

AFLATOXINAS EM ALIMENTOS COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL DE 1985 a 1995.

Saulo Cardoso SILVA
João Nascimento de OLIVEIRA
Eloisa Dutra CALDAS*

RIALA 6/814

S.C. SILVA, J.N. OLIVEIRA, E.D. CALDAS, Aflatoxinas em Alimentos Comercializados no Distrito Federal de 1985 a 1995. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 56 (2):47-52, 1996.

RESUMO: Amostras de alimentos comercializados no Distrito Federal no período de 1985 a 1995 foram analisadas quanto ao teor de aflatoxinas B₁ e G₁. Das 681 amostras, 450 foram amendoim e produtos de amendoim, 117 castanhas diversas, 28 feijão, 19 arroz e produtos de arroz, 16 trigo e produtos de trigo, 9 milho e produtos de milho, entre outros. Apenas amendoim e produtos de amendoim e uma única amostra de castanha do pará, apresentaram contaminação por aflatoxinas. Das amostras positivas de amendoim e seus produtos (19,8%), 39,3% apresentaram teores de aflatoxinas B₁ + G₁ acima do limite permitido pela legislação brasileira (30 µg/kg), sendo que o maior teor foi encontrado em amostras de amendoim cru (600 µg/kg). Estes valores estão abaixo dos níveis de contaminação reportados nas regiões sul e sudeste do país, principais regiões produtoras de grãos e fornecedoras de alimentos industrializados ao Distrito Federal.

DESCRIPTORIOS: aflatoxinas, cromatografia de camada delgada, amendoim, castanhas, feijão, trigo, arroz, milho.

INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que provocam uma resposta tóxica quando ingeridos pelo homem ou animais em baixa concentração¹. Aproximadamente 350-400 micotoxinas produzidas por mais de 350 espécies de fungos já foram identificadas, e de longe, as aflatoxinas são as micotoxinas mais estudadas, tanto no Brasil quanto no resto do mundo. Descrita primeiramente nos anos 60 após a morte de perus jovens na Inglaterra, depois de se alimentarem com farelo de amendoim proveniente do Brasil, as aflatoxinas se tornaram desde então uma preocupação maior como contaminante de alimentos e ração no mundo todo. Aflatoxina B₁ (AFB₁) é considerada a substância natural mais tóxica que se conhece², e a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer colocou AFB₁ na sua lista de prováveis carcinogênicos humano. Além de carcinogênica, AFB₁ é mutagênica e teratogênica. Incidência de câncer de fígado e mortalidade têm sido relacionados com contaminação de alimentos por aflatoxinas em vários países do mundo^{3, 21, 22}. Recentemente, 13 crianças morreram na Malásia devida a um surto de encefalopatia hepática aguda causado pela presença de aflatoxinas em alimentos⁵.

O Brasil regula a presença de aflatoxinas em alimentos desde 1976⁴, com limite máximo permitido de

30 µg/kg (AFB₁ + AFG₁). Recentemente, o Grupo Mercado Comum (MERCOSUL), através da Resolução nº 56/94, estabeleceu limite máximo de 20 µg/kg para as quatro aflatoxinas (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂), valor comparável aos limites em outros países. Essa resolução já foi internalizada pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (Portaria nº 183, de 21/03/96) e o Ministério da Saúde deverá fazer o mesmo ainda no ano de 1997².

Em 1993, Sabino & Rodriguez-Amaya¹³ revisaram os artigos publicados em pesquisa de micotoxinas no Brasil, principalmente aflatoxinas, no período de 1961 a 1991. Dos 92 trabalhos publicados, 42 (45,6%) tratavam da incidência de micotoxinas em alimentos e ração, sendo que a grande maioria dos dados se referiam a estudos conduzidos no estado de São Paulo (3 em Minas Gerais, 1 em Goiás, 2 no Rio Grande do Sul, 2 no Paraná, 1 no Espírito Santo e 1 em Santa Catarina). Como os próprios autores realçaram, estes dados não são representativos da situação dos níveis de micotoxinas nos alimentos consumidos pelos brasileiros. Desde 1991, outros trabalhos reportando a incidência de micotoxinas em alimentos no país foram publicados, porém, novamente as amostras eram originárias da região sul e sudeste^{6, 13}.

