

Deteção presuntiva de aflatoxinas em amendoins comercializados na cidade do Recife-PE

Presumptive detection of aflatoxins in peanuts marketed in Recife-PE

HOLANDA, Ewelynn Guedes Menezes¹BRAGA, Carolinne Melo Salgado Ribeiro¹; Barbosa, Manuela Bernardo Câmara²;GOMES, Elisangela Christianne Barbosa da Silva².

¹Graduanda do curso de Farmácia da Faculdade Pernambucana de Saúde - FPS

²Coordenadora de tutor do curso de Farmácia da Faculdade Pernambucana de Saúde - FPS

RESUMO: As micotoxinas são contaminantes naturais de difícil controle em alimentos. Estima-se que cerca de 25% de todos os produtos agrícolas do mundo estejam contaminados por tais substâncias. A aflatoxina é a micotoxina mais conhecida por seus efeitos tóxicos no homem e em animais. Com base nos riscos aos quais a população está exposta, realizamos um estudo presuntivo para a identificação da presença de aflatoxinas em amendoins industrializados adquiridos em supermercado, e torrados coletados na Praia de Boa Viagem na cidade do Recife-PE. Aplicando-se a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), foram usadas 6 amostras onde todas apresentaram resultado positivo para a presença de aflatoxinas. Verificou-se contaminação por aflatoxina B, tanto nas amostras de amendoim industrializado, quanto nas amostras artesanais. Em relação ao subtipo G apenas foi observado em uma das amostras do amendoim torrado, em pequena evidência. Sabido ser praticamente impossível a eliminação total das aflatoxinas nos alimentos, há que tomar as precauções adequadas, procurando reduzir ao máximo os níveis de aflatoxina nos alimentos humanos e dos animais. Além da fiscalização do governo, a indústria alimentar e o público devem também colaborar para garantir uma melhor segurança alimentar.

Palavras-chave: Aflatoxinas, *Aspergillusflavus*, Cromatografia em camada delgada

INTRODUÇÃO

Fungos são encontrados em diferentes ambientes e desempenham papel importante na deterioração de alimentos. A partir da década de 1960, a

contaminação fúngica de grãos passou a ser considerado um problema ainda mais relevante, tendo em vista a verificação de que algumas espécies de fungos eram capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos, as micotoxinas (Einloft et al. 2009).

A história das micotoxinas surgiu em 1960, com um surto inexplicável de morte de aves (em particular perus) no Reino Unido. A causa do surto foi investigada e chegou-se a conclusão que o problema era na ração, produzida com amendoim, provenientes da África e Brasil. Este amendoim estava contaminado com uma substância tóxica fluorescente produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*. Da expressão *A.flavustoxin* derivou a palavra AFLATOXINA (FoodIngredients Brasil, 2009).

As aflatoxinas são metabólitos tóxicos produzidos principalmente pelo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (IARC,1993), dentre os quais os mais importantes são as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Elas foram assim classificadas por apresentarem fluorescência azul (*Blue*) e verde (*Green*) quando observadas a luz ultravioleta de 365nm. Sabe-se que a aflatoxina (AFB1) é o agente natural mais carcinogênico que se conhece (FoodIngredients Brasil, 2009), seguida das G1, B2 e G2 (Coulombe, 1991). Existem duas outras substâncias denominadas M1 e M2 detectadas no leite, urina e fezes de mamíferos, resultantes do metabolismo das B1 e B2 (Franco, 1996).

A aflatoxina já foi identificada no milho e seus derivados, amendoins e seus derivados, sementes de algodão, leite e nozes (Food Ingredients Brasil, 2009). Considerado um alimento altamente energético, o amendoim é consumido em sua forma natural e em diferentes produtos por grande parte da população brasileira (Hoeltz,2009). Nesta semente, o crescimento de fungos e a produção de aflatoxinas ocorrem em grande parte, durante o armazenamento, após a colheita (Food Ingredients Brasil, 2009).

Os principais riscos que o consumo gradativo deste alimento contaminado pode trazer a população é o câncer hepático, lesão renal e depressão do sistema imune (Food Ingredients Brasil, 2009). As aflatoxinas foram classificadas como carcinogênicas para humanos (grupo 1) pela *International Agency for ResearchonCancer* (IARC) (IARC,1993). Partindo desse princípio o mecanismo de carcinogênese se desenvolve a partir da ingestão do alimento contaminado, onde as aflatoxina são absorvidas no trato

gastrointestinal e biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microsossomais do sistema de funções oxidases mistas.

