

Doi: 10.5212/Publ.Exatas.v.15i1.039044

DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE AFLATOXINAS EM CASTANHAS DE CAJU

DETERMINATION OF THE PRESENCE OF AFLATOXINS IN CASHEW NUTS

**Josyanne Araújo NEVES¹; Robson Alves da SILVA¹;
Lucillia Rabelo de OLIVEIRA²; Rita Débora de Sá Rodrigues BATISTA³**

¹Centro Federal de Educação Tecnológica do Piauí – CEFET-PI, Departamento de Tecnologia em Alimentos, Teresina-PI.

²Universidade de São Paulo – USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo-SP; Faculdade de Ciências Agrárias de Araripina – FACIAGRA, Araripina-PE.

³Faculdade de Ciências Agrárias de Araripina - FACIAGRA, Araripina - PE.

Recebido para publicação em 17/11/2008

Aceito para publicação em 02/03/2009

RESUMO

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*. Tais substâncias são tóxicas para o homem e animais, possuindo ação mutagênica, carcinogênica, teratogênica e de imunossupressão, sendo a aflatoxina B1 o mais potente carcinógeno natural conhecido. As aflatoxinas ocorrem principalmente em produtos oleaginosos e ricos em proteínas, tendo sido encontradas em castanhas de caju, uma noz produzida abundantemente no Brasil, país que apresenta condições climáticas propícias para o desenvolvimento de tais micotoxinas. O objetivo do presente estudo foi realizar um levantamento da ocorrência de aflatoxinas em castanhas de caju comercializadas por vendedores ambulantes no centro da cidade de Teresina, Piauí. Dez amostras foram coletadas aleatoriamente, sendo avaliada a ocorrência de aflatoxinas B e G, utilizando-se a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), com a detecção das aflatoxinas nas cromatofolhas efetuada em duplicata. Em nenhuma das amostras foi encontrada aflatoxinas. No entanto, é válido ressaltar que a não detecção de aflatoxinas não descarta a possibilidade da presença das mesmas nas amostras de castanha, uma vez que a CCD possui certo limite de detecção para estas micotoxinas. Apesar da negatividade do exame, é importante destacar que estudos como este são de suma importância e devem ser realizados com frequência, tendo em vista que o consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas, mesmo que em doses mínimas, na ordem de nanogramas, confere risco potencial à saúde.

Palavras-chave: Aflatoxinas. Castanhas de caju. Cromatografia em camada delgada.

ABSTRACT

Aflatoxins are secondary metabolites produced by fungi of the genus *Aspergillus*. These substances are toxic to humans and animals, with action mutagenic, carcinogenic, teratogenic and immunosuppression, with aflatoxin B1 the most potent natural carcinogen known. The products aflatoxins occur mainly in oil and rich in protein, was found in cashew nuts, a nut produced abundantly in Brazil, and that the country presents conditions favorable for development of such mycotoxins. The purpose of this study was to survey the occurrence of aflatoxins in cashew nuts sold by street vendors in the inner city of Teresina (PI). December samples were collected randomly, and assessed the occurrence of aflatoxin B and G, using the technique of Thin-Layer Chromatography (TLC), and the detection of aflatoxins in cromatofolhas was done in duplicate. In none of the samples was found aflatoxin. However it is not valid to emphasize that the detection of aflatoxin does not rule out the possibility of the presence in samples of the same brown, because the SSC has certain limit of detection for these mycotoxins. Despite the negativity of the examination, it is important to emphasize that studies of this are extremely important and should be conducted frequently, since the consumption of food contaminated with aflatoxins, even in minimal doses in the range of nanograms, gives potential to health.

Keywords: Aflatoxins. Cashew nuts. Thin layer chromatography.

