

Ocorrência de Aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de Marília – SP, Brasil no período de 1999-2001

Occurrence of Aflatoxins in peanut and peanut products commercialized in the region of Marília - SP, Brazil in the period of 1999-2001

Luzia SHUNDO^{1*}
Rosângela A. SILVA²
Myrna SABINO¹

RIALA6/955

Shundo, L. ; Silva, R. A. e Sabino, M. - Ocorrência de Aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de Marília – SP, Brasil no período de 1999-2001 **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 177 - 181, 2003.

RESUMO. Oitenta e sete amostras de amendoim e produtos derivados de amendoim comercializados na região de Marília/SP – Brasil no período de 1999 a 2001 foram analisadas para identificar e quantificar aflatoxinas B₁ e G₁, determinadas através de cromatografia em camada delgada, de acordo com o método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya. As aflatoxinas foram encontradas em 56 (64,4%) amostras e 34 (39,1%) excederam os limites da legislação brasileira em vigor neste período, que para a somatória de AFB₁ e AFG₁, era de 30 µg/kg. As concentrações de aflatoxinas nas amostras variaram de 3 a 1659 µg/kg, com a média de 306 µg/kg. Em 31 amostras (35,6%) não foram detectadas aflatoxinas e o 90th percentil foi de 601 µg/kg. Dados de temperatura e pluviosidade neste mesmo período indicaram que a contaminação em altos níveis, coincidiram com temperaturas e pluviosidade elevadas e, possivelmente pode ter sido a causa dos altos teores de aflatoxinas encontrados. Este estudo indicou que a contaminação por aflatoxinas existe, possivelmente devido às condições de temperatura e umidade prevalentes na região de Marília que são favoráveis ao crescimento de fungos. A implantação de boas práticas agrícolas e uma avaliação contínua e sistemática é o melhor caminho para prevenir e controlar a infestação de produtos agrícolas por fungos toxigênicos.

PALAVRAS-CHAVE. aflatoxinas B₁ e G₁, amendoim, ocorrência, cromatografia em camada delgada.

¹Instituto Adolfo Lutz – São Paulo - Brazil

²Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Marília

*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica. Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – São Paulo/SP, Brazil.

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos secundários tóxicos, produzidos por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e eventualmente *Aspergillus nomius* durante seu crescimento em alimentos e rações. Existem quatro principais toxinas distribuídas nos grupos B e G, baseadas na fluorescência azul (blue) e verde (green) quando adsorvidas sobre substrato sólido e submetidas à luz ultravioleta, denominadas aflatoxina B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂).

A AFB₁ e AFG₁ ocorrem mais frequentemente na maioria dos produtos agrícolas¹⁵. O metabólito aflatoxina B₁ é o mais tóxico do grupo, sendo considerado o mais potente hepatocarcinogênico natural⁹.

Aspergillus flavus e *Aspergillus parasiticus* são saprófitas naturais do solo e ar, e em condições ideais são capazes de contaminar os alimentos. A ocorrência e magnitude da contaminação por essas micotoxinas variam de acordo com os fatores geográficos e sazonais, com as condições locais de crescimento do vegetal e ainda com as práticas de colheita e estocagem utilizadas. As culturas em áreas tropicais e subtropicais como o Brasil estão mais sujeitas à contaminação, pois as melhores condições para o desenvolvimento dos fungos e, conseqüentemente, para a produção das aflatoxinas são encontradas em áreas com altas temperaturas (25 a 30°C) e umidade elevadas (80 a 90 %). A contaminação dos produtos agrícolas ocorre através do contato com os esporos do fungo presentes no ambiente, sobretudo no solo, durante os procedimentos de colheita e secagem^{4,13}. O armazenamento em locais úmidos e sem ventilação, bem como o transporte inadequado, favorecem não apenas a contaminação com esporos, mas também o crescimento fúngico nos produtos já contaminados⁵.