A forma ativada da AFB1 é o composto identificado como AFB1-epóxido. Este composto é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas (Biehl & Buck, 1987).

Estas ligações determinam a formação de adutos, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas. A ligação da AFB1-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB1 (Wogan, 1992). Além de induzir o câncer hepático, pode ocasionar cirrose hepática e surto de hepatite viral tipo B pelo fato do fígado ser um órgão alvo para essas micotoxinas (Mallmann et al,2003).

As técnicas rotineiramente usadas para determinação de micotoxinas em alimentos são principalmente Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Enzima Imunoensaio (ELISA). Todavia, qualquer que seja a técnica de escolha, esta deve ser reprodutível e apresentar baixo limite de detecção, uma vez que os limites máximos permitidos para tais compostos são baixos (Gilbert, 2002; Amaral et.al, 2006).

Em 2002, a legislação brasileira aprovou o regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e milho, de acordo com as normas do MERCOSUL/GMC/RES. N° 25/02. Esta resolução estabelece o limite máximo admissível de $20,0\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxinas (B1+B2+G1+G2) para milho em grão, farinhas ou sêmolos de milho, amendoim em casca e descascado, cru ou tostado, pastas e manteiga de amendoim (Brasil,2002). Este valor serve como guia no controle de qualidade dos alimentos, mas não deixa a população isenta do risco de contaminação. Em outros alimentos para consumo humano o limite máximo para aflatoxinas totais é de $30\mu\text{g kg}^{-1}$ regulamentado pela Resolução N°34/76 do Ministério da Saúde (Brasil,1977).

No Brasil, apesar da legislação em vigor, a ocorrência de aflatoxinas tem sido observada com frequência, e em altos níveis nos alimentos utilizados para consumo humano e animal, como, milho, amendoim e derivados (Sabino et al. 1989).

Visto que as aflatoxinas são altamente tóxicas e que, os produtos alimentícios, como amendoim e derivados, constituem matéria-prima (substrato) ideal para o crescimento de fungos e conseqüentemente produção das micotoxinas (Rocha et al. 2008), o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de aflatoxinas, através da técnica de cromatografia em camada delgada, em amostras de amendoim adquiridas na praia de Boa Viagem e em supermercados na cidade do Recife - PE, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada com amostras de amendoim torrado adquiridos na praia de Boa Viagem (PE) e amostras de amendoim processado industrialmente adquiridos em supermercado. As análises foram realizadas no campus da Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS). O estudo foi executado em 6 amostras alimentícias, sendo 3 de amendoim industrializado e 3 de amendoim torrado.

As amostras alimentícias de amendoim processado industrialmente foram atribuídas no resultado dessa pesquisa como “AMOSTRA I1,I2 e I3”. Em relação as amostras de amendoim torrado foram atribuídas como “AMOSTRA T1,T2 e T3”.

As amostras do amendoim processado industrialmente foram de uma única marca e um único lote, adquiridas em embalagens pesando em média 130 g sem apresentar indício de deterioração e armazenados na prateleira à temperatura ambiente. O amendoim estava exposto em local seco, como recomendado pelo fabricante. As amostras coletadas na praia de Boa Viagem por vendedores ambulantes, foram adquiridas aleatoriamente em embalagens caseiras pesando em média 80g, não apresentavam sinais de contaminação e ou deterioração, apesar de estarem expostas ao sol.

As amostras foram trituradas e misturadas até se tornarem homogêneas, tomando-se precauções para evitar possíveis contaminações. Desta amostra tratada foram retiradas 50 g para realização da análise. O método analítico utilizado foi realizado com base no método da *Internation Official Methods of Analysis* (AOAC,1999), descrito na Figura 1.