1 Introdução

Aflatoxinas são metabólitos fúngicos secundários produzidos por algumas linhagens das espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* (CHELL et al., 2007) e, mais raramente, *Aspergillus nomius*. (SANTURIO; FERNANDO; ROSA, 2006). Possuem efeitos tóxicos agudos, mutagênicos, carcinogênicos, teratogênicos e de imunossupressão sobre os seres humanos e várias espécies domésticas (HASHIMOTO et al., 2003; SIMIONATO; ASTRAY; SYLOS, 2003), pois essas toxinas exercem antagonismo ao metabolismo das vitaminas, proteínas e aminoácidos, lipídios e carboidratos, agindo sobre coenzimas ou complexos enzimáticos, principalmente no fígado, além de afetar a estrutura química do DNA. (TESSARI et al., 2005). Segundo a Food and Drug Administration/CFSAN (2003), em cada espécie o fígado é o primeiro órgão a ser atacado.

Segundo a European Mycotoxin Awareness Network (EMAN), atualmente conhecem-se 20 tipos de aflatoxinas (EMAN, 2007), porém os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B1, B2, G1 e G2 (MALLMANN et al., 2006),

sendo a aflatoxina B1 o mais potente carcinógeno conhecido. (BENNETT et al., 2003).

O clima tropical do Brasil propicia condições favoráveis para a proliferação dos fungos responsáveis pela produção das aflatoxinas. Além disso, sendo um país em desenvolvimento, as condições inadequadas de plantio, colheita, secagem, transporte e armazenamento de produtos agrícolas favorecem a contaminação por fungos toxigênicos. Nos países tropicais, as perdas causadas por fungos são em torno de 4%, podendo chegar até 30% em alguns países, principalmente devido às temperaturas e umidades relativas altas. (LOPES et al., 2005).

Estudos realizados pelo Centro Nacional de Pesquisa Agroindustrial Tropical (CNPAT) nos últimos anos confirmaram a presença de diversos fungos, inclusive *Aspergillus flavus*, associados à deterioração das amêndoas. Aproximadamente 10% das castanhas de caju que aportam nas indústrias de processamento não possuem amêndoas, por terem sido destruídas por fungos. (PINHEIRO, 2004). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de castanhas de caju, sendo que a safra para 2007 é estimada em mais de 252 mil toneladas. (IBGE, 2007).

Dada a importância das aflatoxinas, devido à sua alta toxicidade, e sendo o Brasil um país com condições favoráveis para sua produção e um dos maiores produtores mundiais de castanha, o objetivo do presente trabalho foi verificar a ocorrência de aflatoxinas em castanhas de caju comercializadas informalmente no centro da cidade de Teresina, Piauí, através de cromatografia em camada delgada (CCD).

2 Material e métodos

2.1 Amostras de castanha de caju

Um total de dez amostras de castanha de caju foram coletadas ao acaso de diferentes vendedores ambulantes, escolhidos aleatoriamente, localizados em pontos diversos do centro comercial da cidade de Teresina-PI. As amostras tiveram um peso representativo de 100 g.

2.2 Métodos

2.2.1 Temperatura ambiente, umidade relativa do ar e precipitação

As informações climáticas referentes à temperatura ambiente, umidade relativa do ar e precipitação mensal na cidade de Teresina foram obtidas através de levantamentos diários com dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), no período de abril a junho de 2007.

2.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A detecção de aflatoxinas foi realizada segundo o método de CCD de Soares e Rodriguez-Amaya (1989).

2.2.2.1 Extração

A extração e limpeza das amostras foram realizadas no laboratório de alimentos do CEFET-PI. As amostras foram levadas à estufa por aproximadamente 48 horas a 65 °C a fim de retirar a umidade das castanhas, facilitando assim a moagem. Após a moagem e homogeneização, pesou-se 50 g para

estudo. A seguir, foram adicionados, lentamente, 30 ml de solução de KCl 4% e 270 ml de metanol, agitando-se por cinco minutos em liquidificador, à velocidade intermediária. Essa solução foi filtrada em papel-filtro qualitativo e foram coletados 150 ml em béquer de 500 ml.

