

OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA EM PASTAS DE AMENDOIM
(*Arachis hypogaea*, L.)¹

Homero Fonseca²
Humberto Del Nery³

RESUMO

No presente trabalho os autores analisaram, para aflatoxina, 30 amostras de pasta de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), sendo 10 de uma firma nacional (A), 10 de outra firma nacional (B) e 10 procedentes de 7 firmas dos EE.UU.

A extração da aflatoxina foi feita com clorofórmio, separada por cromatografia em camada delgada de silicagel-G e quantificada sob luz ultra-violeta.

Os resultados mostraram que apenas 3 amostras (10%) não acusaram aflatoxina e eram de procedência norte-americana; 6 (20%) tinham-na abaixo de 0,05 ppm; 15 (50%) estavam entre 0,05 e 0,25 ppm; 5 outras (16,6%) entre 0,25 e 1,00 ppm e 1 (3,3%) acima de 1,00 ppm.

Êstes dados exprimem a toxidez total, em tÊrmos de Bl.

Os autores concluem, que, das amostras nacionais de pasta de amendoim, apenas 3 estariam em condições de serem consumidas, ainda assim, com restrições. Ressaltam que, uma das amostras da Fábrika B, apresentou um nÍvel de aflatoxina bastante elevado.

INTRODUÇÃO

Em 1960 uma misteriosa e aparentemente nova doença apareceu nas granjas inglesas matando, em poucos meses, mais

¹ Entregue para publicação em 1/12/1970.

² Professor de Disciplina, Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ.

³ Quintoanista, ex-bolsista do Convênio USAID/OSU/ESALQ, junto a Êste Departamento.

de 100.000 perūzinhos. Em virtude de não ter sido possível estabelecer sua identidade, a suposta moléstia foi denominada "doença X dos perūs" por BLOUNT (1961). Estudos posteriores revelaram que ela não era contagiosa, e sim, era devida a material tóxico presente nas rações, sendo fator comum do problema, uma partida de torta de amendoim proveniente do Brasil (BLOUNT, 1961). Em seguida, foi demonstrado que esta torta tóxica não afetava apenas perūzinhos, mas também marrequinhos, frangos (ASPLIN & CARNAGHAN, 1961), porcos (LOOSMORE & HARDING, 1961), bezerros (LOOSMORE & MARKSON, 1961) e também outros animais (ALLCROFT & CARNAGHAN, 1963).

Isolado o princípio tóxico, verificou-se que êle era composto de 4 substâncias: B1, B2, G1 e G2 que, à luz ultra-violeta, davam fluorescência azul-violeta, as B1 e B2 e verde clara, as G1 e G2. A estas substâncias foi dado o nome de Aflatoxina, pois, verificou-se que eram metabólitos do fungo *Aspergillus flavus*, LINK ex FRIES, que se desenvolvia sobre o amendoim, após a colheita, sob condições favoráveis de umidade do amendoim e temperatura e umidade relativa do ar. Hoje são conhecidos outros metabólitos integrantes do grupo da aflatoxina, ou sejam, a M1 e M2 dão fluorescência azul-violeta (DE IONGH et al, 1964 e ALLCROFT et al, 1966) e que são as B1 e B2, metabolizadas e encontradas no leite de bovinos alimentados com tortas tóxicas. Foram isoladas de culturas de *A. flavus* e identificadas recentemente as B2a e G2a que são B2 e G2 (DUTTON & HEATHCOTE, 1966) hidroxiladas, tal qual M1 e M2, porém com hidroxilos em posições diferentes.

Os efeitos hepatotóxicos da aflatoxina estão sendo estudados com bastante intensidade em várias espécies animais.

Naquelas suscetíveis há sempre dano às células hepáticas, quando não, desenvolvimento de carcinomas. Já foi provado que a aflatoxina é um potente agente cancerígeno em ratos (WORGAN, 1965), trutas (ASHLEY et al, 1964) e marrecos (SCHOENTAL, 1967). Todavia, em relação ao homem, os resultados e observações ainda não são conclusivos e às vezes contraditórios. Segundo PAYET et al (1964), durante o período de 1958 a 1960, antes portanto do conhecimento do problema da aflatoxina, quatro crianças do Senegal com menos de 1 ano de idade foram alimentadas com concentrados proteicos de amendoim, em níveis de 70 a 140 g diárias, durante 10 meses. Estes concentrados proteicos, que foram guardados para posteriores estudos de conservação, foram analisados e constatou-se que continham de 0,5 a 1 mg/kg, ou seja, 0,5 a 1 ppm de aflatoxina. Em 1963 e 1965 foram feitas biópsias do fígado de 2 destas crianças e não foram

