

Aurélia Lopes Castrillón (\*\*)

Adhemar Purchio (\*\*\*)

## RESUMO

Foi investigada a ocorrência de aflatoxinas em 100 amostras de castanhas do Pará (*Bertholletia excelsa* HUMB. & BONPL.) provenientes de produtores e de diversos pontos de comercialização das sementes, na região de Manaus, Estado do Amazonas e de São Paulo, Estado de São Paulo. As amostras foram classificadas em 4 tipos de apresentação do produto (natural em casca, desidratada com e sem casca e em ouriço). Três amostras apresentaram-se contaminadas por aflatoxinas com níveis de toxidez considerados: em termos de B1 médio (0,1 ppm) e muito elevado (2,25 ppm) e, em G1, baixo (0,075 ppm) e muito elevado (1,5 ppm).

## INTRODUÇÃO

Após a revelação da atividade tóxica das aflatoxinas, em 1960, inúmeras investigações têm sido conduzidas em setores os mais diversos da ciência básica e aplicada.

A extrema versatilidade ecológica apresentada pelos fungos produtores daquele potente carcinógeno (*A. flavus* e *A. parasiticus*) propicia a contaminação de substratos alimentícios importantes para a saúde humana e animal.

Estão definitivamente comprovados os principais efeitos biológicos das aflatoxinas, os quais traduzem-se por lesões hepáticas agudas e crônicas, diminuição da velocidade de crescimento e danos nos mecanismos imunológicos de animais, além de efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos.

Existem correlações entre a incidência de hepatoma primário humano e nível dietário de aflatoxina (Peers & Linsell, 1977).

Estudo realizado de caso-controle, demonstrou que indivíduos que consomem diariamente alimentos contendo mais de 4 ug de aflatoxinas por dia, apresentam risco relativo

---

(\*) . Parte da Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Microbiologia e Imunologia no Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

(\*\*) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus - AM.

(\*\*\*) Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia - USP. S. P.

17 vezes maior de contrair hepatoma primário do fígado, em relação aos que ingerem alimentos que oferecem teores nulos ou baixos. O risco relativo verificado, aumentou para 35 vezes com o consumo concomitante de altas doses de bebidas alcoólicas (Butalao-Jaime *et al.*, 1982).

A castanha do Pará constitui-se num excelente alimento de consumo humano, apresentando teor protéico da ordem de 50% e a existência de todos os aminoácidos (Zucas *et al.*, 1971).

A partir de 1982, após os estudos iniciais da produção de aflatoxinas em rações à base de amendoim, por extrapolação, o problema foi levado à castanha e assim, os importadores restringiram a sua comercialização.

Apesar de constituir-se em excelente substrato nutritivo, seus invólucros (ourico, casca e películas) protegem-na parcialmente, dos ataques de predadores, bactérias, fungos e ácaros. Na vigência de danos em seus constituintes de proteção, há penetração de microrganismos, especialmente de fungos, os quais vão provocar alterações como; podridão e produção de substâncias tóxicas.

Assim, considerando-se o pequeno número de trabalhos relativos à incidência de aflatoxinas em castanha do Pará, a importância dessa oleaginosa como alimento básico da população da Amazônia bem como os efeitos tóxicos que o consumo intermitente do alimento contaminado pode causar, estudou-se a ocorrência dessas micotoxinas em amêndoas da *Bertholletia excelsa* HUMB. & BONPL.

## MATERIAL E MÉTODOS

### AMOSTRAS DE CASTANHAS DO PARÁ

#### Origem

As castanhas armazenadas procederam de regiões adjacentes dos chamados rios produtores da Amazônia: Purus, Solimões, Amazonas, Negro e ainda pertencentes ao território da Bolívia.

Foram analisadas amostras de castanhas do Pará, coletadas em Manaus, de usinas de beneficiamento, de mercados e feiras-livres, de propriedades particulares e de supermercados da grande São Paulo, Estado de São Paulo.

O produto originário de Manaus, constou das safras de 1979/1983, não sendo possível determinar as safras dos provenientes de supermercados de São Paulo.