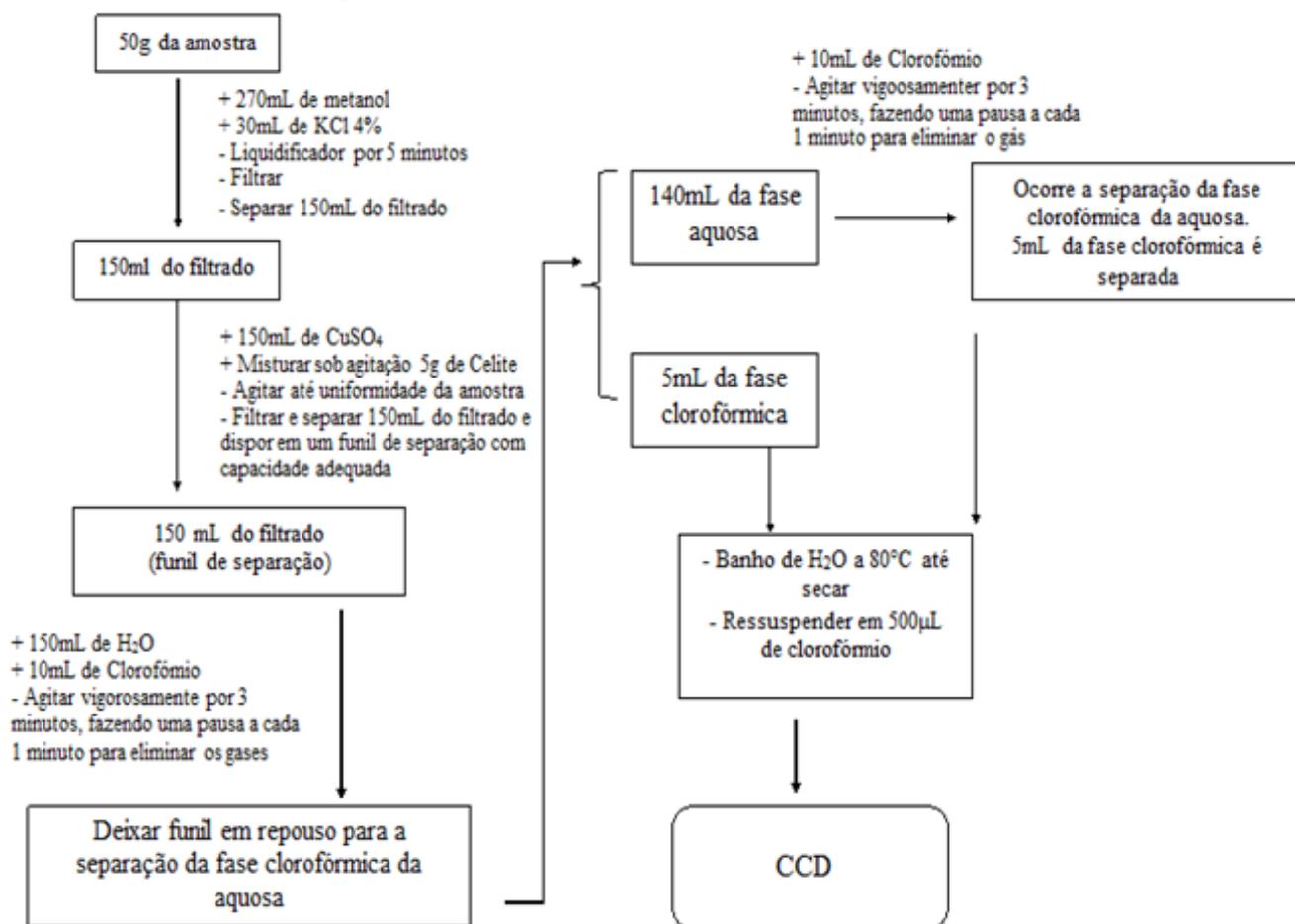


Figura 1. Fluxograma do método de separação, extração e purificação para identificação de aflatoxinas B e G em amostras de amendoim(AOAC,1999).

Na etapa de extração, os reagentes utilizados foram metanol (Cinética®) e cloreto de potássio (Dinâmica®). Em seguida, foi realizada a etapa de limpeza, com a precipitação das proteínas, foram utilizados como agentes clarificantes: sulfato de cobre pentahidratado (Dinâmica®) e Celite (Dinâmica®).

Houve uma nova extração das aflatoxinas com clorofórmio (Cinética®) por partição líquido-líquido sendo a fase clorofórmica separada e posteriormente aquecida em banho maria a 80°C, para evaporação do solvente. Em seguida, o extrato foi ressuspenso com 500µL de clorofórmio (Cinética®), e submetido à análise em CCD. A CCD foi realizada com eluição no sistema solvente, constituído por tolueno (Vetec®), acetato de etila (Cinética®) e ácido fórmico (Dinâmica®) na proporção 60:30:10. As placas cromatográficas de sílica gel utilizadas foram de 60x0,2 mm espessura (Macherey-Nagel®). A detecção presuntiva foi realizada por visualização de acordo

com a intensidade da fluorescência sob luz UV de 365nm para a presença das aflatoxinas e para determinação do tipo da mesma mediante a coloração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras analisadas apresentaram contaminação por aflatoxinas. Nas figuras 2 e 3 é possível visualizar a presença de fluorescência presuntiva da presença de aflatoxina B (blue) e de aflatoxina G (green).

