



Revista Iberoamericana de Tecnología
Postcosecha

ISSN: 1665-0204

rebasa@hmo.megared.net.mx

Asociación Iberoamericana de
Tecnología Postcosecha, S.C.
México

Ribeiro de Araújo, Dyalla; de Assis Cardoso Almeida, Francisco; Palmeira Gomes,
Josivanda; Figueiredo Neto, Acácio; Cezar Alves, Niédja Marizze
INCIDENCIA DE HONGOS Y PRODUCCION DE AFLATOXINA EN SEMILLAS DE MANÍ
CRIOCONSERVADAS

Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, vol. 16, núm. 1, 2015, pp. 136-147
Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C.
Hermosillo, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81339864020>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

INCIDENCIA DE HONGOS Y PRODUCCION DE AFLATOXINA EN SEMILLAS DE MANÍ CRIOCONSERVADAS

Dyalla Ribeiro de Araújo¹, Francisco de Assis Cardoso Almeida¹, Josivanda Palmeira Gomes¹, Acácio Figueiredo Neto², Niédja Marizze Cezar Alves¹

¹Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande, Av. Aprígio Veloso, 882, Campina Grande – PB, dyalla_ra@yahoo.com.br; almeida@deag.ufcg.edu.br; ²Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Av. Antonio Carlos Magalhães, 510, Juazeiro – BA, acacio.figueiredo@univasf.edu.br;

Palavras-chave: Arachis hypogaea, Aspergillus flavus, micotoxinas

RESUMEN

Se realizó este trabajo con el objetivo de estudiar la contaminación por hongos y micotoxinas en semillas de maní, de la variedad BRS Havana, almacenada en ambiente natural y en nitrógeno líquido a -196°C y, también, la viabilidad y el contenido de humedad, de estas semillas, en estas condiciones de almacenamiento. Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Almacenamiento y Procesamiento de Productos Agrícolas de la Unidad Académica de Ingeniería Agrícola de la Universidad Federal de Campina Grande y en el Laboratorio de Química de la Embrapa Algodão, Paraíba. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con el fin de que los tratamientos dispuestos en un diseño factorial con 4 repeticiones. El *software* utilizado en los cálculos fue el Assistat, y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey al 5% de probabilidad. Los resultados revelaron la presencia de aflatoxina por encima del nivel permitido por la legislación brasileña para la comercialización de maní tanto para semillas crioconservadas como para las almacenadas en el medio natural, la viabilidad de las semillas se mantuvo en el almacenamiento a temperaturas ultra bajas (-196°C) y los hongos *Aspergillus flavus* y *Rhizopus*, con la predominancia del *A. flavus* en las dos condiciones de almacenamiento - de crioconservación y en ambiente natural.

INCIDENCE OF FUNGI AND PRODUCTION OF AFLATOXIN IN SEEDS OF PEANUT CRYOPRESERVED

Key-words: Arachis hypogaea, Aspergillus flavus, mycotoxins

ABSTRACT

We conducted this study in order to study the contamination by fungi and mycotoxins in peanut seeds, BRS Havana, stored in the natural environment and in liquid nitrogen at -196°C and also the viability and moisture content of the seed in these storage conditions. The experiments were conducted at the Laboratory of Storage and Processing of Agricultural Products Academic Unit of Agricultural Engineering, Federal University of Campina Grande and the Chemistry Laboratory of Embrapa Cotton, Campina Grande, Paraíba. We used a completely randomized design (CRD) in order that the treatments arranged in a factorial design with four replications. The Computer Program used to perform the calculations was the Assistat and means were compared by Tukey test at 5% probability. The results revealed the presence of aflatoxin above those permitted by Brazilian law for marketing peanut seeds in either cryopreserved or stored in the natural environment, the viability of seeds was kept in storage at ultra low temperatures (-196°C) and *Aspergillus flavus* and *Rhizopus*, predominantly *A. flavus* is presented in both storage conditions - Cryopreservation and natural environment.

INTRODUCCIÓN

El maní (*Arachis hypogaea* L.), leguminosa originaria de América del Sur, es una de las

principales semillas oleaginosas que se cultivan en el mundo. En Brasil, se produce de norte a sur, en las más variadas condiciones, a

escala comercial o en cultivos familiares, dependiendo de la región donde es producido. Datos de la CONAB (2011) indican que la producción de la cosecha 2010/2011 fue de 148.82 millones de toneladas de este producto.

En el nordeste brasileño el maní es un cultivo de gran importancia socio-económica representando aproximadamente el 5% de la producción nacional, siendo referenciado como una opción altamente viable para la agricultura familiar, contribuir a la diversificación con otras culturas y para la autosustentabilidad de la pequeña propiedad agrícola (Santos et al., 2005). En esta región, el cultivo de maní, se destaca por ser de fácil manejo, ciclo corto y precio atractivo en el mercado además de constituir una fuente adicional de ingresos debido a las diversas formas de los productos que pueden ser procesados y fomentar la agroindustria regional. Sin embargo, sus productores no utilizan técnicas avanzadas en el cultivo y en la post-cosecha. De esta forma, el bajo nivel tecnológico ha contribuido al incremento de los problemas fitosanitarios, entre los que se destacan la contaminación por hongos y las aflatoxinas, los cuales pueden ocurrir durante la formación de la semilla, la cosecha, el transporte y en el almacenamiento, que interactuando con los factores ambientales, pueden ser capaces de acelerar el proceso de deterioro.