O Instituto de Saúde do Distrito Federal (ISDF) iniciou o trabalho de monitoramento dos níveis de

*a quem correspondência deve ser enviada

AFB₁ e AFG₁ em alimentos consumidos na área do DF em 1985, através do Programa de Vigilância Sanitária (PVS). Nesse programa, amostras fiscais são coletadas aleatoriamente pelo Departamento de Fiscalização e Saúde do DF no comércio local e trazidas ao laboratório para análise. Além deste programa, o laboratório tem atendido também à denúncias de consumidores e a análises de orientação encaminhadas pela comunidade. Este trabalho reporta os resultados obtidos nos dez anos de existência do Laboratório de Micotoxinas do ISDF no que diz respeito à análise de AFB₁ e AFG₁ em alimentos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes. Todos os solventes e reagentes empregados foram grau P.A. As placas para cromatografia camada delgada (250 µm) foram preparadas no laboratório segundo o procedimento descrito por Stahl¹⁹, utilizando sílica gel 60 G (E. Merck, Darmstadt). Os padrões de AFB₁ e AFG₁ (5,0 e 3,6 ng/mL, respectivamente), preparados em benzeno: acetoneitrila 9:1, foram gentilmente cedidos pela Dra. Myrna Sabino, do Instituto Adolfo Lutz, SP.

Amostras. Foram analisadas 681 amostras, coletadas pelo Departamento de Fiscalização de Saúde do DF no comércio local do Distrito Federal ou trazidas pela comunidade para análise de orientação, durante o período de janeiro de 1985 a dezembro 1995. Foram elas: amendoim cru e produtos de amendoim (450); castanhas (117); feijão (28); arroz e produtos de arroz (19); trigo e produtos de trigo (16); ração animal (11); milho e produtos de milho (9) e outros alimentos diversos. 1 kg de amostra foi coletada, homogeneizada e aproximadamente 500 g foram trituradas utilizando um liquidificador comum; 30 ou 50 gramas, dependendo do método empregado, foram retiradas para análise.

Extração das aflatoxinas B₁ e G₁. Dois métodos foram empregados. De 1985 a 1991 foi utilizado o método recomendado pelo Instituto Adolfo Lutz⁹ (método I). Resumidamente, as aflatoxinas foram extraídas de 30 gramas da amostra com 100 mL de clorofórmio, o extrato filtrado, evaporado e dissolvido em metanol. As gorduras foram extraídas em n-hexano e as toxinas reextraídas em clorofórmio. A partir de 1991, o procedimento descrito por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA¹⁸ (método II) passou a ser utilizado pelo laboratório, principalmente devido à sua maior simplicidade comparado com o anterior. O método envolve extração de 50 g de amostra com solução de metanol: KCl 4% (9:1) e clean-up com agentes clarificantes sulfato de cobre ou sulfato de amônio e celite (Hyflo Super-Cel), seguido por duas partições com clorofórmio. Em ambos os métodos, o extrato em clorofórmio foi evaporado e ressuspensionado em 1 mL de clorofórmio imediatamente antes da aplicação em camada delgada.

Identificação e quantificação por cromatografia camada delgada. Inicialmente, 20 µL da amostra juntamente com 5 e 10 ng de aflatoxinas foram aplicados na placa cromatográfica e esta desenvolvida em cloroformio:acetona (9:1). Aos spots fluorescentes foi

colocado uma gota de H₂SO₄ 25% para confirmar a ausência de aflatoxinas. Amostras supostamente positivas foram reaplicadas e desenvolvidas em um segundo sistema de solvente (tolueno:acetato de etila:ácido fórmico 5:4:1) para confirmação. Quantificação das aflatoxinas foi feita por comparação visual da intensidade da fluorescência dos spots da amostra com padrões de AFB₁ e AFG₁, aplicados em incremento de massa de 30% (5 pontos). Os limites de detecção das aflatoxinas em camada delgada para os métodos de extração I e II (descritos anteriormente) foram 3,2 e 2 µg/kg, respectivamente. Amostras analisadas por ambos os métodos não apresentaram resultados significativamente diferentes (p>0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra o número de amostras analisadas, positivas e condenadas segundo a legislação brasileira vigente⁴ (>30 µg/kg para AFB₁ + AFG₁) pelo Laboratório de Micotoxinas do ISDF durante os dez anos do estudo. Logo que o Laboratório iniciou suas atividades, o número de amostras analisadas se manteve em mais de 100 por ano (média 111/ano), caindo consideravelmente durante os anos de 1988 a 1991 (média 28/ano) e a partir daí mantendo-se ao nível de 58/ano. A porcentagem de amostras positivas para AFB₁ e/ou AFG₁ durante este período variou entre 5,4% (1987) a 23,9 (1992). O maior número de amostras contendo níveis de AFB₁ + AFG₁ acima de 30 µg/kg foi encontrado em 1988 (12,1% das amostras analisadas) sendo que em alguns anos (1989, 1991, 1993 e 1995) nenhuma amostra analisada pelo laboratório apresentou níveis de aflatoxinas acima dos limites permitidos pela legislação.

