com maior contribuição para o modelo é o comprimento de onda de 431 nm; provavelmente, a melhor explicação é que, neste comprimento de onda exista uma absorção maior dos componentes internos do fungo e das aflatoxinas produzidas.

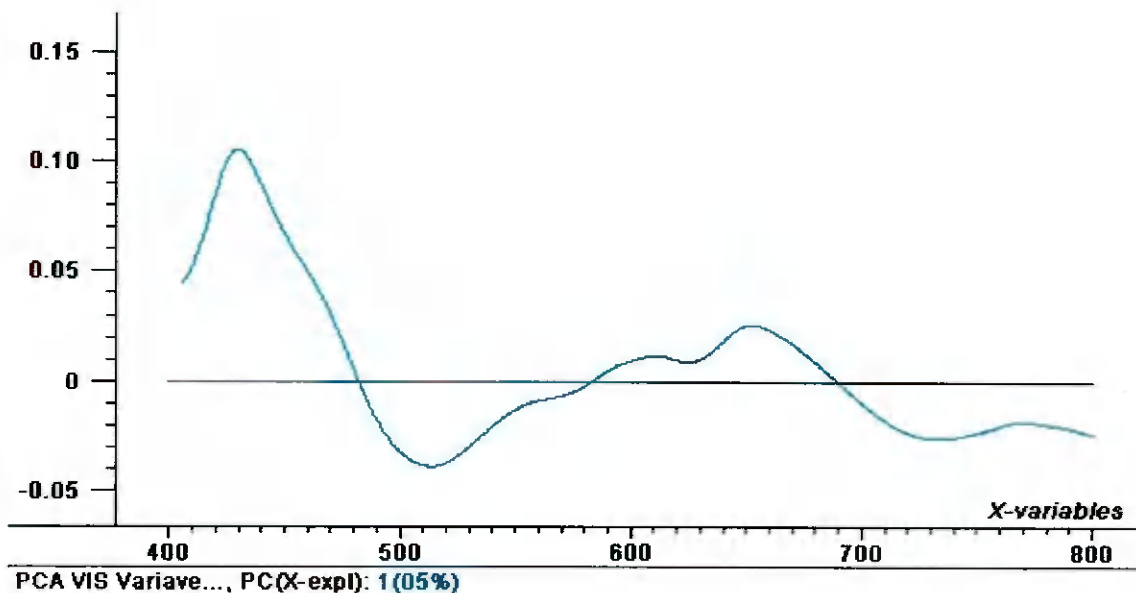


Figura 20. Gráfico dos loadings (pesos) PCA na região 400 a 800 nm para amostras de grãos triturados

#### 4.4.4 PCA de grãos triturados na região do infravermelho próximo

No gráfico dos escores das PC1 versus PC2 para a região de 1105 a 2494 nm, notou-se que as amostras não contaminadas se distinguem das amostras contaminadas (Figura 21). Nessa PCA a amostra controle do sexto dia se destacada de sua classe, mas, mesmo assim, constatou-se que essa amostra se distingue das amostras contaminadas. Os resultados nessa região são análogos aos de grãos inteiros.

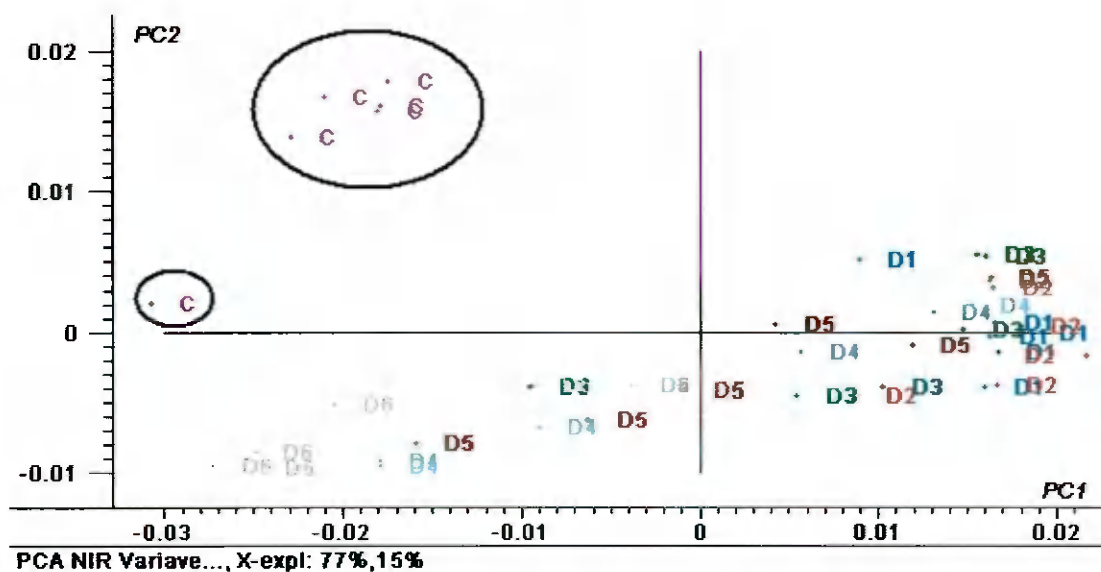


Figura 21. Gráfico dos escores PC1 vs PC2 com pré-tratamento dos espectros na região 1105 a 2494 nm para amostras de grãos triturados. C = controle, D=dia de amostragem, os números 1, 2, 3, 4, 5 e 6 se referem aos dias de amostragem

Entretanto, no gráfico dos loadings (Figura 22) as variáveis com maior contribuição no modelo ficaram mais evidentes em razão da maior uniformidade das amostras e como consequência da absorção dos grupos característicos que compõem as amostras.

