

PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A EM FEIJÃO
(Phaseolus vulgaris L.)

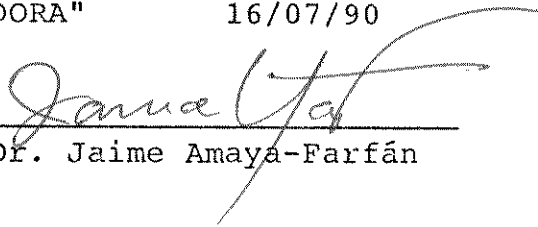
Milade dos Santos Carneiro Cordeiro
Tese de Doutorado

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
MILADE DOS SANTOS CARNEIRO CORDEIRO E APROVADO PELA COMISSÃO

JULGADORA"

16/07/90


Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán

PRODUÇÃO DE OCRATOXINA A EM FEIJÃO
(*Phaseolus vulgaris* L.)

MILADE DOS SANTOS CARNEIRO CORDEIRO
Química Orgânica

Orientador

Prof. Dr. JAIME AMAYA-FARFÁN

Co-orientador

Prof. Dr. PAULO JOSÉ SAMENHO MOURAN

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Doutorado em Química Orgânica

À memória
de meus pais.

Ao Antonio, meu marido.
À Amanda e Marco Antonio,
meus filhos.
Aos sobrinhos pela confiança
e pelos incentivos recebidos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jaime Amaya-Farfán, pela orientação e apoio dedicados a esse trabalho, os quais possibilitaram um maior desenvolvimento científico e crítico, e pela sua amizade.

Ao Prof. Paulo José Samenho Moran, pelo incentivo no desenvolvimento desse trabalho e pela amizade.

Ao corpo docente do Departamento de Química da Universidade do Estado do Amazonas pela oportunidade que me deram para realizar meu curso de Doutorado.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, por possibilitar o desenvolvimento desse trabalho.

À CAPES, Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal Especializados pela bolsa de pós-graduação.

À Carla De Marco, Cristina Boccato Ferreira e Iná Aparecida Costa dos Santos pelo auxílio que me deram nas análises.

À Sílvia Janzon pela datilografia desse trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE ESPECTROS.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1 - INTRODUÇÃO.....	01
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Preparo Geral das Amostras.....	19
3.1.1. Produção de Ocratoxina no feijão.....	20
3.1.2. Meio de cultura.....	20
3.1.3. Preparo das amostras de feijão.....	21
3.1.4. Padrão de micotoxina.....	21
3.1.5. Método para extração.....	23
3.1.6. Quantificação.....	25
3.1.7. Confirmação das ocratoxinas A e B pela formação de éster metílico.....	26
3.2. Purificação da Ocratoxina A.....	27
3.2.1. Análise espectroscópica.....	30
3.3. Determinação da Composição de Aminoácidos Livres.....	30
3.3.1. Preparo das amostras.....	31
3.4. Nitrogênio Total e Proteína.....	32

	Página
3.5. Determinação de Metais.....	32
3.6. Determinação de Teor Total de Aminoácidos no Feijão..	33
3.7. Determinação de Açúcares Solúveis Totais e Redutores no Feijão.....	35
3.8. Teste Biológico com <i>Artemia salina</i> L.....	36
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Evidência da Ocratoxina A.....	37
4.2. Conteúdo de Aminoácidos Livres.....	44
4.3. Minerais.....	56
4.4. Açúcares.....	61
4.5. Toxidez da Ocratoxina A.....	63
5 - CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1 - Ocorrência de ocratoxina A em vários países em anos diferentes.....	06
2 - Valores obtidos na quantificação da ocratoxina A produzida pelos <i>Aspergillus ochraceus</i> inoculado em feijão natural e em feijão irradiado com ^{60}Co . (Incubado a 25°C durante 28 dias com 12% de umidade).....	38
3 - Espectro de massa da ocratoxina A.....	41
4 - Composição de aminoácidos livres do feijão preto expressa em $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de massa.....	45
5 - Composição de aminoácidos livres do feijão branco expressa em $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de massa.....	46
6 - Composição de aminoácidos livres do feijão rosinha expressa em $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de massa.....	47
7 - Composição de aminoácidos livres do feijão roxo expressa em $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de massa.....	48
9 - Composição de aminoácidos livres do feijão rajado expressa em $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de massa.....	49
9 - Metionina livre como fator inibitório da produção de ocratoxina nos grãos de feijão.....	52

10 - Conteúdo de aminoácidos totais de cotilédone das cinco variedades de feijão.....	54
11 - Conteúdo de aminoácidos totais do tegumento das cinco variedades de feijão.....	55
12 - Composição de minerais do tegumento das cinco variedades de feijão expressa em $\mu\text{g/g}$	57
13 - Composição de minerais do cotilédone das cinco variedades de feijão expressa em $\mu\text{g/g}$	58
14 - Teores de açúcares de feijões, <i>Phaseolus vulgaris</i> , extraídos com etanol a 80%.....	62
15 - Bioensaio de toxidez com <i>Artemia salina</i> L. em meio etanol-água (1 + 9).....	64
16 - Tempos de retenção dos aminoácidos livres em coluna de troca catiônica tipo Dowex 50W, sistema de tampão citrato de lítio.....	79
17 - Tempo de retenção dos aminoácidos totais em coluna de troca catiônica tipo Dowex 508-2B, sistema de tampão citrato de lítio.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1 - Estruturas dos composotos do grupo das ocratoxinas..	04
2 - Extração e limpeza para triagem da ocratoxina A.....	22
3 - Triagem e quantificação da ocratoxina A.....	24
4 - Procedimento geral para a purificação da ocratoxina A, obtida do extrato clorofórmico em <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	29

ÍNDICE DE ESPECTROS

Página

- 1 - Ocratoxina A em metanol. Espectro ultravioleta e visível DMS 100..... 42
- 2 - Ocratoxina A em filme. Espectro de absorção infravermelho. Espectrômetro infravermelho PERKIN-ELMER, modelo 1430 com registrador rotativo..... 43
- 3 - Espectro de ressonância magnética nuclear. Solvente: CDCl_3 ; Referência: TMS ; Modelo: 100 MHz ^1H RMN Varian XL-100 NMR spectrometer..... 43

RESUMO

Foram produzidos em torno de 700 mg de ocratoxina A usando-se um sistema de *Aspergillus ochraceus* e cinco variedades de feijão em grão para avaliar a qualidade do substrato na bioprodução dessa micotoxina. Para tanto, cinco variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L., Preto, Branco, Rosinha, Roxo e Rajado; 22% de umidade) foram inoculadas com infusões de $2,65 \times 10^5$ esporos e incubadas a 28°C durante 28 dias.

Um quarto dos lotes de substrato era de grãos intactos, 1/4 de grãos sem tegumento e 1/2 de grãos previamente gama-irradiados (1MRad). Demonstrou-se que o feijão não só suporta o crescimento do fungo e a produção de ocratoxina como é um substrato altamente estimulador da bioprodução de toxina. A bioprodução variou de aproximadamente 150 mg/kg no feijão Branco até aproximadamente 250 mg/kg no Preto, sendo que, de modo geral o cotilédone descorticado foi ligeiramente mais eficiente do que o grão intacto. Após irradiado, o substrato torna-se sensivelmente menos eficiente, ao contrário do que tem sido relatado para outros grãos e toxinas. Em adição, o cotilédone mostrou ser ainda menos eficiente quando foi irradiado sem o tegumento. Estudando-se a influência de alguns componentes-chave do grão no poder estimulatório da bioprodução encontrou-se que os aminoácidos livres e os açúcares redutores, ao invés dos aminoácidos e açúcares totais, estavam relacionados com a maior ou menor produção de toxina das variedades. Ácido glutâmico e prolina foram dois aminoácidos particularmente comprometidos no poder estimulador, enquanto que a metionina, em níveis acima de 2×10^{-2} da soma de aminoácidos, mos

trou um efeito inibitório dominante sobre a bioprodução. As concentrações dos elementos Fe, Zn, Cu, Mn, Li e Mg, além de K, Ba, Ca, Na e P, não mostraram correlação com os níveis de bioprodução, talvez por se encontrarem já, em patamares satisfatórios, especialmente com respeito aos microelementos Fe, Zn e Cu.

A ocratoxina A produzida foi purificada em coluna de sílica gel 60-G e a sua identidade demonstrada por espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear (^1H), absorção infravermelha e ultravioleta e ainda pelo seu comportamento cromatográfico com e sem reação com FeCl_3 .

Em adição a ocratoxina A, o teste biológico com *Artemia salina* revelou a presença significativa de mais uma substância tóxica desconhecida no extrato bruto que não coincide com as ocratoxinas B nem C.

Os resultados aqui apresentados vêm também confirmar definitivamente a identidade da ocratoxina A extraída pelo novo método de análise rotineira proposto por Soares e Rodriguez-Amaya (1987).

SUMMARY

Approximately 700 mg of ochratoxin A were produced in a system consisting of *Aspergillus ochraceus* and five varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in order to assess the ability of this substrate to support the bioproduction of the mycotoxin.

Samples of the varieties Preto, Branco, Rosinha, Roxo and Rajado (22% humidity) were inoculated (2.65×10^5 spores) and incubated at 28°C for 28 days. One fourth of the lots were intact kernels, 1/4 decorticated kernels and the remaining 1/2 were beans which were previously gamma irradiated (1 MRad).

It was shown that the common bean does not only support growth and bioproduction of ochratoxin but it is a highly stimulatory substrate. Bioproduction ranged from approximately 150 to 250 mg/kg for the Branco and Preto varieties, respectively. In general, the decorticated cotyledon was slightly more efficient as substrate than the intact kernel.

Following irradiation, the bean became considerably less efficient a substrate, contrary to what has been reported for other food commodities and toxins. Such an effect was even more pronounced with the decorticated cotyledon.

It was found that both free amino acids and reducing sugars, as opposed to total amino acids and sugar, were key compounds for the stimulatory properties of the bean. Thus, glutamic acid and proline were two amino acids particularly linked to the stimulatory effect while methionine showed an overriding inhibitory effect in levels above 2×10^{-2} of the amino acid total.

The concentration of Fe, Zn, Cu, Mn, Li and Mg, in ad-

dition to those of K, Ba, Ca, Na and P did not correlate with the extents of bioproduction, perhaps due to the presence of already-satisfactory levels, especially in the case of the micro elements Fe, Zn and Cu.

The ochratoxin A produced was purified in a column of silica gel 60-G and its identity proved by mass spectrometry, ^1H -nuclear magnetic resonance, infra-red and ultra-violet absorption. The chromatographic behavior before and after reaction of the toxin with FeCl_3 was also used as a criterion of identity.

Biological assays with *Artemia salina* showed that, in addition to ochratoxin A, substantial amounts of an unidentified toxic substance are present in the crude extract, which does not seem to be either ochratoxin B or C.

The data presented also provide unequivocal proof that ochratoxin A is the target compound extracted by the recently proposed method for routine analysis of ochratoxin A of Soares and Rodriguez-Amaya (1987).

1 - INTRODUÇÃO

As ocratoxinas são produtos do metabolismo secundário dos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium viridicatum* que reconhecidamente agem como potentes agentes hepatotóxicos, nefrotóxicos, carcinogênicos e teratogênicos em diferentes espécies de animais.

Os esporos dos fungos ocratoxinogênicos encontram-se normalmente no solo e no ar podendo, portanto, contaminar uma gama muito ampla de produtos como sementes, farinhas, alimentos de consumo humano, ração animal, etc., quando em condições de umidade e temperatura favoráveis à germinação e desenvolvimento do microrganismo.

O clima é talvez o fator regional mais importante à proliferação da biota fúngica, principalmente em países de zonas tropicais como o Brasil.

Dentre a gama de produtos alimentícios de origem vegetal reconhecidamente contamináveis por micotoxinas estão os cereais e leguminosas como arroz, milho, trigo, cevada, amendoim, grão de bico, etc. Até o momento de se iniciar o presente estudo, entretanto, não se tinha conhecimento da contaminação de sementes de leguminosas como o feijão ou a soja.

Em levantamentos realizados visando entender a susceptibilidade dos produtos agrícolas à invasão pelos fungos, têm-se observado que certos cereais são menos resistentes do que outros devido à ausência de barreiras naturais ou à própria composição química dos substratos.

Ao observar esta maior ou menor susceptibilidade dos

substratos ao ataque pelos fungos, passou-se a estudar a influência da composição de grãos e sementes na invasão de fungos produtores de ocratoxina.

Dada a gravidade dos danos que a ocratoxina pode causar à saúde de animais e humanos que a consomem, tem se tornado grande o interesse em alcançar meios que venham a evitar ou minimizar qualquer incidência de ocratoxina em alimentos, tanto *in natura* como processados.

O presente trabalho teve por objetivo primeiro, determinar se o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), componente básico da alimentação do brasileiro e sobre o qual até hoje não existem relatos de contaminação com ocratoxinas, é um substrato adequado para o crescimento de fungos ocratoxigênicos e, segundo, estudar a possível incidência da composição química de cinco variedades de feijão brasileiro na capacidade dos mesmos suportarem o crescimento do fungo toxigênico *Aspergillus ochraceus* e a de promoverem a produção de sua principal toxina, a ocratoxina A.

Foram estudadas cinco variedades de feijão *Phaseolus vulgaris* L. a saber: preto, branco, rosinha, roxo e rajado. Como era de interesse se conhecer a composição química e a distribuição dos nutrientes ou substâncias que estão mais disponíveis aos fungos, os grãos foram separados em amêndoas (cotilédone) e casca (tegumento) antes de serem submetidos à análise.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A ocratoxina forma um grupo de metabólitos produzidos por *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium viridicatum* que naturalmente contaminam os alimentos de origem animal e vegetal que servem para o consumo humano e animal.

No Sul da África, em 1965 os cientistas que isolavam cepas de *Aspergillus ochraceus*, responsáveis por certos efeitos tóxicos em animais de laboratório, identificaram o metabólito responsável por tal toxidez (van der Merwe, 1965; Scott *et alii*, 1965, 1965a).

As ocratoxinas formam um grupo de micotoxinas derivadas da 3-metildihidrocumarina unidas por uma ligação amida a L-fenilalanina (Figura 1). Com a determinação das estruturas, veio em seguida a determinação de suas propriedades físico-químicas por van der Merwe (1965), Scott *et alii* (1965), Pohland *et alii* (1982) e Rahimtula *et alii* (1988).

A ocratoxina A é um composto cristalino incolor com ponto de fusão de 90°C, quando cristalizado em benzeno e 169°C, quando cristalizado em xileno. Apresenta fluorescência verde brilhante sob a lâmpada de ultravioleta (366nm). Apresenta-se bastante estável a altas temperaturas como as desenvolvidas durante a autoclavagem. Resiste às temperaturas de torrefação do café até 200°C (Levi *et alii*, 1974; Tsubouchi *et alii*, 1987) e permanece inalterada por várias semanas na natureza (Ribelin, 1978). Feijões contaminados com ocratoxina A, apresentaram uma redução de 10% no nível da toxina após processamento térmico de uma hora a 121°C e de 34% após 4 horas na mesma

temperatura (Soares, 1987). Cereais mistos de aveia e arroz para café da manhã, quando autoclavados por 3 horas, apresentaram uma diminuição de teor de ocratoxina A de 60% (Soares, 1987).

Quando submetida à hidrólise ácida, quebra-se a ligação amida liberando L-fenilalanina e dihidroisocumarina (van der Merwe *et alii*, 1965; Steyn e Holzapfel, 1967; Stormer *et alii*, 1983).

Juntamente com a ocratoxina A, podem também ser encontradas as ocratoxinas B e C.

A ocratoxina foi primeiramente isolada dos fungos *Aspergillus ochraceus* K-804, uma linhagem isolada por Scott (1965a), de grãos de sorgo. A ocratoxina é na realidade uma família de compostos tóxicos em que somente um membro é de baixa toxidez: a ocratoxina B. Ela é produzida pelos seguintes fungos e principalmente ^{por} *Aspergillus ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sulphureus*, *A. sclerotiorum*, *Penicillium viridicatum*, *P. palitans*, *P. commune*, *P. purpurescens*, *P. verruculosum*, *P. variabile*, *P. cyclopium* e *P. chrysogenum* (Hesseltine *et alii*, 1972; Wyllie *et alii*, 1978; Ribelin, 1978).