El aumento significativo del consumo combinado a la producción y la productividad se debe al rendimiento de los sistemas de producción y a la aplicación de prácticas que posibiliten mantener la calidad fisiológica y sanitaria de las semillas durante su almacenamiento. Las semillas de maní se pueden almacenar en la propia fruta, dando una mayor protección a los granos, o fuera de ellas, requiriendo de un control más eficaz para mantener su calidad.

Una de las alternativas que está despuntando en cuanto a los métodos tradicionales de conservación de las semillas, es la crioconservación del material biológico, a temperaturas muy bajas (-196 °C) en nitrógeno líquido. A través de este método, el material se almacena en una forma estable e, a esta temperatura, todos los procesos metabólicos tales como la respiración y la actividad enzimática, son paralizados, impidiendo su deterioración (Almeida, 2006). De esta forma, por ser un método eficiente y práctico de conservación es posiblemente, hoy en día, la técnica que proporciona más ventajas para conservación *ex situ* de las especies vegetales en especial para aquellas en las que la conservación convencional de las semillas no se puede utilizar satisfactoriamente. Sin embargo, es conveniente realizar estudios para poner esta técnica al alcance de cada especie, inclusive para cada genotipo e, sobre todo, para comprender los mecanismos fisiológicos que actúan durante la crioconservación.

Con base en estas consideraciones el objetivo del presente trabajo fue, evaluar el efecto de la crioconservación sobre la calidad fisiológica, la incidencia de los hongos y las aflatoxinas en las semillas de maní de la especie BRS Havana, durante 12 meses de almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Lugar de realización de los experimentos.

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio Almacenamiento y Procesamiento de Productos Agrícolas (LAPPA) de la Unidad de Académica de Ingeniería Agrícola (UAEA) Centro de Tecnología y Recursos Naturales (CTRN), de la Universidad Federal de Campina Grande (UFCG) y en el Laboratorio de Química Embrapa Algodão, en Campina Grande, Paraíba.

Origen de las semillas y los frutos. Para la realización de los experimentos se utilizaron

semillas de maní de la especie RBS Havana, que fueron adquiridas de un productor que forma parte de un proyecto de producción integrada junto a la Embrapa Algodão, Campo Experimental de Barbalha, Distrito Missão Nova, Município Missão Velha, CE.

Aislamiento y crecimiento de los hongos.

En cada lote de maní fue evaluada la microbiota fúngica utilizando la metodología del papel de filtro humedecido (Neergaard, 1979). Cuatro repeticiones de diez semillas cada una, fueron distribuidas en placas de Petri, conteniendo tres discos de papel de filtro ($\emptyset = 9,5$ cm) humedecidos con agua destilada y esterilizada; después, dejadas en estantes en ambiente no controlado del LAPPA, durante ocho días. Transcurrido este período, las semillas contenidas en las placas fueron examinadas individualmente en un microscopio estereoscópico para la visualización de las colonias de hongos presentes. Considerándose las características de las colonias en las semillas de maní, se procedió al aislamiento del *Aspergillus flavus*, retirándose los fragmentos micelianos (2 mm de diámetro), de los bordes de las colonias y inoculándolos en el medio del cultivo BDA (compuesto por 200 g de papa, 20 g de dextrosa, 20 g de Agar-agar y 1000 ml de agua destilada) esterilizado en autoclave a 121 °C, durante 30 min, contenido en placas de Petri. En las colonias formadas se observaron las de *A. flavus* que se desarrollaron sin contaminación, retirándose los fragmentos micelianos e inoculando en el centro de las placas de Petri conteniendo el medio de cultivo Czapek, utilizado como medio de cultivo estándar para observar las características de los cultivos de hongos del género *A. flavus* y *Penicillium*, como forma, color y la producción de pigmento.

De esta forma las especies *A. flavus* debidamente identificados fueron cultivadas en medio del cultivo BDA contenido en tubos de ensayo, produciendo así, el inóculo que fue

multiplicado en una masa de semillas de maní precalentado en una estufa a 105°C, durante una hora, y enfriada a temperatura ambiente. Los hongos fueron inoculados, la masa de semillas contenidas en un recipiente de vidrio, agitando manualmente y luego siendo distribuidas en placas de Petri que contenían tres discos de papel de filtro humedecido con agua destilada y esterilizados; después dejados a temperatura ambiente y transferidos para una nueva masa de semillas de maní siguiendo el mismo procedimiento, antes de que hubiera agotamiento total del sustrato; esas semillas contaminadas fueron utilizadas con inóculo para los experimentos descritos a continuación.

Crioconservación de las semillas. En la crioconservación se utilizaron 300 g de semillas, las cuales fueron envasadas en envases de plástico, recubiertos con papel de aluminio y colocados en canister, los cuales eran llevados a los cilindros criogénico que contenían nitrógeno líquido a -196 °C, durante un período de 12 meses; cada dos meses las semillas fueron descongeladas, a temperatura ambiente del LAPPA (± 25 °C) y luego fueron determinados los contenidos de humedad (%), micoflora (%), aflatoxinas (cada tres meses), la germinación (%) y el vigor (la longitud de las plántulas y la materia seca). En comparación con las semillas de crioconservadas, se dejaron semillas condicionadas en envases de algodón en condiciones naturales, evaluando las mismas variables analizadas en las semillas crioconservadas.

