

Incidência de aflatoxinas no amendoim (*Arachis hypogaea* L) cru em casca da região da Alta Paulista-SP, durante o período de 2011 a 2012

Incidence of aflatoxins in the raw peanut (*Arachis hypogaea* L) in shell of Alta Paulista-SP region during the period from 2011 to 2012

RIALA6/1603

Kely Braga IMAMURA¹, Jufner Celestino Vaz TONI¹, Maria Angélica Lopes BOCHE², Davi Abdou de SOUZA³, Juliana Audi GIANNONI³

¹Endereço para correspondência: ¹Instituto de Química – UNESP Araraquara, R Melchiades Nery de Castro, 151 - Centro, CEP. 17400-000, Garça, SP. Tel: (16) 98835-5588. E-mail: kely.imamura@hotmail.com

²Faculdades Adamantinenses Integradas, São Paulo, SP, Brasil

³Faculdade de Tecnologia de Marília – FATEC, Marília, SP, Brasil

Recebido: 02.12.2013 - Aceito para publicação: 30.06.2014

RESUMO

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos pelas espécies do gênero *Aspergillus* e a frequente ingestão de alimentos contendo teores de aflatoxinas tem sido correlacionada às neoplasias hepáticas pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC). Foram analisadas 966 amostras de amendoim cru em casca, coletadas no período de fevereiro a maio, correspondente à época de colheita das safras 2010-2011 e 2011-2012. Para detecção de aflatoxinas foram utilizadas as metodologias de coluna de imunoafinidade acoplada à fluorometria (CIA) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seguindo-se os parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Foram detectadas aflatoxinas acima do limite máximo tolerado pela legislação em 12,6 % e 19,5 % das amostras, respectivamente nas safras de 2011 e 2012. Na safra de 2010-2011, a faixa de contaminação foi de 21-52 µg/kg, e na safra de 2011-2012 a faixa de contaminação variou de 28-260 µg/kg, cujo valor é cinco vezes maior quando comparado ao obtido em 2011. Os maiores índices de contaminação foram encontrados nos períodos com menor índice pluviométrico, tanto em 2011 quanto em 2012. Por conseguinte, a realização de rastreamento é necessária durante toda a cadeia produtiva do amendoim, com a finalidade de propiciar alimentos seguros à saúde humana e animal.

Palavras-chave. *Aspergillus spp.*, micotoxinas, aflatoxicoses, saúde.

ABSTRACT

Aflatoxins are the secondary metabolites produced by the species of *Aspergillus* genus, and the frequent intake of aflatoxin-containing foods has been correlated with the occurrence of hepatic neoplasms by the International Agency for Research on Cancer (IARC). This study analyzed 966 samples of raw peanuts in shell, collected in the period from February to May, corresponding to the harvest seasons of 2010-2011 and 2011-2012. For detecting aflatoxins, immunoaffinity column coupled with fluorometry (CIA) and high performance liquid chromatography (HPLC) methodologies were employed, following the parameters established by the *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Aflatoxins were detected in amount above the maximum tolerated by the legislation in 12,6 % and 19,5 % of samples, corresponding to 2011 and 2012 harvests, respectively. In the 2010-2011 season the range of contamination was 21-52 µg/kg, and for 2011-2012 crop the range of contamination varied from 28 to 260 µg/kg, being the value five times higher than those observed in 2011. The highest contamination indices were found in periods with lower rainfall in both 2011 and 2012. Therefore, the peanut tracking is required during the entire production chain of this product in order to provide safe food for human and animal health.

Keywords. *Aspergillus spp.*, mycotoxins, aflatoxicosis, health.

INTRODUÇÃO

Os fungos, principalmente dos gêneros *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp e *Fusarium* spp são abundantes na natureza, contaminando alimentos frescos, secos e alimentos processados, de origem vegetal e animal como o amendoim, milho, trigo, castanha, amêndoas, frutas secas, arroz, leite e a carne, resultando em grandes prejuízos para a agroindústria e riscos tanto à saúde humana como de animais¹. O estudo das micotoxinas iniciou-se na Inglaterra, em 1960, quando mais de 100.000 perus morreram em curto espaço de tempo, após consumirem ração que possuía em sua constituição torta de amendoim contaminada com aflatoxinas².

Entretanto, de acordo com Romero e Gloria³, a maioria dos fungos capaz de produzir micotoxinas está frequentemente envolvida na contaminação de produtos agrícolas. Os alimentos são susceptíveis à invasão de fungos micotoxigênicos durante os estágios de produção, processamento, transporte e armazenamento, sendo que as micotoxinas são estáveis, permanecem no substrato mesmo após a destruição do fungo⁴, além de serem resistentes aos processos de torrefação e pasteurização.

Os principais fatores que influenciam o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas são umidade relativa, temperatura, danos mecânicos, infestações por insetos⁵ e períodos de seca. A presença de aflatoxinas em alimentos tem sido reportada no mundo todo, principalmente em milho, amendoim, cacau e arroz. No Brasil, a maior incidência de contaminação tem sido descrita em milho e amendoim em grãos⁶, alimentos destinados ao consumo humano e animal.