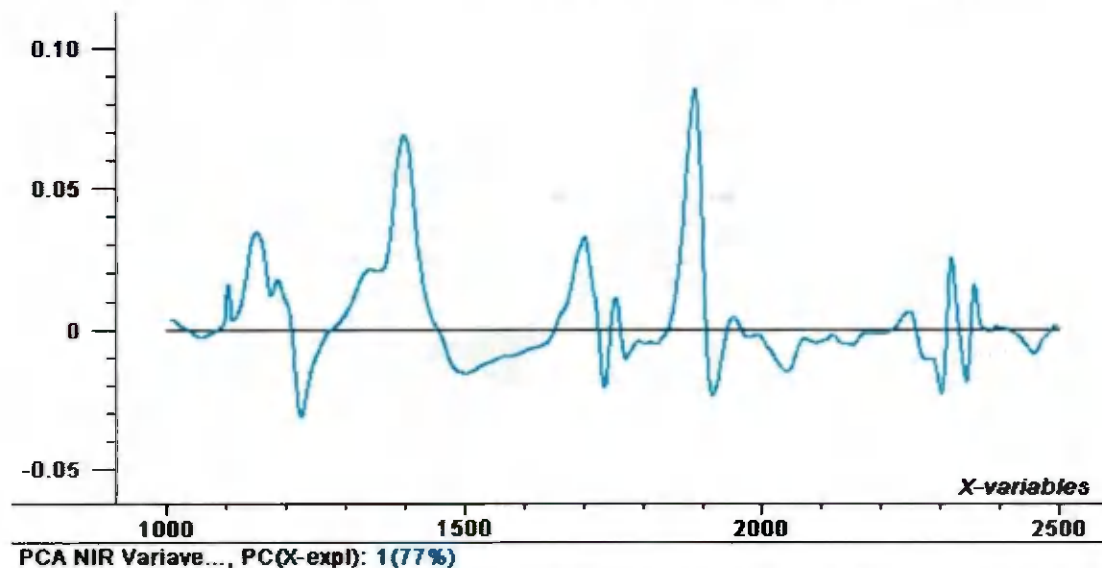


Figura 22. Gráfico dos loadings (pesos) PCA na região 1005 a 2494 nm para amostras de grãos triturados

As variáveis de maior relevância na PCA da região de 1105 a 2494 nm foram as de maior amplitude no gráfico dos loadings (Figura 22); dentre elas, os comprimentos de onda 1142, 1223, 1390, 1397 e 1888 nm foram as variáveis mais relevantes.

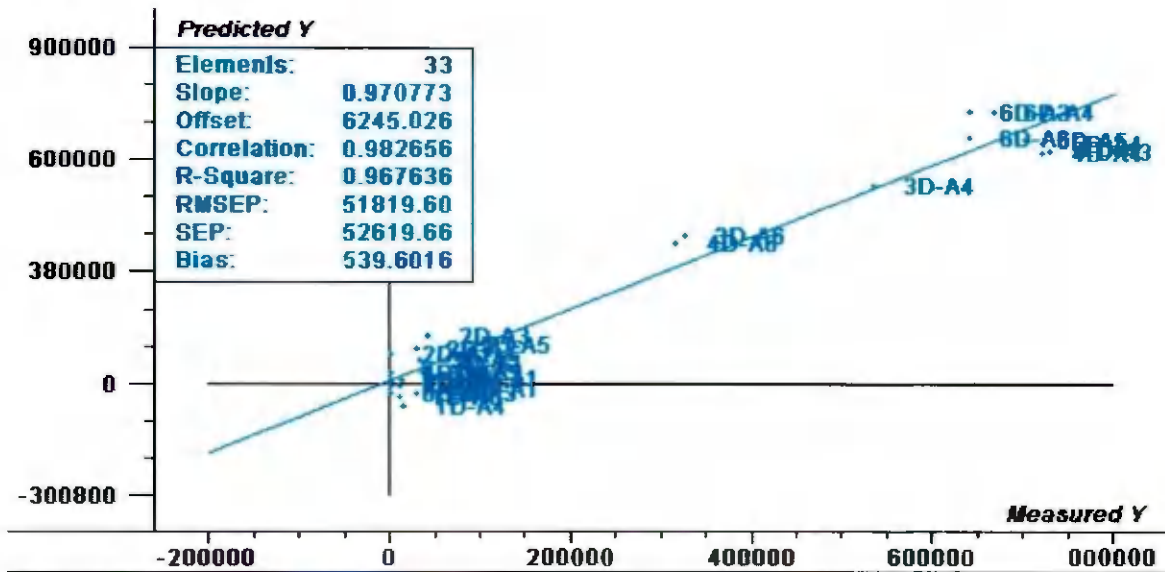
#### 4.5 Calibração multivariada para predição não destrutiva de aflatoxinas