A região oeste do estado de São Paulo é uma grande produtora de amendoim e Marília, onde esta pesquisa foi realizada, está localizada nesta área. O clima desta região é caracterizado pela ocorrência de duas estações bem definidas: uma marcada por altas temperaturas e pluviosidade, que inicia em outubro e termina em março e outra, com temperaturas elevadas, porém com pluviosidade consideravelmente menor, que inicia em abril e termina em setembro.

Existem duas colheitas anuais de amendoim. A primeira e a mais significativa é denominada safra das águas e ocorre durante o período de temperaturas e pluviosidade altas, e a segunda, de menor produção é denominada safra da seca e ocorre durante o período de menor pluviosidade (Tabela 2).

Além da produção agrícola, a região possui várias indústrias que processam amendoim, visando tanto o comércio local, quanto à exportação. A produção local é insuficiente para suprir a demanda das indústrias, havendo a necessidade de obter amendoim de outras localidades.

A contaminação de alimentos por aflatoxinas constitui um problema de saúde pública com grande impacto e

conseqüências na economia. Este trabalho apresenta a ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de Marília - SP (Brasil) nos anos de 1999, 2000 e 2001.

MATERIAL E MÉTODOS

Oitenta e sete amostras de amendoim e produtos de amendoim colhidas no comércio pela Vigilância Sanitária Municipal de Marília - SP foram analisadas para identificação e quantificação de aflatoxinas B₁ e G₁ no Laboratório Regional de Marília – Instituto Adolfo Lutz, seguindo a Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos¹ nos anos de 1999, 2000 e 2001. A maioria das amostras foram empacotadas ou processadas por indústrias da região.

Amostras representativas foram trituradas e homogeneizadas e uma alíquota de 50 gramas foi utilizada para análise. As aflatoxina B₁ e G₁ foram separadas por cromatografia em camada delgada (CCD), de acordo com o método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya²¹. O método consiste na extração com uma mistura de solução de cloreto de potássio 4% e metanol (m/V), seguido de um procedimento de clarificação com solução de sulfato de cobre 10% e celite e partição com clorofórmio. A quantificação foi através de comparação visual dos padrões quantitativos com as amostras. O limite de detecção deste método é de 2 µg/kg. A confirmação foi através de derivatização com ácido trifluoroacético em CCD¹⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os níveis de aflatoxinas nas 87 amostras analisadas. As concentrações das amostras variaram de 3 a 1659 µg/kg e o 90th percentil foi de 601 µg/kg. Em 31 amostras (que corresponde a 35,6%) não foram detectadas aflatoxinas e a média de contaminação das amostras positivas foi de 306 µg/kg. Em 56 amostras (que corresponde a 64,4%) foram detectadas aflatoxinas sendo que 34 amostras (que corresponde a 39,1%) excederam o limite estabelecido pela Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos¹, que é de 30 µg/kg para a somatória de AFB₁ e AFG₁. Este limite máximo tolerado foi modificado em outubro de 2002, quando o Ministério da Saúde publicou novos limites para aflatoxinas em amendoim e milho, através da Resolução RDC nº 274 de 15/10/2002², que corresponde à somatória das 4 aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), igual a 20 µg/kg.

Caso a legislação em vigor fosse utilizada para avaliar os resultados apresentados por este estudo, mesmo considerando apenas as AFB₁ e AFG₁, as amostras com teores de aflatoxinas acima do limite máximo tolerado, passaria de 34 (39,1%) para 42 amostras (que corresponde a 48,3%). Este novo limite máximo tolerado irá incentivar as empresas a adotarem um maior controle da qualidade da matéria prima e do produto acabado.

Tabela 1. Ocorrência de AFB₁ e AFG₁ em amendoim e produtos de amendoim da região de Marília/SP, Brasil nos anos de 1999, 2000 e 2001.