De acordo com Shundo et al⁷, as espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxinas e a consequente contaminação de grãos e alimentos são frequentes em áreas geográficas com clima quente e úmido, desse modo, o Brasil, por ser um país de clima predominantemente tropical, apresenta condições favoráveis ao desenvolvimento destes fungos.

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos pelas espécies do gênero *Aspergillus* spp., principalmente *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e, eventualmente, *Aspergillus nomius*⁸. Esses fungos são contaminantes naturais de produtos agrícolas, pois ocorrem naturalmente em solos e suas micotoxinas podem causar várias doenças no homem e nos animais, constituindo, de acordo com Silva⁹, um fator de risco importante para o carcinoma hepatocelular.

Entre os 18 tipos conhecidos de aflatoxinas, quatro são de interesse médico sanitário e são identificados como aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, devido à coloração da fluorescência (“Blue” ou “Green”) emitida quando expostas à luz ultravioleta de ondas longas³. Apesar de apresentarem quimicamente fórmula molecular bastante semelhante, as aflatoxinas do grupo B possuem anel ciclopentenona B1(C₁₇H₁₂O₆) e B2 (C₁₇H₁₄O₆), enquanto as do grupo G, lactona insaturada G1 (C₁₇H₁₂O₇) e G2 (C₁₇H₁₄O₇). De acordo com Oliveira et al⁶, o metabólito B1 é considerado o mais potente hepatocarcinogênico natural.

Devido à biotransformação das aflatoxinas B1 e B2, no organismo de mamíferos que tenham ingerido alimentos contaminados, em M1 e M2, estudos tem demonstrado a presença desta toxina na carne, no leite de bovinos e humanos e em outros produtos lácteos¹⁰.

Após a ingestão, as aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal por difusão passiva, alcançam a circulação sistêmica e são distribuídas pelo organismo. No fígado, a aflatoxina sofre ativação oxidativa pelo citocromo P450 sendo convertida para metabólitos como aflatoxicol, aflatoxina Q1, aflatoxina P1, aflatoxina M1 e aflatoxi-;8,9-epoxi¹¹. De acordo com Silva⁹, a ligação da AFB₁-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura, inibindo a sua síntese, interferindo na síntese do RNA e na síntese proteica, iniciando assim, lesões hepáticas, mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas, representando um risco à saúde humana e animal.

De acordo com Batina et al¹², a prevenção de contaminação por aflatoxinas é difícil, devido às condições climáticas do Brasil no período da colheita, que não favorecem a secagem dos grãos. 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 contaminados e consequentemente o aumento da contaminação, devido ao aumento do número de micro-organismos toxigênicos. Para tanto, em termos nacionais, a RDC n° 7, de 2011, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, recomenda limites máximos admissíveis de aflatoxinas totais, B1, B2, G1 e G2 em amendoim e seus derivados, de 20,0 µg/kg e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, adota o limite de 50 µg/kg de aflatoxinas totais para alimento destinado ao consumo animal¹³.

A facilidade e frequência com que as micotoxinas contaminam os produtos agrícolas constituem um

problema de saúde pública com grande impacto econômico para a agroindústria, uma vez que o quadro clínico da aflatoxicose está diretamente relacionado ao grau de contaminação do produto, tempo e quantidade de alimento contaminado ingerido além do estado nutricional do indivíduo. O amendoim na sua forma *in natura* ou industrializada são cada vez mais consumidos pela população, portanto, o nível de aflatoxinas deve ser avaliada para verificar a segurança do produto final ao consumidor. Sendo assim, este estudo, avalia a ocorrência de aflatoxinas totais em amendoim cru na região da Alta Paulista-SP, na época da safra, nos anos de 2011 a 2012. A investigação de aflatoxinas na maior região produtora e industrializadora de amendoim do estado de São Paulo poderão contribuir para elucidar que, passados mais de 50 anos da descoberta das aflatoxinas em amendoim brasileiro, o problema ainda persiste.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

A coleta das amostras foi realizada em propriedades agrícolas do estado de São Paulo, na região da Alta Paulista, compreendendo as cidades de Tupã, Bastos, Herculândia, Pompéia, Rancharia, Marília e Queiroz. O período das coletas foi determinado de acordo com a época de colheita da safra, durante o período de fevereiro a maio de 2011 e 2012.

As análises de micotoxinas foram realizadas no Laboratório de Micotoxinas localizado na cidade de Tupã-SP e no Laboratório de Cromatografia localizado na cidade de Marília-SP. Foram analisadas 489 amostras de amendoim cru em casca, no período de colheita da safra de 2010-2011 e 477 amostras de amendoim cru em casca no período de colheita da safra de 2011-2012, todos da marca *Runner*, totalizando 966 amostras para detecção de aflatoxinas totais, de acordo com a Resolução nº 7 de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária¹³.