As usinas fornecedoras pertencem aos grupos comerciais: CLEX (beneficiamento e depósito: Americana, Londrina e Canadense); COIMEX (Usina Coimex); I. B. SABBÁ (Usina I.B. Sabbá); Rubem Melo Cia. Ltda. (Usina Rubem Melo); propriedades particulares: Colônia Santo Antonio (Sítio Rosa de Maio/Manaus); mercado CEASA (Manaus-AM); Supermercado em São Paulo e em municípios vizinhos.

As usinas de beneficiamento são instaladas em grandes armazéns de alvenaria, com pé direito alto, aeração natural constante, temperatura ambiente variando entre 26 a

38°C; onde o produto permanece dias e até anos. Para evitar a contaminação por fungos e outros microorganismos, as sementes são reviradas constantemente, o que diminui a concentração de umidade.

#### **Caracterização das amostras utilizadas**

As 100 amostras foram identificadas segundo os locais de procedência, o tipo, qualidade e a sefra.

**Grupo I** - Castanhas beneficiadas (com e sem casca) e naturais (com casca), proce dentes de usinas (50 amostras) e depósitos (10 amostras).

**Grupo II** - Castanhas frescas, em casca, provenientes de feiras-livres de Manaus, Amazonas (15 amostras).

**Grupo III** - Castanhas mantidas no ouriço (15 amostras).

Origem: CEASA - Manaus-AM (5)

Colônia Santo Antonio - Manaus-AM (5)

Antonio Faustino - Manaus-AM (5).

**Grupo IV** - Castanhas naturais e em casca provenientes de 4 supermercados da grande São Paulo, (10 amostras).

#### **Meios de cultura**

Meio empregado para plaqueamento e isolamento dos fungos contaminantes: Agar-Sa-bouraud-Glicose (Difco), acrescido de clorafenicol. 100 mg/1.000 ml (pH5.6).

#### **Amostra dos padrões qualitativo de aflotoxinas**

A amostra dos padrões qualitativos de aflotoxinas B1 e G1, utilizados na pesquisa, foram os de uso do laboratório do Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas (PMC - Micotoxinas), São Paulo, procedente do "Agriculture Research" de New Orleans, Lousiana, cedidos pelo Dr. Walter A. Pons Jr.

## **MÉTODOS**

### **Coleta de material**

De cada usina foram coletadas 10 amostras de 1 quilograma de cinco ouriços de cada um dos particulares e do CEASA. A classificação foi feita de acordo com o tipo (tamanho), qualidade (boa, podre e mista) e tratamento (natural em casca, desidratação casca-inteira, ferida, fragmentada). Os ouriços foram representados por frutos recém-caídos das árvores. Amostras de mercados e supermercados, foram classificados como produtos na turais, em casca, de qualidade mista.

### **Preparo das amostras**

Para eliminar excesso de impureza, as amostras de castanhas em casca, foram lavadas

em água corrente e depois, rapidamente, em água quente (50°C) e submetidas à secagem em estufa a 45°C, descascadas, e condicionadas em sacos plásticos e mantidas sob refrigeração até o processamento analítico. Os ouriços foram cortados com serra elétrica, as sementes extraídas e imediatamente descorticadas. Após esses processos, as sementes foram cortadas com tesoura-alicate, estéril, nos sentidos horizontal e transversal, para a verificação de contaminação interna. A seguir, foram trituradas em centrífuga apropriada.

De cada amostra foi tomada uma alíquota de 40 g, de desengordura, inicialmente por prensa mecânica para retirar o excesso de óleo e, a seguir, submetida a extração com éter de petróleo p.a. por 4 - 12 horas em aparelho de soxhlet. O extrato resultante, foi concentrado em banho maria a 60°C e o resíduo guardado sob refrigeração até o momento da análise.

#### **Extração de aflatoxina das amostras**

O esquema analítico para a extração de aflatoxinas B1 e G1, foi o mesmo utilizado no Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas (PMC-Micotoxinas), São Paulo, com base no método de Lee (1965), do "Tropical Products Institute" (1972) e a dosagem segundo o método de Coomes & Feuell (1965).

Para enquadramento das amostras quanto ao teor de toxidez foi observada a Tabela do "Tropical Products Institute" (1962), a qual está baseada nos efeitos de testes biológicos realizados em marrequinhos de um dia (Quadro I).