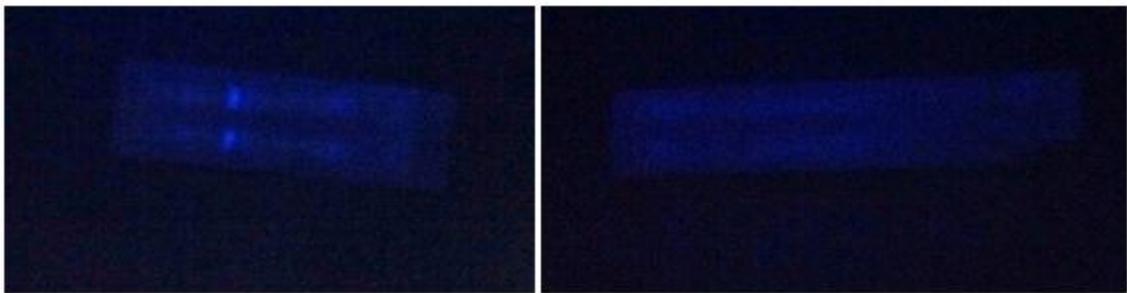


Figura 2:Placa vista em UV com duas manchas da amostra torrada.

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 3 :Placa vista em UV com duas manchas da amostra industrializada.

Fonte: Dados da pesquisa

Através da avaliação da intensidade da fluorescência de cada amostra (Quadro1), é possível presumir a presença das aflatoxinas B, tanto nas amostras de amendoim industrializado, quanto nas amostras de amendoim artesanal. Em relação ao subtipo G só foi observado em uma amostra de amendoim artesanal, em pequena evidência.

Quadro1. Resultados obtidos por CCD em amendoim industrializado e torrado.

AMOSTRAS	COLORAÇÃO	TIPO DE AFLATOXINA	INTENSIDADE DA FLUORESCÊNCIA
AMOSTRA I1	Azul	B	+
AMOSTRA I2	Azul	B	+
AMOSTRA I3	Azul	B	+
AMOSTRA T1	Azul	B	+++
AMOSTRA T2	Azul	B	+++
AMOSTRA T3	Verde	G	+

I1, I2 e I3 (amostras de amendoim industrializado); T1, T2 e T3 (amostras de amendoim torrado);+(baixa intensidade de fluorescência sob luz UV 365 nm); ++ (média intensidade de fluorescência sob luz UV 365 nm); +++ (alta intensidade de fluorescência sob luz UV 365 nm).

Quanto a análise da intensidade da fluorescência (Quadro1), foi possível verificar que a intensidade da cor que representa a aflatoxina B foi maior para a amostra de amendoim torrado. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (ABICAB,2009) a maior incidência de contaminação se dá quando o amendoim é batido, ensacado e armazenado com umidade elevada, e quando reumedece depois que já estiver seco. Quando o alimento encontra-se em condições de umidade e temperaturas ideais, se torna menos susceptível a tal contaminação. Como citado anteriormente o amendoim torrado encontrava-se em condições inadequadas de conservação o que proporcionou um nível de contaminação maior que o amendoim industrializado, cujas condições de umidade e temperatura são monitoradas, reduzindo assim as chances de desenvolvimento fúngico.

A alta incidência de micotoxinas encontrada nesta pesquisa é corroborada por outros achados descritos na literatura. Rocha et al. (2008) determinaram a ocorrência de aflatoxinas B₁,B₂,G₁ e G₂ em amostras de amendoim e paçoca adquiridas no comércio de Alfenas-MG,Brasil. A técnica utilizada para a separação, identificação e quantificação das substâncias foi a cromatografia em camada delgada com prévia extração, líquido-líquido, dos analitos. Neste estudo foi observado que 38% das amostras de amendoim e 13% das amostras de paçoca estavam contaminadas com aflatoxinas, sendo que as concentrações variaram de 21 a 138µg kg⁻¹.Todas as amostras

positivas excederam o limite máximo permitido, preconizado pela legislação brasileira de $20\mu\text{gkg}^{-1}$.