Prueba de germinación. Fue realizada en las condiciones ambientales del LAPPA (sin control de temperatura y humedad), se utilizaron 200 semillas por tratamiento, distribuidas en cuatro repeticiones de 50 semillas, las cuales fueron sembradas en bandejas de plástico que contenían, como sustrato, vermiculita, humedecido con agua destilada con 70% de su capacidad para retención de agua. El conteo se llevó a cabo 10

días después de la siembra, de acuerdo con los procedimientos establecidos en las Normas para el Análisis de Semillas (BRASIL, 2009), así como para la evaluación de plántulas normales y anormales.

Prueba de vigor. Las pruebas de vigor fueron realizadas junto con la prueba de germinación.

a) Longitud de las plántulas: al 10^o días después de la siembra las plántulas consideradas normales fueron retiradas del sustrato e medidas (hipocótilo + epicótilo) con una regla milimetrada. Los resultados de la evaluación fueron obtenidos por medio del cociente entre la sumatoria de las medidas de plántulas normales y el número de plántulas evaluadas, expresada en centímetros (Nakagawa, 1994).

b) Materia seca: determina la longitud de las plántulas, se eliminaron los cotiledones, en donde cada repetición del tratamiento se colocó en bolsas de papel y llevado a la estufa termoeléctrica, con circulación de aire a una temperatura de 70 °C ± 3 °C, durante 72 horas. Después de ese tiempo, las muestras fueron retiradas de la estufa y colocadas para enfriar en un desecador, durante 30 minutos. Cada repetición fue pesada en una balanza de precisión de 0,001 g (NAKAGAWA, 1994). Los resultados fueron obtenidos dividiendo el peso de la materia seca total de las plántulas por el número de plántulas componentes, expresado en gramos por plántula. Se obtuvo el peso medio de materia seca de las plántulas por la media aritmética de las repeticiones.

Determinación y evaluación de la micoflora. En la determinación de la micoflora fue utilizado el método del papel de filtro o "blotter-test" (Neergaard, 1979). Diez semillas fueron distribuidas en placas de Petri, que contenían dos discos de papel de filtro (∅ = 9,5 cm) esterilizado y humedecido con agua destilada esterilizada, se utilizaron 4 repeticiones por tratamiento y se dejaron en ambientes no controlados del LAPPa durante

ocho días. Transcurrido este período, las semillas contenidas en las placas fueron examinadas individualmente para la visualización de las colonias de hongos presentes y, cuando necesario, una confirmación de colonia, esta fue examinada en el microscopio estereoscópico; de esta manera, la cuantificación fue efectuada considerando el porcentaje de semillas infectadas por hongos y el género presente.

Determinación de la aflatoxina. Las muestras de semillas de maní para el análisis de aflatoxinas estaba compuesta de 100 g de semillas trituradas en un molino de hélice, similar a un multiprocesador y fueron tamizadas a través de un tamiz de 14 mesh, para obtener la textura adecuada requerida para realizar el experimento, utilizándose 50 g de muestra para la extracción de las aflatoxinas.

a) Preparación de las soluciones estándar. Se adquirieron los patrones de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en el Laboratorio SIGMA en forma de cristales. Para la preparación de las soluciones estándar se utilizó la metodología AOAC (2005), donde cada patrón de aflatoxina fue diluido individualmente en metanol, originando la solución madre, con una concentración de 20 µg mL⁻¹, después, fueron preparadas las soluciones de trabajo con diferentes concentraciones para ser utilizadas en la detección y cuantificación de las aflatoxinas. La concentración final de las soluciones estándar de aflatoxina fue determinada mediante la lectura de la absorbancia utilizando un espectrofotómetro y se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$CA = \frac{A \times PM \times 1000}{\epsilon} \quad (2)$$

en que:

CA – concentración de aflatoxina, µg mL⁻¹

A – absorbancia

PM – peso molecular

ε - absortividad molar de la aflatoxina

b) Extracción y purificación de las muestras. La extracción y purificación de las muestras para la determinación de las aflatoxinas fueron realizadas de acuerdo con la metodología descrita por Soares & Rodrigues-Amaya, mejorado por Queiroz (1998).

De acuerdo con el método, la extracción de aflatoxinas fue realizada utilizando metanol como solvente orgánico y una solución acuosa de cloruro potásico al 4%, agitándose en una licuadora durante cinco minutos a baja velocidad y luego efectuando la filtración cualitativa.

El extracto obtenido fue purificado con una solución de sulfato cúprico al 10% de Celite (agente filtrante), con la finalidad de retirar todas las sustancias que interferirían, como pigmentos. En la partición líquido-líquido se utilizó el hexano como disolvente orgánico para el desengrase, y cloroformo para la extracción de las aflatoxinas; luego, el extracto fue evaporado en un baño de maría a 60 °C y mantenido bajo refrigeración en un congelador, hasta el momento del análisis cromatográfico, cuando el concentrado fue resuspendido en 500 µmL de metanol y se agitó manualmente, por 1 min.

c) Identificación de las aflatoxinas. La selección de las aflatoxinas en las muestras fue realizada a través de la cromatografía en capa delgada (CCD), con el uso de cromato hojas de aluminio de 20 x 20 cm, espesura de 0,2 mm, de la marca Merck (KIESEL GEL - 60/1.05553) y la mezcla de tolueno, acetato de etilo y ácido fórmico, en las proporciones de 60:30:10, respectivamente, como sistema móvil. Fueron aplicados 10 µL de las muestras y 10 µL dos patrones B₁, B₂, G₁ y G₂, a 2 cm de la base de la placa y colocadas en una cuba que contenía la fase móvil; la elución se realizó a 10 cm a partir del punto de aplicación (Figura 1).