Na construção do modelo de calibração para aflatoxinas foram consideradas as amostras de grãos inteiros explorando a região do visível e do infravermelho próximo. A técnica de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) com validação cruzada completa foi empregada a partir dos espectros derivativos (Figura 13).

A validação cruzada permite obter parâmetros referentes à estimativa do erro de predição. Neste procedimento, uma amostra é removida do cálculo de regressão e se prevê seu valor por meio da regressão. Na próxima rotina a amostra predita é incluída no conjunto de calibração e outra amostra é utilizada e comparada com o seu valor de referência para a estimativa do RMSEP.

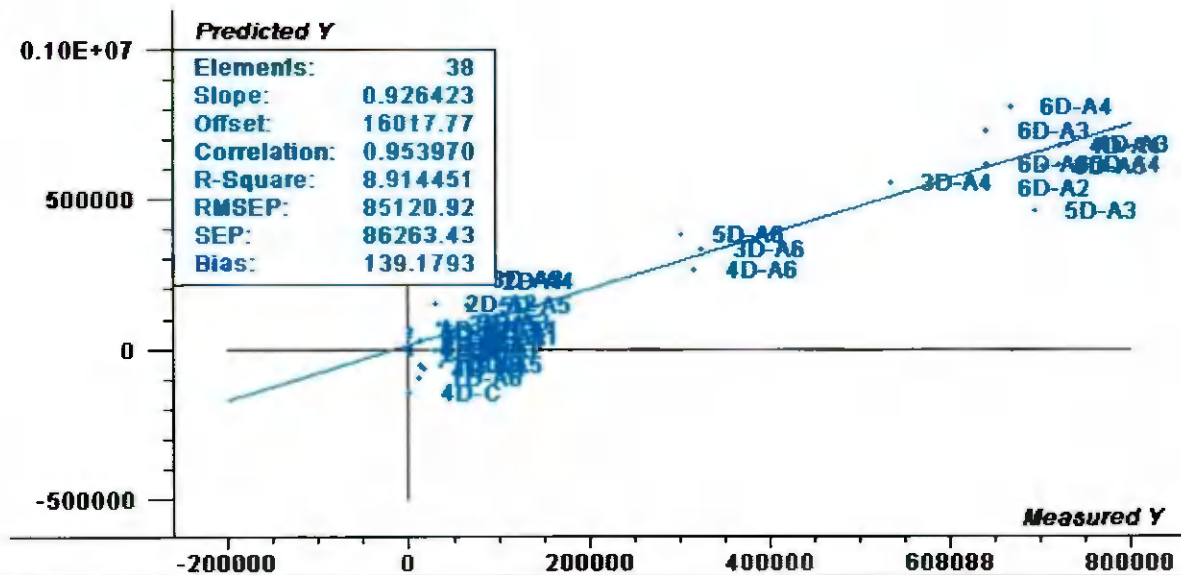
Foi empregado um total de 42 amostras com valores de aflatoxinas na faixa de concentração de 0 a  $7,2 \times 10^5 \mu\text{g kg}^{-1}$  (ppb). Com a inoculação artificial para a cepa toxicogênica obtiveram-se altos valores de concentração de aflatoxinas.

Os gráficos de concentração medida por concentração predita a partir da regressão por PLS com validação cruzada completa para a região de 400 a 800 nm e 1105 a 2494 nm, são detalhados nas Figuras 23 e 24.



PLS1 - VIS, (Y-var, PC): (Total,3)

Figura 23. Modelo PLS para valores medidos versus valores preditos de aflatoxinas totais (B1, B2, G1 e G2) na região de 400 a 800 nm usando 3 PCs com validação cruzada completa de dados. Os valores de unidade do gráfico são equivalentes para ambos os eixos em ppb



PLS1 - NIR, (Y-var, PC): (Total,3)

Figura 24. Modelo PLS para valores medidos versus valores preditos de aflatoxinas totais (B1, B2, G1 e G2) na região de 1105 a 2494 nm usando 3 PCs com validação cruzada completa de dados. Os valores de unidade do gráfico são equivalentes para ambos os eixos em ppb

Nos modelos PLS para a região do visível e infravermelho próximo foi necessário a exclusão de amostras consideradas anômalas em que interferiram no RMSEP e no coeficiente de regressão. Para a região do visível usaram-se 33 amostras e na região do infravermelho próximo, 38 amostras. Mesmo com a exclusão de amostras, a região do



visível foi mais versátil e simples de ser utilizada. Outro fator importante de se considerar é que, nas condições experimentais, os modelos desenvolvidos foram influenciados pelo método de referência e faixa de concentração de aflatoxinas quantificadas nas amostras inoculadas artificialmente.