A partir do conhecimento dos riscos à saúde decorrente da presença de aflatoxina em alimentos Guimarães et al. (2013) realizaram um estudo com objetivo de avaliar a presença de aflatoxinas em amendoins assados coletados em praias da região metropolitana de Maceió-AL, utilizando as técnicas de CCD e espectrofotometria. As aflatoxinas foram encontradas nas sete amostras analisadas, onde três amostras excederam os limites estabelecidos pelo Ministério da Saúde, que é de $30\mu\text{g/kg}$ e uma amostra apresentou concentração superior a $20\mu\text{g/kg}$ de aflatoxinas totais limite máximo tolerado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Em outros achados Caldas et al. (2002), analisaram 366 amostras de alimentos consumidos no Distrito Federal, no período de julho de 1998 a dezembro de 2001, com amendoim e derivados, castanhas, milho, produtos de trigo e/ou aveia, arroz e feijão. As amostras foram processadas, as micotoxinas extraídas, detectadas e quantificadas por fluorescência, após separação em CCD. Foram detectadas aflatoxinas em 19,6% das amostras, de amendoim cru e derivados, milho de pipoca, milho em grão e castanha-do-pará. Amendoim e derivados apresentaram maior incidência de contaminação por aflatoxinas (34,7%) com amostras contendo até $1280\mu\text{g kg}^{-1}$ dada como somatório de B1 e G1 e $1706\mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxinas totais. Das amostras positivas, B1 estava presente em 98,5%, B2 em 93%, G1 em 66,7% e G2 em 65,4%.

Os efeitos biológicos decorrentes da ação das micotoxinas estão relacionados a fatores como dosagem, duração da exposição e combinação entre as toxinas. As micotoxinas afetam o fígado e seu complexo sistema enzimático de várias formas, porém outros órgãos também são lesados. (Scussel, 2002). De acordo com as normas do MERCOSUL/GMC/RES. N° 25/02, fica estabelecido que para o consumo humano adequado há um limite admissível de $20\mu\text{g.kg}$ de aflatoxinas em alimentos. Esta concentração serve como guia no controle de qualidade dos alimentos, porém sabe-se que o consumo em longo prazo de aflatoxinas mesmo em pequenas quantidades, pode causar danos ao organismo, uma vez que estas toxinas apresentam efeitos mutagênicos e cumulativos.

O amendoim é um produto consumido mundialmente. Cerca de 8 milhões de toneladas anuais de grãos destinam-se ao consumo como alimento *in natura* ou industrializado, e de 15 a 18 milhões são esmagados para fabricação de óleo comestível

(Conab, 2004). Devido a esse amplo acesso torna-se ainda mais importante a fiscalização dos limites da aflatoxina pelos órgãos federais, já que essa micotoxina tem um efeito biológico degenerativo a longo prazo. Inúmeros procedimentos analíticos vêm sendo empregados na análise e controle da presença de aflatoxinas em alimentos, por exemplo, CCD, CLAE, ELISA, biossensores e a espectroscopia no infravermelho (Amaral & Junior, 2006; Rocha et al. 2008).

CONCLUSÃO

A comparação dos resultados obtidos nesta pesquisa, onde foi observada contaminação de 100% das amostras testadas, com as análises desse mesmo substrato realizadas por outros autores, mostra que a contaminação por esse fungo permanece em um patamar elevado. Fato que representa um risco para a toda população, uma vez que produtos produzidos a partir do amendoim são largamente consumidos por humanos e animais. É preciso considerar que a ingestão do alimento contaminado, mesmo em pequenas quantidades, se feito por um longo período de tempo pode representar danos graves ao organismo. É sabido ser praticamente impossível a eliminação total das aflatoxinas nos alimentos, portanto, há que tomar as precauções adequadas, procurando reduzir ao máximo os níveis de aflatoxina nos alimentos humanos e do gado. E além da fiscalização do governo, a indústria de alimentos e o público devem também colaborar para garantir uma melhor segurança alimentar.

ABSTRACT

Presumptive detection of aflatoxins in peanuts marketed in Recife

Mycotoxins are natural contaminants difficult to control in food. It is estimated that about 25% of all agricultural products in the world are contaminated by these substances. Aflatoxin is the most well known mycotoxin for its toxic effects in humans and animals. Based on the risks to which the population is exposed, we conducted a study for the presumptive identification of the presence of aflatoxins in peanuts industrialized purchased at the supermarket, and roasted collected in Boa Viagem beach in Recife-PE. Applying the chromatography technique in thin layer (TLC), they were used where all 6 samples were positive for the presence of aflatoxin. It is aflatoxin B, both samples of processed peanuts, as the artisan samples. Regarding the G subtype was observed only in one of the roasted peanuts samples, little evidence. Known to be virtually impossible to complete elimination of aflatoxins in food, it should take appropriate precautions, seeking to reduce the

maximum aflatoxin levels in human food and animal. In addition to government oversight, food industry and the public should also help to ensure better food safety.