A Tabela 1 mostra os tipos de alimentos analisados pelo laboratório nesse período. É sabido que o amendoim é o principal substrato do *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, produtores das aflatoxinas²². Durante o período do estudo, o amendoim e seus produtos foram os alimentos mais frequentemente analisados pelo laboratório, compreendendo 66% das amostras. Com exceção de uma amostra de castanha do Pará, analisada em 1985 e contendo 1200 µg/kg de AFB₁, a presença de aflatoxinas somente foi detectada em amendoins e seus produtos. O nível de contaminação média encontrada nesses produtos (19,8%) é relativamente baixo comparado com outros estudos realizados no Brasil, em épocas variadas. Sabino et alii¹⁶ reportaram que 42% das amostras de amendoim e produtos derivados analisados na cidade de São Paulo no período de 1980 a 1987 continham aflatoxinas. Em Belo Horizonte, 61% das amostras de amendoim analisadas entre 1983 e 1988 apresentaram contaminação por aflatoxinas¹². Mais recentemente, porcentagem similares de contaminação foram reportados no sul do país¹³ e em São Paulo⁶.

Apesar de vários estudos no Brasil mostrarem níveis de contaminação por aflatoxinas em amendoim e derivados a níveis superiores a 10.000 µg/kg^{13, 15}, os valores máximos encontrados nas amostras analisadas nesse estudo foram 600 µg/kg para amendoim cru, 260 µg/kg para amendoim confeitado, 500 µg/kg para paçoca e 330 µg/kg para amendoim torrado. Apenas 7,8% do

total das amostras analisadas apresentaram níveis de aflatoxinas superiores ao permitido pela legislação vigente (Tabela 1), representando 39,3% das amostras positivas. Oliveira et alii¹⁰ encontraram 34,6% das amostras de amendoim e produtos comercializados em Goiânia com níveis de contaminação por aflatoxinas acima do limite permitido pela legislação brasileira.

Durante o ano de 1992 e parte de 1993, o Laboratório desenvolveu um trabalho específico com paçocas de amendoim. As paçocas são alimentos de grande consumo pelo público infante juvenil, comercializadas na maioria das vezes em cantinas escolares e por vendedores ambulantes nas proximidades de escolas do DF. Das 77 amostras analisadas, 25% apresentaram teores de aflatoxinas ($B_1 + G_1$) em níveis que variaram de 3 a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sendo que 37% destas apresentaram teores acima do limite máximo tolerado (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Esta porcentagem de amostras de paçoca contaminadas por aflatoxinas (25%) também é inferior aos resultados encontrados em outros estudos realizados no Brasil. Sabino et alii¹⁴ encontraram 50% das amostras de paçocas comercializadas em São Paulo contaminadas por aflatoxinas e estudos semelhantes realizados posteriormente apresentaram até 60% de amostras contaminadas¹⁵.

Aflatoxinas têm sido encontradas em vários outros alimentos no Brasil e no mundo, como feijão, milho e seus produtos, trigo e seus produtos, entre outros^{1, 13, 16, 20}. Porém, entre os alimentos analisados neste estudo (Tabela 1), além de uma única amostra de castanha do Pará, aflatoxinas foram detectadas apenas em amostras de amendoim e seus produtos, com frequência e níveis de contaminação bem inferiores aos reportados em outras regiões do país. O Distrito Federal não é uma região produtora de grãos, e importa grande parte dos alimentos processados das regiões sul e sudeste do país. Os resultados aqui reportados podem sugerir que os produtos comercializados no DF apresentam qualidade satisfatória, no que se refere à contaminação por aflatoxinas. Por outro lado, o número relativamente pequeno de amostras analisadas durante o período do estudo (média de 68 amostras/ano) pode ter levado à resultados que não

correspondam à realidade da situação de contaminação dos alimentos por aflatoxinas no DF.

A maior preocupação a nível de saúde pública no que se refere às micotoxinas são seus efeitos crônicos, que não podem ser detectados a curto prazo. Doll & Petto⁷ estimaram que aproximadamente 35% de toda mortalidade por câncer nos Estados Unidos está relacionado com a dieta, e as micotoxinas têm papel importante e reconhecido nas etiologias de vários tipos de câncer. Um trabalho persistente no controle de aflatoxinas e outras micotoxinas em alimentos é de extrema importância para os órgãos responsáveis de saúde no sentido de se estabelecer normas e prioridades e garantir um alimento seguro e de qualidade à população. Apesar de no Brasil existir trabalhos isolados no controle de aflatoxinas em alimentos, ainda se faz necessário um programa coordenado entre os estados para que se possa avaliar de maneira definitiva o problema de contaminação alimentar por aflatoxinas a nível nacional.