O método CCD, que é baseado em medidas visuais, dependentes da acuidade visual do operador, fornece resultados com incertezas superiores a 20%. Neste trabalho, os experimentos de inoculação permitiram que o fungo se desenvolvesse em condições ideais e, desta forma, os níveis de aflatoxinas foram muito superiores quando comparados a uma situação de contaminação real.

Em ambos os modelos de calibração desenvolvidos os valores de RMSEP (erro médio quadrático de predição) e do coeficiente de correlação, foram de 51.819,08 ppb e 0,9827 para o visível e de 85.120,92 ppb e 0,9539 para o infravermelho próximo. Em relação a esses parâmetros observa-se que a região do visível fornece resultados mais exatos e consistentes.

Os gráficos dos coeficientes de regressão em função das variáveis X (comprimentos de onda) para a região do visível e do NIR, estão ilustrados nas Figuras 25 e 26.

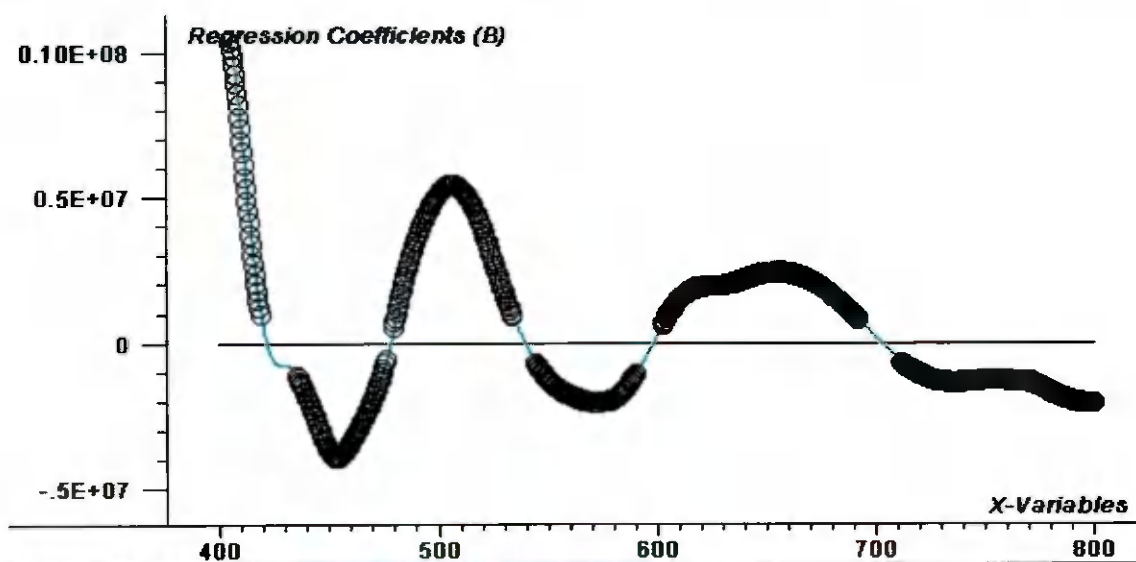
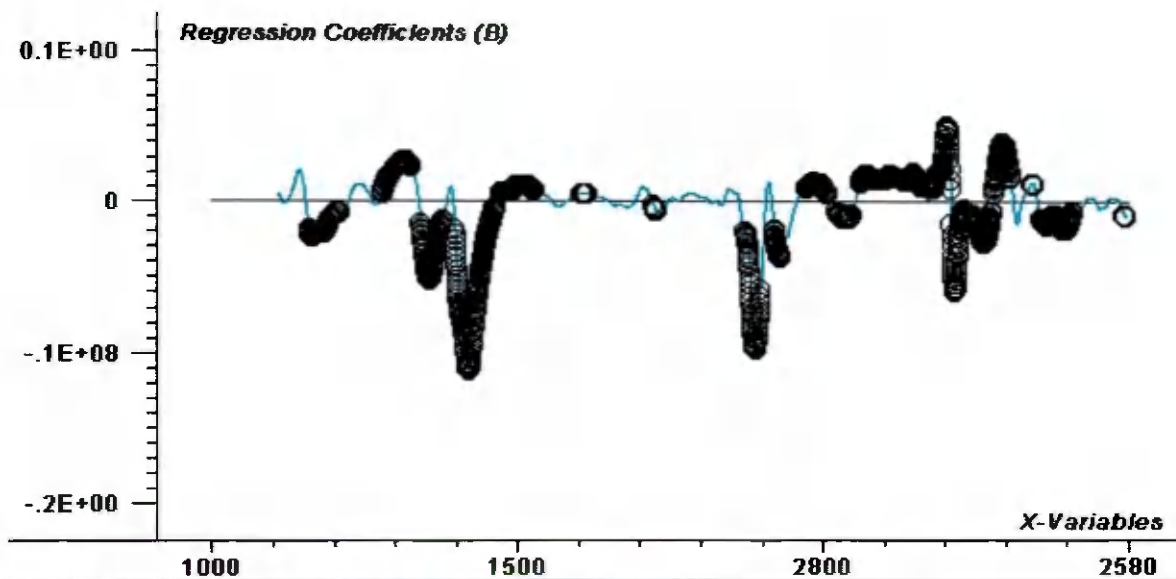