2.2.2.2 Purificação

No extrato filtrado, foram adicionados lentamente 150 ml de clarificante (sulfato de cobre 10%) e 50 cm³ de celite, homogeneizando e aguardando por 10 minutos. A amostra foi filtrada em papel-filtro, retirando-se os primeiros 150 ml para funil de separação.

2.2.2.3 Desengorduramento

Foram adicionados ao extrato 50 ml de hexano e, após agitação por um minuto e repouso para separação das fases, foi coletada a fase inferior.

2.2.2.4 Partição líquido-líquido

Na fração coletada em funil de separação, foram adicionados 10 ml de clorofórmio, agitando-a vigorosamente por dois minutos. Após a separação, a fase inferior (clorofórmica) foi coletada. Essa etapa foi novamente repetida. O frasco com a amostra, devidamente identificado, foi levado para estufa a 60 °C para evaporação do clorofórmio. Os extratos secos foram acondicionados em frascos de vidro limpos, envolvidos em papel alumínio e enviados para leitura no laboratório de química da Universidade Federal do Piauí.

2.2.2.5 Leitura

O extrato seco foi ressuspenso em 300 µl de tolueno e a verificação da presença de aflatoxinas foi feita aplicando-se sobre a cromatofolha uma pequena fração do extrato com auxílio de um capilar de vidro. O desenvolvimento da corrida foi realizado por 10 cm, em cuba saturada por 30 minutos, com clorofórmio: acetona (9:1). Após a corrida, deixou-se a cromatofolha secar naturalmente. A revelação foi realizada com o auxílio de uma câmara com lâmpada ultravioleta de comprimento de onda 366 nm.

2.2.2.6 Detecção de aflatoxina

As bandas de aflatoxina sob exposição à luz ultravioleta (366 nm) apresentam coloração azul fluorescente ou, pela adição do ácido sulfúrico 20%, passam para amarelo-esverdeado fluorescente. Este último procedimento permite confirmar a presença ou ausência de aflatoxina. Para fazer a quantificação de aflatoxina por cromatografia em camada delgada, compara-se a coloração das bandas correspondentes à molécula de aflatoxina no padrão e na amostra.

3 Resultados e discussão

3.1 Temperatura ambiente, umidade relativa do ar e precipitação

Segundo Pereira, Carvalho e Prado (2002), a temperatura do ambiente e umidade relativa do ar constituem pontos críticos na produção de aflatoxinas, sendo que a interação entre estes parâmetros é o fator mais significativo para impedir a produção destas toxinas. Nesse contexto, Queiroz et al. (2006) afirmam que a faixa de temperatura ideal para a produção de aflatoxina é de 25 °C a 40 °C. Quanto à umidade relativa do ar (URA), os mesmos autores reportaram que a ideal deve ser superior a 85%.

Tabela 1 - Temperatura média, teor de umidade relativa do ar e precipitação acumulada em Teresina entre os meses de abril a junho de 2007.

Mês	Temperatura média (°C)	Teor de umidade relativa do ar média (%)	Precipitação acumulada mm
Abril	26,03	68,67	230
Maio	26,80	59,93	60
Junho	26,46	51,66	0,9
Média total	26,43	60,08	290,9

No que se refere à temperatura média total em Teresina (Tabela 1), no período do estudo observou-se que este parâmetro poderia favorecer o crescimento fúngico e a produção de aflatoxinas (25 °C a 35 °C). Quanto à média total de umidade relativa do ar (URA) registrada na cidade em questão (Tabela 1), esta se apresentou em nível inferior ao ideal para o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus* e *Penicillium* (URA acima de 75%). Para a produção de aflatoxina

propriamente dita, esse teor de URA também se encontrou abaixo do valor relatado na literatura como suficiente para produção das aflatoxinas (URA acima de 85%), não favorecendo assim a produção das mesmas. Esse baixo teor de umidade relativa do ar em Teresina é corroborado pelo também baixo índice de chuvas registradas mensalmente (Tabela 1).