Parte experimental

Para as análises de aflatoxinas totais foram utilizados: colunas de imunoafinidade AflaTest-P, VICAM; padrão de calibração VICAM; cubetas de vidro, VICAM; filtro de microfibra com 11 cm de diâmetro, VICAM; funis de haste curta com 7 e 11 cm de diâmetro PYREX; erlenmeyer de 250 mL, LABOR; papel de filtro qualitativo pregueado com 24 cm de diâmetro, VICAM; papel de filtro plissado, LABOR; seringas de vidro de 10

mL, PYREX; suporte de acrílico para seringas, VICAM; metanol grau HPLC; cloreto de sódio p.a. e metanol p.a., SYNTH; solução reveladora AflaTest® P, VICAM e água destilada.

Métodos

Amostragem e preparo das amostras

Assim que os lotes de amendoim foram colhidos no campo, foram direcionados para secadores de amendoim e, em períodos constantes durante as treze horas de secagem, amostras foram coletadas dos secadores e analisadas quanto ao parâmetro umidade. Após o término da secagem dos grãos, 25 kg de amendoim foram retirados dos secadores e amostras representativas de 7 kg foram descascadas, trituradas e homogeneizadas. Para a análise de aflatoxinas, utilizou-se a metodologia com coluna de imunoafinidade (CIA) e leitura em fluorímetro, uma alíquota de 25 g de amendoim triturado foi utilizada.

Extração de Aflotoxinas

A extração procedeu-se conforme recomendação do manual da CIA comercial (Aflatest-P). Adicionou-se às amostras de amendoim 5g de NaCl e 100 mL de solução de metanol:água (80:20, v/v) e agitou-se esta mistura por 1 minuto (175 rpm). O extrato foi filtrado em papel plissado (filtro qualitativo nº 1) e coletado em erlenmeyer.

Purificação e quantificação

Ao extrato bruto (10 mL) foi adicionado 40 mL de água destilada (diluição 1:4), filtrado em filtro de microfibra e 10 mL do extrato diluído foram submetidos à limpeza pela CIA Aflatest-P a um fluxo contínuo de 1-2 gotas por segundo. Em seguida, a coluna foi lavada com 10 mL de água destilada sob o mesmo fluxo (1-2 gotas/seg). A coluna (CIA Aflatest-P) compõe-se de um suporte de fase sólida, que contém anticorpos específicos para a aflatoxinas totais. Assim, a aflatoxina presente no extrato irá ligar-se aos anticorpos da coluna. Em seguida a coluna com a aflatoxina retida é eluída com 1,0 mL de metanol grau HPLC (1-2 gotas/seg) para um tubo de vidro. Uma alíquota de 100 µL de amostra foi adicionada de 100 µL de revelador (solução aquosa de bromo 0,003 %, v/v) e então o conteúdo de aflatoxinas totais foi quantificado por fluorimetria a 360 nm de excitação e 420 nm de emissão, após 60 segundos¹⁴.

A coluna de imunoafinidade Aflatest, acoplada à fluorimetria tem sido adotada como método oficial de primeira escolha (*Official First Action Method*) pela AOAC para determinação de aflatoxina total (≥ 10 ng/g) em milho, amendoim cru e pasta de amendoim¹⁵.

Validação dos resultados pelo método CLAE

Todas as amostras analisadas pelo método de CIA foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que se constitui em um dos métodos oficialmente aceitos e validados para determinação de micotoxinas em alimentos, assim como a Cromatografia em Camada Delgada (CCD)¹⁶. A validação intralaboratorial da metodologia CIA, tem demonstrado precisão de parâmetros comparável ao fornecido pelo método de CLAE.

Para a análise de aflatoxinas por CLAE, uma alíquota de 50 g de amendoim triturado foi utilizada. Extraíu-se a toxina utilizando-se metanol p.a e solução de cloreto de potássio a 4 %. A purificação do extrato foi realizada empregando-se solução de sulfato de amônio a 30 % e Celite, seguida por duas partições com clorofórmio, e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência¹⁷.

Descontaminação do material utilizado para análise de aflatoxina

Todo o resíduo de aflatoxinas resultante da pós-análise (amendoim triturado e amostra filtrada) foi descontaminado com hidróxido de sódio a 20 % e neutralizado com ácido cítrico a 50 %, antes de ser descartado.

Dados de validação das metodologias utilizadas

A análise de aflatoxinas totais para o método de CIA obteve limite de detecção de 0,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, limite de quantificação de 0,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e recuperação de 86,5 %, com níveis de concentração de AFs (B1, B2, G1 e G2) de 6,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O coeficiente de variação foi de 5 % e a curva de calibração apresentou coeficiente de linearidade de 0,9997.

Para o método CLAE, o limite de detecção para aflatoxinas totais foi de 0,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, limite de quantificação de 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e faixa de recuperação de 97,05 %, com níveis de concentração de AFs de 4,90 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O coeficiente de variação encontrado foi de 5 % e a linearidade de 0,9998.

Dados climáticos

As informações climáticas referentes à temperatura média, precipitação pluviométrica e umidade relativa do período estudado foram fornecidas pelo Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas¹⁸.