Figura 25. Coeficientes de regressão em função das variáveis (comprimento de onda) para modelo PLS na região do visível



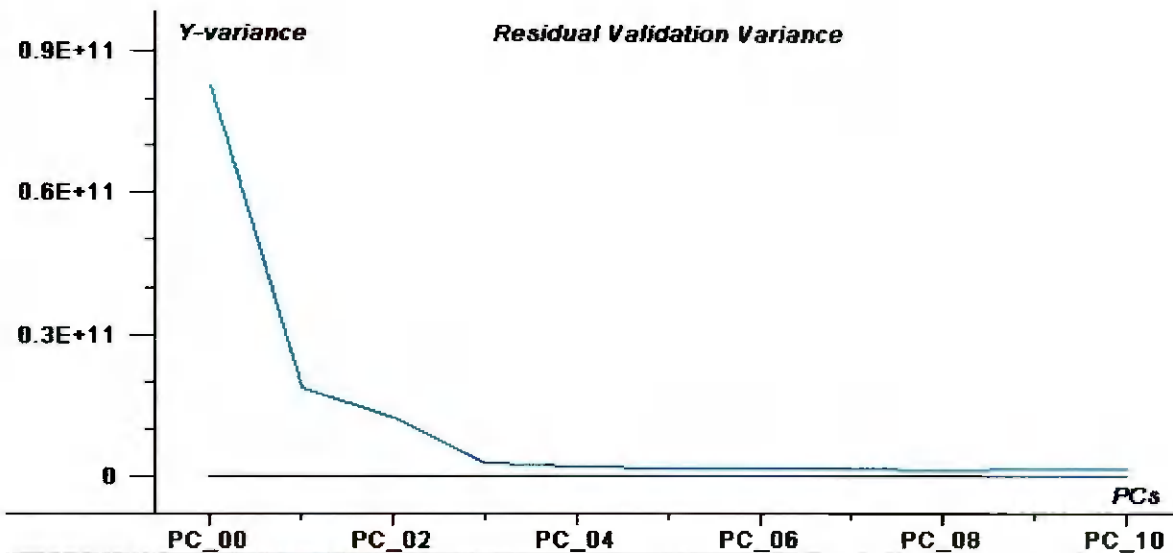
RESULT11. (Y-var, PC): (Total,3) B0 = 1743170.000000

Figura 26. Coeficientes de regressão em função das variáveis (comprimento de onda) para modelo PLS do infravermelho próximo

Nos gráficos das Figuras 25 e 26, as variáveis (comprimentos de onda) mais significativas foram identificadas com um círculo, as quais foram determinadas por meio da rotina do software Unscrambler 9.8.

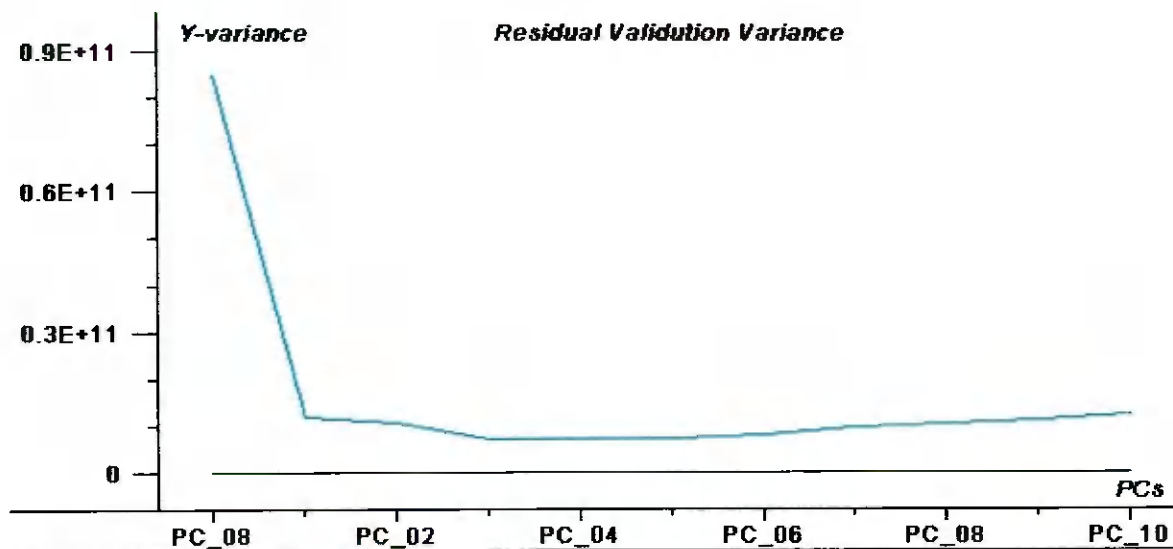
A seleção de variáveis fornece uma estratégia de otimização dentre as variáveis utilizadas, que são mais significativas para a calibração. É evidente que esta escolha dependerá da observação do fenômeno a ser descrito.