A toxina é razoavelmente estável no laboratório, 45% permanecendo presente após 12 semanas de estocagem (Trenk *et alii*, 1971). Entretanto, ela pode provavelmente persistir por vários meses no meio ambiente. Ela tem sido encontrada em grãos de milho, de soja, na aveia, na cevada, no trigo morisco, no trigo branco, no sorgo, no arroz, no amendoim, em nozes brasileiras, na pimenta vermelha, na pimenta do reino, na castanha do pará, no grão de café, na superfície de pernil, em vegetação apodrecida e no solo (Ribelin, 1978). No início da década de 70 não se esperava que níveis tóxicos pudessem ser encontrados em grãos comerciais (Ano-

Tabela 1 - Ocorrência de ocratoxina A em vários países em anos diferentes^a

Material	Ano	País	Número de amostras analisadas	% de amostras contaminadas	Faixa (µg/kg)
Amendoim	1970	Canadá			4-900
Milho	1970	U.S.A.			10-150
Trigo (Primavera)	1970	Canadá	4	100	20-100
Milho	1973	U.S.A.	293	1,00	83-166
Milho	1973	França	463		15-200
Milho	1974	França	461		20-200
Milho	1979	Índia	21		30 - 50
Trigo	1979	Índia	24	8,0	30 - 50
Sorgo	1979	Índia	18	12,5	50 - 70
Semente de nozes	1979	Índia	18	11,0	50-200
Cevada	1976	Suíça	269	6,3	2 - 20
Trigo (inverno)	1970-73	U.S.A.	291	1,0	25 - 35
Trigo (primavera)	1970-73	U.S.A.	286	2,8	15-115
Milho	1972-76	Iugoslávia	542	8,3	6-140
Trigo	1972-76	Iugoslávia	130	8,5	14-135
Cevada	1974-76	Iugoslávia	64	25,0	14 - 27
Ração animal	1975-79	Canadá	496	1,1	50-200
Milho	1977	Iugoslávia	191	25,7	45-5215
Cevada, Trigo, Aveia, Milho,					
Centeio	1976	Polônia	150	5,3	50-200
Alimento variado	1977	Polônia	203	4,9	10 - 50
Cevada, Aveia	1978	Suíça	84	8,3	16-409
Café grão	1978	U.S.A.	267	7,1	23-360

^a Steyn, 1984.

nymous, 1972). A ocorrência da ocratoxina A em alimentos e rações está espalhada nos vários climas em todo o mundo e tem sido detectada em cereais, em níveis comumente baixos mas podendo ocasionalmente atingir níveis de 5.215 $\mu\text{g/kg}$ (Balzer *et alii*, 1977) e 27.500 $\mu\text{g/kg}$ (Rahimtula *et alii*, 1988).

Muitos organismos que produzem ocratoxina também produzem outras toxinas ou estão associadas a outros que o fazem. A citrinina, o ácido penicílico, o ácido hidroaspergílico e um composto ainda não identificado produzido pelo *P. viridicatum*, são as toxinas mais encontradas em companhia da ocratoxina A (Carlton e Tuite, 1970; Ribelin, 1978).

Os esporos dos fungos ocratoxigênicos se encontram espalhados sob condições naturais no solo, no ar, em alimentos de origem vegetal e em vegetações apodrecidas. Devido a sua característica saprofítica, seu desenvolvimento se dá quando as condições de umidade e de temperatura lhe são propícias ou quando o tecido vegetal se encontra morto.

De uma maneira geral, os microrganismos produtores de ocratoxina A são hidrofílicos e são encontrados em cereais com teores de umidade acima de 16%. Em trigo e cevada, com atividade de água (a_w) de 0,95, o *Penicillium viridicatum* cresce na faixa de temperatura de 0 a 31°C, exibindo produção de ocratoxina em temperatura de 12 a 24°C. A atividade de água ótima tanto para crescimento do fungo e produção da toxina é de 0,97 a 0,93, com produção de altas concentrações de ocratoxina A (Northolt *et alii*, 1979). Os fungos ocratoxigênicos preferem temperaturas brandas para sua proliferação e produção de toxina, tendo um pico de produção entre 20 a 25°C, podendo ainda ocorrer produção em tempera

turas mais baixas, com um possível limite mínimo a -20°C . Em condições ótimas, 7 a 14 dias são necessários para que um nível significativo da toxina seja atingido (Ribelin, 1978).

Não foi observada alteração na produção de toxina quando foi modificado o tamanho do inóculo nas mesmas condições de temperatura em cevada com teor de 22% de umidade (Häggblom, 1982).

O Brasil, por ser um país de clima predominantemente tropical, tem condições favoráveis para a contaminação e o desenvolvimento de fungos ocratoxigênicos em alimentos e rações. Entretanto, não dispõe de uma legislação definindo o limite de tolerância de ocratoxina A em alimentos. Apenas uma Proposta de Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas, determinando um máximo de 50 $\mu\text{g/kg}$ (Egmond, 1989).

Apesar de que alimentos brasileiros como milho, cevada, arroz, feijão, trigo, etc., e as carnes de animais que consomem rações contaminadas terem todas características para serem portadoras de ocratoxinas, existem poucos estudos mostrando a ocorrência dessa toxina no Brasil. De todos estes produtos, apenas milho e feijão têm sido encontrados ocasionalmente contaminados (Soares, 1987), sendo que o feijão era proveniente de um lote de um carregamento importado dos EUA em 1986 e o milho era oriundo do sul do Brasil.

Aspergillus ochraceus e membros desse grupo são provavelmente os mais significantes produtores de ocratoxina em regiões de climas tropicais e semi-tropicais enquanto que os *Penicillium* sp. predominam em regiões frias, mais particularmente no Canadá, Dinamarca e Suécia (Carlton *et alii*, 1979).

Todos os alimentos que se encontram na Tabela 1, são considerados bons substratos, favorecendo em maior ou menor grau o crescimento dos fungos e a produção de ocratoxinas.

Além dos substratos acima mencionados, Bauer e Gareis (1987) relataram encontrar ocratoxina A em 48,7% e 21,2% entre mais de cem amostras de soro e rins de porcos pesquisados, respectivamente. Até amostras de soro humano (173 de 306 examinadas) estavam contaminadas com ocratoxina A, segundo esses autores.

Até pouco tempo atrás, poucos países concediam importância às implicações das ocratoxinas na saúde pública. Hoje, devido aos efeitos tóxicos, teratogênicos e carcinogênicos que esse grupo de toxinas pode causar e, considerando também o grande fluxo internacional de matérias primas alimentícias, as ocratoxinas são consideradas de muita relevância toxicológica.

A ocratoxina A é a mais potente do grupo. Recentemente, porém, testes com cobaias mostraram que a ocratoxina C (éster etílico da ocratoxina A) e o éster metílico da ocratoxina A são igualmente tóxicas em contraste com outros membros do grupo que são virtualmente inócuos (Stubblefield, 1979).

A ocratoxina A é primeiramente uma nefrotoxina (Wyllie *et alii*, 1978), sendo seu alvo secundário o fígado (Wyllie *et alii*, 1978). Os efeitos principais são necrose do epitélio tubular renal e das células periportais hepáticas. Enterite frequentemente acompanha o quadro sintomático (Wilson, 1978).

A ocratoxina A nos animais causa necrose tubular dos rins e degeneração do fígado segundo Paster *et alii*, (1983). No homem, uma doença renal chamada de nefropatia endêmica dos balcãs tem sido correlacionada à presença da ocratoxina A nos alimentos (Krogh *et alii*, 1977).

Um grupo de pesquisadores (Hult *et alii*, 1979) sugeriu que a presença da toxina no sangue pode ser tomada como um índice de predisposição à doença na população de Vratza, distrito da Bulgária, uma área nefropática endêmica onde se apresenta uma alta incidência de tumores no sistema urinário.

Uma porção da toxina ingerida permanece nos tecidos de animais domésticos alimentados com ração contaminada com ocratoxina A (Elling *et alii*, 1975 e Bendele *et alii*, 1985). As maiores concentrações são encontradas no sangue, nos rins, no fígado e nos músculos esqueléticos de animais como porco, peru e frango (Bendele *et alii*, 1985).

No sangue, a toxina se liga à albumina do soro (Bendele *et alii*, 1985 e Petkova-Bocharova *et alii*, 1988). A molécula possui alta afinidade pela albumina do soro à qual se liga aparentemente por interação iônica do grupo carboxílico e interação hidrofóbica do grupo isocumarínico com resto da soroalbumina, resultando em aumento de 100% na sua fluorescência característica, (Uchyama *et alii*, 1987). Proteínas solúveis do fígado e rins, porém, têm pouca afinidade pela ocratoxina A. Soroalbumina humana (HSA), para o caso, se comporta como a bovina (BSA) (Uchyama *et alii*, 1987). São poucos os relatos que existem sobre a carcinogenicidade da ocratoxina A. Os resultados experimentais indicaram que a ocratoxina A é um produtor de carcinoma renal em ratos ma-

chos e carcinoma hepático em fêmeas (Bendele *et alii*, 1985 e Rahimtula *et alii*, 1988). Num dos relatos, 40 ppm de ocratoxina A na dieta de 49 ratos machos durante 20 meses, produziram neoplasma renal morfológicamente consistente com carcinoma. Nenhum carcinoma foi encontrado quando as doses foram inferiores a 40 ppm. A incidência do neoplasma hepatocelular foi alta em ratos machos e fêmeas.

A ocratoxina A apresenta atividade fortemente teratogênica pelas manifestações observadas em embriões de ratos. Em fêmeas no 7º dia de gestação submetidas a uma única dose de 1,75 mg de ocratoxina A por quilo de peso corpóreo, 47% dos fetos apresentavam má formação externa (hidrocefalia, hematoma), má formação do esqueleto (o esterno partido, as vértebras centrais partidas, ossificação incompleta do crânio, costelas fundidas, partidas, falsas e fora do lugar) e má formação das vísceras (vísceras na posição do esôfago) (Mayura *et alii*, 1984). A ocratoxina A também produz outros sérios transtornos fisiológicos em frangos como: fragilidade intestinal, imunodeficiência, redução na coagulação do sangue, pigmentação escassa da carne, anemia ferro deficiente e leucopenia (Steyn, 1984). Em ratos também foi demonstrada a imunossupressão e a inibição da síntese de proteínas pela competição com a fenilalanina (Bunge *et alii*, 1978 e Creppy *et alii*, 1979).

A ocratoxina A não produz efeitos de tipo genético, a julgar por uma variedade de testes *in natura* de curta duração (Rahimtula *et alii*, 1988), mas foi mostrado que produz rompimentos simples no DNA do fígado, dos rins e do baço do camundongo. Apesar dos numerosos relatos indicando que a administração de

ocratoxina A em roedores altera uma variedade de parâmetros bioquímicos no trato urinário, no fígado e nos rins desses animais (Rahimtula *et alii*, 1988), o mecanismo de sua ação tóxica apenas agora começa a ser elucidado.

Relatos recentes demonstraram o envolvimento das ocratoxinas na exacerbação da peroxidação de lipídios pelos sistemas NADPH- e de microsomas ascorbato- dependentes de fígado de rato (Rahimtula *et alii*, 1988). Esses autores propõem um mecanismo mediante o qual o grupo fenólico em C₈ é essencial na quelação do Fe³⁺ do organismo, que na presença de O₂ catalisa a peroxidação dos lipídios. Outro trabalho mostra o efeito inibitório imediato que a ocratoxina A causa no funcionamento da bomba ATP- dependente de íons Ca²⁺ no microsoma hepático (Khan *et alii*, 1989). A quebra do equilíbrio homeostático do cálcio é aparentemente um resultado da peroxidação acelerada dos lipídios das membranas do retículo endoplasmático. A peroxidação intracelular exacerbada de lipídios é também um dos primeiros passos nos mecanismos de ação deletéria já conhecidos para outras substâncias tóxicas (Khan *et alii*, 1989).

O efeito dos aminoácidos na formação da ocratoxina foi estudada por vários pesquisadores. A presença da prolina e do ácido glutâmico sobre a produção de ocratoxina A na cultura líquida, estimulou a produção de ocratoxina A (Häggbloom e Ghosh, 1985), pelos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium viridicatum*. Ferreira (1968) também demonstrou que a prolina e o ácido glutâmico induziam a produção de ocratoxina pelo *Aspergillus ochraceus*.

Tanto a metionina (Lisker *et alii*, 1983), como a etionina em baixa concentração (Lisker e Paster, 1985), inibem a produção de ocratoxina pelo *Aspergillus*, enquanto que a cistina e derivados não manifestam nenhum efeito.

Os aminoácidos fenilalanina, metionina e ácido glutâmico, quando acrescentados ao meio do fungo *Aspergillus ochraceus* na fase log do crescimento, incorporam-se rapidamente à molécula de ocratoxina. A metionina ($^{14}\text{CH}_3$) e a fenilalanina ($\text{U}^{14}\text{-C}$) são aproveitados integralmente na adição do grupo carboxila da posição C_4 do anel isocumarina e na sua amidação, respectivamente (Steyn *et alii*, 1983). Já a incorporação do ácido glutâmico (^{14}C) pode se dar tanto na fenilalanina, como no anel isocumarina da toxina (Bacon *et alii*, 1975).

Vários metais têm sido estudados com respeito a sua influência na biossíntese da ocratoxina e de outras micotoxinas. Entretanto, uma comparação direta entre essas investigações é difícil, dada a diversidade dos meios de cultura nelas utilizados, algumas vezes de composição química simples e definida, mas às vezes complexas ou não definidas ou em quantidades desconhecidas. Também, costuma-se complicar ainda mais o quadro face ao número de espécies e linhagens que têm sido estudadas.

Lai *et alii* (1970) mostraram que traços de Mo^{6+} são requeridos pelo *Aspergillus ochraceus* na produção de ocratoxina. A. Mateles e Adyes (1965), Lee *et alii* (1966) e Davis *et alii* (1967) relataram que o manganês tem pequeno efeito na produção de aflatoxinas enquanto que Lillehoj *et alii* (1974) e Rabie *et alii*

(1981) relataram que este íon produzia um certo estímulo na síntese de aflatoxinas.

O íon bário reduz a produção de aflatoxina (Lee *et alii*, 1966). O íon ferro também tem um efeito inibitório na produção de aflatoxina B₁, segundo Rabie *et alii* (1981), enquanto que Lee *et alii* (1966) e Lillehoj *et alii* (1974) não observaram efeito nenhum do íon na produção das aflatoxinas.

Lai *et alii* (1970) relataram que o ferro exerce um certo estímulo na produção de ocratoxina pelo *Aspergillus ochraceus*. Lillehoj *et alii* (1974) afirmaram que o cobre aumentou a produção da toxina enquanto que Marsh *et alii* (1975) e Rabie *et alii* (1981) observaram que a inibição na produção da aflatoxina é total ou parcial. Este íon tem efeito inibitório na produção de ocratoxina como mostrado por Lai *et alii* (1970). Esses mesmos autores relataram que traços de zinco são também requeridos pelos *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus melleus*, mas não pelo *Aspergillus sulphureus* na produção de ocratoxina.

A utilização de minerais pelos fungos é altamente dependente do estado de complexação em que o íon se encontra. Assim, Marsh *et alii* (1975) propuseram que as concentrações dos íons livres no meio e não as concentrações totais é que determinam os parâmetros produtores ou inibidores da aflatoxigênese e a ocratoxigênese. Essa afirmação parece ter sido confirmada num estudo sobre alimentos tropicais por Obidoa *et alii* (1981) no qual demonstrou-se que a quantidade ideal de zinco para produção máxima de aflatoxina depende do substrato especificamente, não havendo, portanto, correlação linear exata entre a produção de toxina e o nível de zinco no alimento. Essa falta de linearidade pode

ser devida à presença de outros compostos que podem se ligar ao zinco, tornando-o não disponível para o fungo, como o fitato, relatado por Lillehoj *et alii* (1974), o que vem interferir diretamente na avaliação biológica desse elemento.

Com relação aos efeitos dos açúcares sobre a produção de ocratoxinas, vários pesquisadores verificaram que adição de sacarose ao meio estimulava a produção tanto para *Aspergillus ochraceus* como para *Penicillium viridicatum* (Ferreira, 1968; Davis *et alii*, 1969; Yamazaki *et alii*, 1970 e Sanchis *et alii*, 1988). De igual forma, vários outros carboidratos influenciam a produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* (Davis *et alii*, 1967), sendo a glicose e a sacarose os principais estimuladores, seguidos da frutose, posteriormente da rafinose e galactose, porém, nenhuma produção ocorreu quando a lactose foi a única fonte de carbono.

A atmosfera modificada e a irradiação gama são dois métodos físicos que estão sendo usados efetivamente no controle de microrganismos em alimentos estocados. O crescimento dos fungos não depende somente das condições de umidade e temperatura, mas também de outras condições ambientais, como são as concentrações relativas dos componentes da atmosfera. Os ambientes contendo excesso de CO_2 ou outros gases como N_2 afetam radicalmente o crescimento de fungos, que são tipicamente aeróbios, assim como a produção das toxinas. O efeito de tais atmosferas no crescimento de fungos nos alimentos estocados e produtos subsequentes de mi-

cotoxinas foram estudados por Landers *et alii* (1967), Lillehoj *et alii* (1972), Wilson *et alii* (1975) e Epstein *et alii* (1970).