Análise estatística

Os dados amostrais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey e Kramer através do programa GRAPHPAD INSTAT (Rutgers University, Camden, New Jersey). Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por CIA e por CLAE foram comparados e não houve diferença de resultados em nenhuma amostra analisada, independente do método utilizado (Tukey, $p > 0,05$). As aflatoxinas apresentam-se fluorescentes sob luz ultravioleta de ondas longas, o que permite sua quantificação em concentrações reduzidas e fornece a fundamentação para quase todos os métodos de detecção e quantificação¹⁹. Assim, os dados são relativos às análises por CIA.

A coluna de imunoafinidade CIA, preparada com anticorpos anti-micotoxinas, destaca-se por proporcionar alta especificidade e recuperação, melhorando os limites de detecção¹⁹. Os valores de LQ obtidos não interferiram no resultado analítico, ambas as amostras apresentaram os mesmos valores de aflatoxinas totais. Assim, os dados são referentes às análises por CIA.

A técnica de cromatografia por afinidade pode ser considerada como inovação na área de metodologia analítica por utilizar componente biológico (anticorpos) como reagente principal da análise¹⁹. A aplicabilidade de análises utilizando colunas de afinidade vem sendo muito utilizada na análise de micotoxinas²⁰.

A Tabela 1 apresenta os níveis de aflatoxinas encontrados no período de 2011 a 2012, época da colheita da safra de 2010-2011 e 2011-2012, respectivamente. Neste período foram analisadas um total de 966 amostras de amendoim cru em casca da marca *Runner* e detectou-se aflatoxinas em 169 amostras.

Estes resultados demonstram que não houve diferença significativa entre as amostras analisadas, nos períodos de colheita em 2011 e 2012 (Tukey, $p > 0,05$), obtendo-se valores de 17,8 % e 17,2 % de amostras

positivas para aflatoxina, respectivamente.

Sabino et al²¹, pesquisaram aflatoxinas no estado de São Paulo. Em 137 amostras de amendoim e produtos de amendoim analisados, 45,3 % das amostras encontraram-se positivas para aflatoxinas e 27 % deste total apresentaram valores acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira¹³.

Caldas et al²⁰, ao realizarem um estudo sobre a presença de aflatoxinas em amendoim, derivados de amendoim, milho em grão e castanhas comercializados no Distrito Federal, no período entre 1998 e 2001, relataram a ocorrência de aflatoxinas em todas as classes de alimentos estudadas. Neste período, dentre as 366 amostras, 19,6 % foram positivas para aflatoxinas. Entretanto houve uma maior incidência de contaminação em amostras de amendoim e produtos derivados de amendoim, compreendendo 34,7 % das amostras contaminadas, o amendoim obteve também as maiores concentrações detectadas, 1.706 µg/kg de aflatoxinas totais.

Na safra de 2010-2011, a faixa de contaminação foi de 21-52 µg/kg, sendo o maior valor obtido de 52 µg/kg e na safra de 2011-2012 a faixa de contaminação variou de 28-260 µg/kg, sendo o maior valor obtido de 260 µg/kg, valor este, cinco vezes maior quando comparado ao obtido em 2011. A maior concentração de aflatoxina do amendoim (260 µg/kg), na safra de 2012

pode ter sofrido influência pelo clima seco no mês de março deste ano, quando comparado aos altos índices pluviométricos do ano de 2011.

É possível fazer uma correlação entre o clima seco e a maior concentração de aflatoxina encontrada nos grãos, pois quando há situações de estresse para o micro-organismo, provocado pela queda na temperatura, umidade ou redução de nutrientes, os fungos realizam o metabolismo secundário para economizar energia, e assim a produção de toxina é priorizada como forma de defesa. Estas toxinas são liberadas quando as células microbianas não encontram mais condições de sobrevivência²².

Nos últimos anos, a detecção de toxinas em alimentos, especialmente aflatoxinas, vem apresentando frequências relativamente altas, entretanto, ainda não existem estimativas sobre o grau de exposição da população brasileira pela ingestão de alimentos contaminados. De acordo com análises realizadas por Caldas et al²⁰, no período de julho de 1998 a dezembro de 2001, os produtos derivados de amendoim comercializados no Distrito Federal, apresentaram os maiores índices e os mais altos níveis de contaminação por aflatoxinas. Já em 2004, Zlotowski et al²³, relataram um surto de aflatoxicose aguda em suínos ocorrido

Tabela 1. Ocorrência de aflatoxinas totais (B1, B2, G1 e G2) e a média da umidade dos grãos de amendoim em 2011 e 2012

Período	Amostras Positivas				Amostras ND			
	Nº total de amostras	> Valor Obtido (ug/kg)	Nº de amostras ≥ 20 ug/kg	Umidade (%)	Nº de amostras < 20 ug/kg	Umidade (%)	Nº de amostras ND	Umidade (%)
2010-2011	87	52	11	8,8	76	9,6	402	9,13
489	(17,8%)		(12,6%)		(87,4%)		(82,21%)	
2011-2012	82	260	16	9,11	66	9,6	395	8,00
477	(17,2%)		(19,5%)		(80,5%)		(82,8%)	