O número de PCs ou variáveis latentes é imprescindível para uma boa calibração. Nos modelos PLS desenvolvidos as três primeiras PCs descrevem mais de 98% de variância explicada. Os modelos de calibração desenvolvidos usaram sempre três PCs para os cálculos, as quais foram escolhidas automaticamente pelo software. Esta observação é comprovada nos gráficos da variância residual para os dados de referência em que se observa estabilidade da variância residual a partir da terceira PC (Figuras 27 e 28).



PLS1 - VIS, Variable: *v.Total*

Figura 27. Variância residual para os dados de referência como função do número de PCs da PLS para a região do visível



PLS1 - NIR, Variable: *v.Total*

Figura 28. Variância residual para os dados de referência como função do número de PCs da PLS para a região do infravermelho

## 5. CONCLUSÕES E PROPOSTAS FUTURAS

---

### 5.1. Conclusões

1) A produção de aflatoxinas em grãos de amendoim com 11% de umidade e inoculados artificialmente com cepa toxicogênica de *A. parasiticus* em ambiente com 85% de umidade relativa, 30 °C e fotoperíodo de 12 horas, ocorreu a partir do sexto dia de incubação;

2) Modelos PCA e medidas de reflectância na região do visível, permitem obter os melhores resultados para discriminação de amostras de grãos de amendoim contaminados artificialmente com *A. parasiticus*, de forma rápida (60 s), não destrutiva e sem a utilização de reagentes;

3) Os modelos PLS de calibração para aflatoxinas totais forneceram coeficiente de correlação e RMSEP de 0,9827 e  $5,2 \times 10^4 \mu\text{g kg}^{-1}$  para a região VIS e 0,9540 e  $8,5 \times 10^4 \mu\text{g kg}^{-1}$  para o NIR.

4) As metodologias propostas são alternativas para identificação de grãos contaminados de amendoim com *A. parasiticus* e quantificação de aflatoxinas de forma de forma rápida, sem destruir a amostra e com menor exposição a reagentes tóxicos.

### 5.2. Propostas futuras

1) Explorar modelos de reconhecimento de padrão supervisionados com amostras de grãos contaminados naturalmente e/ou artificialmente, com aflatoxinas;

2) Desenvolver modelos de discriminação com medidas na região de 400 a 2500 nm para identificação de *A. parasiticus* e *flavus* em grãos de amendoim contaminados artificialmente;

3) Construir modelos de calibração multivariada com medidas de reflectância VIS-NIR usando amostras contaminadas naturalmente e/ou artificialmente que explorem concentração de aflatoxinas totais em níveis inferiores a 20 ppb, de 20 a 100 ppb e superiores a 100 ppb.

## 6. REFERÊNCIAS

---

- AGRIANUAL. **Consultoria & Agroinformativos**, São Paulo: FNP 2004. 324p.
- BEEBE, K.R.; PELL, R.J.; SEASHOLTZ, M.B. **Chemometries a practical guide**. New York: John Wiley & Sons, 1998.
- BERARDO, N.; PISACANE, V.; BATTILANI, P.; SCANDOLARA, A.; PIETRI, A.; MAROCCO, A. Rapid Detection of Kernel Rots and Mycotoxins in Maize by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy, **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8128-8134, 2005.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **IN nº 09, de 24 março 2000**. Diário Oficial da União, Seção 1, p. 35-41, 30, março, 2000.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução RDC u. 274, de 15 de outubro de 2002**. Diário Oficial da União, Brasília, Outubro, 2002.
- BRERETON, R.G. **Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant**. Chichester: John Wiley, 2003. 489p.
- CAMO S.A. *Manual do Usuário. UNSCRAMBLER*, versão 7.5. Noruega, 2007.
- CARVALHO, N. M.; J. NAKAGAWA. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal, SP, Funep, 2000. 588 p
- CAST - Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxius: Risks in plant, Animal and Human**. Report No. 116. Ames, Iowa. 2003. 217 p.
- CONAB - **Compauhia Nacional de Ahasteeimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 12 fev. 2010.
- COOPERBIO - **Cooperativa Mista de Produção, Industrialização e Comercialização de Bioombnstíveis do Brasil Ltda** - Disponível em: <http://www.cooperbio.com.br/materias/amendoim.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2009.

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

FARIAS, A.X.; ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M.; ANDERSEN, P.M.; CORREA, T.B.S. Contaminação endógena por *Aspergillus spp.* em milho pós-colheita no Estado do Paraná, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.3, p.617-621, 2000.