Em estudos mais recentes, Paster e Chet (1982), observando o efeito de atmosfera modificada sob a formação de colônias de *Aspergillus ochraceus* verificaram que CO₂ a 20% inibia completamente esse processo morfogênico. Posteriormente, Paster *et alii* (1983) informaram da influência de CO₂ no crescimento e produção de ocratoxina pelo *Aspergillus ochraceus*, variando a concentração desses gases num período de incubação de 14 dias, a 16 ± 1°C. Para níveis de CO₂ de 10 e 20% da atmosfera, o aumento do teor de O₂ trouxe como resposta um aumento crescente na produção de ocratoxina, sem importar a concentração de O₂. As colônias sofreram uma inibição parcial, sob uma atmosfera de 60% de CO₂, durante 14 dias crescendo apenas 63,6% do controle. Após liberação das condições experimentais o crescimento das colônias voltou a ser normal, porém a ocratoxina produzida foi três vezes maior àquela do controle (55 x 15 µg/g). Paster *et alii* (1983) afirmaram que inibição total no crescimento e produção de toxina do *Aspergillus ochraceus* foi atingida quando a concentração de CO₂ foi de 80 e 100%. Após os 14 dias de incubação, a câmara foi liberada desse sistema e a colônia passou a desenvolver-se e produzir normalmente, significando que as concentrações inibitórias não foram letais a esse fungo. Paster e Bullerman (1988) concluíram que a via biossintética para produção de micotoxina é meramente bloqueada, mas não prejudicada pela alta concentração de CO₂.

Diener e Davis (1967), Horner *et alii* (1973), Northolt *et alii* (1976) e Paster e Bullerman (1988) verificaram que o grau de inibição pela concentração elevada de CO₂ é dependente de ou-

tros fatores ambientais, tais como a umidade relativa, atividade de água (a_w) e atmosfera.

Embora a radiação gama tenha um efeito deletério nos organismos vivos, os baixos níveis de irradiação têm mostrado aumentar a produção de micotoxina em alguns casos. Paster *et alii* (1985) verificaram os efeitos da irradiação sobre a esporulação e produção de ocratoxina pelo *Aspergillus ochraceus* incubados durante 14 dias a temperatura ambiente. A irradiação gama pelo ^{60}Co de 150 e 200 Krad sobre os micélios provocou um retardamento de 24 e 48 horas respectivamente em relação ao controle. Quando a irradiação gama foi de 60 ou 100 Krad nenhum efeito foi observado. Ao passo que quando esta irradiação foi de 300 Krad, ocorreu uma inibição total no crescimento. Applegate e Chipley (1976) mostraram que em seus trabalhos 400 Krad foram necessários para inibir completamente a germinação de esporos deste mesmo fungo, portanto, as doses exigidas para os fungos podem variar de um fungo para outro (Paster *et alii*, 1985).

Um aumento na produção ocorreu em meios sintéticos quando irradiados com 50, 100, 150 e 200 Krad para 3500, 4100, 3200 e 3000 mg por placa respectivamente, em comparação com 2880 mg de ocratoxina produzida pela placa não irradiada. Reduzindo a dose de irradiação para 19, 25, 50 e 100 Krad após a exposição em um banho de água a 40°C, nenhuma alteração foi observada.

Paster *et alii* (1986) verificaram que a inibição dos micélios de grãos e de meio-semissintético ocorreu com uma dose de 200 Krad, mas nenhum dos níveis testados (15, 50 ou 100 Krad) causou um aumento na produção de ocratoxina. O *Aspergillus ochraceus* sofreu uma redução marcante, quando exposto a uma irradiação de 200 Krad, após submeter-se a um banho de água a 60°C. Paster *et*

alii (1985) conseguiram este resultado com 300 Krad de irradiação; enquanto que Applegate e Chipley (1976), para obterem um mesmo resultado, tiveram que empregar doses de 400 e 600 Krad.

O uso de *Artemia salina*, em salmoura nos bioensaios para testar a presença de micotoxinas tem várias vantagens; não precisa de material de pesquisa sofisticado nem pessoal altamente treinado, os ovos são de preço baixo e estão disponíveis em supermercados ou lojas de aquários, têm uma vida prolongada quando estocados secos e em temperatura ambiente. Os microcrustáceos são obtidos num período de 24 horas mediante incubação em salmoura (solução de sal grosso, densidade 1,02 - 1,03) na temperatura ambiente. Os testes são rápidos, simples e exigem pequenas quantidades de amostras tóxicas (Harwig e Scott, 1971; Reiss, 1972). *Artemia salina*, em salmoura, tem também sido usada para o bioensaio de anestésicos (Robinson *et alii*, 1965), inseticidas (Grosch, 1967; Michael *et alii*, 1956), antibióticos (Brown e Wildman, 1968).

OBJETIVOS GERAIS

1. Verificar se as variedades comuns de feijão brasileiro, servem como substrato a bioprodução de OA.
2. Estabelecer relações entre a composição de cinco variedades de feijão e a maior ou menor capacidade do fungo *Aspergillus ochraceus* de produzir OA.
3. Obter evidência espectroscópica que esclareça se a OA está presente entre as substâncias extraídas pelo novo método de Soares e Rodriguez-Amaya.

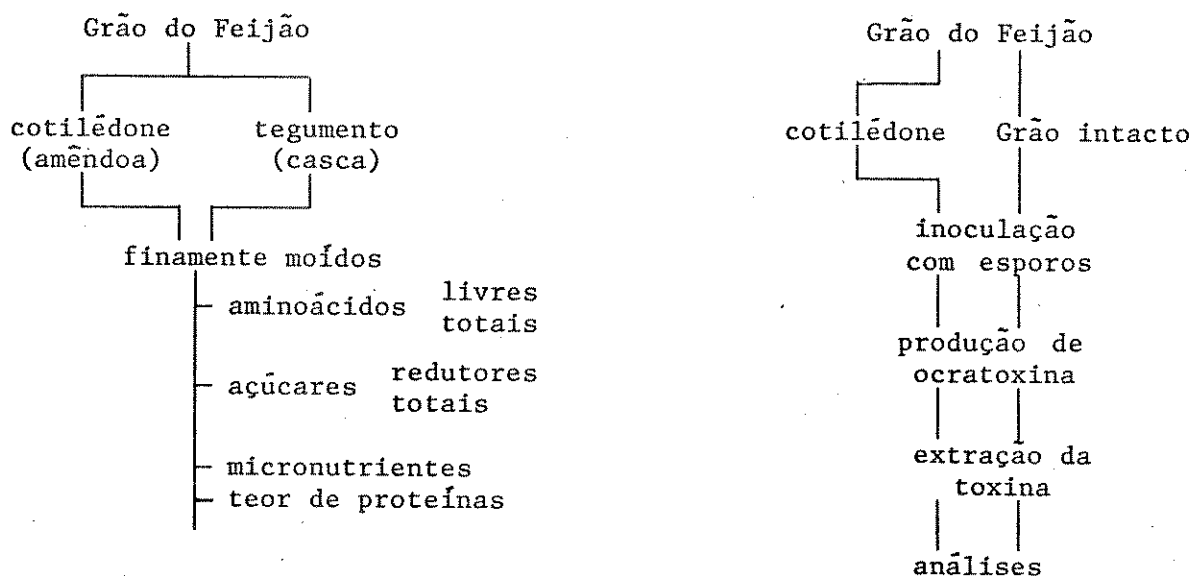
3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Preparo Geral das Amostras

Os cinco cultivares de feijão *Phaseolus vulgaris*, preto, branco, rosinha, roxo e rajado (carioquinha) foram adquiridos ao acaso em vários pontos do comércio varejista, tais como mercados e supermercados de Campinas, porém oriundos de vários Estados e de diversos beneficiadores. Os grãos foram assim tratados: manualmente foram separados os tegumentos ou cascas dos cotilédones e, cada uma das frações foram moídas e secas em estufa, numa faixa de 60 a 70° C, até peso constante.

Fluxograma do preparo das amostras e análises executadas

Todos os valores obtidos foram expressos em base seca



3.1.1 - Produção de ocratoxina no Feijão

3.1.2 - Meio de cultura

Preparamos a cultura com *Aspergillus ochraceus* cedidos a Brasília por Dr.^a D. I. Fennell do USDA anexada à coleção da UnB Lab. de Fitopatologia sob nº UNBF A-26. Cd. NRRL 3174, produtores de ocratoxina A e B, em extrato de malte agar durante 10 dias. Após este período, lavamos com Tween 80 (0,05%) e preparamos uma diluição de $2,65 \cdot 10^5$ (esporos) /ml de suspensão (Häggblom *et alii*, 1985; Häggblom, 1982).

3.1.3 - Preparo das amostras de feijão

Antes da inoculação e de sua preparação fizemos um teste para se ter a certeza da não contaminação prévia por *Aspergillus*. Teste negativo.

Os grãos foram esterilizados com radiação gama de 1 MRad num irradiador de ^{60}Co , tipo Gammabeam 150, da "Atomic Energy of Canada Ltd." Ottawa, com uma atividade aproximada de 680 Ci no início do trabalho, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), em Piracicaba - SP.

As amostras de 50 g cada uma foram esterilizadas em sacos de plásticos fechados. Para fazermos a inoculação, transferimos as amostras para erlenmeyers de 250 mL os quais foram fechados com tampão de algodão. Ficando incubados a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com agitações diárias, com uma umidade por volta de 22%, portanto, acima das condições normais que é de 14,5% aproximadamente.

Além dessas amostras estéreis, foram incubadas amostras em seu estado natural com os mesmos inóculos e sob as mesmas condições de temperatura e umidade, para compararmos os níveis de produção nesses produtos, tal qual aqueles encontrados nos grandes armazéns e silos do governo.

Foram inoculados 4 kg de feijão nestas mesmas condições, com o objetivo de obtermos uma maior produção de ocratoxina.

As amostras foram extraídas após 28 dias de incubação.

Para matarmos os *Aspergillus ochraceus*, injetamos 10 mL de clorofórmio e deixamos 15 minutos, em seguida, fizemos a extração conforme descrito na Figura 1.

3.1.4 - Padrão de micotoxina

A micotoxina utilizada foi ocratoxina A, fornecida pela Makor Chemicals, Israel. A diluição foi feita com benzeno. A quantificação foi realizada como descrita em 3.1.6. O valor encontrado foi então dividido pelo valor da adição de ocratoxina A (200 µg/kg) para cálculo da recuperação.

3.1.5 - Método para extração

No copo do liquidificador foram colocados 50 g de amostra, 270 mL de metanol e 30 mL KCl 4%. Em velocidade baixa, foram misturados por 5 minutos e a seguir filtrados em papel de filtro qualitativo sanfonado (Soares e Rodriguez-Amaya, 1987).

Uma alíquota de 150 mL do filtrado foi adicionada a 150 mL do clarificante sulfato de cobre 10% e 50 mL de celite ou equi

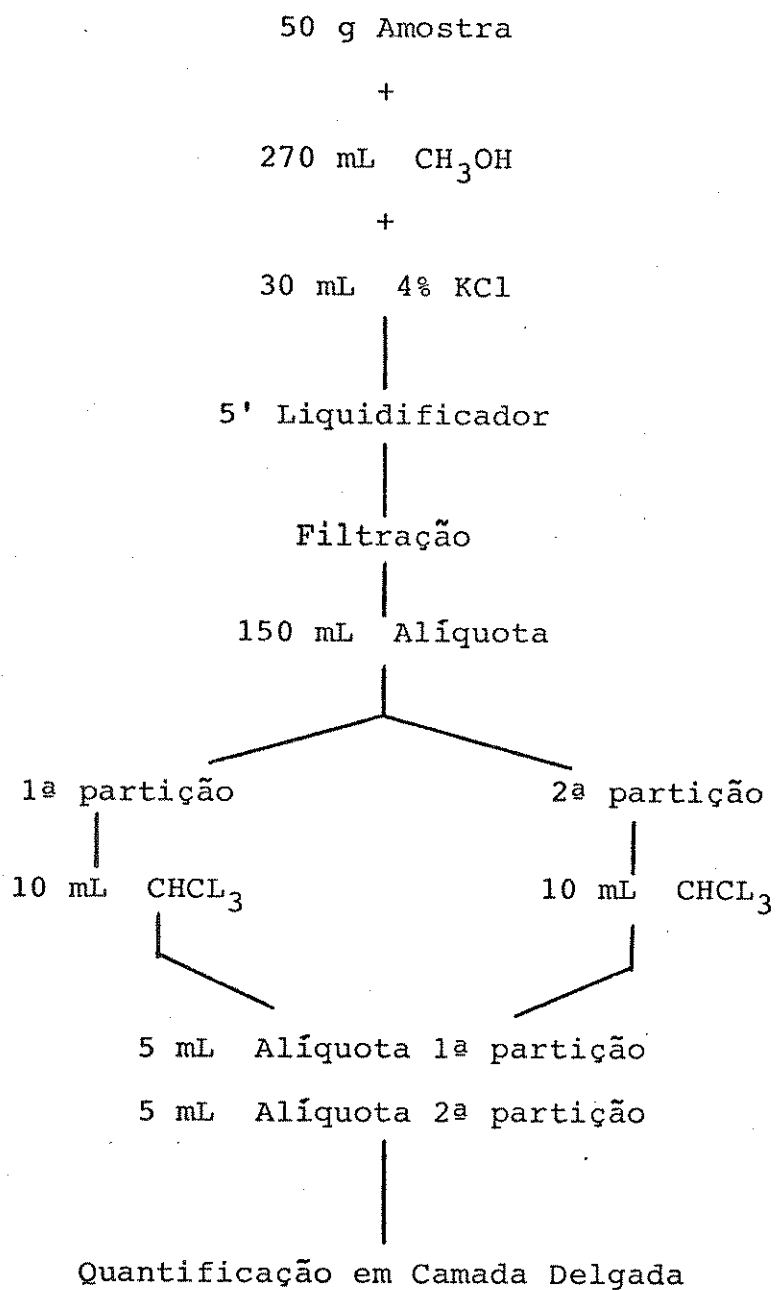


Figura 2 - Extração e limpeza para triagem da Ocratoxina A.
(Soares e Rodriguez-Amaya, 1987)

valente medido em um bēquer. A mistura foi homogeneizada com bastão de vidro e filtrada em papel de filtro qualitativo sanfonado.

Uma alíquota de 150 mL dessa segunda filtração foi transferida para um funil de separação, onde 150 mL de água haviam sido previamente colocados. Duas partições para 10 mL de clorofórmio com um tempo de agitação de 3 minutos foram realizadas.

Para quantificação foram tomados 5 mL de cada extrato clorofórmico, reunidos em um pequeno frasco âmbar e submetidos a secagem em banho-maria (Figura 3). Foi seguido o método descrito em 3.1.6., utilizando como solvente para desenvolvimento em camada delgada tolueno/acetato de etila/ácido fórmico(50:40:10 v/v).

3.1.6 - Quantificação

A quantificação foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) através de comparação visual com padrões. Placas de sílica gel 60 G com 0,25 mm de espessura foram preparadas no laboratório e aquecidas por 1 hora a 80°C. O aquecimento torna-se desnecessário em climas secos.

Os extratos secos foram redissolvidos em 200 µL ou outro volume conveniente de benzeno. Uma agitação em banho de ultra-som por 30 segundos foi empregado para garantir solubilização.

Para verificar a presença de micotoxina e poder realizar simultaneamente a quantificação, foram aplicadas em placa de sílica gel, ao lado do padrão 5 µL de cada extrato, uma só vez. Na mesma placa foram aplicados 1, 2, 3, 4 e 5 µL do padrão de micotoxina. A placa foi desenvolvida em tolueno/acetato de

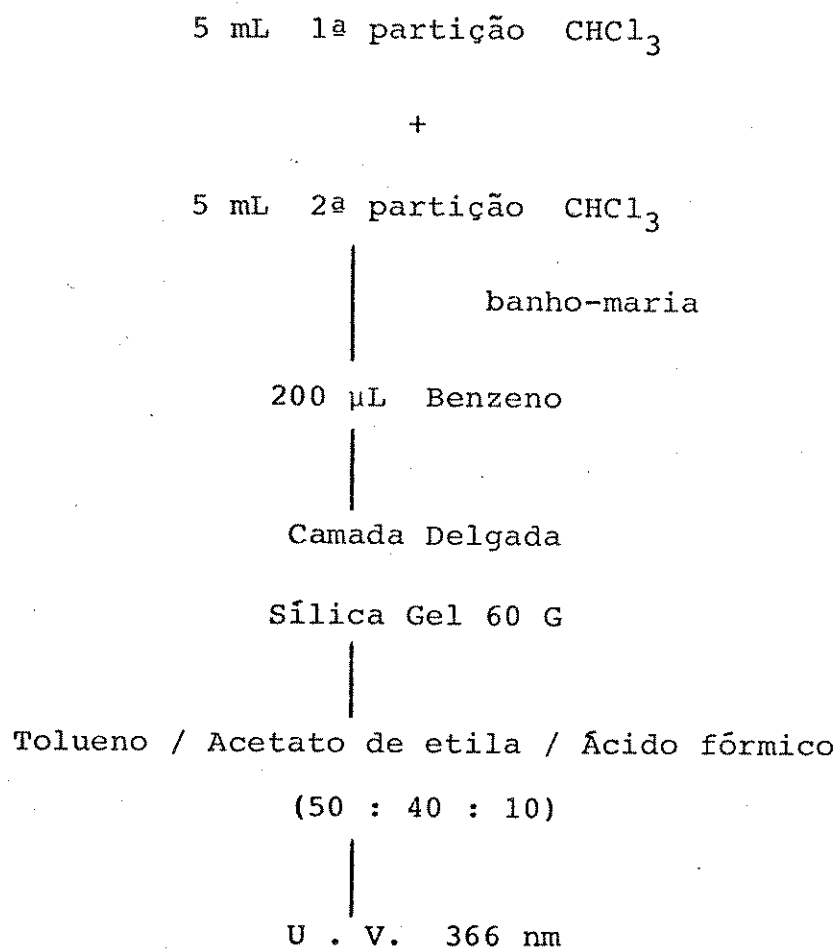


Figura 3 - Triagem e quantificação da Ocratoxina A.

etila/ácido fórmico (50:40:10) e deixada secar naturalmente ao ar. A quantificação foi feita comparando a intensidade das manchas fluorescentes da amostra visualmente comparada com as dos padrões, sob iluminação ultravioleta. Quantificamos, portanto, a ocratoxina produzida nos grãos (Hesseltine *et alii*, 1972; Visconti *et alii*, 1983) (Tabela 2).