Fonte: Dados dos autores, 2013

*O limite de detecção para este método é de 0,10 µg/kg; Limite de quantificação é de 0,55 µg/kg; Recuperação de 86,5 %; Coeficiente de variação é de 5%; Coeficiente de Linearidade é de 0,9997. Os resultados encontrados abaixo deste valor foram interpretados como "Não Detectado" (ND)

*Limite máximo aceitável (LMT) pela legislação brasileira 20 µg/kg (Brasil, 2011)

no estado do Rio Grande do Sul, a partir de análises realizadas detectou-se que a alimentação fornecida aos animais continha altas concentrações de aflatoxinas.

Estima-se que aproximadamente 35 % dos casos de câncer humano estejam diretamente relacionados ao consumo de alimentos, em média 10 % destes casos estão relacionados com a ingestão de toxinas²⁴. Assim, entende-se que a presença de aflatoxinas em alimentos é considerada um fator de risco, relacionados à indução de neoplasia hepática, principalmente em países tropicais²⁵.

De acordo com o *International Agency for Research on Cancer* (IARC)²⁶, a neoplasia hepática tem sido correlacionada à ingestão de alimentos contendo níveis altos de aflatoxinas por períodos frequentes. Segundo dados apresentados por Wogan²⁷, o efeito da toxicidade crônica das aflatoxinas pode ocorrer em diferentes espécies, incluindo peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas. Embora o fígado seja o alvo primário, o desenvolvimento de tumores em outros órgãos, como pâncreas e intestino, tem sido observado em animais alimentados com rações contendo aflatoxinas.

Dentre as 489 amostras de amendoim analisadas, na safra de 2010-2011, quantidades superiores ao limite estabelecido pela legislação (20 µg/kg) foram detectadas em 11 (12,6 %) amostras e, na safra de 2011-2012, estes valores foram maiores, obteve-se 16 (19,5 %) amostras acima do valor aceitável pela legislação¹³. A média da umidade obtida entre a safra de 2011 e 2012 foi de 8,8 % e 9,11 %, respectivamente, não apresentando diferença significativa (Tukey, $p > 0,05$), como mostra a Tabela 1.

Resultados semelhantes foram obtidos por Shundo e Silva²⁸, ao investigarem a presença de aflatoxinas em produtos de amendoim e seus derivados na cidade de Marília-SP. Um total de 57 amostras foram coletadas de março a outubro de 1999, os resultados apresentados indicaram que 71,9 % das amostras estavam contaminadas e 47,9 % excederam as concentrações estabelecidas pela legislação brasileira¹³. Mallmann et al²⁹, ao estudarem o nível de contaminação por aflatoxinas em produtos à base de amendoim no estado do Rio Grande do Sul, revelaram que das 664 amostras avaliadas, no período de março de 2000 a abril de 2002, foram positivas para aflatoxinas 208 amostras, e deste total, 98 apresentaram níveis de contaminação superiores a 20 µg/kg.

O número de amostras que apresentaram níveis detectáveis de aflatoxinas em concentrações inferiores a 20 µg/kg, foi maior na safra de 2011 (87,4%) quando comparada à safra de 2012 (80,5 %). Estes resultados

demonstram que houve detecção de toxina nos grãos, mesmo que em quantidades pequenas como 2 µg/kg, evidenciando que em condições favoráveis, as espécies de *Aspergillus* podem produzir aflatoxinas em produtos agropecuários.

A presença de aflatoxinas em concentrações inferiores a 20 µg/kg não caracteriza toxicidade, mas a frequente e prolongada ingestão de alimentos com baixas concentrações de aflatoxinas, pode induzir à produção de células cancerígenas³⁰. Não houve diferença entre os valores de umidade da amostra, conforme indica a Tabela 1.

De acordo com Kawashima³¹, o alimento mais citado como contaminado por aflatoxinas e com maiores concentrações é o amendoim e seus produtos. Os níveis de aflatoxinas detectadas estão diretamente relacionados com as condições climáticas. A umidade do solo favorece o desenvolvimento do fungo; assim como os períodos de seca podem favorecer o estresse metabólico do *Aspergillus* ssp e a produção de toxina pelo seu metabolismo secundário, os danos aos grãos provocados por insetos facilitam a entrada dos fungos à planta³², sendo assim é provável que o crescimento fúngico e a contaminação por aflatoxinas sejam consequência da interação entre fungos, hospedeiro e ambiente⁸.

Shundo et al³³ ao analisarem 87 amostras de amendoim e produtos de amendoim na região de Marília-SP no período de 1999 a 2001, detectaram aflatoxinas em 64,4 % das amostras e 39,1 % excederam os limites da legislação em vigor de 20 µg/kg¹³.