La identificación de las aflatoxinas fue hecha a través de la comparación con Rfs, color y la intensidad de fluorescencia de las

manchas correspondientes a las muestras comparadas con las manchas patrones, usando una cámara de luz ultravioleta con longitud de onda de 366 nm.

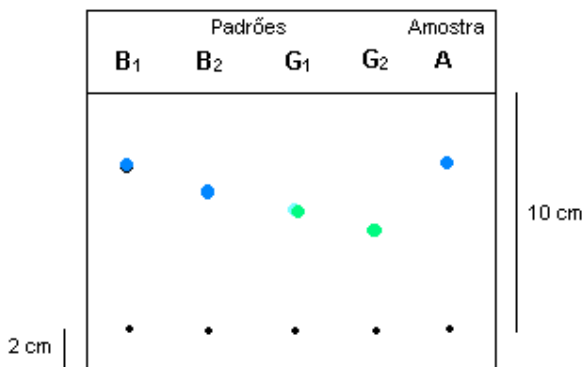


Figura 1 Esquema representando una placa unidimensional de CCD (cromatografía en capa delgada)

Para la confirmación de las muestras en que hubo sospecha de presencia de algún tipo de aflatoxina, se realizó una nueva lectura, utilizando el sistema solvente cloroformo - acetona (90:10) y, enseguida, sometiéndolas nuevamente a lectura, en la cámara la luz ultravioleta de 366 nm.

La cuantificación de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ fue realizada a través de la comparación visual de la intensidad de la fluorescencia de la mancha de la muestra, con la fluorescencia de las manchas de los patrones aplicados en la placa en concentraciones crecientes, en alícuotas de 0,4, 0,6, 0,8, 1 y 2 µL. Repeticiones con nuevas alícuotas de patrones o de muestras fueron hechas, cuando fue necesario, para obtener una mejor aproximación de la intensidad de la fluorescencia, entre la mancha sospechosa y el patrón.

Se determinó el cálculo de la concentración de aflatoxinas mediante la ecuación 3:

$$\mu\text{g de toxina / kg de muestra} = \frac{S_x \times Y \times V}{W \times Z} \dots(3)$$

en que:

S – microlitros del patrón de la toxina con fluorescencia equivalente a la de la muestra;

Y – concentración del patrón, $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$;

V – volumen final, en μL , del extracto de la muestra, 500 μL

Z – microlitros aplicados del extracto final;

W – peso da muestra en gramos en el extracto final, 8,35 g

d) Prueba de recuperación de la aflatoxina B₁. La prueba de recuperación consistió en contaminar una muestra de semilla de maní que no contenía contaminación por aflatoxinas, mediante el siguiente procedimiento: se pesaron muestras de 50 g en tres repeticiones y se adiciono una solución do patrón B₁ en los niveles de 7,8 $\mu\text{g } \text{kg}^{-1}$ (para muestras inoculadas y no inoculadas y sin tratamiento), 12,68 $\mu\text{g } \text{kg}^{-1}$ (para muestras inoculadas y con diferentes concentraciones del extracto) y 17,6 $\mu\text{g } \text{kg}^{-1}$ (para la muestra sin inoculación y con diferentes concentraciones extracto). Después de 24 horas se procedió a la extracción para verificar el porcentaje de aflatoxina B₁, recuperada a través de la metodología utilizada en el experimento. La recuperación fue calculada a partir de la relación entre la cantidad de toxina cuantificada y la adicionada al inicio del procedimiento analítico, ejecutado de forma completa.

Análisis estadístico. El diseño experimental utilizado fue el completamente al azar (DAC) en un diseño factorial con cuatro repeticiones, de la siguiente manera:

a) 2 x 7 referente al contenido de humedad y la incidencia de los hongos, 2 x 4 concerniente a la germinación y el vigor y 2 x 2 para aflatoxina, representandos por: ambiente natural y nitrógeno líquido (-196 °C) y período de almacenamiento.

El programa computacional utilizado para realizar los cálculos fue el Assistat (Silva & Azevedo, 2006) versión beta 7.4, las medias

fueron comparadas mediante la prueba de Tukey al 1 y 5% de probabilidad y, para el factor cuantitativo (tiempo) se aplicó una regresión en el análisis de de la varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación. A través de los datos de la Tabla 2, se observa que las semillas almacenadas en nitrógeno líquido no sufrieron perdida de germinación durante el almacenamiento, diferentemente del ambiente natural, en que la pérdida fue del 70%, pasando de 83,50% de germinación al inicio del almacenamiento para 13,50% después de seis meses.