FERNÁNDEZ-IBAÑEZ, V.; SOLDADO, A.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.; ROZADDELGADO, B. Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in maize and barley as analytical quality assessment, **Food Chemistry**, v. 113, p. 629-634, 2009.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria i: calibração multivariada, um tutorial, **Química Nova**, v.22, n.5, p.724-731 , 1999.

FONSECA, H. Sampling plan for the analysis of aflatoxin in peanuts and corn: An update, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n.2, p. 97-105, 2002.

GAIAO, E.N.; MEDEIROS, E.P.; LYRA, W.S.; , MOREIRA, P.N.T.; Vasconcelos, P.C.; SILVA, E.C.; ARAÚJO, M. C. U. Um fotômetro multi-led microcontrolado, portátil e de baixo custo. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p.1102-1105, 2005.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial least-squares regression: a tutorial. **Aalytica Chimica Acta**, v.185, n. 1, 1986.

GODOY, I.J.; MORAES, S.A.; ZANOTTO, M.D.; SANTOS, R.C. Melhoria do amendoim. In: BOREM, A. **Melhoramento de espécies cultivada**. Viçosa: UFV, p.54-95, 2005.

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.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Avaliação da safra de grãos 2009**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em: 02/ 03/ 2010.

JIN, J.; TANG, L.; HRUSKA, Z.; YAO, H.B. Classification of toxigenic and atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* with hyperspectral imaging. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 69, n. 2, p. 158-164, 2009.

KESSLER, W.; OELKRUG, D.; KESSLER, R. Using scattering and absorption spectra as MCR-hard model constraints for diffuse reflectance measurements of tablets. **Analytica Chimica Acta**, v. 642, p. 127-134, 2009.

KIM, K.S.; PARK, S.H.; CHOUNG, M.G. Nondestructive determination of oil content and fatty acid composition in perilla seeds by near-infrared spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 5, 2007.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 14, n.2, p.198-219, 2003.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. E. **Introduction to Spectroscopy**. 3.ed. United States, 2001.

PEDROSA, J. P.; CIRNE, L. E. M. R.; MEDEIROS NETO, J. M.. Teores de bixina e proteína em sementes de urucum em função do tipo e do período de armazenagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.3, n.1, p.121-123, 1999.

PETISCO, C.; DOWNEY, G.; MURRAY, I.; ZABALGOGEAZCOA, I.; GARCÍA-CRIADO, B.; GARCÍA-CIUDAD, A. Direct classification of related species of fungal endophytes (*Epichloe* spp.) using visible and near-infrared spectroscopy and multivariate analysis, **FEMS Microbiol Lett**, v. 284, p. 135-141, 2008.

PETTERSSON, H.; ABERG, L. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals, **Food Control**, v. 14, p. 229-232, 2003.

PONTES, M.J.C.; SANTOS, S.R.B.; ARAUJO, M.C.U.; ALMEIDA, L.F.; LIMA, R.A.C.; GAIAO, E.N.; SOUTO, U.T.C.P. Classification of distilled alcoholic beverages and verification of adulteration by near infrared spectrometry. **Food Research International**, v. 39, n.2, p.182-189, 2006.

RANJAN, K. S.; SINHA, A. K. Occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in animal feed from Bihar, India. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.56, n.1, p.39-47, 1991.

RICHARD, J. L.; PAYNE, G. A. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Paris: CAST, 2003. 199 p.

SANDERS, T. H. Harvesting, storage and quality of peanuts. In: MELOUK, H.A.; SHOKES, F. M. (Ed.). **Peanut health management**, St. Paul: APS Press, cap. 5, p. 23-31, 1995.

SKOOG A.D.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2005.

SMALL, G.W. Chemometrics and near-infrared spectroscopy: avoiding the pitfalls. **Trends in analytical chemistry**, v.25, n.11, p. 1057-1066, 2006.

SUASSUNA, T. M. F.; SANTOS, R. C.; GONDIM, T. M.S. **Cultivo do amendoim**. Embrapa Algodão (versão eletrônica). Sistema de produção n. 7. 2006.

SUASSUNA, T. M. F.; SUASSUNA, N. D.; ALMEIDA, R. P.; FONSECA, H. **Segurança e qualidade na produção primária do amendoim**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 22 p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 88).

TRIPATHI, S.; MISHRA, H.N. A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B-1 in red chili powder. **Food Control**, v. 20, n. 9, p. 840-846, 2009.

VAZQUEZ-BARRIOS, M.E.; MARTINEZ-PENICHE, R.; FERNANDEZ-ESCARTIN, E. Development of toxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on kernels of native pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch] genotypes under different water activities. **Scientia Horticulturac**, v.89, n.2, p.155-169, 2001.

WHITAKER, T. B. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. **Food Control**, v.14, n.4, p.233-237, 2003.