#### **Purificação dos extratos**

Conforme a necessidade de exclusão de interferentes nos extratos, utilizou-se, isoladamente ou em combinação, os seguintes métodos: precipitação com acetato de chumbo neutro a 20%, coluna de sílica-gel (Pons *et al.*, 1966), purificação direta na placa cromatográfica realizando um primeiro desenvolvimento com éter etílico (Nabney & Nesbitt, 1965).

#### **Teste para confirmar a presença de aflatoxina**

Os métodos de confirmação utilizados foram o de Schuller *et al.*, 1973 (cromatografia bi-dimensional) e pela aspersão de solução de ácido sulfúrico a 50% sobre as manchas fluorescentes da amostra e do padrão. Os sistemas de solventes observados no primeiro foram, respectivamente: Clorofórmio - acetona (90:10) e benzeno - acetato de etila-etanol (60:39:1).

### **RESULTADOS**

Os resultados obtidos nas análises estão expressos no Quadro II ressaltando-se a presença de aflatoxinas em amostra da Usina Londrina (UL - 3), sob a forma de castanhas desidratadas sem casca, qualidade boa, Grupo I; da Usina I.B. Sabbá (UISB - 3) castanha natural em casca, qualidade mista Grupo I e da amostra do supermercado (SEL - 7) de São Paulo, natural em casca qualidade mista, integrada no Grupo IV.

A análise qualitativa das aflatoxinas B1 e G1 baseou-se nas tonalidades das fluorescências emitidas, e no Rf da mancha comparada ao Rf do padrão, nos cromatogramas resultantes dos processos analíticos utilizados. Quando o Rf do extrato da amostra e do padrão coincidiram, o extrato foi considerado positivo (+) e, em casos de proximidades de Rf, como suspeito ( $\pm$ ), nestes casos, repetiu-se o processo cromatográfico, adotando o teste de confirmação com ácido sulfúrico e cromatografia bidimensional.

As concentrações das aflatoxinas detectadas e expressas no Quadro II variam de 1,0 a 2,25 ppm. (AFB1) e de 0,75 a 1,5 ppm (AFG1). A amostra que apresentou maior nível de toxidez para as duas micotoxinas foi a SEL-7, enquadrada, portanto, em índice "muito elevado".

## DISCUSSÃO

Em virtude de não existir na literatura uma técnica extrativa específica para esse tipo de material excessivamente oleoso (68,0%) foram observadas técnicas combinadas já descritas. A julgar pelo tempo de estocagem, poucas amostras não apresentaram esse teor graxo. Além desse fator, a grande profusão de pigmentos observados nos extratos dificultaram sobremaneira as análises.

Avaliando-se a técnica modificada como um todo, pode-se tecer algumas considerações: A extração da gordura embora efetiva, é lenta, chegando-se a extremos de 12 horas.

O emprego de cromatografia em camada delgada (bidimensional) foi utilizada nos casos de dúvida, pois além de purificar o extrato é confirmativa, aumentando a sensibilidade do método.

Após ensaios com vários sistemas de solventes, estabeleceu-se como base benzeno-acetato de etila e etanol (60:30:1), pois foi o que melhor separou as manchas, oferecendo maior nitidez na visualização das fluorescências.

Considerando-se os níveis de aflatoxina B1 encontrados nas amostras de castanha (Quadro II), pode-se afirmar que são relativamente elevados, se comparados a estudo anterior (Gelda & Luyt, 1977). Pode-se-ia incluí-los na categoria de toxidez média muito elevada pelos padrões do Tropical Products Institute (1962). (Quadro I).

Os resultados relativos aos extratos e suas procedências, indicaram que a amostra proveniente de supermercado (SEL-7) diferenciou-se das duas originárias de usinas, apresentando nível de toxidez mais elevado (Quadro II).

A presença de aflatoxinas B1 e G1 nas três amostras deve-se, provavelmente a alguns fatores. 1) tempo e condições de estocagem; 2) tipo de tratamento anteriormente recebido e 3) integridade das amêndoas.

As experiências demonstraram que não houve diferença significativa entre níveis de toxicidade e tipos de tratamento.

Considerando-se os fatores que contribuem para o estímulo ou inibição da produção de aflatoxina, sabe-se que a presença de alguns elementos químicos (ferro, zinco, manganês e cádmio) são indispensáveis à síntese dessa micotoxina e, em contraposição o bário

e inibe (Suryanarayana & Tulpule, 1967). Outras substâncias como o etanol a 2% e a tiamina são capazes de estimular a sua produção (Basappa et al., 1967).