3.2 Ocorrência de aflatoxinas por CCD

Do total de dez amostras analisadas em duplicata, não foi verificada a presença de aflatoxinas em nenhuma delas. Tal índice está de acordo com outros trabalhos que demonstraram pouca ou nenhuma ocorrência em amostras de castanha de caju. Lima (1997), utilizando o método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya (1989), também não verificou presença de aflatoxinas em amêndoas de castanha de caju fritas e salgadas. No estudo realizado por Taguchi et al. (2007) também não foi detectada presença de aflatoxinas em amostras de castanha de caju analisadas em Osaka, Japão, durante 1988-1992. Leszczynska et al. (2000), pesquisando aflatoxinas em 29 amostras de nozes, entre elas castanhas de caju, chegaram à conclusão de que 38% das amostras estavam contaminadas, sendo que a concentração de aflatoxinas B1 nas castanhas de caju estava a cerca de 0,35 µg/kg. Abdulkadar, Al-Ali e Al-Jedah (2002) analisaram durante quatro anos (1997-2000), no Qatar, 351 amostras de alimentos suscetíveis à contaminação por aflatoxinas, entre elas a castanha de caju. Das 40 amostras de castanha de caju investigadas, apenas uma apresentou contaminação por aflatoxinas em baixos níveis (0,1 µg.kg⁻¹).

Segundo orientações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectada pelo método. O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. Soares e Rodriguez-Amaya (1989) encontraram, como

sendo o limite de detecção para esse método, o valor de 4 µg/kg para aflatoxina B1. Portanto, apesar das aflatoxinas não terem sido detectadas nas amostras de castanha de caju, este fato não descarta a hipótese de possível presença de aflatoxinas, pois podem estar presentes em níveis não detectáveis pela CCD.

Para Silva (2005), a confiabilidade dos resultados analíticos na determinação de micotoxinas é preocupante, tendo em vista vários fatores, como a distribuição não uniforme das micotoxinas nos alimentos e rações animais, as baixas concentrações, em que os níveis encontrados estão em µg/kg e ainda a presença de interferentes. O cromatograma não apresentou interferências, sendo que o extrato obtido foi claro e límpido, não havendo necessidade de nova extração. Segundo Collins et al. (1995), a CCD é a mais simples e a mais econômica das técnicas cromatográficas quando se pretende uma separação rápida e identificação visual.

4 Conclusão

Apesar das aflatoxinas não terem sido detectadas nesta pesquisa, convém ressaltar que este fato não descarta a possibilidade das amostras de castanha de caju analisadas apresentarem algum nível de contaminação. Isso se deve ao fato de que a CCD apresenta um certo limite de detecção.

O resultado médio da umidade relativa do ar obtida ao longo de três meses apresentou-se abaixo do teor descrito na literatura como favorável ao desenvolvimento de aflatoxinas, o que demonstra que o controle deste fator é um método efetivo para inibir o desenvolvimento de fungos toxigênicos e a contaminação com aflatoxinas.

Entretanto, mais amostras devem ser analisadas em períodos climáticos diferentes visando a verificar a tendência observada neste trabalho.

Referências

ABDULKADAR, A. H. W.; AL-ALI, Abdulla; AL-JEDAH, Jassim H. Occurrence of aflatoxin in commodities imported into Qatar, 1997-2000. **Food Additives & Contaminants**, v. 19, n.7, July 2002, p. 666-670. Disponível em: <<http://www.informaworld.com/smpp/content~content=a713811096?words=cashew%7cnuts&hash=391259243>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.3, p.497-516, Jul 2003.

CHELL V. et al. **Aflatoxins**. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim18>>. Acesso em: 22 abr. 2007.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. S. Princípios básicos da cromatografia. In: _____. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6.ed. p. 13-19. Campinas: Unicamp, 1995.