Na safra de 2010-2011, não foram detectadas amostras positivas para aflatoxinas em 82,2 % das amostras analisadas e na safra de 2011-2012 não houve detecção de contaminação em 82,8 % das amostras, de acordo com dados apresentados na tabela 1 (Tukey, $p > 0,05$). Os resultados encontrados no presente estudo assemelham-se aos encontrados por Gloria et al³⁴ ao analisarem produtos derivados de amendoim comercializados na cidade de Piracicaba-SP, não constatando contaminação em 75 % das 297 amostras analisadas.

O fungo filamentososo da espécie *Aspergillus* está distribuído em toda cadeia produtiva do amendoim. Seu habitat natural é o solo, local onde os grãos de amendoim são plantados, sendo assim, a presença de fungos produtores de aflatoxinas nos grãos é difícil de ser controlada³⁵. Então é necessária a detecção de amostras positivas para aflatoxinas antes que o amendoim seja destinado à alimentação humana e animal para que haja

diminuição dos riscos à saúde da população.

De acordo com a patogenicidade das toxinas em humanos e animais, pesquisadores vêm tentando estudar novos métodos para diminuir os níveis de aflatoxinas nos grãos. Baseado no princípio de adsorção da toxina pela parede celular de leveduras e outros fungos filamentosos, Paster et al³⁶, utilizaram micro-organismos não patogênicos e não produtores de toxinas, para testar a capacidade de adsorção destes organismos. Então, conduziram um estudo com diferentes espécies de micro-organismos, competindo com fungos produtores de toxinas em silos herméticos. Verificaram que as leveduras conseguiram competir com a microbiota existente quando inoculadas três dias antes dos fungos toxigênicos, houve também redução na produção de aflatoxinas e inibição do crescimento de *Aspergillus flavus*.

Estão demonstrados na Tabela 2, o número total de amostras positivas para aflatoxina de acordo com os meses de colheita na safra 2010-2011 e 2011-2012.

No ano de 2011, os índices pluviométricos nos meses de março a abril que correspondem ao maior período de colheita da safra, indicou chuva intensa principalmente no mês de março com um decréscimo do índice no mês de abril (Tabela 3). Já no ano de 2012, ocorreu o inverso, no mês de março quase não choveu e no mês de abril os índices pluviométricos foram

elevadíssimos. De acordo com a Tabela 2, percebe-se que os maiores índices de contaminação por aflatoxina estão indicados no mês de abril de 2011 (66 amostras positivas para aflatoxina) e no mês de março de 2012 (46 amostras positivas para aflatoxina). Assim é possível verificar que houve maior contaminação (Tabela 2) nos períodos com menor índice pluviométrico, conforme o indicado na Tabela 3.

Estes resultados estão diretamente relacionados com o fato de que os altos níveis pluviométricos e temperatura favorável aumentam a probabilidade do desenvolvimento do fungo *Aspergillus* aumentando a possibilidade de contaminação dos grãos no solo. Entretanto é no período de baixa umidade, ocasionada pelos menores índices pluviométricos em que há liberação da toxina pelo fungo e conseqüentemente a contaminação dos grãos³⁷.

Prado et al⁴, observaram que 40-80 % das colheitas podem ser contaminadas com aflatoxinas quando as chuvas são intensas na época de colheita. Em 2000, Orsi et al³⁸ consideraram a umidade como fator determinante na produção de fumonisina em grãos de milho por fungos do gênero *Fusarium* spp., resultados estes, que diferem dos apresentados no presente estudo, por não encontrar maior contaminação por toxinas em períodos chuvosos.

Tabela 2. Número total de amostras positivas, segundo o mês de análise em 2011 e 2012 quanto aos parâmetros de contaminação por aflatoxinas totais dos grãos de amendoim

Mês	2010-2011		2011-2012	
	Nº total de amostras	Nº de amostras	Nº total de amostras	Nº de amostras
	Positivas	> 20 µg/kg	Positivas	> 20µg/kg
Fev.	01	-	01	-
Mar.	20	03	46	09
Abr.	66	08	31	05
Mai	-	-	02	02

Fonte: Dados dos autores, 2013

*O limite de detecção para este método é de 0,10 µg/kg; Limite de quantificação é de 0,55 µg/kg; Recuperação de 86,5%; Coeficiente de variação é de 5%; Coeficiente de Linearidade é de 0,9997. Os resultados encontrados abaixo deste valor foram interpretados como "Não Detectado" (ND)

*Limite máximo aceitável (LMT) pela legislação brasileira 20 µg/kg (Brasil, 2011)

Fonseca et al³⁹, relataram o resultado da análise de aflatoxinas em 1.115 amostras de amendoim in natura proveniente de diversas regiões do estado de São Paulo, demonstrando que há uma alteração na qualidade do amendoim, devido às variações climáticas entre os anos, considerando os períodos de seca na época da colheita dos grãos.