Ano	Total de amostras	Nº de amostras não detectadas	Nº de amostras positivas	Nº de amostras < 30 µg/kg	Nº de amostras < 30 µg/kg	Média das amostras positivas µg/kg	90 th percentil µg/kg	Intervalo min-max µg/kg
1999	57	16 (28,1%)	41 (71,9%)	14 (24,6%)	27 (47,4%)	317	896	3 –1659
2000	14	03 (21,4%)	11 (78,6%)	4 (28,6%)	7 (50%)	313	766	3 -1151
2001	16	12 (75%)	4 (25%)	4 (25%)	0 (%)	18	21	8 –21
Total	87	31 (35,6%)	56 (64,4%)	22 (25,3%)	34 (39,1%)	217	601	3 -1659

Limite de detecção: 2 µg/kg

Das 87 amostras analisadas, 23 (26,4%) correspondiam a amendoim cru e 64 (73,6%) eram de amendoim processado, sendo que 9 (43,5%) e 25 (39,1%) amostras, respectivamente, apresentaram valores acima do limite estabelecido pela Resolução nº 34/76. O maior nível de contaminação por aflatoxinas (1659µg/kg) foi encontrado no amendoim processado (amendoim japonês).

Em 1999, choveu intensamente durante a safra das águas. Em janeiro deste mesmo ano, o índice pluviométrico foi de 876,1 mm, valor considerado alto, se comparado com a média anual da região (Tabela 2). Provavelmente, esta foi a razão do alto nível de contaminação por aflatoxinas neste período. Prado et al¹⁶ observaram que 40-80% das colheitas podem ser contaminadas com aflatoxinas quando as chuvas são intensas na época de colheita.

Em janeiro de 2000, o índice pluviométrico foi de 187,7 mm e em 2001, foi de 106,5 mm, índice este considerado menor quando comparado com o ano de 1999. Este decréscimo de chuvas provavelmente pode ter contribuído para a redução dos

níveis de contaminação do amendoim por aflatoxinas no ano de 2001, já que não houve alterações significativas nas médias das temperaturas máximas tanto na safra das águas quanto na da seca durante o período em que a pesquisa foi realizada.

Os resultados em nosso estudo (Figura 1), quando comparados com os dados relatados por outros pesquisadores do Brasil, indicam que os teores de aflatoxinas encontrados são muito semelhantes^{3,8,10,17,18}, demonstrando que o problema de aflatoxinas em amendoim continua sendo ainda um risco para o consumidor.

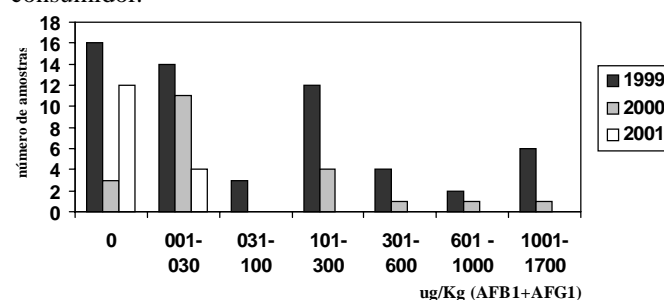


Figura 1. Distribuição de Aflatoxinas B₁ + G₁ em amendoim e produtos de amendoim nos anos de 1999, 2000 e 2001.

Tabela 2. Média da Temperatura Máxima e Pluviosidade

Ano	Média da Temperatura Máxima (°C)		Média da Pluviosidade (mm)	
	Safra das águas (outubro-março)	Safra da seca (abril-setembro)	Safra das águas (outubro-março)	Safra da seca (abril-setembro)
1999	30,7	28,6	317,2	53,9
2000	30,7	27,2	143,6	42,7
2001	31,5	28,3	195,6	60,6

Fonte: Secretaria de Agricultura e Abastecimento ⁽¹¹⁾

Apesar de inicialmente ser considerado um problema que ocorre após a colheita, a contaminação por aflatoxinas pode ocorrer também durante o crescimento da planta no campo¹¹.