Esta operação foi feita usando novas diluições com outra concentração da solução padrão diferente das anteriores para obtenção de uma melhor aproximação da intensidade de fluorescência entre a mancha suspeita e as manchas dos padrões.

3.1.7 - Confirmação das ocratoxinas A e B pela formação de Éster Metílico

Ao extrato da amostra juntamos 5 mL de CHCl_3 em um erlenmeyer de 25 mL e 10 mL de BF_3 14% em metanol, ferveu-se durante 5 minutos em vapores de banho-maria. Transferimos para um funil de separação com 30 mL de H_2O . Extraímos com três porções de 10 mL de água.

Tratamos o padrão tal qual a amostra (Hesseltine *et alii*, 1972; Visconti *et alii*, 1983).

Em placa de CCD aplicamos o padrão e o padrão esterificado, a amostra e a amostra esterificada e desenvolvemos em benzeno/metanol/ácido acético (18:1:1). Sob lâmpada de ultravioleta verificamos que o padrão e a amostra não esterificados tinham R_f 0,54, enquanto que o padrão e a amostra esterificados tinham R_f 0,74.

3.2 - Purificação da Ocratoxina A

A técnica utilizada na purificação da ocratoxina para este trabalho foi desenvolvida por van der Merwe *et alii* (1965), Scott (1965), Hesseltine *et alii* (1972), Davis *et alii* (1972) e Steyn (1984). A ocratoxina A foi isolada de extratos clorofórmicos das culturas fúngicas coletadas de feijões artificialmente inoculados com *Aspergillus ochraceus* obtidos conforme o procedimento descrito em 3.1.3., pela extração com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio 0,5M (3L). A solução aquosa acidificada foi extraída com clorofórmio obtendo-se 1,3 g de material extraído o qual foi cromatografado em sílica gel (coluna 30 cm x 1,7 cm, 36 g de sílica). A eluição foi feita inicialmente com benzeno/clorofórmio (3:1), seguida com benzeno/clorofórmio (1:3) e finalmente, com clorofórmio. Os três eluatos foram recolhidos separadamente. Na fração clorofórmica precipitou um composto opaco cristalino, ainda não identificado. As duas outras frações foram combinadas e cromatografadas em camada delgada com o sistema tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (50:40:10), apresentando várias substâncias fluorescentes, as quais foram separadas em placas preparativas de sílica (0,75 mm). A faixa de sílica que supostamente apresentava a ocratoxina A, foi raspada e extraída com solução aquosa de bicarbonato de sódio (0,5M), em seguida, acidificada e extraída com clorofórmio. Todo o solvente foi evaporado sob pressão reduzida à temperatura aproximada de 50°C. Todo o procedimento descrito nessa purificação está esquematizado na Figura 4. Não foi possível, contudo, recrystalizar a toxina por estar acompanhada de um pigmento colorido. Geralmente grãos que

servem de substrato para produção de ocratoxina, possuem pigmentos que dificilmente se dissociam da ocratoxina, conforme Davis *et alii* (1969) a partir da sua experiência com milho e amendoim.

3.2.1 - Análise espectroscópica

A ocratoxina A, obtida em cromatografia de camada delgada foi satisfatoriamente comparada com o padrão utilizado nas seguintes análises: i) sob a lâmpada de ultravioleta (366 nm), a mancha apresentou cor verde brilhante com Rf igual ao do padrão (3.1.7); ii) o espectro de RMN¹H (Espectro 3 e Figura 1), apresentou um dublete em 1,5 ppm correspondente aos três prótons do grupo CH₃ em C-10, um sinal múltiplo em 2,8 ppm correspondente ao grupo CH₂ em C-4, um sinal múltiplo em 3,3 ppm correspondente ao grupo CH₂ em C-3', um sinal largo em 4,7 ppm correspondente ao grupo CH em C-3, um sinal largo em 5,1 ppm correspondente ao grupo CH em C-2', um sinal em 7,3 ppm correspondente aos cinco prótons aromáticos e um sinal em 8,4 ppm correspondente ao grupo NH. A presença de sinais em 0,9, 1,3 e 3,68 ppm acusaram a presença de impurezas; iii) o espectro de infravermelho (Espectro 2) apresentou uma absorção em 1680 cm⁻¹ correspondente a uma carbonila, uma absorção em 1740 cm⁻¹ correspondente a lactona e absorções em 3380, 1656 e 1530 cm⁻¹ correspondentes a amida secundária; iv) o espectro de massa (Tabela 3) apresentou um íon em m/z = 403 (3,3%) correspondente provavelmente ao íon molecular de C₂₀H₁₈ClNO₆. O fragmento em m/z = 239, com alta abundância relativa (100%), correspondente a perda do radical PhCH₂CH(CO₂H)NH, um fragmento em m/z = 255 (91%), correspondente a perda do radical PhCHCH(CO₂H),

outros fragmentos conforme Tabela 2. Nesse espectro de massa a presença de um íon em $m/z = 441$ (6,6%), pode ser devido a impureza já detectada no espectro de RMN¹H (Stormer *et alii*, 1983); v) o espectro de ultravioleta (Espectro 1) $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ em 210 e 330 nm ; vi) a ocratoxina em etanol apresentou coloração vermelha ao se adicionar cloreto férrico, confirmando assim, a presença da hidroxila fenólica.

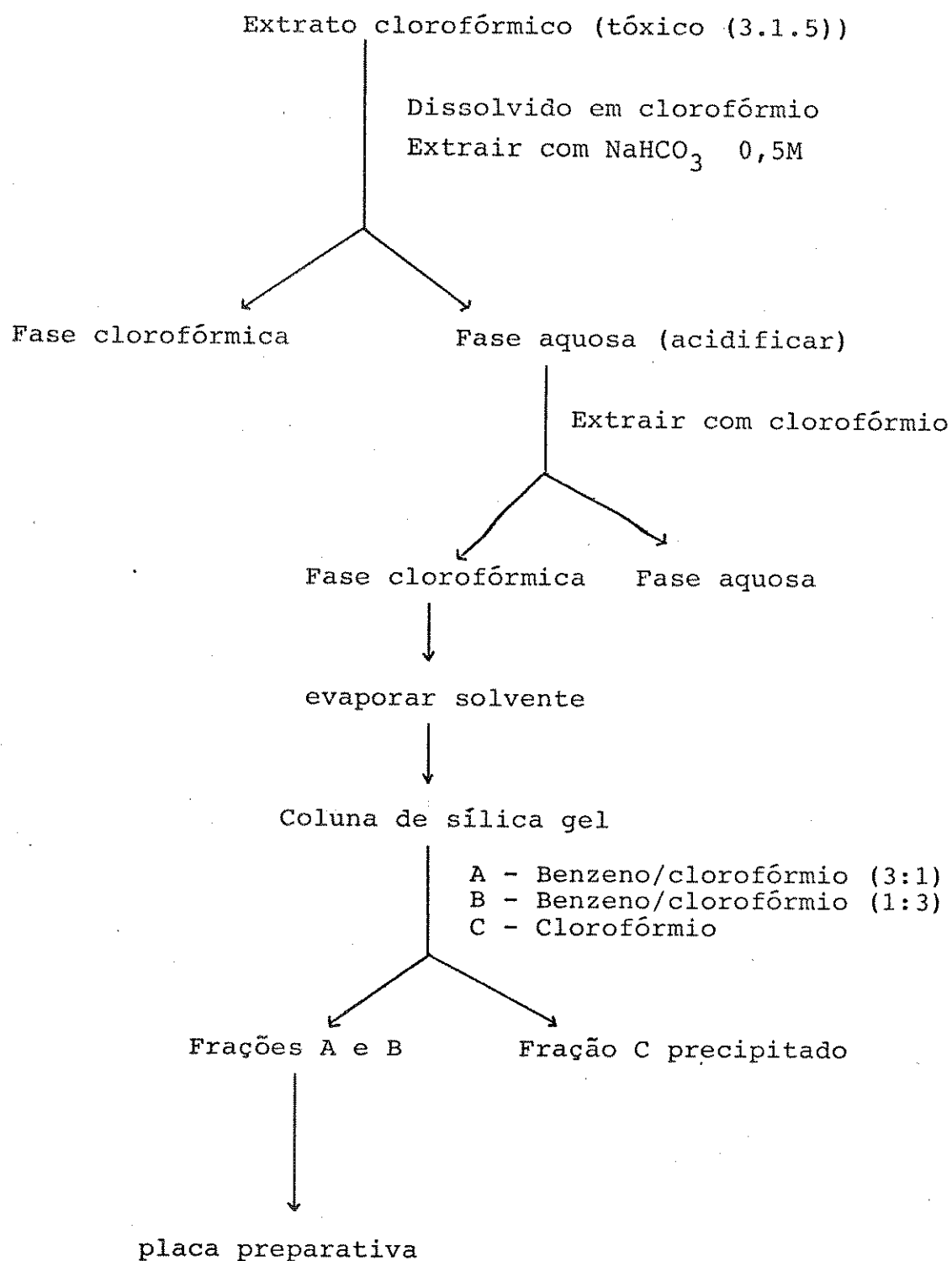


Figura 4 - Procedimento geral para a purificação da ocratoxina A, obtida do extrato clorofórmico em *Phaseolus vulgaris* L.

3.3 - Determinação da Composição de Aminoácidos Livres

3.3.1 - Preparo das amostras

Para a extração de aminoácidos livres das cinco variedades de feijão foi usado ácido sulfossalicílico (SSA), agente precipitante das proteínas e peptídios como recomendado pela BECKMAN INSTRUMENTS, Palo Alto, Ca, USA, 1977 (Norman, 1979). À 1,00 g de tegumento de cada um dos feijões adicionou-se 4 mL do ácido sulfossalicílico 3,5%, seguido de agitação por 15 minutos e posteriormente, centrifugação a 8.000 rpm durante 15 minutos. Uma alíquota de 0,4 mL foi retirada e diluída em 0,2 mL de tampão citrato de lítio (0,15 N) e estocada a 4°C até a análise.

À 0,5 g de farelo de cotilédone foram adicionados 4 mL de ácido sulfossalicílico 3,5% e agitou-se por 15 minutos. Uma alíquota de 0,4 mL foi retirada e diluída em tampão de lítio (0,15 N) e estocada a 4°C até a análise.

Os extratos, após diluição no tampão citrato, foram analisados em analisador de aminoácidos Beckman 119-CL, onde as condições de operação foram as seguintes:

- Dimensões da coluna de vidro: 6 x 220 mm
- Resina: W-3P
- Tampões: pH 2,83 0,20N Li^+
 pH 3,70 0,20N Li^+
 pH 3,75 1,00N Li^+ , mais 6% de iso-propanol
 LiOH 0,30N Li^+ com 0,25g/L de EDTA na forma ácida
- Taxas de fluxos: tampões 44 mL/h

ninidrina 22 mL/h

- Tempo de análise: 267 minutos

A mistura padrão de aminoácidos foi preparada com padrão-ácido neutro e padrão básico da marca Hamilton Co. Partes iguais desses dois padrões foram misturadas e diluídas 5 vezes em tampão citrato de lítio (pH 2,2).

Para todas as análises o volume injetado foi de 100 µL.

3.4 - Nitrogênio Total e Proteína

O nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldhal. A proteína foi calculada multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio total pelo fator 6,25 (AOAC, 1980; Jones *et alii*, 1930).

Jones publicou uma lista de fatores de conversão propostos para alimentos, rações, sementes e derivados de proteínas concentradas. Smith *et alii* (1972) indicaram que o fator 6,25 é provavelmente o mais justificável.

3.5 - Determinação de Metais

A determinação de metais nas cinco espécies de feijão foi feita por espectrofotometria de absorção atômica.

As amostras moídas e secas do grão foram incineradas em mufla a 500°C, as cinzas dissolvidas com 50 mL da solução de HCl 6N e evaporadas em chapa a 100°C aproximadamente. Dissolveu-se o resíduo em duas alíquotas de 10 mL de HCl 2N e levou-se a volume com água deionizada: filtradas através de papel de filtro lavado previamente em ácido (Boletim Técnico, 1983). Os índices de metais foram expressos em µg/g (partes por milhão).

A construção da curva de calibração foi feita a partir da diluição individual de cada solução-estoque, a diferentes concentrações.

As análises foram feitas utilizando-se o espectrofotômetro de absorção atômica UNICAM modelo SP 90 2A, seguindo-se as condições especificadas para os metais bário, cálcio, cobre, ferro, fósforo, potássio, lítio, magnésio, manganês e sódio. No espectro de absorção atômica modelo PERKIN-ELMER 5000 medimos o zinco. O fósforo foi medido no espectrofotômetro modelo B 295 II Micronal.

3.6 - Determinação do Teor Total de Aminoácidos no Feijão

Amostras naturais secas e previamente deslipidizadas segundo o método adaptado de BLIGH & DYER (1954), foram utilizadas seguindo basicamente o método de SPACKMAN *et alii*, 1958. As modificações introduzidas são aquelas testadas e sugeridas pelo fabricante BECKMAN INSTRUMENTS, Palo Alto, Ca, USA (1977).

Foram pesadas amostras finamente moídas, contendo aproximadamente 25 mg de proteína. Em seguida, foram colocadas em tubo pyrex (9825, de 12 x 150 mm) e acrescentadas aproximadamente 35 mL de ácido clorídrico 6N, de modo a minimizar o ar residual no tubo, e tampadas posteriormente, com tampa provida de arruela de teflon. A hidrólise foi realizada em estufa a $110^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, por 22 horas. Após a hidrólise, os tubos foram retirados da estufa e deixados esfriar sobre o balcão e o hidrolisado foi filtrado em funil de vidro sinterizado super fino. A seguir, o filtrado foi quantitativamente transferido para o balão volumétrico de 100 mL e, finalmente, completado o volume com água destilada. O material hidrolisado e seco foi dissolvido em 5 mL de tampão citrato de sódio (0,10 N em Na^{+} ; pH 2,2), e filtrado através de membrana Millipore (poro 0,2 μm) e injetados 30 μL no aparelho para análise.

As análises de aminoácidos totais foram realizadas em analisador de aminoácidos (AMINOCHROM II - Type OE - 914 - LABOR MIM) com as seguintes características de operação:

Instrumento: Aminochrom II

Resina: Varion chrom 9

Lot nº 508-2B

Coluna: 4,5 x 230 mm

Tampões: Pico tampão II

A

B

Temperaturas: $T_1 = 40^\circ\text{C}$

$T_2 = 65^\circ\text{C}$

$T_3 = 80^\circ\text{C}$

Velocidade do fluxo do tampão: 20 cm³/h

Pressão máxima: (A, T_1) 48 bar

A análise está programada para 90 minutos.

Para todas as análises o volume injetado foi de 30 µL.

O comprimento de onda é de 570 nm. (440 nm para prolina)

Os cálculos foram utilizados usando-se a relação

$$\frac{A_x}{C_x} = \frac{A_p}{C_p},$$

onde C é concentração, A absorbância, e os sub-índices x p denotam amostras e o padrão respectivamente.

Os resultados podem ser expressos em gramas de aminoácidos por 16 gramas de nitrogênio ou alternativamente, em gramas de aminoácidos por 100 gramas de amostra.

3.7 - Determinação de Açúcares Solúveis Totais e Redutores no Feijão

A extração dos açúcares solúveis foi efetuada nas cinco variedades de feijão no tegumento e no cotilédone separadamente, moídos segundo AOAC (1970), procedimento 7058, que consiste na extração dos açúcares com etanol a quente.

Nesses extratos, os açúcares redutores foram quantificados de acordo com o método espectrofotométrico de Somogyi-Nelson (1945) e os açúcares totais determinados pelo método espectrofotométrico de Miller (1959), que envolve hidrólise prévia com HCl e reação com o ácido dinitrossalicílico.

Inicialmente, era pretendido obter os níveis dos açúcares tanto nos cotilédones como nos tegumentos. Entretanto, a presença dos pigmentos das cascas, que interferiu na determinação do cromóforo formado, e a falta de um sistema cromatográfico para eliminar os interferentes, não foi possível a utilização dos resultados dos tegumentos.

3.8 - Teste Biológico com *Artemia salina* L

Sobre uma superfície clara foram colocados dez béqueres de 10 mL que foram utilizados nos ensaios à temperatura ambiente.