Cabe señalar que, para las semillas crioconservadas la germinación se mantuvo durante todo el tiempo del experimento (12 meses) y, en conformidad con las recomendaciones de Cochran (1974) se utilizó, para el análisis estadístico, el tiempo de seis meses, debido a las semillas en el ambiente natural no haber presentado germinación a los ocho meses (T8) de almacenamiento, es decir, el uso de datos de valor cero, influencia directamente la homogeneidad de las varianzas de los tratamientos, siendo recomendado la omisión de esos datos.

Después de someter los datos a un análisis de regresión en la variación, se optó por el efecto lineal, en virtud de la significancia y el mayor coeficiente de correlación (R²), el cual fue del 86% para las semillas crioconservadas y 99,4% para las almacenadas en ambiente natural (Figura 2).

El comportamiento de la germinación del maní crioconservado sin disminución significativa hasta el final del período de almacenamiento se debe al hecho de que las semillas mantenidas con bajo contenido de humedad (5,31%) a bajas temperaturas (-196 °C), teóricamente el período de conservación puede ser incrementado por cien y miles de años, conforme los estudios de Roberts (1973), mientras que la pérdida lineal de la

germinación de las semillas almacenadas en un ambiente natural es debido al hecho de que las mismas pertenecen a la categoría de productos perecibles, proceso este irreversible y que, si no es evitado y controlado, puede llevar a la muerte de las semillas (plántulas) en poco tiempo (Almeida, 2006). Esos resultados encuentran apoyo en el trabajo de Almeida et al. (2010) que almacena los 5 (cinco) especies de oleaginosas y no registraron pérdida de la germinación para las semillas de maní crioconservadas, ocurriendo lo contrario con estas semillas en el ambiente natural.

Tabla 2. Valores medios de la germinación (%) de las semillas de maní de la cv. BRS Habana crioconservadas y almacenadas en ambiente natural, po 12 meses

Tiempo (meses)	Condición de almacenamiento	
	Crioconservadas (C)	Ambiente natural (AN)
T ₀	83,50 A	83,50 A
T ₂	83,00 A	59,00 B
T ₄	81,00 A	41,00 B
T ₆	81,00 A	13,50 B
DMS (L)	3,63	

Las medias seguidas de la misma letra en la línea no difieren estadísticamente por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad

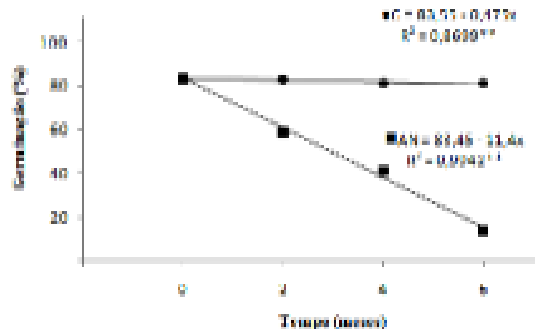


Figura 2. Representación gráfica del porcentaje de germinación de las semillas de maní cv. BRS Habana crioconservados (C) y almacenadas en el ambiente natural (AN) por 6 meses

Vigor - longitud y materia seca de las plántulas. De acuerdo con la Tabla 3 se verifica, entre la condición de almacenamiento, la inferioridad de la longitud

de las plántulas y la materia seca en los tiempos de T₄ y T₆ para las semillas almacenadas en el ambiente natural frente a las crioconservadas. Por otro lado, para T₀ y T₂ tanto en la longitud de las plántulas como en la materia seca no hubo diferencias significativas para la condición de almacenamiento.

Tabla 3 Valores medios de la longitud de las plántulas (cm) y de la materia seca de las semillas de maní cv. BRS Habana crioconservados y almacenados en un ambiente natural por 12 meses

Tiempo (meses)	Condición de almacenamiento	
	Crioconservadas (C)	Ambiente natural (AN)
	Longitud de las plántulas (cm)	
T ₀	7,97 A	7,97 A
T ₂	8,02 A	8,24 A
T ₄	7,71 A	6,95 B
T ₆	7,58 A	4,09 B
DMS (L)	0,36	
Materia seca (g)		
T ₀	0,2348 A	0,2348 A
T ₂	0,2135 A	0,2035 A
T ₄	0,2020 A	0,1630 B
T ₆	0,2103 A	0,1560 B
DMS (L)	0,01	

Las medias seguidas de la misma letra en la línea no difieren estadísticamente por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad

Comparando el vigor de las semillas después del análisis de regresión, considerándose la prueba de significancia y el mayor coeficiente de correlación (R²) se escogió el efecto lineal de la longitud de las plántulas de las semillas crioconservadas y el cuadrático para las mantenidas en el ambiente natural y, para la materia seca, en ambas condiciones el efecto cuadrático.

A través de los datos de esta tabla y de sus representaciones gráficas (Figura 3) se nota claramente que las semillas, cuando almacenadas en nitrógeno líquido, mantuvieron su vigor (longitud de la plántula y materia seca) durante los tiempos de almacenamiento estudiados mientras que en

las semillas almacenadas en el ambiente natural hubo pérdida de vigor. Este comportamiento puede ser explicado por el hecho de que las semillas almacenadas pueden conservar como máximo sus cualidades iniciales, siendo inevitable las pérdidas de origen fisiológico, en el caso específico, se dio con el vigor a los 4 meses del inicio del almacenamiento para las semillas mantenidas en el ambiente natural sin control de la temperatura y de la humedad relativa do ar, comportamiento que, en parte, se explica por ser la viabilidad de las semillas dependientes de las características genéticas, de las especies y de los efectos del medio ambiente durante la formación, desarrollo, maduración, recolección, procesamiento y almacenamiento.