Keywords: Aflatoxin.*Aspergillusflavus*. Thin layer chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICAB – Associação Brasileira da Indústria de Chocolate, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados. (2009). Disponível em: [http://www.abicab.org.br/index_home.html] . Acessado em: 02 mar. 2015.

Amaral KAS, Nascimento GB, Sekiyama BL, Janeiro V, Machinski JR. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. *CiêncTecnolAliment* 2006; 26:336-342.

Amaral K. A. S. do; Junior, M. M. Métodos analíticos para a determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados: uma revisão. *Revista Analytica*. 2006; 24: 60-62.

AOAC International Official Methods of Analysis. 16^a ed. 1999; 2:2-28.

Biehl M.L. & Buck W.B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. *J. Food Protec.*, 1987; 50:58-73.

Brasil,1977. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos [CNNPA]. Resolução nº 34 de 1976. *Diário Oficial da União, Brasília*, 19 de janeiro de 1977.

Brasil,2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002. *Diário Oficial da União, Brasília*, 16 de outubro de 2002.

Caldas ED, Silva SC, Oliveira JN. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Rev Saúde Pública* 2002; 36:319-323.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2004). Disponível em: [<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/b57c748fe53e5e90efcfbf76a7b93421..pdf>]. Acessado em:03 mar. 2015.

Coulombe R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P. &Salunkhe, D.K. *Mycotoxinsandphytoalexins*. Boca Raton, CRC Press, 1991. p.103-43.

EinloffT.C ,Hoeltz M. , Noll I.B. Aflatoxina B1 em amendoim e produtos derivados comercializados na cidade de Porto Alegre.X Salão de Iniciação Científica PUCRS. 2009; 26-28

FoodIngredients Brasil. As micotoxinas,2009;7: 32-40. Disponível em: [http://www.revista-fi.com/materias/90.pdf] acessado em 16/08/2014.

Franco B.D.G.M. Critérios microbiológicos para avaliação da qualidade de alimentos. 1996. In: Microbiologia dos alimentos. FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. São Paulo: Atheneu, (1996). 182 p.

Gilbert J. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. Trends in Anal Chem 2002; 27:468-486.

Guimarães KCSS , Ferro FO , Rocha TJM , Silva ACP , Silva ECB. Aflatoxinas: análise por cromatografia em camada delgada e espectrofotometria de amendoins assados coletados em praias da região metropolitana de Maceió-AL. Biofar, Rev. Biol. Farm. Campina Grande/PB 2013; 9:42-50.

Hoeltz M. Caracterização da contaminação fúngica e por micotoxinas em diferentes fases da cultura do amendoim (*Arachishypogaea* L.) produzido no Rio Grande do Sul, Brasil/ Michele Hoeltz. Tese (doutorado) –Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

Iamanaka BT, Oliveira IS, Taniwaki MH. Micotoxinas em alimentos. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, 2010; 7:138-161.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Aflatoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1993; 56:245-395.

Kwiatkowschi, A.; Alves, A. P. F. Importância de detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. SaBios-Rev.Saúde e Biol. Campo Mourão, 2007; 2:45-54.

Mallmann C.A; Kowalski C.H; Almeida C.A; Mürmann I; Silveira V.G. Prevalência de aflatoxinas em amendoim e seus derivados, destinados ao consume humano, no estado do Rio Grande do Sul. Trabalho publicado em anais de eventos, 2º simpósio em ciência de alimentos, 2003.

Rocha MD, Maia PP, Rodrigues MAC, Martins I. Incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas-MG,Brasil. Rev Brasileira de Toxicologia 2008;21:15-19.

Sabino, M.; Zorzetto, M.A.; Pedroso, M.O.; Milanez, T.V. Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de São Paulo, no período de 1980 a 1987. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 49: 41-4, 1989.

Scussel, V. M. Fungos em grãos armazenados. In: Lorini, I.; Miike, L. H.; Scussel, V. M. (Ed.). Armazenagem de grãos. Campinas: InstitutoBiogeneziz, 2002; 675-691.

Wogan, G.N. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. Prog. Clin. Biol. Res., 1992; 374: 123-37.