Foi feito o extrato das amostras de feijão a serem testadas com uma solução etanol + água (1 + 9).

A cada béquer contendo 1,0 mL da suspensão de artemias (76 a 217 artemias vivas) foi acrescentado 1,0 mL da solução teste.

A solução teste consistia de:

- a) solução etanol-água (1 + 9)-branco;
- b) extrato etanólico de feijões isentos de ocratoxina A dissolvido em água na relação 1 + 9 (álcool + água);
- c) extrato etanólico de feijões contaminados com ocratoxina A dissolvido com água na solução 1 + 9 (álcool + água), nas concentrações de 0,37 - 32,9 µg/mL.

Os experimentos foram observados nos intervalos de 4 e 12 horas.

Foi feito também o teste para a substância pura não identificada, a qual mostrou-se muito tóxica.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Evidência da Ocratoxina A

A ocorrência natural da ocratoxina, em geral, tem sido relatada em grãos como milho, trigo, amendoim, sorgo, cevada, aveia, centeio e grãos de café em diversos países (Steyn, 1984; Haggblom e Ghosh, 1985; Rahimtula *et alii*, 1988; Tsubouchi *et alii*, 1988) em níveis variando entre 0,01 e 29,5 mg/kg de grão. Alguns pesquisadores, usando meios semi-sintéticos para culturas submersas, conseguiram atingir níveis de produção de 290 mg/L (Davis *et alii*, 1965) e 61 mg/L (Davis *et alii*, 1972). Já em farelo de arroz e trigo a 18°C, obteve-se produção de 176 e 147 mg/kg, respectivamente (Trenk *et alii*, 1971).

Por ocasião do início desta pesquisa não existia informação documentada sobre a ocorrência de ocratoxina em feijão embora também nada indicasse que esse produto deveria estar isento de contaminação. Baseados em resultados positivos obtidos de um carregamento de 12.000 toneladas de feijão importados por uma firma brasileira e, nos quais empregou-se uma metodologia analítica recém-desenvolvida (Soares e Rodriguez-Amaya, 1987) estabeleceu-se o objetivo de verificar a eficácia do grão de feijão (*Phaseolus vulgaris*) como substrato para a produção de ocratoxina, assim como confirmar, por todos os meios disponíveis, a identidade da toxina produzida após inoculação com um fungo produtor.

Após incubação de vinte lotes de feijão, contendo 22% de umidade e incubação dos mesmos durante 28 dias a 25°C, obteve-se a Tabela 3. Os resultados mostram que todas as variedades de

Tabela 2 - Valores obtidos na quantificação da Ocratoxina A produzida pelo *Aspergillus ochraceus* inoculado em feijão natural e em feijão irradiado com ^{60}Co . (Incubado a 25°C durante 28 dias com 22% de umidade).

Feijão		Tratamento	
		Irradiado ^a	Não Irradiado ^b
		^{60}Co mg/Kg	mg/Kg
Preto	Cotilédone	81,4	257,6 (1,3)
	Tegumento	162,8	235,2 (0,8)
Branco	Cotilédone	33,9	159,1 (1,2)
	Tegumento	40,7	145,9 (0,6)
Rosinha	Cotilédone	40,7	215,2 (0,4)
	Tegumento	122,1	153,1 (0,5)
Roxo	Cotilédone	81,4	202,3 (0,7)
	Tegumento	203,5	169,2 (1,3)
Rajado	Cotilédone	33,9	212,7 (0,6)
	Tegumento	81,4	182,6 (1,8)

a - é uma só determinação

b - é a média de cinco determinações

(nos parênteses, o desvio médio) (Baccan et alii, 1979)

feijão constituem um excelente meio para o desenvolvimento do fungo *Aspergillus ochraceus* e produção de ocratoxina A. Considerando ainda que o grão inteiro como meio de cultura possui uma área superficial muito inferior à dos farelos de Trenk *et alii* (1971), os níveis de produção de 153 a 257 mg/kg são os mais altos até hoje relatados para meios sólidos. Nos grãos não irradiados e excetuando a variedade Rajado, o cotilédone exposto ofereceu melhores condições para a produção de toxina do que o grão protegido com seu tegumento. Essa diferença era previsível dada a função protetora do pericarpo, como já foi observado em sementes de amendoim (Amaya-Farfán *et alii*, 1977). Das cinco variedades, os feijões Preto e Rajado foram os mais eficientes, enquanto que o Branco estimulou a menor produção.

Foi de interesse, também, conhecer a eficácia do feijão como substrato após ter recebido uma dose de radiação gama da ordem de grandeza usada em alimentos (1 MRad). Com exceção das variedades Rosinha e Roxo, os feijões mostraram grande perda do poder estimulador da síntese de ocratoxina após irradiados. A perda foi mais pronunciada no cotilédone do que no tegumento, a julgar pela resposta do grão completo.

Não se tem conhecimento da forma em que a irradiação do substrato possa estar afetando a produção. De um modo geral, podemos suspeitar que houve destruição de algum nutriente essencial e/ou formação de composto inibidor da via biossintética da toxina.

É interessante notar que esta resposta do feijão é contrária ao aumento de susceptibilidade à contaminação com aflatoxina e crescimento do fungo, já observados em milho e amendoim

após irradiação (Paster *et alii*, 1985). O aumento da susceptibilidade é mais facilmente entendido como um resultado da morte da semente, que a torna mais apropriada para o desenvolvimento do fungo saprofita.

Pelas informações encontradas na literatura (van der Merwe *et alii*, 1965; Scott *et alii*, 1965; Stormer *et alii*, 1983) e conforme os resultados da análise de espectrometria de massa (Tabela 2), absorção ultravioleta (Espectro 1), absorção infravermelho (Espectro 2) e ressonância magnética nuclear (Espectro 3), a ocratoxina A foi um dos compostos extraídos pelo novo método analítico proposto por Soares e Rodriguez-Amaya (1987) para análise rotineira de ocratoxina A. Esse método, proposto e utilizado visando uma simplificação e barateamento de custo, especialmente importante em países do terceiro mundo, apenas não tinha confirmação a nível espectroscópico da presença da ocratoxina A no extrato.

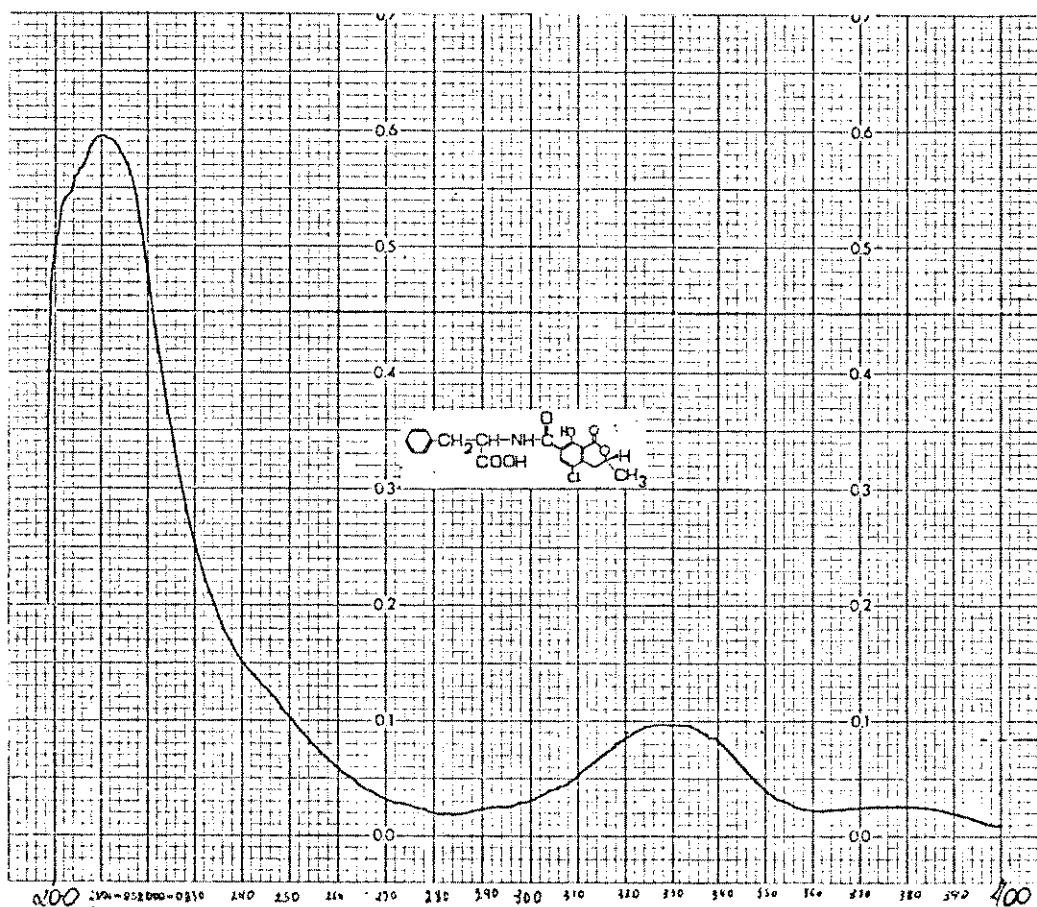
Identificação da outra fração tóxica proveniente do processo de purificação (esquematizado na Figura 4) aguarda ainda identificação por meios espectroscópicos. No momento é apenas possível concluir que se trata de um composto de espectro infravermelho mais simples e ponto de fusão superior a 350°C e um grau de toxidez (Tabela 15).

Tabela 3 - Espectro de massa da Ocratoxina A

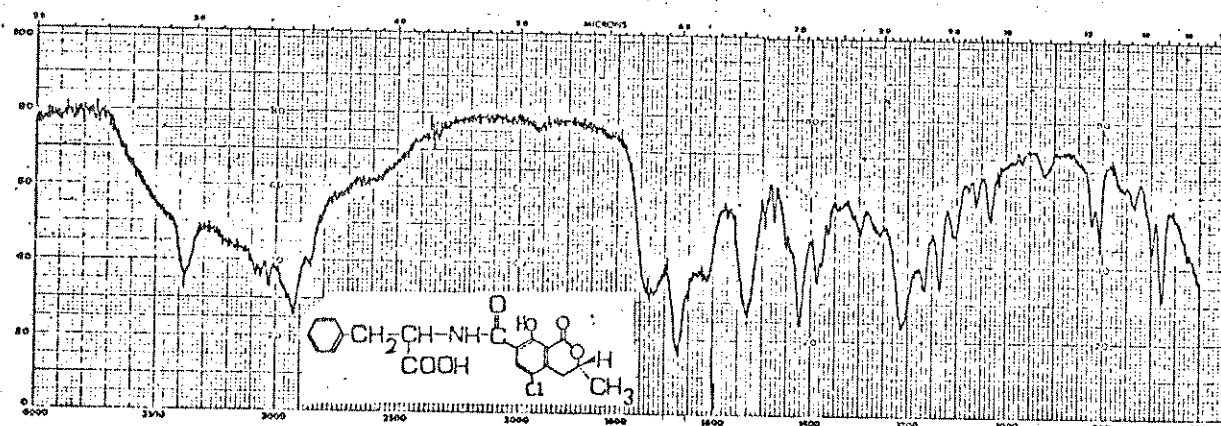
m/z	Intensidade Relativa (%)
91	73,3
102	11,0
120	28,8
221	22,2
237	11,0
239	100,0
240	17,1
241	33,0
255	91,0
256	13,0
257	31,0
403	3,3
441	6,6

O espectro foi feito com um espectrômetro Varian XL-100 NMR 70 eV.

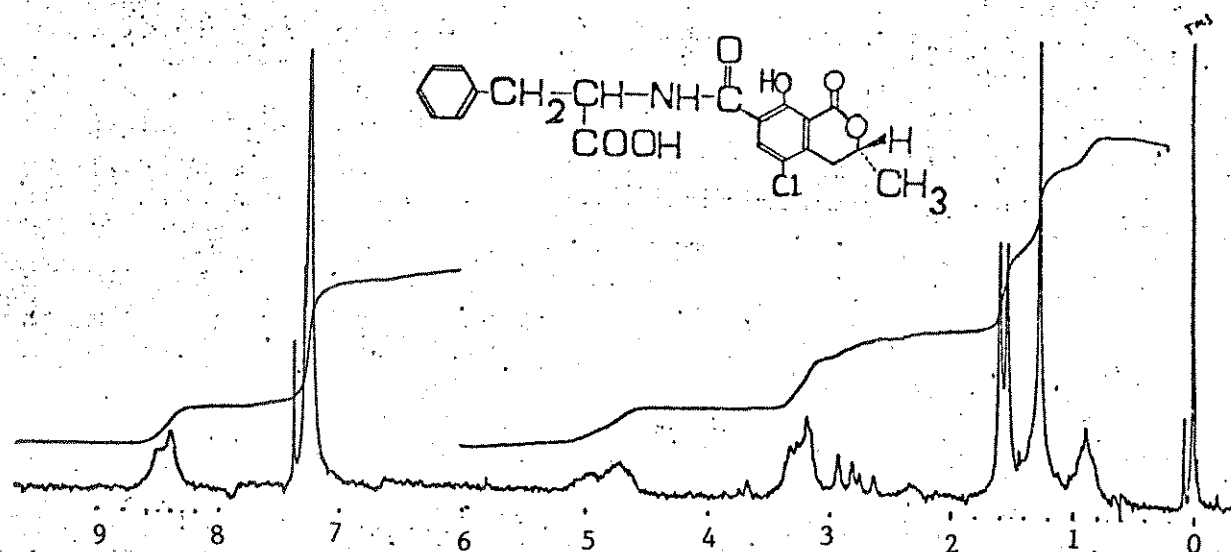
Os fragmentos com abundância abaixo de 10% foram omitidos.



Espectro 1 - Ocratoxina A em metanol. Espectro ultravioleta e visível DMS 100.



Espectro 2 - Ochratoxina A em filme. Espectro de absorção infravermelho. Espectrômetro infravermelho PERKIN-ELMER Modelo 1430, com registrador rotativo.



Espectro 3 - Espectro de ressonância magnética nuclear. Solvente: CDCl_3 ; Referência: TMS; 100 MHz ^1H RMN Varian XL.100 NMR spectrometer.

4.2 - Conteúdo de Aminoácidos Livres

Os compostos nitrogenados de baixo peso molecular, como são os aminoácidos livres e os sais de amônio são fontes importantes para o crescimento miceliar e produção de toxina de fungos do gênero *Aspergillus*, sendo em alguns casos, o efeito estimulatório e, em outros, inibitório (Davis *et alii*, 1967; Ferreira, 1968; Bacon *et alii*, 1975; Payne e Hagler, 1983; Lisker *et alii*, 1983; Lisker *et alii*, 1985; Haggblom e Ghosh, 1985). Interessou para esse trabalho o teor de aminoácidos livres no tegumento e no cotilédone, de forma diferenciada.

Nas Tabelas 4 a 8 podemos observar a presença de aproximadamente 25 aminoácidos livres para cada uma das frações do grão, sendo que houve variação quantitativa considerável entre o tegumento e o cotilédone. Como era esperado, os aminoácidos livres encontrados no tegumento foram menos abundantes do que os presentes no cotilédone (20 - 40% do total do cotilédone). A variedade de feijão Rosinha foi a que mostrou o maior teor de aminoácidos livres, tanto no cotilédone como no tegumento. Foi notável também, o alto teor do íon amônio encontrado em todos os tegumentos, em especial no feijão Preto (2.070 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de pericarpo). O íon amônio representa uma fonte significativa de nitrogênio para o microrganismo especialmente quando certos aminoáci-

Tabela 4 - Composição de aminoácidos livres do feijão preto expressa em $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ de massa.

Aminoácidos	Cotilédone	Tegumento
Ácido L-Aspártico	805,79	57,39
Hidroxi-L-Prolina (desconhecido)		43,60
L-Treonina	51,64	9,84
L-Serina	88,18	14,70
L-Asparagina	1.714,28	
Ácido L-Glutâmico	1.148,93	71,66
Glutamina	-	-
Ácido L- α -Aminoadípico		21,26
L-Prolina	100,00	16,67
Glicina	189,87	12,78
L-Alanina	350,00	58,33
L-Citrulina		
Ácido L- α -Amino-n-Butírico		
L-Valina	79,76	
1/2 Cistina	120,00	12,00
L-Metionina	143,64	8,35
DL-Cistationina	9,38	
L-Isoleucina	28,34	6,61
L-Leucina	36,59	7,32
L-Tirosina	21,82	
L-Fenilalanina	36,36	-
β -Alanina		
Ácido DL- β -Aminoisobutírico		
Ácido γ -Aminobutírico	711,62	106,32
Etanolamina		
NH_4^+	100,20	2.070,04
Hidroxilisina		
L-Ornitina		21,82
L-Lisina	26,30	13,15
L-1-Metilhistidina	56,38	
L-Histidina		7,57
L-3-Metilhistidina	125,22	
L-Anserina		
L-Carnosina		
L-Arginina	1.252,26	167,85

Tabela 5 - Composição de aminoácidos livres do feijão branco expressa em $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de feijão.