constatados carcinomas. Em contrapartida, SCHOENTAL (1967) afirma que há forte e sugestiva evidência da importância de hepatotoxinas na etiologia de doenças hepáticas humanas como a doença veno-oclusiva, cirrose e carcinoma primário do fígado, particularmente em áreas tropicais. Recentemente foi confirmada por ZUCKERMAN & FULTON (1966) a ação hepatotóxica da aflatoxina em fígados de embriões humanos, em cultura de tecidos, tendo sido observadas importantes mudanças citopáticas, principalmente no núcleo, e em especial, nos ácidos ribonucleicos e cromatina, culminando com a morte das células.

Tendo em vista esta possível toxidez ao ser humano, efetuamos anteriormente (FONSECA & LEME JR., 1967), uma pesquisa sobre a ocorrência de aflatoxina em amendoim e subprodutos na cidade de Piracicaba, e agora, fazêmo-la em pastas de amendoim.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Trinta amostras de pastas de amendoim foram usadas neste trabalho. As mesmas eram da seguinte procedência:

- 10 provenientes de uma firma nacional que denominaremos de Fábrica A.
- 10 de outra firma nacional, Fábrica B.
- 10 de procedência norte americana, pertencendo a 7 marcas diferentes, que denominaremos de US-1 a US-7, e que recebemos por gentileza do convênio USAID/OSU/ESALQ.

Métodos

Extração da toxina

De cada amostra foram tomadas 20 g que foram desengorduradas pelo método de COOMES & FEUELL (1965) e a seguir extraída a toxina com 100 ml de clorofórmio, pelo método de LEE (1965).

O filtrado obtido denominaremos de solução X. Quando necessário, diluímos 8 ml desta solução completando a 100 ml, com clorofórmio, em balão volumétrico, solução esta que denominaremos de solução Y.

Preparo das cromatoplacas

As placas com camada de 500 micra de silicagel - G foram preparadas segundo o método de COOMES & FEUELL (1965).

Cromatografia de toxina

A 2 cm da base da cromatoplaca foram colocadas as seguintes alíquotas da sol. X: 40, 20, 4 e 2 microlitros e desenvolvida com a fase superior do solvente Benzeno-Etanol 95% - Água (46-35-19; v/v), em câmara não saturada, até 10 cm acima das alíquotas. Para maior exatidão os extratos eram recromatografados com alíquotas intermediárias. Quando as manchas eram visíveis, mesmo na menor alíquota da sol. X, nova placa era desenvolvida, nas mesmas condições, porém, com as seguintes alíquotas da sol. Y: 25, 20, 15, 10 e 5 microlitros. Paralelamente corriamos na mesma placa uma alíquota de um extrato de concentração conhecida, para fins de comparação de concentração e Rf.

Determinação da concentração de aflatoxina e sua correspondente toxidez

As placas, após a cromatografia, foram examinadas em câmara escura à distância de 30 cm de uma lâmpada ultra-violeta Philips Tipo HPW-125 watts e observada a presença ou ausência de manchas fluorescentes, azul-violeta das aflatoxinas B1 e B2, com Rfs entre 0,45 e 0,40, e esverdeadas das aflatoxinas G1 e G2, Rfs entre 0,40 e 0,35.

O cálculo da concentração foi feito apenas para B1 e G1 em virtude de as aflatoxinas B2 e G2 serem menos tóxicas e ocorrerem em menores quantidades. Para este fim usamos as seguintes fórmulas:

Para aflatoxina B1:

$$\frac{0,4 \times 100}{p \times v} = \text{ppm ou mg/kg}$$

Para aflatoxina G1:

$$\frac{0,3 \times 100}{p \times v} = \text{ppm ou mg/kg}$$

onde,

p = pêsso da amostra

v = volume, em microlitros, da menor alíquota em que foi observada fluorescência na placa (se a alíquota fôr proveniente da sol. Y, o valor 100 deve ser substituído pelo valor 1250) o que nos dava o limite inferior. Para o limite superior foi usada a alíquota menor seguinte em que não foi observada fluorescência.

Os valores 0,4 e 0,3, contidos nas fórmulas acima, são decorrentes do fato de que, nas condições estabelecidas para esta determinação por COOMES & FEUELL (1965), a menor quantidade de aflatoxina B1 em que pode ser observada fluorescência na placa é 0,0004 microgramas. Da mesma forma, o limite visual para a G1 é 0,0003 microgramas.