## **APÊNDICES**

**APÊNDICE – A: Fotos do processo de incubação do *A. parasiticus* e extração de aflatoxinas em grãos de amendoim**



Grãos incubados em câmara do tipo BOD no primeiro dia de extração



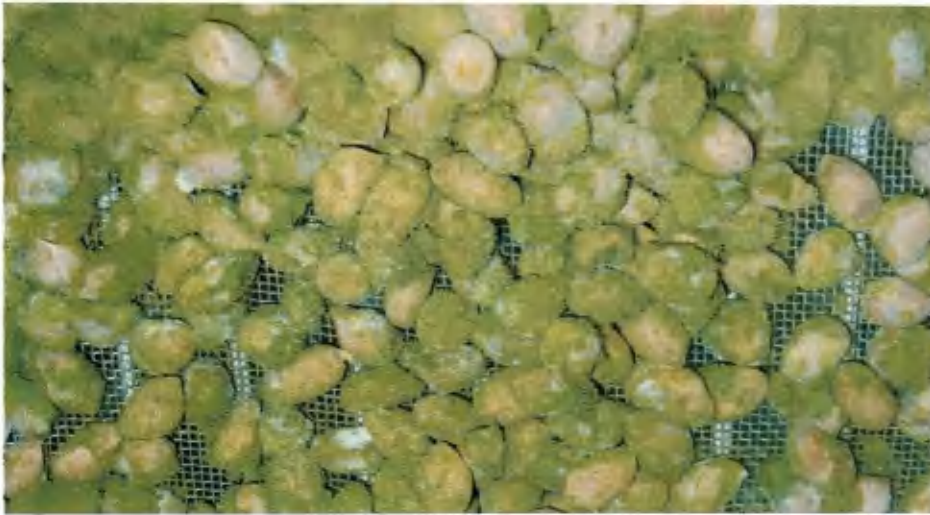
Grãos incubados em câmara do tipo BOD no segundo dia de extração



Grãos incubados em câmara do tipo BOD no terceiro dia de extração



Grãos incubados em câmara do tipo BOD no quarto dia de extração



Grãos incubados em câmara do tipo BOD no quinto dia de extração



Grãos incubados em câmara do tipo BOD no sexto dia de extração



Trituração dos grãos; peneirando-os com granulometria de 14 mesh; pesando o triturado (50,00 g); início do processo de extração de aflatoxinas (50 g do triturado adicionados de 30 mL de solução aquosa a 4% (m/v) de KCl e 270 mL de metanol)



Filtração da solução; filtrado sendo adicionado a 5 g de celite; funil de separação contendo a solução filtrada adicionada de 150,0 mL de água destilada e hexano

**APÊNDICE – B: Tabela dos valores de aflatoxinas quantificados das amostras analisadas em relação ao dia de coleta**

<b>Dia/ amostra</b>	<b>B1 (ppb)</b>	<b>B2 (ppb)</b>	<b>G1 (ppb)</b>	<b>G2 (ppb)</b>	<b>Total (ppb)</b>
D1/C	0	0	0	0	0
D1/A1	0	0	0	0	0
D1/A2	240	0	240	40	520
D1/A3	12000	4000	12000	40	28040
D1/A4	6000	1777	6000	1333	15110
D1/A5	6000	160	6000	106,66	12266
D1/A6	5000	106,66	5000	106,66	10213
D2/C	0	0	0	0	0
D2/A1	60	0	120	0	180
D2/A2	12000	0	12000	4000	28000
D2/A3	14400	6400	14400	6400	41600
D2/A4	20400	13600	20400	13600	68000
D2/A5	12000	6222	12000	4000	34222
D2/A6	3600	1866,66	3600	1866,66	10933
D3/C	0	0	0	0	0
D3/A1	12000	5333	14400	4800	36533
D3/A2	7200	9600	7200	9600	33600
D3/A3	16800	11200	16800	11200	56000
D3/A4	160000	106666	160000	106666	533332
D3/A5	7200	9600	9600	5333,3301	31733
D3/A6	106666	71111	106666	40000	324443
D4/C	0	0	0	0	0
D4/A1	12000	8000	24000	8000	52000
D4/A2	120000	80000	240000	80000	520000
D4/A3	240000	142222	240000	106666	728888
D4/A4	240000	160000	240000	80000	720000
D4/A5	21333	12444	24000	8000	65777
D4/A6	106666	48888	120000	40000	315554
D5/C	0	0	0	0	0
D5/A1	12000	8000	24000	8000	52000
D5/A2	120000	80000	240000	80000	520000
D5/A3	240000	106666	240000	106666	693332
D5/A4	240000	160000	240000	80000	720000
D5/A5	16000	16000	24000	8000	64000
D5/A6	120000	53333	120000	8000	301333
D6/C	0	0	0	0	0
D6/A1	120000	44444	120000	40000	324444
D6/A2	240000	80000	240000	80000	640000
D6/A3	240000	80000	240000	80000	640000
D6/A4	240000	80000	240000	106666	666666
D6/A5	240000	97777	240000	124444	702221
D6/A6	240000	80000	240000	80000	640000