Estudos da ecologia do *Aspergillus flavus* e *parasiticus* indicam que a espécie *parasiticus* é melhor adaptado em solos e é encontrado principalmente em amendoins, enquanto que a espécie *flavus* parece ser melhor adaptado para o desenvolvimento ativo das partes aéreas dos vegetais, como flores e folhas⁷.

A distinção bioquímica entre as duas espécies é que o *Aspergillus parasiticus* produz todos os 4 tipos de toxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, enquanto que o *Aspergillus flavus* possivelmente produz apenas a AFB₁ e AFB₂. Segundo Moss¹¹, dados analíticos demonstraram que a maioria dos amendoins contaminados contém aflatoxinas B e G.

A contaminação com aflatoxinas no campo é muito difícil de ser controlada por ser basicamente influenciada por condições climáticas como a umidade relativa e temperatura. A umidade do solo, estresse provocado pela seca, danos dos grãos provocados por insetos e deficiência de minerais também são fatores importantes na contaminação¹².

O Codex Alimentarius⁶ está discutindo um código sobre práticas para redução da contaminação do amendoim com aflatoxinas, considerando as implicações na saúde pública, os efeitos na saúde dos animais e os efeitos na economia nacional e internacional.

A implantação de boas práticas agrícolas pelos produtores de amendoim é importante pois representam o início

da prevenção da contaminação do amendoim com aflatoxinas, seguido de boas práticas de fabricação durante o manuseio, processamento e distribuição.

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas representam um risco à saúde dos consumidores que utilizam estes produtos, e sua presença em níveis elevados pode acarretar graves conseqüências econômicas por não atender a legislação.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que 64,4% dos amendoim e produtos de amendoim estavam contaminados por aflatoxinas, com 39,1% amostras acima da legislação vigente no período. As condições de temperatura e umidade predominante na região de Marília que são favoráveis ao crescimento de fungos toxigênicos possivelmente influenciaram estes resultados. Nos anos em que o índice pluviométrico foi maior, os níveis de contaminação por aflatoxinas também foram maiores, considerando que a temperatura, ideal ao crescimento de fungos produtores de aflatoxinas, não apresentou alterações significativas.

Boas técnicas de colheita, bem como transporte, armazenamento e processamento adequado certamente poderão auxiliar a solucionar o problema, mas ainda não proporcionam uma solução completa¹⁴. Conseqüentemente, medidas eficientes de prevenção poderão sempre ser confirmadas por análises químicas. Desta forma, a avaliação contínua e sistemática é o melhor caminho para prevenir e controlar a infestação dos produtos agrícolas por fungos toxigênicos.

RIALA6/955

Shundo, L. ; Silva R. A. e Sabino M. - Occurrence of Aflatoxins in peanut and peanut products commercialized in the region of Marília - SP, Brazil in the period of 1999-2001. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 177 - 181, 2003.

ABSTRACT. Eighty seven samples of peanuts and peanut products commercialized in the region of Marília/SP, Brazil in the period of 1999 to 2001 were analyzed in order to identify and quantify aflatoxin B₁ and G₁, determined by thin-layer chromatography (TLC), according to the method described by Soares and Rodriguez-Amaya. Aflatoxins were found in 56 (64,4%) of the samples and 34 (39,1%) exceeded the limits of the Brazilian legislation valid in that period which, for aflatoxin B₁+G₁, was 30 µg/kg. The aflatoxins concentration in the samples varied from 3 to 1659 µg/kg and the average of positive samples was 306µg/kg. In 31 (35,6%) samples were not detected aflatoxins and the 90th percentil was 601 µg/kg. Data of temperature and level of the rains in the same period showed that high levels of aflatoxins had agreed with high levels of temperature and rains and probably, it resulted on this contamination. Our studies showed that aflatoxin contamination exists, mainly due to conditions of temperature and humidity prevalent in the region of Marília that are favorable of fungal growth. A good crop management technique and the continuous and systematic monitoring is the best way to prevent and control the infestation of agricultural products with toxigenic moulds.