Para avaliação da toxidez das amostras os resultados foram cotejados com a relação elaborada pelo TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE (1962) e que consta do Quadro 1.

QUADRO 1 - Relação entre a concentração de aflatoxina B1 e toxidez do material

Categoria de Toxidez	Nível de aflatoxina B1
Muito alta	Acima de 1,00 ppm
Alta	Entre 0,25 e 1,00 ppm
Média	Entre 0,05 e 0,25 ppm
Baixa ou Negativa	Abaixo de 0,05 ppm

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Resultados

Os resultados encontrados foram os dos quadros abaixo:

QUADRO 2 - Ocorrência de aflatoxina em amostras procedentes dos Estados Unidos (ppm)

Amostra	A f l a t o x i n a	
	B1	G1
US - 1a	0,13 - 0,20	0,10 - 0,15
US - 1b	0,13 - 0,20	0,10 - 0,15
US - 2	0,07 - 0,03	0,05 - 0,06
US - 3a	0,00 - 0,05	0,00 - 0,05
US - 3b	0,00 - 0,05	0,00 - 0,05
US - 4	0,00 - 0,05	0,00 - 0,05
US - 5	0,13 - 0,20	0,10 - 0,15
US - 6	Ausente	Ausente
US - 7a	Ausente	Ausente
US - 7b	Ausente	Ausente

QUADRO 3 - Ocorrência de aflatoxina em amostras procedentes da Fábrica A (ppm)

Amostra	A f l a t o x i n a	
	B1	G1
A - 1	0,05 - 0,06	0,00 - 0,05
A - 2	0,05 - 0,06	0,00 - 0,05
A - 3	0,10 - 0,13	0,07 - 0,10
A - 4	0,10 - 0,13	0,07 - 0,10
A - 5	0,10 - 0,13	0,07 - 0,10
A - 6	0,08 - 0,10	0,06 - 0,07
A - 7	0,10 - 0,13	0,07 - 0,10
A - 8	0,10 - 0,13	0,07 - 0,10
A - 9	0,10 - 0,13	0,07 - 0,10
A - 10	0,10 - 0,13	0,07 - 0,10

QUADRO 4 - Ocorrência de aflatoxina em amostras procedentes da Fábrica B (ppm)

Amostra	A f l a t o x i n a	
	B1	G1
B - 1	0,20 - 0,40	0,15 - 0,37
B - 2	0,20 - 0,40	1,25 - 1,87
B - 3	0,00 - 0,05	Ausente
B - 4	0,00 - 0,05	Ausente
B - 5	0,20 - 0,40	0,15 - 0,37
B - 6	0,00 - 0,05	0,00 - 0,05
B - 7	0,05 - 0,06	0,04 - 0,05
B - 8	0,10 - 0,13	0,37 - 0,50
B - 9	0,13 - 0,20	0,37 - 0,50
B - 10	0,66 - 1,00	0,00 - 0,05

Conclusões

Como se pode notar pelos Quadros 2, 3 e 4, apenas 3 amostras (10%) não acusaram a presença de aflatoxina e que 6 (20%) apresentaram-na em níveis abaixo de 0,05 ppm, que corresponde a categoria "Baixa ou Negativa". A maioria das amostras situou-se entre 0,05 e 0,25 ppm, na categoria "Média" em número de 15 (50%), 5 (16,6%) na categoria "Alta", ou seja, entre 0,25 e 1,00 ppm, e 1 (3,3%), amostra B-2, ultrapassando ligeiramente 1,00 ppm e, portanto, na categoria "Muito Alta".

Esta classificação foi efetuada levando-se em consideração que a aflatoxina G1 tem metade da toxidez da B1, segundo CARNAGHAN et al (1963). Pudemos então calcular a toxidez total de cada produto (em termos de B1), somando o valor da B1 com metade do valor da G1.

Desta forma, podemos chegar à conclusão que, das amostras nacionais, apenas 3 estariam em condições de serem consumidas, ainda assim com restrições.

A presença da aflatoxina na maioria das amostras e, principalmente, o elevado teor em várias delas, está a reclamar dos produtores uma melhor seleção da matéria prima para a elaboração das pastas de amendoim, bem como, uma melhor fiscalização por parte das autoridades sanitárias.

Um passo no sentido de melhorar a qualidade do produto, seria a utilização de amendoim proveniente da safra da "seca", em que, a incidência geral de aflatoxina é bem menor, de acordo com FONSECA (1968). Outro seria a aquisição de amendoim de produtores mais qualificados, que deveriam providenciar uma rápida secagem do produto a ser destinado àquele fim.