O fator umidade está diretamente relacionado com o índice pluviométrico e temperatura na época da safra, assim como as práticas pós-colheita dos grãos de

a produção de toxinas como forma de defesa. Desse modo, há necessidade que o controle de aflatoxinas em produtos agropecuários ocorra tanto em épocas com altos índices pluviométricos quanto em épocas com baixos índices pluviométricos, e durante toda a cadeia produtiva do amendoim, com o intuito de diminuir os níveis de contaminação encontrados nos grãos de amendoim principalmente no estado de São Paulo, reduzindo a exposição da população a estas toxinas.

Em relação à comparação dos resultados

Tabela 3. Parâmetros de temperatura média e índice pluviométrico de 2011 e 2012, na região Alta Paulista-SP

Período Colheita	Temperatura (°C)				Índice pluviométrico (mm)			
	Fev.	Mar.	Abr.	Mai	Fev.	Mar.	Abr.	Mai
2011	28	29	27	27	153,1	208,6	125,0	20,8
2012	29	28	26	26	184,6	64,2	143,7	36,7

Fonte: Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas¹⁸

amendoim, incluindo local, tempo, secagem dos grãos e condições de armazenamento. Sendo assim, a secagem dos grãos antes que eles caiam nesta faixa de umidade é imprescindível para que se diminuam os níveis de contaminação.

No Brasil, apesar da legislação em vigor, a ocorrência de aflatoxinas tem sido observada com frequência, e em altos níveis, principalmente no estado de São Paulo, em alimentos utilizados para consumo humano e animal, tais como, milho, amendoim e derivados⁴⁰.

CONCLUSÃO

A contaminação de amendoim e derivados por toxinas apresenta grande relevância em saúde pública, pois as aflatoxinas podem ser responsáveis pela indução de patologias, como a neoplasia, mutagênese, e imunossupressão em humanos e animais.

No Brasil as condições climáticas na época da colheita favorecem tanto o desenvolvimento de fungos toxigênicos quanto a produção de aflatoxinas por estes fungos. Assim, é possível fazer uma correlação entre o clima seco e a maior concentração de aflatoxinas encontrada nos grãos de amendoim, neste estudo ($p < 0,001$). O clima seco favorece o metabolismo secundário de fungos do gênero *Aspergillus*, priorizando

obtidos por CIA e por CLAE, não houve diferença de resultados em nenhuma amostra analisada, independente do método utilizado. A metodologia CIA, vem sendo amplamente difundida em análises de micotoxinas como aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisina em amostras de amendoim, milho, café, arroz, aveia e entre outras.

REFERÊNCIAS

1. Lopes STA, Franciscato C. Avaliação dos minerais séricos e da função hepática de frangos de corte experimentalmente intoxicados com aflatoxina e submetidos a diferentes concentrações de montmorilonita sódica na dieta [dissertação de mestrado] - Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2006.
2. Almeida AVAF, Botura MB, Abreu RD, Bittencourt TCC, Batatinha MJM. Ocorrência de Aflatoxinas em milho destinado à alimentação de aves no Estado da Bahia. *Arq Inst Biol*.2009;76(3):353-8.
3. Romero ACE, Gloria EM. Mensuração de biomarcador de exposição às aflatoxinas em fluidos biológicos [dissertação de mestrado]. Piracicaba (SP): Universidade de São Paulo; 2007.
4. Prado G, Oliveira MS, Gazzinelli-Madeira JEC, Godoy JI, Corrêa B, Junqueira RG et al. Resistência de quatro genótipos de amendoim à produção de aflatoxina B₁ após inoculação com *Aspergillus flavus*. *Ciênc Tecnol Aliment*.1999;19(1):84-7.