Assim, estimando-se as substâncias inibidoras, salienta-se que a castanha do Pará é o único exemplo de alimento conhecido, portador de altas concentrações de bário (Monier-Williams, 1949). Também fazem parte de seus componentes naturais o cálcio e o rádio (Franca et al., 1967), tendo sido verificado que o hidróxido de cálcio, é útil na inativação das aflatoxinas como substância moderadamente eficiente (Dollear & Gardner, 1966).

Estudos da composição química da castanha, revelam um teor de tiamina superior a do amendoim (1150 g/ 100 g para a primeira e 560 g/100 g para a segunda). Sabe-se que este último é um ótimo substrato para a produção de aflatoxina. As concentrações de tiamina assinaladas fazem supor que a primeira ofereceria melhores condições para a produção da micotoxina. Pelos resultados afindos, no entanto, este fato não parece ser verdadeiro e, possivelmente, o cálcio e bário exercem maior influência na inibição da produção das aflatoxinas.

O percurso comercial do produto talvez seja o maior responsável pelos danos que eventualmente ocorrem nas castanhas, tendo início com a extração que se realiza na época das chuvas, seguindo-se pelo empilhamento da semente, após retirada do ouriço e culminando com o transporte em condições inadequadas. Todos esses fatores vão, gradativamente, causando estragos nas cascas, tais como quebra de nervuras e aparecimento de rachaduras, facilitando a penetração dos fungos.

Além dessas possibilidades, outra circunstância como o fator ecológico podem contribuir para a contaminação da amêndoa pois o produto tem origem na região quente úmida e as safras coincidem com a época das chuvas, quando o grau de umidade se eleva a mais de 90% e a temperatura média anual de 26°C - 27°C, em certas zonas de região produtora (Hueck, 1972).

Investigações realizadas, demonstram que a produção de teores elevados dessa micotoxinas das amêndoas resultam de armazenamento inadequado (umidade mais de 70% e temperatura de (26° - 28°C), Yokaya et al., (1970). Lira (1976), por sua vez, sugere que a susceptibilidade da castanha do Pará frente a contaminação fúngica seja mais uma questão de tratamento e não de transporte e armazenamento.

O número de publicações relativas às aflatoxinas em castanhas, procedem na sua maioria, dos Centros de Controle de Qualidade para importação e exportação dos países compradores (Nilsson, 1974; Yndestad & Underdal, 1975), concluindo-se que, na realidade, a estrutura externa do produto deve limitar a penetração dos fungos e conseqüente produção das micotoxinas.

#### SUMMARY

*The occurrence of aflatoxins was investigated in one hundred samples of Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.) from producers and from several seed marketing posts, in the region of Manaus, state of Amazonas and São Paulo, state of São Paulo. The samples*

were classified according to four types of product presentation: naturally within the shell; dehydrated within the shell; dehydrated without shell and within the chestnut bur. Three samples were found contaminated with aflatoxins types B1 and G1. The toxicity levels for B1 were regarded as: medium (0,1 ppm) and very high (2.25 ppm); those of G1 were regarded low (0.075) and very high (1.5 ppm).

**Quadro I.** Relação entre concentração de aflatoxinas B1 e toxidez para mar-requinhos de um dia.

Nível de Aflatoxina B1	Categoria de Toxidez
Abaixo de 0,05 ppm	Baixa ou negativa
Entre 0,05 e 0,25 ppm	Média
Entre 0,25 e 1,0 ppm	elevada
Acima de 1,00 ppm	elevada

**Quadro II.** Teor de aflatoxinas B1 e G1 em amostras de castanhas do Pará.

Amostras	Concentração de Aflatoxinas (mg/Kg)	
	B1	G1
UL	0,1	0,075
UISB-3	0,25	0,875
SEL-7	2,25	1,5

UL - 3 = Usina Londrina.  
 UISB - 3 = Usina I. B. Sabbá.  
 SEL - 7 = Supermercado Eldorado - São Paulo.