Con relación a las semillas criopreservadas, Cavalcanti Mata et al. (2002), trabajando con semilla de maíz de las variedades BR-451, BR-201 y BR-2121 y utilizando dos técnicas por inmersión en nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C y en vapor de nitrógeno a -170 °C, verificaron que la calidad fisiológica disminuye significativamente hasta los 30 días y a partir de este periodo permaneció constante hasta el final (150 días) de almacenamiento.

Esta pérdida de viabilidad de la semilla en condiciones naturales puede ser explicada por el posible hecho de que cada especie vegetal tiene sus propias características genéticas; luego, algunas especies puede ser almacenado sin pérdida de viabilidad en un cierto período de tiempo mientras que otras pierden su viabilidad marcadamente con el tiempo de almacenamiento. Además, las condiciones ambientales, como la humedad relativa del aire y la temperatura, pueden haber influenciado directamente en la reducción de la viabilidad una vez que esas semillas fueron envasadas en embalajes permeables permitiendo, así, interferencia del

medio ambiente sobre la calidad de las semillas.

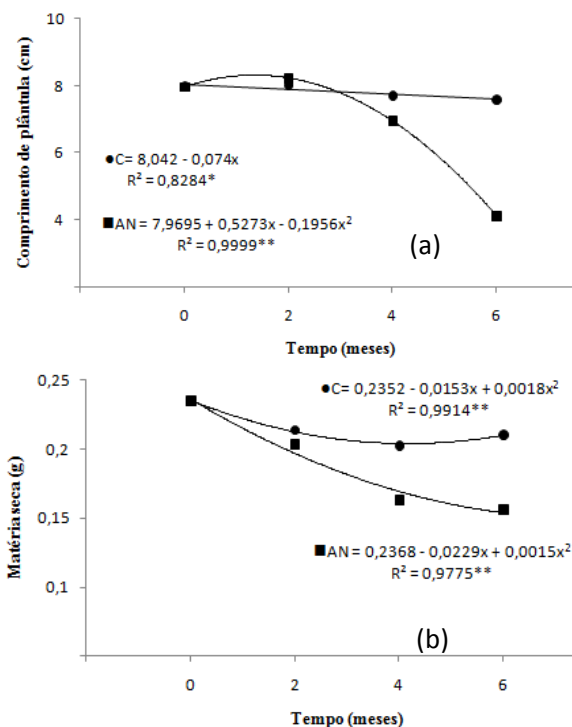


Figura 3 Representación gráfica de la longitud de la plántula (a) y de la materia seca (b) de las plántulas de las semillas de maní de la cv. BRS Havana criopreservadas (C) y almacenadas en el medio ambiente natural (AN) por 6 meses.

Incidencia de hongos. El comportamiento de la incidencia de hongos para la interacción Condición de almacenamiento x tiempo es mostrada en la Tabla 4 observándose, para la criopreservación y para el ambiente natural, la incidencia de *A. flavus* y *Rhizopus*, a excepción del T₂ para *Rhizopus* en el ambiente natural (AN), donde no se registró incidencia ni superioridad estadística de esta condición cuando comparado con la criopreservación. Comportamiento semejante ocurrió para el *A. flavus*, a excepción de los tiempos T₁₀ y T₄ que, en AN, la incidencia fue menor que la registrada en la condición criopreservada.

Con relación al tiempo para cada condición de almacenamiento, se verifica una tendencia para una mayor incidencia de esos

hongos a medida en que pasa el tiempo de almacenamiento y, para el *A. flavus* en la condición C la mayor incidencia es registrada en T₁₂ (92,50%) seguida de T₁₀ y T₄ que, estadísticamente, no difirieron y presentaron media de 56,25% y las menores en los demás tiempos en que, estadísticamente la incidencia

fue la misma. Para la condición AN la mayor incidencia también fue en T₁₂ (95,00%), seguida de T₈ y en T₁₀ y las menores en T₂ y T₀, en que los valores medios registraron 26,25% de incidencia.

Tabla 4 Valores medios de incidencia (%) de hongos para la interacción Condición de almacenamiento x Tiempo en semillas de maní de la cv. BRS Havana crioconservadas y almacenadas en ambiente natural, por 12 meses

Tiempo (meses)	Condición de almacenamiento			
	C		AN	
	<i>A. flavus</i>		<i>Rizophus</i>	
T ₀	30,00 cA	30,00 deA	5,00 bcA	5,00 deA
T ₂	22,5 cA	22,50 eA	25,00 aA	0,00 eB
T ₄	50,00 bA	42,50 cdA	15,00 abB	25,00 bcA
T ₆	25,00 cB	40,00 cdA	12,50 abcB	35,00 bA
T ₈	22,5 cB	65,00 bA	5,00 bcB	17,50 cdA
T ₁₀	62,50 bA	52,50 bcB	0,00 cB	22,50 bcA
T ₁₂	92,50 aA	95,00 aA	5,00 bcB	65,00 aA
DMS (C)	14,43		13,19	
DMS (L)	9,41		8,60	

Las medias seguidas de la misma letra minúscula en la columna y mayúscula en la línea no difieren estadísticamente por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad; C: crioconservada; NA: Ambiente Natural

El aumento de la incidencia del *A. flavus* a lo largo del tiempo de almacenamiento para la condición crioconservada se debe, probablemente, a su existencia en diferentes formas (vegetativo y latente) en las semillas antes de su crioconservación, afirmación que se basa en las observaciones de CAMPOS et al. (2004), realizando pruebas *in vitro* para evaluar el efecto de la crioconservación (-196 °C) en el crecimiento radial y la producción de conidios de dos cultivos de hongos depredadores de nematodos, al verificar que las bajas temperaturas no influenciaron significativamente el crecimiento radial de los hongos, de modo que este crecimiento fue más expresivo con el uso de glicerol, pero la producción de esporas ocurrió en mayor proporción cuando conservadas en un refrigerador a 4 °C.