Aminoácidos	Cotilédone	Tegumento
Ácido L-Aspártico	1.380,00	105,79
Hidroxi-L-Prolina (desconhecido)		36,33
L-Treonina	73,77	14,75
L-Serina	66,13	21,12
L-Asparagina	90,97	160,71
Ácido L-Glutâmico	1.853,12	38,29
Glutamina	-	-
Ácido L- α -Aminoadípico	204,60	19,13
L-Prolina	133,33	14,00
Glicina	159,49	58,42
L-Alanina	333,33	66,66
L-Citrulina		
Ácido L- α -Amino-n-Butírico		
L-Valina	178,28	26,65
1/2 Cistina	72,00	4,80
L-Metionina	179,59	56,71
DL-Cistationina	5,62	
L-Isoleucina	166,29	11,81
L-Leucina	92,56	14,63
L-Tirosina	36,36	20,45
L-Fenilalanina	40,74	12,12
β -Alanina		
Ácido DL- β -Aminoisobutírico		
Ácido γ -Aminobutírico	23,26	
Etanolamina	475,24	
NH ₄ ⁺	87,13	490,90
Hidroxilisina		
L-Ornitina		
L-Lisina	13,15	39,04
L-1-Metilhistidina		
L-Histidina	183,30	11,35
L-3-Metilhistidina		
L-Anserina		
L-Carnosina		
L-Arginina	1.836,07	132,51

Tabela 6 - Composição de aminoácidos livres do feijão rosinha expressa em $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ de feijão.

Aminoácidos	Cotilédone	Tegumento
Ácido L-Aspártico	1.518,84	156,52
Hidroxil-L-Prolina (desconhecido)	326,98	108,99
L-Treonina	77,45	15,56
L-Serina	131,16	29,39
L-Asparagina	2.515,52	294,64
Ácido L-Glutâmico	1.046,39	210,63
Glutamina	-	-
Ácido L- α -Aminoadípico	344,36	31,88
L-Prolina	133,33	98,98
Glicina	253,55	
L-Alanina	497,77	121,38
L-Citrulina		
Ácido L- α -Amino-n-Butírico		
L-Valina	85,24	53,30
1/2 Cistina	182,40	384,00
L-Metionina	185,26	37,81
DL-Cistationina		
L-Isoleucina	18,89	16,53
L-Leucina	25,60	15,54
L-Tirosina	27,27	9,09
L-Fenilalanina	36,36	12,12
β -Alanina		
Ácido DL- β -Aminoisobutírico		
Ácido γ -Aminobutírico	133,76	38,37
Etanolamina	368,31	118,81
NH_4^+	248,65	509,67
Hidroxilisina		
L-Ornitina		16,36
L-Lisina	39,45	23,63
L-1-Metilhistidina		
L-Histidina	104,29	18,93
L-3-Metilhistidina	176,14	
L-Anserina		
L-Carnosina		
L-Arginina	1.677,05	496,01

Tabela 7 - Composição de aminoácidos livres do feijão roxo expressa em $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ de feijão.

Aminoácidos	Cotilédone	Tegumento
Ácido L-Aspártico	1.049,27	28,98
Hidroxil-L-Prolina (desconhecido)		24,91
L-Treonina	77,86	14,75
L-Serina	62,46	29,39
L-Asparagina	1.821,42	163,04
Ácido L-Glutâmico	931,91	85,65
Glutamina	-	-
Ácido L- α -Aminoadípico		
L-Prolina	100,00	84,00
Glicina		16,35
L-Alanina		21,66
L-Citrulina		
Ácido L- α -Amino-n-Butírico		
L-Valina	133,26	16,88
1/2 Cistina	226,40	79,20
L-Metionina	170,14	15,12
DL-Cistationina		
L-Isoleucina	56,69	34,01
L-Leucina	36,58	16,82
L-Tirosina	18,18	15,00
L-Fenilalanina	54,54	
β -Alanina		
Ácido DL- β -Aminoisobutírico		
Ácido γ -Aminobutírico		19,38
Etanolamina	356,43	
NH_4^+	85,89	290,32
Hidroxilisina		
L-Ornitina		
L-Lisina	26,30	32,87
L-1-Metilhistidina		
L-Histidina	213,02	11,35
L-3-Metilhistidina		
L-Anserina		
L-Carnosina		
L-Arginina	1.716,07	517,91

Tabela 8 - Composição de aminoácidos livres do feijão rajado expressa em $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de feijão.

Aminoácidos	Cotilédone	Tegumento
Ácido L-Aspártico	915,44	88,76
Hidroxil-L-Prolina (desconhecido)		52,40
L-Treonina	55,73	18,91
L-Serina	88,18	33,56
L-Asparagina	1.821,42	152,29
Ácido L-Glutâmico	970,21	122,74
Glutamina	-	-
Ácido L- α -Aminoadípico	242,33	-
L-Prolina	100,00	118,00
Glicina	129,11	18,25
L-Alanina	300,00	80,12
L-Citrulina		
Ácido L- α -Amino-n-Butírico		
L-Valina	106,61	51,25
1/2 Cistina	52,80	6,92
L-Metionina	135,17	36,35
DL-Cistationina	7,81	
L-Isoleucina	37,79	17,03
L-Leucina	51,21	12,66
L-Tirosina	27,27	8,74
L-Fenilalanina	84,84	17,43
β -Alanina		
Ácido DL- β -Aminoisobutírico		
Ácido γ -Aminobutírico		-
Etanolamina	475,24	-
NH_4^+	131,25	446,35
Hidroxilisina		
L-Ornitina		11,85
L-Lisina	39,45	18,96
L-1-Metilhistidina	42,28	
L-Histidina		14,56
L-3-Metilhistidina	286,23	-
L-Anserina		
L-Carnosina		
L-Arginina	1.409,07	417,64

dos, como o ácido glutâmico e a prolina se encontram ausentes do meio (Ferreira, 1968), sendo essa a razão pela qual a maior produção de ocratoxina dos feijões Preto e Rajado não mostrou correlação com os níveis de NH_4^+ , que foram alto no Preto e médio no Rajado (Tabelas 4 e 8). Observando os valores de glutâmico e prolina nessas duas variedades, podemos ver que o teor de NH_4^+ relativamente baixo no Rajado é compensado pelo maior teor de prolina no tegumento.

O ácido glutâmico e a prolina são considerados por vários pesquisadores como estimuladores da produção de ocratoxina por *Aspergillus ochraceus* (Ferreira, 1968; Bacon *et alii*, 1975; Haggblom e Ghosh, 1985). O ácido glutâmico é incorporado tanto na porção fenilalanina quanto na isocumarina da molécula. Por outro lado, a fenilalanina, no meio submerso, não pareceu ter qualquer importância na biossíntese da ocratoxina A, segundo Ferreira (1968). Não obstante, Yamazaki *et alii* (1970) comprovaram que 1% de fenilalanina, quando acrescentada a um meio basal líquido de extrato de leveduras resultou em aumento de 100% na produção de ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus*. Da mesma forma, outros autores (Bacon *et alii*, 1975 e Haggblom e Ghosh, 1985) sugerem que a prolina contribui para a biossíntese após conversão para ácido glutâmico via ácido pirrolina-5-carboxílico.

Nos feijões estudados, estes dois aminoácidos estiveram presentes em concentrações que variaram de 38 a 210 e de 14 a 118 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ de material, respectivamente. Considerando a produção excepcionalmente elevada de ocratoxina que todas as variedades tiveram, é de se supor que as concentrações desses aminoácidos não são fatores limitantes por quanto as variações na

distribuição não se encontram relacionadas com a produção da toxina.

A metionina, apontada como um aminoácido que, em meio líquido e em concentrações de 10^{-2} M, é capaz de agir como um forte inibidor da produção de toxina é uma forma útil de nitrogênio orgânico quando em concentrações de 10^{-4} M (Ferreira, 1968; Paster e Chet, 1980; Lisker *et alii*, 1983). Não sendo possível comparar diretamente as condições do meio líquido com um substrato sólido e de constituição complexa como é o feijão, podemos apenas notar que as concentrações de metionina, relativas ao total de aminoácidos, são suficientemente baixas para não causar toxidez biossintética crítica ao organismo devido ao excesso de poder metilante. Para a maioria dos organismos vivos, a metionina começa a manifestar-se tóxica quando atinge concentrações superiores a 2×10^{-2} em relação ao total de aminoácidos, mais amônia. Assim, as concentrações relativas de metionina nos tegumentos (calculadas na base molar e incluindo alguns compostos aminados que não aparecem nas Tabelas 4 a 8) foram, na ordem, de $2,9 \times 10^{-3}$; $4,2 \times 10^{-2}$; $1,3 \times 10^{-2}$; $9,9 \times 10^{-3}$ e $2,0 \times 10^{-2}$ para o Preto, Branco, Rosinha, Roxo e Rajado (Tabela 9). Isto é, aparentemente consistente com a escala de produção das variedades se considerarmos que a variedade Roxo que, a julgar pelo baixo teor de metionina deveria ter produzido mais toxina do que o Rosinha e o Rajado, mostrou produção modesta devido ao baixo conteúdo de glutâmico e prolina.

Tabela 9 - Metionina livre como fator inibitório da produção de Ocratoxina nos grãos de feijão.

Variedade	Total de Aminoácidos Livres (mg/100 g)		Metionina Livre (mg/100 g)		Metionina Livre nos Tegumentos em Relação ao Total de Aminoácidos Livres	
	Cotilédono	Tegumento	Cotilédono	Tegumento	Cotilédono	Tegumento
Preto	7.196	2.727	144	8	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,9 \times 10^{-3}$
Branco	7.684	1.356	180	57	$2,3 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-2}$
Rosinha	10.154	2.818	185	37	$1,8 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-2}$
Roxo	7.136	1.518	170	15	$2,3 \times 10^{-2}$	$9,9 \times 10^{-3}$
Rajado	7.509	1.745	135	36	$4,7 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$

Nas Tabelas 10 e 11 estão apresentadas as concentrações dos aminoácidos totais, isto é, a soma dos aminoácidos livres e os protéicos, dos cotilédones e os tegumentos.

Se a baixa bioprodução no feijão Branco correlacionou com o elevado teor de metionina livre na casca, esse achado foi consistente com o alto teor de metionina total também encontrado na fração ($6,83 \times 10^{-2}$, Tabela 11). Colocada em segundo lugar, em termos de metionina livre no tegumento, foi a variedade Rosinha. As variedades restantes exibiram quantidades baixas de metionina e níveis mais altos de bioprodução. É provável também que, na variedade Rosinha, o nível extraordinariamente alto de fenilalanina não tenha resultado em maior bioprodução devido ao alto teor de metionina. Por outro lado, os níveis de aminoácidos totais encontrados nos cotilédones (Tabela 10) não parecem mostrar correlação nenhuma com os níveis de bioprodução. Talvez por se tratar de um universo maior, no qual os aminoácidos se encontram sob diversas formas, as diferenças sutis que existem entre os substratos não possam ser percebidas através desses dados. Dessa forma, pode ser mostrada uma maior uniformidade entre os teores de todos os aminoácidos, inclusive o ácido glutâmico, prolina, metionina e fenilalanina.

Isto parece indicar que, em termos de aminoácidos do feijão, um fator determinante da bioprodução são os aminoácidos livres e não os aminoácidos totais ou protéicos, já que esses últimos perfazem a vasta maioria do conjunto total. Esse achado está em acordo com o já observado para amendoim e outros grãos (Amaya-Farfan *et alii*, 1977; Holder *et alii*, 1974).

Tabela 10 - Conteúdo de aminoácidos totais de cotilédones das cinco variedades de feijão.

Aminoácidos	Preto		Branco		Rosinha		Roxo		Rajado	
	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>
	100g	100gP	100g	100P	100g	100gP	100g	100gP	100g	100gP ^a
Ác. aspártico	2,00	9,06	2,54	10,46	2,61	9,91	2,07	9,66	2,70	10,07
Treonina	0,73	3,31	0,81	3,33	1,09	4,04	0,74	3,45	1,05	3,91
Serina	0,98	4,44	0,95	3,91	1,25	4,64	0,94	4,38	1,25	4,66
Ác. glutâmico	3,18	14,42	3,77	15,53	3,86	14,34	3,03	14,15	4,02	15,00
Prolina	0,73	3,31	0,71	2,92	0,83	3,08	0,66	3,08	0,93	3,47
Glicina	0,67	3,03	0,05	0,20	0,90	3,34	0,70	3,26	0,85	3,17
Alanina	0,78	3,53	1,07	4,40	1,00	3,11	0,75	3,50	0,93	3,47
Cistina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND ^b
Valina	1,03	4,67	1,26	5,15	1,22	4,53	1,02	4,76	1,28	4,77
Metionina	0,17	0,77	0,19	0,78	0,21	0,78	0,17	0,79	0,20	0,74
Isoleucina	0,83	3,76	0,94	3,87	1,04	3,86	0,84	3,92	1,00	3,73
Leucina	1,40	6,34	1,55	6,38	1,88	6,98	1,42	6,63	1,62	6,04
Tirosina	0,48	2,17	0,71	2,92	0,63	2,34	0,41	1,91	0,67	2,49
Fenilalanina	0,95	4,30	1,29	5,31	1,24	4,61	0,97	4,53	1,25	4,66
Histidina	0,51	2,31	0,65	2,67	0,66	2,45	0,54	2,52	0,57	2,12
Lisina	1,19	5,39	1,48	6,09	1,49	5,49	1,13	5,27	1,50	5,59
Amônia	0,28	1,26	0,32	1,31	0,32	1,88	0,24	1,12	0,31	1,15
Arginina	1,20	5,44	1,58	6,50	1,56	5,79	1,08	5,04	1,47	5,48
Totais	17,11	77,51	19,87	81,73	21,79	81,17	16,71	77,97	21,60	80,52

a - P = proteína

b - ND = não detectado (considerado zero)

aa - aminoácidos

Tabela 11 - Conteúdo de aminoácidos totais do tegumento das cinco variedades de feijão.

Aminoácidos	Preto		Branco		Rosinha		Roxo		Rajado	
	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>	<u>g aa</u>
	100g	100gP	100g	100gP	100g	100gP	100g	100gP	100g	100gP ^a
Ác. aspártico	0,56	7,84	0,48	8,34	0,46	5,52	0,37	7,77	0,44	7,49
Treonina	0,26	3,64	0,24	4,17	0,18	2,16	0,17	3,57	0,21	3,57
Serina	0,34	4,76	0,26	4,52	0,24	2,68	0,22	4,62	0,26	4,42
Ác. glutâmico	0,84	11,76	0,61	10,61	0,66	7,92	0,49	10,29	0,63	10,73
Prolina	0,38	5,04	0,54	9,39	ND	ND ^b	0,16	3,36	0,56	9,54
Glicina	0,66	9,24	0,40	6,95	0,28	3,36	0,35	7,35	0,32	5,45
Alanina	0,38	5,32	0,23	4,00	0,20	2,40	0,22	4,62	0,22	3,74
Cistina	ND	ND	1,26	21,91	1,22	14,64	ND	ND	ND	ND
Valina	0,42	5,88	0,17	2,95	0,14	1,68	0,27	5,67	0,26	4,42
Metionina	0,06	0,84	0,34	0,83	0,38	4,56	0,01	0,21	0,01	0,17
Isoleucina	0,26	3,64	0,06	1,04	0,06	0,72	0,16	3,36	0,19	3,23
Leucina	0,46	6,44	0,20	3,47	0,14	1,68	0,32	6,72	0,32	5,45
Tirosina	0,14	1,92	0,45	7,82	0,48	5,76	0,09	1,89	0,12	2,04
Fenilalanina	0,30	4,36	0,88	15,30	2,18	26,17	0,18	3,78	0,22	3,74
Histidina	0,20	2,80	0,21	3,65	0,30	3,60	0,21	4,41	0,10	1,70
Lisina	0,42	5,88	0,09	1,56	0,42	5,04	0,28	5,88	0,33	5,62
Amônia	0,32	4,48	tr	tr ^c	0,02	0,24	0,11	2,31	0,10	1,70
Arginina	0,32	4,48	0,11	1,91	0,08	0,96	0,19	3,99	0,27	4,59
Totais	6,32	88,36	6,58	108,42	7,44	89,09	3,80	79,80	4,56	77,60

a - P = proteína

b - ND = não detectado (considerado zero)

c - tr = traços

aa - aminoácidos

4.3 - Efeito de Alguns Metais

As concentrações de onze metais constatados no cotilédone e no tegumento separadamente mostraram que existe uma coerência quantitativa entre as cinco variedades de feijão aqui estudadas.

De um modo geral, pode ser observado que o bário e o potássio apresentaram teores notavelmente elevados em ambas as frações do grão.

Em magnitude, o magnésio foi o segundo elemento mais abundante, sendo sua concentração no tegumento aproximadamente 4 vezes maior do que no cotilédone. Em terceiro lugar, aparecem fósforo, zinco, sódio, ferro e cobre, exibindo cada um distribuição aproximadamente igual nas duas frações, exceção do fósforo que apresentou concentração 10 vezes maior no cotilédone do que no tegumento. Finalmente, em último lugar da lista dos elementos pesquisados, aparece o lítio, presente no tegumento em concentração 10 vezes superior àquela do cotilédone (Tabela 12).