SUMMARY

In the present work, the Authors studied the incidence of aflatoxin in 30 samples of peanut butter, (*Arachis hypogaea*, L.) being 10 from a Brazilian factory (A), 10 from another Brazilian factory (B) and 10 of 7 brands from U.S.A.

The extraction of aflatoxin was made with chloroform, separated by thin-layer chromatography with Silicagel-G and quantified under an ultra-violet lamp.

The results showed that only 3 samples (10%) were free from aflatoxin and were of U.S. origin; 6 (20%) had them under 0,05 ppm; 15 (50%) were between 0,05 and 0,25 ppm; 5 (16,6%) between 0,25 and 1,00 ppm. and 1 (3,3%) more than 1,00 ppm.

These values express the total toxicity in terms of B1.

The Authors have concluded that of the Brazilian samples, only 3 were in a condition for being consumed, and those still with some restrictions. They pointed out that one sample of the Factory B, have showed a very high level of aflatoxin.

LITERATURA CITADA

- ALLCROFT, R. & R.B.A. CARNAGHAN, 1963 - Toxic products in groundnuts. Biological effects. Chem. Ind., (2): 50-53.
- ALLCROFT, R., H. ROGERS, G. LEWIS, J. NABNEY & P.E. BEST, 1966 - Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the milk toxin. Nature, 209 (5019): 154-155.
- ASHLEY, L.M., J.E. HALVER & G.N. WOGAN, 1964 - Hepatoma and aflatoxicosis in trout. Fed. Proc., 23: 105.

- ASPLIN, F.D. & R.B.A. CARNAGHAN, 1961 - The toxicity of certain groundnuts meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. *Vet. Rec.*, 73: 1215-1219.
- BLOUNT, W.P., 1961 - Turkey "X" disease. *Turkeys*, 9: 52, 55, 58, 61, 77.
- CARNAGHAN, R.B.A., R.D. HARTLEY & J.O'KELLY, 1963 - Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. *Nature*, 200: (4911): 1101.
- COOMES, T.J. & A.J. FEUELL, 1965 - Recommended procedures for the detection of aflatoxin B1 in groundnuts and groundnut materials. Tropical Products Institute, Report n^o G,13, Ministry of Overseas Development, London.
- DE IONGH, H., R.O. VLES & J.G. VAN PELT, 1964 - Milk of mammals fed on aflatoxin-containing diet. *Nature*, 202 (4931) : 466-467.
- DUTTON, M.F. & J.G. HEATHCOTE, 1966 - Two new aflatoxins. *Biochem. J.*, 101 (2): 21P-22P.
- FONSECA, H. & J.LEME JUNIOR, 1967 - Ocorrência de aflatoxina em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) do comércio. Aceito para publicação pelos Arquivos Brasileiros de Nutrição.
- FONSECA, H., 1968 - Contribuição ao estudo da ocorrência de aflatoxina em tortas, farelos e farinhas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) no Estado de São Paulo. Tese de Doutorado. E.S.A."Luiz de Queiroz"-USP-Piracicaba.
- LEE, W.V., 1965 - Quantitative determination of aflatoxin in groundnut products. *Analyst (Lond.)*, 90(1070):305-307.
- LOOSMORE, R.M. & J.D.J. HARDING, 1961 - A toxic factor in Brazilian groundnut causing liver damage in pigs. *Vet.Rec.*, 73: 1362-1364.
- LOOSMORE, R.M. & L.M. MARKSON, 1961 - Poisoning of cattle by Brazilian groundnut meal. *Vet. Rec.*, 73: 813-814.

- PAYET, H., J. CROS, C. QUENUM, M. SANKALE & M. MOULANIER, 1964 - Deux observations d'enfants ayant consommé de façon prolongée des farines souillées par "*Aspergillus flavus*". La Presse Médicale, 74(13): 649.
- SCHOENTAL, R., 1967 - Aflatoxins. In "Annual Review of Pharmacology", 7: 343-356.
- TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE, 1962 - Aflatoxin in groundnuts and groundnut products. Interpretation of physico chemical and biological test results. T.P.I., Ministry of Overseas Development, London, 1 pág. mimeografada.
- WOGAN, G.N., 1965 - Experimental toxicity and carcinogenicity of aflatoxins. In "Mycotoxins in Foodstuffs" Ed. G.N. Wogan, The M.I.T. Press, Cambridge, Mass. U.S.A.
- ZUCKERMAN, A.J. & F. FULTON, 1966 - Acute toxic effects of aflatoxin on human embryo liver cells in culture. Brit Med. J., 2: 90-91.