### Referências bibliográficas

- Basappa, S. C.; Jayaraman, A.; Sreenivasamurthy, V. - 1967. Effect of B. group vitamins and ethyl alcohol on aflatoxins productions by *Aspergillus flavus*. *Indian. J. Exp. Biol.*, 5: 262 - 263.
- Butalao-Jaime, J. - 1982. A case-control dietary study of primary liver cancer risk from aflatoxin exposure. *Int. J. Epidemiol.*, 11: 112 - 119.
- Coomes, T. J. & Feuell, A. J. - 1965. Recommended procedures for the detection and estimation of aflatoxin B1 in groundnuts and groundnut material. *Trop. Prod. Inst. Resp.*, 13:
- Difco Laboratories - 1974. **Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures.** 9. (ed. Detroit).
- Dolleary, F. G. & Gardner, H. K. Jr. - 1966. **Inactivation and removal of aflatoxins.** In: National Peanut Research Conference, 4 Tifton, Ga, July 14 - 15.
- Franca, E. P.; Fiszman, M.; Lobão, N.; Ribeiro, C. C.; Trindade, H. A.; Santos, P. L.;

- & Batista, D. - 1967. Radiotividade das castanhas do Pará. In: **Simpósio Sobre a Biota Amazônica**, Atas. v. 4. p. 187 - 208.
- Gelda, C. S. & Luyt, L. J. - 1977. Survey of total aflatoxin content in peanuts, peanut butter, and othr foodstuffs. **Ann. Nutr. Aliment.**, 31: 477 - 483.
- Hueck, K. - 1972. **As florestas da América do Sul: ecologia, composição e importância econômica**. Tradução de Hans Heichart. São Paulo, Pligono; Brasília, ed. Univ. de Brasília.
- Jones, B. D. - 1972. **Methods of aflatoxins analysis**. London, Tropical Products Institute (TPI Report, G 70). 58 p.
- Lee, W. V. - 1965. Quantitative determination of aflatoxin in groundnut product. **Analyst.**, 90(1070): 305 - 307.
- Lira, M. B. - 1976. A castanha da *Bertholletia excelsa* e a aflatoxicose. In: **Congresso de Toxicologia Tropical**. 1., Manaus. Anais. p. 153 - 155.
- Monier-Williams, G. W. - 1949. Trace elements in food. New York, J. Wiley.
- Nabney, J. & Nesbitt, B. F. - 1965. A espectrophotometric method for determining the aflatoxins. **Analyst**, 90: 155 - 160.
- Nilsson, G. - 1974. Aflatoxin in nuts. **Vor Joda**, 26: 56 - 62.
- Peers, F. G. & Linsell, C. A. - 1977. Dietary aflatoxins and human primary liver cancer. **Ann. Nutr. Aliment.**, 31: 1006 - 1018.
- Pons, W. A. Jr.; Cucullu, A. F.; Lee, L. S.; Robertson, J. A.; Franz, A. O.; Goldblatt, L. A. - 1966. Determination of aflatoxins in agricultural products: use of aqueous acetona for extraction. **J. Assoc. Offic. Anal. Chem.**, 49: 555 - 562.
- Schuller, P. L.; Verhülsoonk, C. A. H.; Paulsch, W. E. - 1973. Analysis of aflatoxin M1 in liquid an powdered milk. **Pure Appl. Chem.**, 35: 291 - 296.
- Suryanarayana Rao, K. & Tulpule, P. G. - 1967. Varietal differences of groundnuts in the production of aflatoxin. **Nature**, 214(5089): 738 - 739.
- Tropical Products Institute - 1962. **Aflatoxin in groundnuts and groundnut products: interpretation of physica-chemical and biological test results**. London, T.P.I.
- Yndestad, M. & Underdal B. - 1975. Aflatoxin in goods on the Norwegian markets. **Noad. Veterinaarmed.**, 27: 48 - 8.
- Yokoya, F.; Antunes, A. J.; Jordão, B. A. - 1970. Deterioração da castanha do Pará. I. Armazenamento das amêndoas. **Rev. Bras. Tecnol.**, 1: 17 - 21.
- Yokoya, F.; Antunes, A. J.; Jordão, B. A. - 1971. Deterioração da castanha do Pará. II. Armazenamento das Castanhas. **Rev. Bras. Tecnol.**,

(Aceito para publicação em 14.03.198 )