5. Prado G, Carvalho EP, Oliveira MS, Gazzinelli JECM, Moraes VD, Corrêa RF et al. Influência da irradiação gama (60°C) na destruição da aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Rev Inst Adolfo Lutz*.2005;64(2):186-92.
6. Oliveira CAF, Gonçalves NB, Rosim E, Fernandes AM. Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. *Int J Mol Sci*.2009;10:174-83.
7. Shundo L, Navas AS, Ruvieri V, Alaburda J, Lamardo LCA, Sabino M. Aflatoxinas em amendoim: melhoria da qualidade e programas de controle. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2010;69(4):567-70.
8. Ferreira H, Pittner E, Sanches HF, Monteiro MC. Aflatoxinas: Um risco a saúde humana e animal. *Ambiência*. 2006;2(1):113-27.
9. Silva RA. Avaliação do quadro de estresse metabólico em ratos Wistar expostos à aflatoxina B₁. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2007;6(3):311.
10. Martins JLS, Martins IS. Aflatoxina M₁ no leite tipo “B” comercializado no Município de São Paulo, SP (Brasil). *Rev Saúde Pública*.1986;20:303-8.
11. Rosmaninho JF, Oliveira CAF, Bittencourt ABF. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. *Arq Inst Biol*.2001;68(2):107-14.
12. Batina PN, Lopes STA, Santurio JM, Souza C, Martins DB. Efeitos da adição de montmorilonita sódica na dieta sobre o perfil bioquímico de frangos de corte intoxicados com aflatoxina. *Ciênc Rural*.2005;35(4):826-31.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução – RDC n° 7 de 18 de fevereiro de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aprova o Regulamento Técnico sobre limites máximos de aflatoxinas, amendoim e seus derivados, especiarias, castanha-do-Brasil e milho. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF*, 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em 15 de fevereiro de 2011.
14. Akiyama H, Goda Y, Tanaka T, Toyoda M. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in spices using multifunctional column clean-up. *J Chromatogr A*.2001;932(1):153-7.
15. Bradburn N, Coker RD. A comparative study of solvent extraction efficiency and the performance of immunoaffinity and solid phase columns on the determination of aflatoxin B₁. *Food Chem*.1995;52(1):179-85.
16. Kolosova AY, Shim W, Yang Z, Eremin SA, Chung D. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B₁. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. *Anal Bioanal Chem*.2006;384(1):286-94.
17. Calori-Domingues MA, Rechdan RC, Moretti A, Gloria EM, Zambel IV. Avaliação de procedimentos de preparo de amostra de amendoim in natura para análise de aflatoxinas. *Quim Nova*.2010;33(7):1490-5.
18. Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO). [acesso em 28 de setembro de 2013] Disponível em: [http:// www. ciagro.sp.gov.br].
19. Jurado LA, Jarret HW. In flow activation of diol-silica with cyanogen bromide and triethylamine for preparing high-performance affinity chromatographic columns. *J Chromatogr A*.2003;984(1):9-17.
20. Caldas ED, Silva SC, Oliveira NO. Aflatoxinas e ocratoxinas A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Rev Saúde Pública*.2002;36(3):319-23.
21. Sabino M, Milanez TV, Lamardo LCA. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos contendo amendoim consumidos no Estado de São Paulo/Brasil no período 1995-1997. *Rev Microbiol*.1999;1:85-8.
22. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev*.2002;66(3):447-59.
23. Zlotowski P, Corrêa AMR, Rozza DB, Driemeier D, Mallmann CA, Migliavacca FA. Surto de aflatoxicose em suínos no estado do Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras*.2004;24(4):207-10.
24. World Health Organization - WHO. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva: WHO, 2006.
25. Lopes PRS, Neto JR, Mallmann CA, Lazzari R, Pedron FA, Veiverberg CA. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. *Pesq Agropec Bras*.2005;40(10):1029-34.
26. International Agency for Research on Cancer - 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.
27. Wogan GN. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. *Prog Clin Biol Res*.1992;374(1):123-37.
28. Shundo L, Silva RA. Occurrence of aflatoxins in peanut and peanut products in the region of Marília (SP) Brazil. *In: Official Program and Abstract Book of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin*; 2000; São Paulo. p.133.
29. Mallmann CA, Kowalski CH, Almeida CA, Mürmann L, Silveira VG. Prevalência de aflatoxinas em amendoim e seus derivados destinados ao consumo humano no Estado do Rio Grande do Sul. *In: Anais 2º Simpósio em Ciência de Alimentos*, 2003.
30. Schneider EM, Mostardeiro CP. Aflatoxinas em amendoim e toxicidade no organismo humano. *Rev Contexto Saúde*.2007;7(13):47-52.
31. Kawashima LM. Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP; 2004.
32. Moss MO. Economic Importance of Mycotoxins-Recent Incidence. *Int Biodeterior Biodegr*.1991;27(1):195-204.
33. Shundo L, Silva RA, 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*.2003;62(3):177-81.
34. Gloria EM, Romero AC, Carvalho APP, Calori-Domingues MA, Gonçalves PVM. Perfil da contaminação com aflatoxinas entre embalagens de produtos de amendoim. *Ciênc Tecnol Aliment*.2006;26(2):660-5.
35. Queiroz MSR, Narain N, Freire RMM, Farias SR, Santos RC. Determinação de aflatoxinas em sementes de amendoim armazenadas em condições ambiente e em câmara fria. *Rev Bras OL Fibras*. 2006;10(1/2):1009-15.
36. Paster N, Droby S, Chalutz E, Menasherov M, Nitzan R, Wilson CL. Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans. *Mycol Res*.1993;97(1):1201-6.

37. Eizendeher LB, Freitas RJS, Caçado RA. Incidência de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em doces de amendoim e amendoim in natura comercializados no Estado do Paraná. *Hig Alim*.2005;19(129):101-4.
38. Orsi RB, Correa B, Possi CR, Schammas EA, Nogueira JR, Dias SMC, et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *J Stor Prod Res*.2000;36(1):75-87.
39. Fonseca H, Calori-Domingues MA, Gloria EM, Zambello IV, Segatti-Piedade F. Ocorrência de amendoim contaminado no Estado de São Paulo nos anos de 1990 a 1996. *In: Encontro Nacional de Micotoxinas*; Setembro de 1998; Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina.
40. Silva RA, Chalfoun SM, Silva MAM, Pereira MC. Inquérito sobre o consumo de alimentos possíveis de contaminação por micotoxinas na ingesta alimentar de escolares da cidade de Lavras, MG. *Ciênc Agrotec*.2007;31(2):439-47.