A literatura sobre a função dos elementos traço no crescimento dos fungos toxigênicos e produção de micotoxinas é escassa e, particularmente com respeito ao *Aspergillus ochraceus*. Lai et alii (1970), num estudo sobre os requerimentos nutricionais das espécies de *Aspergillus ochraceus*, *melleus* e *sulphureus* determinaram que o acréscimo individual de qualquer um dos íons Cu^{2+} , $\text{B}_4\text{O}_7^{2+}$, Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{2+} e Zn^{2+} a um meio sólido basal, teve pouco efeito no crescimento miceliar, com exceção do manganês que causou uma depressão de aproximadamente 40%, em relação ao meio contendo todos esses elementos. Quanto à produção de ocrato

Tabela 12 - Composição de minerais do tegumento das cinco variedades de feijão expressa em $\mu\text{g/g}^a$.

Minerais	Feijão				
	Preto	Branco	Rosinha	Roxo	Rajado
Bário ^b	231,00	171,75	202,50	231,25	217,50
Cálcio	275,33 (0,08)	139,01 (0,03)	223,00 (0,63)	231,40 (0,47)	232,26 (0,43)
Cobre	2,50 (0,00)	1,64 (0,33)	3,34 (0,12)	1,80 (0,14)	0,44 (0,12)
Ferro	6,96 (0,32)	3,08 (0,03)	1,90 (0,40)	1,94 (1,00)	2,85 (0,02)
Fósforo	1,33 (0,02)	1,00 (0,00)	1,95 (0,02)	0,83 (0,04)	0,60 (0,00)
Lítio	0,40 (0,01)	0,61 (0,31)	0,41 (0,33)	0,52 (0,09)	0,55 (0,03)
Magnésio	92,50 (0,33)	81,33 (0,03)	108,66 (0,12)	100,66 (0,13)	98,00 (0,13)
Manganês	0,24 (0,01)	0,22 (0,00)	0,22 (0,01)	0,24 (0,01)	0,12 (0,10)
Potássio	137,00 (0,13)	102,86 (0,02)	75,66 (0,03)	101,00 (0,07)	76,00 (0,40)
Zinco ^b	3,43	3,69	3,46	2,78	3,77
Sódio	7,31 (0,02)	7,34 (0,34)	7,90 (0,72)	9,25 (0,13)	4,73 (0,13)

a - Os valores são médias de três determinações.

b - É uma única determinação.

(No parêntese o desvio médio). (Baccan et alii., 1979)

Tabela 13 - Composição de minerais do cotilédone das cinco variedades de feijão expressa em $\mu\text{g/g}^a$.

Minerais	Feijão				
	Preto	Branco	Rosinha	Roxo	Rajado
Bário ^b	287,50	275,00	280,50	427,50	288,00
Cálcio	7,70 (0,01)	6,43 (0,02)	7,23 (0,01)	6,20 (0,00)	7,00 (0,02)
Cobre	1,12 (0,01)	0,91 (0,00)	0,90 (0,02)	1,17 (0,01)	0,81 (0,02)
Ferro	2,08 (0,02)	0,65 (0,04)	4,00 (0,06)	0,97 (0,03)	1,24 (0,04)
Fósforo	11,47 (0,02)	7,65 (0,00)	11,43 (0,04)	9,53 (0,03)	9,73 (0,06)
Lítio	0,04 (0,04)	0,05 (0,00)	0,05 (0,05)	0,02 (0,03)	0,05 (0,02)
Magnésio	25,40 (0,50)	12,77 (0,06)	21,17 (0,05)	21,30 (0,20)	25,87 (0,03)
Manganês	0,35 (0,00)	0,32 (0,00)	0,40 (0,03)	0,42 (0,01)	0,33 (0,03)
Potássio	274,33 (0,30)	191,66 (0,31)	229,33 (0,03)	245,66 (0,05)	233,33 (0,00)
Zinco ^b	3,28	3,07	2,67	2,81	3,47
Sódio	3,19 (0,10)	5,46 (0,01)	3,21 (0,01)	2,82 (0,30)	3,52 (0,20)

a - Os valores são médias de três determinações.

b - É uma única determinação.

(No parêntese o desvio médio). (Baccan et alii, 1979)

xina A, o *Aspergillus ochraceus* não respondeu ao acréscimo de nenhum deles isoladamente, com exceção do zinco, que mostrou apenas um pequeno estímulo.

Já com respeito às outras espécies ocratoxigênicas, *Aspergillus sulphureus* e *melleus*, pode ser mostrada uma maior retração do crescimento miceliar, mas não quanto à produção de toxina. O *Aspergillus sulphureus* foi indiferente à presença ou ausência dos minerais no meio, em se falando da produção de toxina, ao passo que o *Aspergillus melleus* teve um comportamento semelhante ao do *Aspergillus ochraceus*.

Através do trabalho de Lai *et alii* (1970) ficou evidente a importância do zinco na bioprodução de ocratoxina A, em relação a cinco outros elementos. Pelos dados expressos nas Tabelas 12 e 13 podemos constatar que os níveis de zinco no feijão, tanto no tegumento quanto no cotilédone, estão numa concentração ideal para a produção de toxina pelo *Aspergillus flavus* (Davis *et alii*, 1967; Lai *et alii*, 1970; Lillehoj *et alii*, 1974; Marsh *et alii*, 1975 e Obidoa e Ndubuisi, 1981) e pelo *Aspergillus ochraceus* (Lai *et alii*, 1970), que se localiza entre 1 e 5 mg/kg.

Chama a atenção a elevada concentração de bário nos feijões analisados. Pelo fato do bário não ser um elemento para o qual tenha-se apontado qualquer valor nutricional para o homem, não existem dados que possam servir de comparação com outros feijões ou grãos, em geral. A informação que se encontra na literatura sobre culturas micotoxigênicas é exígua e, mesmo assim, refere-se ao *Aspergillus flavus* (Lee *et alii*, 1966). O trabalho desses autores mostra que o Ba^{+2} , em proporções superiores a 100% do K^{1+} , 10% do Co^{2+} e 1,5% do Fe^{2+} , provoca a inibição da produ-

ção de aflatoxina pelo fungo *Aspergillus flavus*. Por outro lado, é de conhecimento comum que, apesar de o *Aspergillus flavus* ter sido isolado de feijões mofados, não foi possível ainda detectar a aflatoxina nesse produto agrícola. Dessa forma, os resultados aqui apresentados sugerem que a presença anormalmente elevada de um elemento sem interesse nutricional ou toxicológico para o homem possua alguma relevância quanto a não ocorrência de aflatoxina em feijão; sem dúvida, uma idéia que merece ser pesquisada com suficiente profundidade.

É interessante também observar as concentrações diferenciadas de cálcio, fósforo, magnésio e potássio encontrados entre o pericarpo e o resto da semente. Até hoje não temos conhecimento da existência de dados composicionais de feijão relatados em forma separada para o cotilédone e o tegumento. É evidente que as informações contidas nas Tabelas 12 e 13 refletem de certa forma características estruturais de partes morfológicamente diferentes; por exemplo, a alta concentração de cálcio no tegumento é consistente com uma estrutura compacta e insolúvel, enquanto que a maior concentração de fósforo no cotilédone corresponde ao alto teor de cálcio fítico (fosfoinositol) típico do feijão (Tobin e Carpenter, 1978). Em adição, é de grande importância se conhecer o teor de cada elemento no microambiente mais próximo da frente onde se desenvolve o micélio, isto é, a composição do verdadeiro meio sólido, mesmo antes de termos mais informações quanto a forma química em que cada elemento se encontra.

Infelizmente não é possível comparar os resultados aqui apresentados com a composição do meio líquido usado no único trabalho relevante na área (Lai *et alii*, 1970). A relação de

micronutrientes Zn/Cu e Zn/Fe empregada no meio por esses autores foi de 50,94 e 1,55, enquanto que os valores médios encontrados no tegumentos dos feijões foram 1,55 e 0,91, respectivamente.

Os grãos de milho, arroz e trigo são conhecidos como bons substratos para os fungos ocratoxigênicos. Num trabalho de O'Dell *et alii* (1972) em que se estuda a composição mineral nas frações de germe, endosperma e pericarpo, podemos observar que as relações Zn/Cu, Zn/Fe, Zn/Mn e Zn/Ca (em especial a relação Zn/Fe dos pericarpos, onde a mesma aparece quase constante ao redor de 0,9) são mais consistentes com os resultados aqui apresentados do que os de Lai *et alii* (1970), mostrando mais uma vez que os feijões estudados constituem um substrato adequado para a produção de ocratoxina.

4.4 - Efeito da Composição de Açúcares

A fonte de carboidratos para o crescimento do micélio e produção da toxina é de fundamental importância. O microrganismo é capaz de aproveitar os carboidratos mais complexos do substrato através de seu poderoso sistema enzimático. Entretanto, a presença de açúcares livres, ao invés de amidos e polissacarídeos estimula o desenvolvimento dos esporos de tal forma que, grãos e sementes com teores elevados de açúcares (e aminoácidos) livres são excepcionalmente susceptíveis à invasão por fungos (Amaya-Farfán *et alii*, 1977; Holder *et alii*, 1974).

Na Tabela 14 aparecem consignados os valores de açúcares redutores e totais das cinco variedades de feijão. Deve ser observado de antemão, que apenas figuram os dados correspondentes ao tegumento do feijão branco devido à interferência apresentada pelos pigmentos dos tegumentos coloridos dos outros feijões.

Tabela 14 - Teores de açúcares de feijões, *Phaseolus vulgaris*, extraídos com etanol a 80%.

Amostras de Feijão		Açúcares ^a	
		Totais %	Redutores %
Preto	cotilédone	4,77 (0,00)	0,07 (0,04)
Branco	cotilédone	5,20 (0,10)	0,04 (0,02)
	tegumento	1,05 (0,02)	0,11 (0,00)
Rosinha	cotilédone	5,40 (0,18)	0,07 (0,03)
Roxo	cotilédone	5,91 (0,17)	0,08 (0,02)
Rajado	cotilédone	4,88 (0,28)	0,06 (0,00)

a - Valores de três determinações

(no parênteses, desvio médio) (Baccan et alii, 1979)

Apesar de não terem sido determinados individualmente os açúcares constituintes do grão, os açúcares redutores ainda podem ser um bom parâmetro por duas razões: 1) glicose e frutose (em relação quase equimolar) são os monossacarídeos mais abundantes nos grãos; 2) Lai e Hesseltine (1970) mostraram que a glicose e a sacarose (o dissacarídeo principal) são equivalentes em termos do poder estimulador da bioprodução.

Os níveis de açúcares redutores encontrados no cotilédone do feijão branco foram inferiores aos das outras variedades, o que evidencia uma correlação com a bioprodução de ocratoxina no grão sem o tegumento (Tabela 3, coluna 2).

Já no caso dos açúcares totais, a situação foi semelhante àquela dos aminoácidos totais, isto é, o universo dos açúcares totais escurece a importância do açúcar livre para o desenvolvimento do micélio e produção de toxina.

4.5 - Toxidez da Ocratoxina A

Mediante um bioensaio de toxicidade simples foi possível confirmar que o extrato fúngico possui toxidez e que a mesma está relacionada com a concentração do extrato (Tabela 15).

É interessante observar aqui que a fração do extrato separada em 3.2, e que por não coincidir com ocratoxina A, B ou C não fez parte do objetivo dessa tese, possui também propriedades tóxicas, podendo-se tratar de uma nova toxina fúngica.

O assunto merece ser estudado com maior profundidade.

Tabela 15 - Bioensaio de toxidez com *Artemia salina* L. em meio etanol-água (1 + 9).

Tempo (h)	Concentração (OA µg/mL)	Vivos		Sobreviventes %
		Início	Fim	
Álcool-água (controle)				
12		122	122	100
Extrato de feijão não contaminado				
12		115	115	100
Extrato purificado				
12	0,37	98	98	100
12	0,75	111	111	100
12	1,08	140	140	100
12	11,90	52	40	76
12	40,30	82	63	76
04	205,00	76	0	0
04	329,00	84	0	0
Extrato desconhecido purificado				
12		217	15	5

5 - CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados encontrados neste estudo conclui-se:

- 1) O feijão comum, *Phaseolus vulgaris* L. desta região do Brasil é um substrato altamente adequado à produção de toxina A pelo fungo *Aspergillus ochraceus*.
- 2) Sendo um substrato de tão boa qualidade, o grão normalmente não é portador da toxina por se encontrar na prática, com teores de umidade de 13 a 15%, ou seja, muito inferiores aos níveis que conduzem ao crescimento do fungo e à bioprodução.
- 3) Irradiação gama (1 MRad) poderá ser um método de esterilização mais eficaz para o feijão do que para outros grãos, a julgar pela diminuição da bioprodução que o tratamento ocasionou.
- 4) Os nutrientes livres do grão, como aminoácidos e açúcares redutores, mostraram ser o alimento mais imediato e disponível ao micélio para produção da toxina no período de 28 dias após inoculação.
- 5) A maior ou menor resposta do fungo ao substrato parece ser função de múltiplas variáveis dentre as quais merecem destaque os teores de ácido glutâmico, prolina (efeito positivo) e metionina (efeito negativo na bioprodução), especialmente no que se refere ao tegumento.
- 6) As concentrações de elementos-traço nos feijões, talvez por se encontrarem em níveis adequados, não mostraram correlação

com a maior ou menor bioprodução da ocratoxina A. Nesse sentido, os minerais parecem ter cedido a sua importância para os aminoácidos livres e os açúcares livres.

- 7) Confirmou-se que a ocratoxina A é, de fato, um dos compostos orgânicos extraídos por um método analítico proposto recentemente por esta Universidade para dosagem rotineira da toxina.

- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAYA-FARFÁN, J.; YOUNG, C.T.; MIXON, A.C. e NORDEN, A.J. 1977. Soluble amino and carbohydrate compounds in the testae of six experimental peanut lines with various degrees of *Aspergillus flavus* resistance. *J. Agr. Food Chem.* 25:661-663.
- ANONYMOUS. 1972. FDA in analyzing beer, malted barley for ochratoxins. *Food Chem. News*, May 22, p.14, em Thomas D. Wyllie and Lawrence G. Morehouse (eds) 1978. "Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses vol. II. Marcel Dekker, New York, p.28.
- AOAC. 1970. "Official methods of analysis". 10th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- AOAC. 1980. "Official Methods of Analysis" 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- APPLEGATE, K.L.; CHIPLEY, J.R. 1976. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 before and after exposures to ⁶⁰Co irradiation. *Appl. Envir. Microbiol.*, 31:349-353.
- BACON, C.W.; ROBBINS, J.D.; BURDICK, D. 1975. Metabolism of glutamic acid in *Aspergillus ochraceus* during the biosynthesis of ochratoxin A. *Applied Microbiology*, 29:317-322.
- BALZER, I.; BOGDANIC, C.; MUZIC, S. 1977. "Ann. Nutr. Aliment." 31: 425-430 em STEYN, P.S. (eds) 1984. Mycotoxins. Production, isolation and purification. V. Betina Elsevier Science Publishers. B.V. Amsterdam Printed in the Netherlands, p.187.
- BACCAN, N.; ANDRADE, J.C. DE; GODINHO, D.E.S.; BARONE, J. S. 1979. Química Analítica Quantitativa Elementar. Ed. Edgar Blucher Ltda. Publicada por UNICAMP.

- BAUER, J.; GAREIS, M. 1987. Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. *J. Vet. Med. B*, 34:613-627
- BECKMAN 118/119 CL Application Notes. 1977. 001 Hydrolizate analysis. 002 Physiological fluid analysis. Published by Spinco Division of Beckman Instruments Inc. Palo Alto, California. April.
- BENDELE, ALISON M.; CARLTON, WILLIAM W.; KROGH, PALLE; LILLEHOJ, E.B. 1985. Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J x C3H) F₁ mouse. *JNCI*, 75:733-742.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37:911.
- BOLETIN TÉCNICO. 1983. Instituto Agronômico de Campinas. 78:48.
- BROWN, R.F.; WILDMAN, J.D.; EPPLEY, R.M. 1968. Temperature-dose relationships with aflatoxin on the brine shrimp, *Artemia salina*. *Journal of the A.O.A.C.*, 51:905-906.
- BUNGE, I.; DIRHEIMER, G.; ROSCHENTHALER, R. 1978. In vivo and in vitro inhibition of protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* by ochratoxin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83:398-405.
- CARLTON, W.W.; TUIITE, J. 1970. Nephropaty and edema syndrome induced in miniature swine by corn cultures of *Penicillium viridicatum*. *Pathol. Vet.*, 7:68-80.
- CARLTON, W.W.; KROGH, P. 1979 em STEYN, P.S. (eds) 1984. Mycotoxins. Production, isolation and purification. V. Betina Elsevier Science Publishers. B.V. Amsterdam Printed in the Netherlands, p.184-186.