KEY WORDS. aflatoxins B₁ and G₁, peanut, occurrence, thin layer chromatography.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Leis, Decretos, etc. Resolução n° 34/76 da Comissão de Normas e Padrões para Alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, DF, Sec. I, p 710, 19 de janeiro de 1977. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos.
2. Brasil. Leis, Decretos, etc. Resolução – RDC n° 274 de 15/10/2002 da ANVISA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Sec. I, 16 de outubro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre limites máximos de aflatoxinas no leite, amendoim e milho.
3. Brigido, B.M.; Badolato, M.I.C.; Freitas, V.P.S. Contaminação de amendoim e seus produtos comercializados na região de Campinas – SP por aflatoxinas durante o ano de 1994. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 55(2): 85-90, 1995.
4. Bullerman, L.B.; Schroeder, L.L.; Park, K.Y. Formation and Control of Mycotoxins in Food. **J. Food. Prot.**, 47(8): 637-646, 1984.
5. Chu, F.S. Mycotoxins: food contaminations, mechanism, carcinogenic potencial and preventive measures. **Mutat. Res.**, 259: 291-306, 1991
6. Codex Alimentarius – **Codex Committee on Food Additives and Contaminants** – Discussion Paper on the Development of a Code of Practice for the Reduction of Aflatoxin Contamination in Peanuts – CX/FAC 03/25 – nov/2002.
7. Diener, U.L.; Davis, N.D. 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, 1987.
8. Freitas, V.P.S.; Brigido, B.M. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in peanuts and their products marketed in the region of Campinas, Brazil in 1995 and 1996. **Food Addit. Contam.**, 15(7): 807-811, 1985.
9. IARC. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins., **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Lyon, International Agency for Research on Cancer 1993, 56: 254-395.
10. Martins-Maciel, E.R. et al. Incidence of aflatoxins and *Aspergillus flavus* in peanuts consumed in Maringá city, Brazil. **Arq. Biol. Tecnol.**, 39(4): 807-813, 1996.
11. Moss, M.O. Mycotoxins of *Aspergillus* and other Filamentous Fungi. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.**: 69S-81S, 1989.
12. Moss, M.O. Economic Importance of Mycotoxins – Recent Incidence. **Int. Biodeterior. Biodegradation**, 27:195-204, 1991.
13. OPAS. Organización Panamericana de la Salud. Micotoxinas. Criterios de Salud Ambiental 11, Washington, OPAS, 1983, 131 p.
14. Park, L.; Liang, B. Perspectives on Aflatoxin Control for Human Food and animal feed. **Trends Food Sci. Tech.**, 4: 334-342, 1993.
15. Pittet, A. Natural Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds: A Decade Review. In: Koe, WJ, Samson RA, van Egmond HP, Gilbert J, Sabino M (Ed). **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium**. Wageningen, The Netherlands: 2001, p.153-172.
16. Prado, G. Incidência de Aflatoxina B₁ em Alimentos. **Rev. Farm. Bioquím.**, 5:147-157, 1983.
17. Sabino, M. et al. A Survey of the Occurrence of Aflatoxins in groundnut (peanuts) and groundnut products in São Paulo State/Brazil in 1994. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 58(1): 53-57, 1999.
18. Sabino, M. et al. Occurrence of Aflatoxins in Peanuts and Peanuts Products Consumed in the State of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. **Rev. Microbiol.**, 30: 85-88, 1999.
19. Scott, PM. – Natural Toxins. In: **Association of Official Analytical Chemists** – Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Maryland: 1997, cap 49, p.26-27.
20. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI)** – Regional de Marília. Escritório de Desenvolvimento Rural. Observações termo-pluviométricas, 1998, 1999, 2000 e 2001.
21. Soares, L.V.; Rodriguez-Amaya, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using a multitoxin thin-layer chromatographic method. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 72 (1): 22-26, 1989.

Recebido em 18/02/2003 ; Aprovado em 08/10/2003