La presencia de hongos en las semillas crioconservadas muestra que, posiblemente, ellos resisten a una gran amplitud térmica,

tolerando bajas temperaturas o mismo forman estructura de resistencia, como las esporas que soportan condiciones ambientales adversas, como escasez de nutrientes, de agua y temperaturas desfavorables al desarrollo fúngico; luego, al encontrar las condiciones ideales vuelven a desarrollarse.

Goldfarb et al. (2010) en su estudio con las semillas de Jatrofa verifico que los hongos del género *Aspergillus* ocurrieron de forma predominante sobre los demás géneros en los períodos de 30, 60 y 90 días en las semillas de crioconservadas, no siendo identificado este género en las semillas que no fueron crioconservadas . De la misma forma Farías (2003), verifico la presencia de hongos del género *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. y *Rhizopus* sp. en semillas de jatoba crioconservadas durante siete días.

Determinación de aflatoxinas. La evaluación de la determinación de aflatoxinas

fue realizada durante 12 meses, en que las semillas permanecieron almacenadas, pero para el análisis estadístico se utilizaron solamente dos tiempos T_0 y T_{12} en que se detecto la ocurrencia de aflatoxinas, en virtud de que el empleo de los demás meses de la media y la varianza igual a cero influencio directamente en la homogeneidad de las varianzas de los tratamientos, por lo que Cochran (1947) recomienda su omisión en el análisis.

La Tabla 5 contiene los resultados de la cantidad de aflatoxina B_1 y B_2 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para la interacción Condiciones de almacenamiento x Tiempo de las de las semillas de maní crioconservadas y almacenadas en un ambiente natural por 12 meses. En el análisis de los datos se observa, para la aflatoxina B_1 , superioridad estadística en T_{12} en ambas condiciones de almacenamiento ($-196\text{ }^\circ\text{C}$ y AN). En las semillas crioconservadas el nivel de la cantidad de aflatoxina B_1 fue de $14,62\ \mu\text{g kg}^{-1}$ en T_0 y $57,25\ \mu\text{g kg}^{-1}$ en T_{12} , y en las mantenidas en el AN presentaron, en T_0 , $14,62\ \mu\text{g kg}^{-1}$, y en T_{12} $34,10\ \mu\text{g kg}^{-1}$. Entre las condiciones de almacenamiento la aflatoxina B_1 fue igual en la condición C y NA en T_0 , mientras se verifico e T_{12} la menor ocurrencia de la aflatoxina B_1 en las semillas almacenadas en el ambiente natural y mayor en las semillas de crioconservadas, comportamiento similar se tiene para la aflatoxina B_2 , pero con ocurrencia solamente en T_{12} , en que el nivel para la condición AN fue de $10,07\ \mu\text{g kg}^{-1}$ y en la condición criopreservados $50,22\ \mu\text{g kg}^{-1}$.

La superioridad de los niveles de aflatoxina para la condición crioconservação (C) se debe, probablemente, a las condiciones de tensión del proceso de almacenamiento a temperatura ultra-baja ($-196\text{ }^\circ\text{C}$) hasta que las semillas entren en equilibrio con este ambiente, afirmación que se respalda en las consideraciones de Pinheiro (2004), cuando afirma que el hongo, cuando crece en

condiciones de tensión, prioriza la producción de toxinas.

Los resultados del presente estudio revelaron en T_{12} , para las semillas crioconservadas, niveles de aflatoxinas superiores a los exigidos para la comercialización de este producto por el Ministerio de Agricultura, el cual es fijado como límite máximo permitido para la comercialización $20\ \mu\text{g kg}^{-1}$. Cabe señalar que referidos niveles máximos permitidos se refieren a la suma de los tipos de aflatoxina ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) que en el presente trabajo ($B_1 + B_2$) fue $107,47\ \mu\text{g kg}^{-1}$ para la condición (C) y $44,17\ \mu\text{g kg}^{-1}$ para la condición (AN).

Tabla 5 Cantidad de aflatoxina B_1 y B_2 ($\mu\text{g kg}^{-1}$) para la interacción Condición de almacenamiento x Tiempo en las semillas de maní de la cv. BRS Havana crioconservadas y almacenadas en un ambiente natural, por 12 meses

Tiempo (meses)	Condición de almacenamiento	
	Crioconservadas (C)	Ambiente natural (AN)
Aflatoxina B_1		
T_0	14,62 bA	14,62 bA
T_{12}	57,25 aA	34,10 aB
Aflatoxina B_2		
T_0	0,00 bA	0,00 bA
T_{12}	50,22 aA	10,07 aB

Las medias seguidas de la misma letra minúscula en la columna y mayúscula e la línea, no difieren estadísticamente por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad.