EUROPEAN MYCOTOXIN AWARENESS NETWORK (EMAN). **Fact sheet 2: the aflatoxins**. Disponível em: <<http://193.132.193.215/eman2/fsheet2.asp>>. Acesso em: 03 abr. 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA/CFSAN). 2003. **Bad Bug book: aflatoxins**. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/cgi-bin/bbbglos?Aflatoxins>>. Acesso em: 10 abr. 2007.

HASHIMOTO, Elisabete Hiromi; SANTOS, Maria Angela do; ONO, Elisabete Yurie Sataque et al. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 123-132, jan./jun. 2003

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2007. **Previsão de safra de castanha de caju no Brasil**. Disponível em: <http://cajucultura.com.br/p_brasil.html> Acesso em: 10 abr. 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). **Previsão do tempo**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/html/observacoes.php?lnk=Capitais>>. Acesso em: 16 abr. 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. 35 p. Revisão: 01 – março/2003.

LESZCZYNSKA J.; KUCHARSKA U.; ZEGOTA H. Aflatoxins in nuts assayed by immunological methods. **Europ. Food Res. Technol.** v.210, n.3, p.213-215. 2000. Disponível em: <[ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac35/fa03_23e.pdf](http://ftp.fao.org/codex/ccfac35/fa03_23e.pdf)>. Acesso em: 10 jun. 2007.

LIMA, Janice Ribeiro. **Produção de pasta de amêndoa da castanha de caju**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT. 2007.

LOPES, Paulo Rodinei Soares; RADUNZ NETO, João; MALLMANN, Carlos Augusto et al. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 40, n. 10, 2005.

MALLMANN, Carlos Augusto; DILKIN, Paulo; GIACOMINI, Leandro Zanini; RAUBER, Ricardo Hummes. **Impacto das aflatoxinas no desempenho de três linhagens de frangos de corte**. Laboratório de Análises Micotóxico-

lógicas – Universidade Federal de Santa Maria (LAMIC/UFSM). 2006.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G.; Crescimento e produção de aflatoxinas por *aspergillus flavus* e *aspergillus parasiticus*. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 1, p.141-156, jan/jun.2002.

PINHEIRO, Maria dos Reis Rodrigues. **Estudo de variabilidade genética de *aspergillus flavus* como Base para desenvolvimento de PCR multiplex para detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha-do-Brasil e castanha de caju**. 2004. 149 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). Universidade Católica de Brasília.

QUEIROZ, Maria Do Socorro Ramos de; NARAIN, Narendra; FREIRE, Rosa Maria Mendes et al. Determinação de aflatoxinas em sementes de amendoim, armazenadas em condições ambiente e em câmara fria. **Rev. bras. ol. fibros.**, Campina Grande, v. 10, n. 1/2, p.1009-1015, jan./ago. 2006.

SANTURIO, Janio M.; FERNANDES, Adriano; ROSA, Alexandre Pires. **Desempenho de pintos de corte oriundos de matrizes de corte alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de aflatoxina**. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 7, 04-06 de abril de 2006 – Chapecó, SC – Brasil.

SILVA, Jader Oliveira da. **Ocorrência de aflatoxina B1 em arroz consumido por militares do exército brasileiro por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência**. 2005. 101 fls. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

SIMIONATO, Eliane M. R. S.; ASTRAY, Renato M.; SYLOS, Célia M. de. Ocorrência de ocratoxina A e aflatoxinas em arroz. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.62, n.2, p.123 - 130, 2003.

SOARES, L.M.V., RODRIGUEZ- AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin layer chromatographic method. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v.72, n.1, p.22-26, 1989.

TAGUCHI S.; FUKUSHIMA S.; SUMIMOTO, T.; YOSHIDA, S.; NISHIMUNE T. Aflatoxins in Foods Collected in Osaka, Japan, from 1988 to 1992. **J. AOACI**, v.78: p.325-327. 1995. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac35/fa03_23e.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2007.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E. Efeitos da aflatoxina B1 e fumonisina B1 sobre os níveis séricos de aspartato amino-transferase e proteína total de frangos de corte. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n. 2, p.185-189, abr./jun., 2005.