- CREPPY, F.E.; LUGNIER, A.A.J.; BECK, G.; ROSCHENTHLER, R.; DIRHEIMER, G. 1979. Action of ochratoxin A on cultured hepatoma cells-revision of inhibition by phenylalanine. *FEBS Lett*, 104: 287-290.
- DAVIS, N.D.; DIENER, U.L.; AGNIHOTRI, V.P. 1965. Production of aflatoxins B₁ and G₁ in chemically defined medium. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 31:252-256.
- DAVIS, N.D.; DIENER, U.L.; AGNIHOTRI, V.P. 1967. Production of aflatoxin B₁ and G₁ in chemically defined medium. *Mycol. Appl.* 31:252-256.
- DAVIS, N.D.; SEARCY, J.W.; DIENER, U.L. 1969. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in a semisynthetic medium. *Applied Microbiology*, 17:724-744.
- DAVIS, N.D.; SANSING, G.A.; ELLENBURG, T.V.; DIENER, U.L. 1972. Medium scale production and purification of ochratoxin A, a metabolite of *Aspergillus ochraceus*. *Applied Microbiology*, 23: 433-435.
- DIENER, U.L.; DAVIS, N.D. 1967. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 44:259-263.
- EGMOND, H.P. Van. 1989. Current situation on regulation for mycotoxins. A review of tolerances and states of standard methods of sampling and analysis. *Food Additives and Contaminants*. 6:139-188.

- ELLING, F.; HAID, B.; JABOBSENS, CHR; KROGH, P. 1975. Spontaneous toxic nephropathy in poultry associated with ochratoxin A. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A*, 83:739-741.
- EPSTEIN, E.; STEINBERG, M.P.; NELSON, A.I.; WEI, L.S. 1970. Aflatoxin production as affected by environmental conditions. *J. Food Sci.*, 35:389-391.
- FERREIRA, N.P. 1968. The effect of aminoacids on the production of ochratoxin A in chemically defined media. *Antonie van Leeuwenhoek*, 34:433-440.
- GROSCH, DANIEL S. 1967. Poisoning with DDT: effect on reproductive performance of *Artemia*. *Science*, 155:592-593.
- HAGGBLOM, Per. 1982. Production of ochratoxin A in barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum*: effect of fungal growth, time, temperature, and inoculum size. *Applied Environmental Microbiology*, 43:1205-1207.
- HAGGBLOM, Per E; GHOSH, JYOTIRMOY. 1985. Postharvest production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* in barley with different protein levels. *Applied and Environmental Microbiology*, 49:787-790.
- HARWIG, J.; SCOTT, P.M. 1971. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Applied Microbiol.* 21:410-411.
- HESELTINE, C.W.; VANDEGRAFT, ELSIE E.; FENNELL, DOROTHY, I.; SMITH, MABEL L.; SHOTWELL, ODETTE L. 1972. *Aspergilli* as ochratoxin producers. *Mycologia*, 64:539-550.

- HODGE, J.E. e HOFREITER, B.T. 1962. Determination of reducing sugars and carbohydrates. Em "Methods in carbohydrate chemistry (WHISTLER, R.L. e WOLFROM, M.L.), (eds) 1962. Academic Press, New York, vol. 1, p.380-388.
- HOLDER, D.G.; GLOVER, D.V.; SHANNON, J.C. 1974. Interaction of shrunk-2 with five other carbohydrate genes of corn endosperm. *Crop. Sci.*, 14:643-646.
- HORNER, K.J.; ANAGNOSTOPOULOS, G.D. 1973. Combined effects of water activity, pH and temperature on the growth and spoilage potential of fungi. *J. Appl. Bact.*, 36:427-436.
- HULT, K.; HOKBY, E.; HAGGLUND, U.; GATENBECK, S.; RUTQVIST, L.; SELLYER, G. 1979. Ochratoxin A in pig blood: method of analysis and use as a tool for feed studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 38:772-776.
- JONES, D.B.; HORN, M.J. 1930. The proportion of arachin and conarachin and proportionate occurrence of the protein in the peanut. *J. Agr. Res.*, 44:673.
- KHAN, SUMSULLAH; MARTIN, MARIE; BARTSCH, HELMUT; RAHIMTULA, ANVER D. 1989. Perturbation of liver microsomal calcium homeostasis by ochratoxin A. *Biochemical Pharmacology*, 38:67-72.
- KROGH, P.; HALD, B.; PLESTINA, R.; ČEOVIĆ, S. 1977. Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, 85:238-240.

- LAI, M.; SEMENIUK, C.W. 1970. Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in a synthetic medium. *Appl. Microbiol.*, 19:542.
- LANDERS, K.E.; DAVIS, N.D.; DIENER, U.L. 1967. Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts. *Phytopathology*, 57:1086-1090.
- LEE, E.G.H.; TOWNSLEY, P.M.; WALDEN, C.C. 1966. Effect of bivalent metals on the production of aflatoxins in submerged cultures. *J. Food Sci.*, 31:432-436.
- LEVI, COLETTE P.; TRENK, HUGH, L.; MOHR, HERMAN K. 1974. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *Journal of the A.O.A.C.*, 57:866-870.
- LILLEHOJ, E.B.; MILBURN, M.S.; CIEGLER, A. 1972. Control of *Penicillium martensii* development and penicillures. *Appl. Microbiol.*, 24:198-199.
- LILLEHOJ, E.B.; GARCIA, W.J.; LAMBROW, M. 1974. *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production in corn: influence of trace elements. *Applied Microbiology*, 28:763-767.
- LISKER, N.; PASTER, N.; CHET, I. 1983. Ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus* as affected by methionine and structurally related compounds. *Can. J. Microbiol.*, 29:536-540.
- LISKER, N.; PASTER, N.; CHET, I. 1985. Effects of cysteine and structurally related compounds on ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus*. *C.J. Microbiol.*, 31:973-976.

- MARSH, PAUL B.; SIMPSON, MARION E.; TRUCKSESS, MARY W. 1975. Effects of trace metals on the production of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Microbiology*, 30:52-57.
- MATELES, R.I.; ADYE, J.C. 1965. Production of aflatoxin in submerged cultura. *Appl. Microbiol.*, 13:208.
- MAYURA, KITTANE; PARKER, ROGER; BERNDT, WILLIAM O.; PHILLIPS, TIMOTHY D. 1984. Ochratoxin A induced teratogenesis in rats: partial protection by phenylalanine. *Applied and Environmental Microbiology*, 48:1186-1188.
- MICHAEL, A.S.; THOMPSON, C.G.; ABRAMOVITZ, M. 1956. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science*, 123:464.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31:426-428.
- NORSTADT, F.A. e McCALL, T.M. 1969. *Penicillium urticae* Bainer enumeration in soils. *Plant Soil*, 30:129-133.
- NORTHOLT, M.D.; VERHULSDONK, C.A.H.; SOENTORO, P.S.S.; PAULSCH, W.E. 1976. Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *J. Milk Food Technol.*, 39:170-174.
- NORTHOLT, M.D.; VAN EGMOND, H.P.; PAULSCH, W.E. 1979. Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *J. Food Protec.*, 42:485-490.
- OBIDOA, ONYECHI; NDUBUISI, I.E. 1981. The role of zinc in the aflatoxigenic potential of *Aspergillus flavus* NRRL 3251 on foodstuffs. *Mycopathologia*, 74:3-6.

- O'DELL, B.L.; BURPO, C.E.; SAVAGE, J.E. 1972. Avaliação zinco availability in foodstuffs of plant and animal origin. *J. Nutr.*, 102:653-660.
- PASTER, N.; CHET, I. 1980. Effects of environmental factors on grow and sclerotium formation in *Aspergillus ochraceus*. *Can. J. Botany*, 58:1844-1850.
- PASTER, N.; CHET, I. 1982. Influence of controlled atmospheres on formation and ultrastructure of *Aspergillus ochraceus* sclerotia. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 78:315-322.
- PASTER, N.; LISKER, N.; CHET, I. 1983. Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm grown under controlled atmospheres. *Applied and Environmental Microbiology*, 45:1136-1139.
- PASTER, N.; BARKAI-GOLAN, R.; PADOVA, R. 1985. Effect of gamma radiation on ochratoxin production by the fungus *Aspergillus ochraceus*. *Sci. Food Agric.*, 36:445-449.
- PASTER, N.; BARKAI-GOLAN, R.; PADOVA, R. 1986. Heat and gamma irradiation effects on ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus* sclerotia. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 87:223-228.
- PASTER, N.; BULLERMAN, LLOYD B. 1988. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. *International Journal of Food Microbiology*, 7:257-265.
- PAYNE, GARY A.; HAGLER JR., WINSTON M. 1983. Effect of specific amino acids on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in defined media. *Applied and Environmental Microbiology*, 46:805-812.

PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I.N.; CASTEGNARO, M. 1988.

Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Additives and Contaminants*, 5:299-301.

POHLAND, A.E.; SCHULLER, P.L.; STEYN, P.S.; VAN EGMOND, H.P.

1982. Physicochemical data for some selected mycotoxins. *Pure Appl. Chem.*, 54:2219-2264.

RABIE, C.J.; MEYER, C.J.; VAN HEERDEN, LAETITIA; LÜBBEN, ANNELIE

1981. Inhibitory effect of molybdenum and vanadium salts on aflatoxin B₁ synthesis by *Aspergillus flavus*. *Can J. Microbiol.*, 27: 962-967.

RAHIMTULA, A.D.; BÉREZIAT, J.C.; BUSSACCHINI-GRIOT, V.; BARTSCH,

H. 1988. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochemical Pharmacology*, 37:4469-4477.

REISS, JÜRGEN. 1972. Comparing investigations on the toxicity of some mycotoxins to the larvae of the brine shrimp (*Artemia salina*). *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B*, 155:531-534.

RIBELIN, W.E. 1978 em WYLLIE, T.D.; MOREHOUSE, L.G. (eds) 1978.

"Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses". Marcel Dekker, Inc., Nova York, p.28-35.

ROBINSON, ARTHUR B.; MANLY, KENNETH F.; ANTHONY, MICHAEL, P.;

CATCHPOOL, JOHN F.; PAULING, LINUS. 1965. Anesthesia of *Artemia* larvae: method for quantitative study. *Science*, 149:1255-1258.

- SANCHIS, V.; SCOTT, P.M. e FARBER, J.M. 1988. Mycotoxin - producing potential of fungi isolated from red kidney beans. *Mycopathologia*, 104:157-162.
- SMITH, A.K.; CIRDE, S.J. 1972. Soybeans, chemistry and technology. Westpost, A VI, vol. p.61.
- SCOTT, DE B. 1965a. Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 25:213-222.
- SCOTT, DE B.; STEYN, P.S.; FOURIE, L.; VAN DER MERWE, K.J.; THERON, J.J. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh., *Nature*, 205:1112-1113.
- SOARES, L.M.V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. 1985. Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava. *J. Assoc. Anal. Chem.*, 68:1128-1130.
- SOARES, L.M.V. 1987. Micotoxinas: um método para análise simultânea e incidência em alimentos comercializados na região de Campinas. Tese de Doutorado - UNICAMP. p.6.
- SOMOGYI, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, 160:61-68.
- STEYN, P.S.; HOLZAPFEL, C.W. 1967. The synthesis of ochratoxin A and B metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Tetrahedron*, 23:4499-4461.
- STEYN, P.S.; HOLZAPFEL, C.W.; FERREIRA, N.P. 1983. The biosynthesis of the ochratoxins, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, 9:1977-1983.

- STEYN, P.S. (eds) 1984. Ochratoxin and related dihydroisocoumarins. Mycotoxins production, isolation, separation and purification. V. Betina Elsevier Science Publishers. B.V. Amsterdam Printed in the Netherlands, p.188-190.
- STØRMER, FREDRIK C.; STØREN, OSCAR; HANSEN, CARL E.; PEDERSEN, JAN I.; AASEN, ARNE J. 1983. Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A and 10-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by rabbit liver microsomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 45:1183-1187.
- STUBBLEFIELD, R.D. 1979. em TOUCHSTONE, J.C.; SHERMA, J. (eds). 1979. "Densitometry in thin layer chromatography", John Wiley & Sons, Nova York, p.393-429.
- TOBIN, G.; CARPENTER, K.J. 1978. The nutritional value of the dry bean (*Phaseolus vulgaris*): a literature review. *Nutr. Abs. & Reviews Series A*, 48:919-936.
- TRENK, H.L.; BUTZ, M.E.; CHU, F.S. 1971. Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Microbiol.*, 21:1032-1035.
- TSUBOUCHI, HARUO; YAMAMOTO, KATSUHIKO; HISADA, KAZUO; SAKABE, YOSHIO; UDAGAWA, SHUN-ICHI. 1987. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. *Mycopathologia*, 97:111-115.
- TSUBOUCHI, HARUO; TERADA, HISAYA; YAMAMOTO, KATSUHIKO; HISADA, KAZUO; SAKABE, YOSHIO. 1988. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 36:540-542.

- UCHYAMA, SADA0; SAITO, YUKIO. 1987. Protein-binding potential of ochratoxin A *in vitro* and its fluorescence enhancement. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 28:453-460.
- VAN DER MERWE, K.J.; STEYN, P.S.; FOURIE, L. 1965. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J. Chem. Soc.*, 7083-7088.
- VISCONTI, ANGELO; BOTTALICO, ANTONIO. 1983. High levels of ochratoxins A and B in moldy bread responsible for mycotoxicosis in farm animals. *J. Agric. Food Chem.*, 31:1122-1123.
- WILSON, B.J. 1978. Hazards of mycotoxins to public health. *J. Food Protec.*, 41:375-384.
- WYLLIE, THOMAS D.; MOREHOUSE, LAWRENCE G. (eds) 1978. "Mycotoxic fungi mycotoxins, mycotoxicoses vol. II. Marcel Dekker, New York, p.28-33.
- YAMAZAKI, MIKIO; MAEBAYASHI, YUKIO; MIYAKI, KOMEI. 1970. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* isolated in Japan from moldy rice. *Applied Microbiology*, 20:452-454.
- YOUNG, C.T.; MATLOCK, R.S.; MASON, M.E.; WALLER, G.R. 1974. Effect of harvest date and maturity upon free amino acid levels in three varieties of peanuts. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 51:269-273.

Tabela 16 - Tempos de retenção dos aminoácidos livres em coluna de troca catiônica tipo Dowex 50W, sistema de tampão citrato de lítio

Aminoácidos	Padrão	Cotilédone	Tegumento
DL-O-Fosfosserina	3,34		
Taurina	6,10		
C-Fosfoetanolamina	7,09		
Ácido L-Aspártico	21,09	21,00	21,00
Hidroxil-L-Prolina	22,27	22,00	22,00
L-Treonina	25,62	25,65	25,50
L-Serina	26,59	26,79	26,50
L-Asparagina	28,36	28,36	30,00
Ácido L-Glutâmico	33,46	33,00	32,00
Glutamina	37,43	35,00	39,00
Ácido L- α -Aminoadípico	48,00	48,06	47,00
L-Prolina	53,01	53,05	53,00
Glicina	54,20	54,37	53,97
L-Alanina	56,34	58,51	57,91
L-Citrulina	60,01		
Ácido L- α -Amino-n-Butírico	65,81		
L-Valina	72,30	73,68	73,28
1/2 Cistina	86,09	86,10	86,00
L-Metionina	87,47	87,48	87,48
DL-Cistationina	89,44	89,44	91,00
L-Isoleucina	91,01	91,80	91,80
L-Leucina	92,98	93,38	93,50
L-Tirosina	96,33	96,56	96,92
L-Fenilalanina	102,63	103,23	103,62
β -Alanina	139,74		
Ácido DL- β -Aminoisobutírico	143,02		
Ácido γ -Aminobutírico	169,03	173,00	170,21
Etanolamina	178,48	175,33	
Amônia	185,57	186,56	186,76
Hidroxilisina	190,54		
L-Ornitina	201,14		202,50
L-Lisina	206,26	208,91	208,03
L-1-Metilhistidina	210,59	209,50	
L-Histidina	214,73	216,31	216,50
L-3-Metilhistidina	228,92	226,00	
L-Anserina	233,64		
L-Carnosina	244,28		
L-Arginina	256,04	249,01	249,80

Tabela 17 - Tempo de retenção dos aminoácidos totais em coluna de troca catiônica tipo Dowex 508-2B, sistema de tam pão citrato de lítio.

	Padrão	Cotilédone	Tegumento
Ácido aspártico	18,64	19,44	19,44
Treonina	22,50	22,50	23,14
Serina	24,75	24,42	24,75
Ácido glutâmico	29,89	30,21	31,66
Prolina	37,28	36,96	37,92
Glicina	41,14	41,14	41,30
Alanina	43,71	43,39	43,71
Cistina	46,60	46,90	46,85
Valina	49,17	48,22	48,69
Metionina	51,75	51,42	51,42
Isoleucina	55,60	54,96	55,12
Leucina	57,21	56,41	56,57
Tirosina	61,55	60,75	61,07
Fenilalanina	64,28	63,64	63,64
Lisina	70,07	68,94	69,10
Amônea	72,96	71,03	72,00
Histidina	75,53	74,57	74,57
Arginina	83,89	83,08	82,92