Las aflatoxinas son las únicas toxinas reguladas por el Ministerio de Salud de Brasil, en función de los daño que pueden causar a la salud humana y animal, por lo que la presencia de esas micotoxinas en el maní deben ser determinadas y si fueran superiores al límite tolerado, el producto es considerado impropio para el consumo y/o comercialización (BRASIL, 2002).

Debe señalarse que la contaminación por aflatoxinas en el maní ocurre de una manera muy heterogénea, dificultando estimar exactamente la concentración en un gran lote debido a la gran variabilidad asociada con el

análisis de la contaminación por aflatoxinas (CAST, 2003).

CONCLUSIONES

- ✓ Las semillas almacenadas en nitrógeno líquido (-196 °C) mantuvieron su germinación y vigor durante el almacenamiento, mientras que las almacenadas en condiciones ambientales perdieron acentuadamente su viabilidad después de 9 meses de almacenamiento.
- ✓ Los hongos detectados en las muestras de maní traídas del campo y durante el almacenamiento de las semillas crioconservadas y almacenadas en el medio natural, fueron: *A. flavus* y *Rhizopus*, con predominancia del *A. flavus*.
- ✓ Se detecto la presencia de la aflatoxina B₁ en el momento inicial (T₀) e aflatoxina B₁ y B₂ a los 12 meses de almacenamiento tanto en la semillas almacenada en el ambiente natural como en las crioconservadas.
- ✓ Los niveles de aflatoxina (B₁ + B₂), al final del almacenamiento se presentaron por encima del limite máximo permitido por la Legislación Brasileña (20 µg kg⁻¹), para las semillas de crioconservadas (107,47 µg kg⁻¹) y en ambiente natural (44 , 17 µg kg⁻¹).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, F.A.C.; Jerônimo, E.S.; Alves, N.M.C.; Gomes, J.P.G. de ; Silva, A.S. Estudo de técnicas para o armazenamento de cinco oleaginosas em condições ambientais e criogênicas. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v. 12, p. 189-202, 2010.

Almeida, F. de A.C. Crioconservação de sementes na manutenção de bancos de germoplasma. Simpósio Brasileiro do Urucum. Palestra... SIMBRAU. 2006.

Almeida, F. De A.C.; Morais, A.M.; Carvalho, J.M.F.C.; Gouveia, J.P.G. de. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. Revista Brasileira de

Engenharia Agrícola e Ambiental, v.6, n.2, p.295-302, 2002.

Almeida, F. De A.C.; Villamil, J.M.P.; Gouveia, J.P.G. de. Efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.2, n.1, p.67-71, 2000.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Natural Toxins. In: Official Methods of Analysis, Arlington, Virginia, p.3-5, 2005.

BRASIL: Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 274 de 15/10/2002. Dispõe sobre os limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 de out. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Regras para análise de sementes. Brasília, 2009. 365p.

Campos, A.K.; Mota, M.A.; Araújo, J.V.; Cecon, P. R. Atividade predatória, crescimento radial e esporulação de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* spp, submetidos a criopreservação. Ciência Rural, v.34, n.2, p.465-469, 2004.

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

Cavalcanti Mata, M.E.R.M.; Rocha, M. Do S.; Duarte, M.E.M. Crioarmazenagem de sementes de milho (*Zea mays* L.). Revista Brasileira de Armazenamento, v.27, n.2, p.23-30, 2002.

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

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/do>

- wnload/safra/4levsafra.pdf> Acesso em: 18 de novembro de 2011.
- Farias, D.C. Desenvolvimento de um protocolo para crioconservação de sementes de jatobá: fitossanidade e cinética de congelamento. 2003. 93f. Dissertação (Mestrado) – UFCG. Campina Grande, PB.
- Goldfarb, M.; Duarte, M.E.M.; Cavalcanti Mata, M.E.R.M. Armazenamento criogênico de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. Revista Biotemas, v. 23, n.1, 2010.
- Nakagawa, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: Vieira, R. D.; Carvalho, N.M. Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP, p.48-85, 1994.
- Neergaard, P. Seed pathology. 2 ed. London: Mac Millan Press, 1979, v.2, 1191p.
- Pinheiro, M.R.R. Estudo de variabilidade genética de *aspergillus flavus* como base para o desenvolvimento de PCR multiplex para detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha-do-brasil e castanha de caju. 2004. 149f. Dissertação Mestrado – UCB. Brasília, DF.
- Queiroz, M.S.R. de; Narain, N.; Freire, R.M.M.; Farias, S.R. de; Santos, R.C. Dos. Determinação de aflatoxinas em sementes de amendoim armazenadas em condições ambiente e em câmara fria. Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas, v.10, n.1/2, p.1009-1015, 2006.
- Roberts, E.H. Problems of long: term storage of seed and pollen for genetic resouces conservation. In: Frankel, O. H.; Hawkes, J. G. Crop genetic resources for today and tomorrow. Cambridge, p.269-295, 1973.
- Santos, C.C.M.; Lopes, M.R.V.; Kosseki, S.Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/SP. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.60, n.2, 153-157, 2001.
- Silva, F.A.S.; Azevedo, C.A.V.A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: EORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural Engineers, p.393-396, 2006.
-