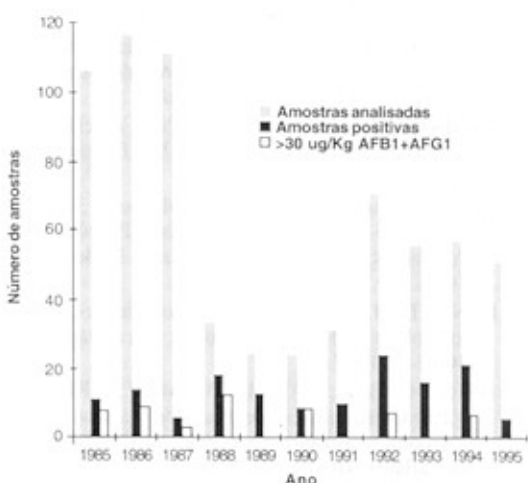


Fig. 1. Amostras analisadas no Distrito Federal quanto a presença de aflatoxinas, no período de 1985 a 1995.

TABELA 1

Aflatoxinas $B_1 + G_1$ em alimentos comercializados no Distrito Federal de 1985 a 1995

Produto	Amostras analisadas	Não detectadas	<10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10-30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	>30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	% amostras positivas
amendoim e produtos de amendoim ¹	450	361	19	35	35	19,8
castanhas ²	117	116	n.d.	n.d.	1	0,01
feijão	28	28	n.d.	n.d.	n.d.	0
arroz ³ e produtos de arroz ⁴	19	19	n.d.	n.d.	n.d.	0
trigo e produtos de trigo ⁵	16	16	n.d.	n.d.	n.d.	0
ração	11	11	n.d.	n.d.	n.d.	0
milho e produtos de milho ⁶	9	9	n.d.	n.d.	n.d.	0
outros ⁷	31	31	n.d.	n.d.	n.d.	0
Total	681	575	19	35	36	12,9

1. Amendoim confeitado, salgado e/ou torrado, paçoca, balas, doces, pé de moleque, creme de amendoim; 2. Nozes, castanha do pará, aveia, amêndoas e castanha de caju; 3. Com casca, sem casca, parbolizado; 4. Farinha e farelo; 5. Farelo, farinha, gérmen e fibra; 6. Fubá, farinha e creme de milho; 7. Café (9), soja (2), achocolatados (10), doce (1), mistura de cereais (7), farinha de aveia (1), pó de mandioca (1). n.d. = abaixo do limite de detecção.

S.C. SILVA, J.N. OLIVEIRA, E.D. CALDAS, Aflatoxinas em Alimentos Comercializados no Distrito Federal de 1985 a 1995. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (2):49-52, 1996

ABSTRACT: Food samples comercialized in the Federal District area from 1985 to 1995 were analysed for aflatoxins B₁ and G₁. From the 681 samples, 450 were peanuts and peanuts products, 117 nuts, 28 beans, 19 rice and rice products, 16 wheat and wheat products, 9 corn and corn products, among others. Contamination by aflatoxins was found in peanuts and peanut products and in one sample of Brazil nut. From the positive peanut and peanut product samples (19,8%), 39,3% had levels of aflatoxins B₁ + G₁ higher than the maximum limit allowed by the Brazilian legislation (30 µg/kg), being the highest level found in one sample of raw peanuts (600 µg/kg). These results are below the ones found in samples from the south and southeast regions of Brasil, main grain producer regions and source of the manufactured food comercialized in the Federal District.

DESCRIPTORS: aflatoxin, thin layer chromatography, peanuts, nuts, wheat, corn, rice.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDELHAMID, A.M. Occurrence of some mycotoxins (aflatoxin, ochratoxin A, citrinin, zearalenone and vomitoxin) in various Egyptian feeds. *Arch. Tierernähr.*, **40**:647-664, 1990.
2. ALBUQUERQUE, M. L. S. Divisão de Alimentos, Departamento Técnico Normativo do Ministério da Saúde. *Comunicação pessoal*.
3. ARMSTRONG, B. The epidemiology of cancer in the People's Republic of China. *Int. J. Epidemiol.*, **9**:305-315, 1980.
4. BRASIL. Leis, decretos, etc.- Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. *Diário Oficial, Brasília*, 19 de janeiro 1977. Sec. I pt. I, p. 710.
5. BENNETT, J.W. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. *Mycopathologia*, **100**:3-5, 1987.
6. BRIGIDO, B.M.; BADOLATO, M.L.C.; FREITAS, V.P.S. Contaminação de amendoim e seus produtos comercializados na região de Campinas-SP, por aflatoxinas durante o ano de 1994. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **55**:85-90, 1995.
7. DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**:1191-1308, 1981.
8. LYE, M.S.; GHAZALI, A.A.; MOHAN, J.; ALWIN, N.; NAIR, R.C. An outbreak of acute hepatic encephalopathy due to severe aflatoxicosis in Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**:68-72, 1995.
9. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 3º ed., São Paulo, IMESP, 1985, Vol.1, p. 432.
10. OLIVEIRA, V.; MESQUITA, A.J.; SERAFINI, A.B.; RIBEIRO, J.L.; SILVA, M.R.L. Ocorrência de aflatoxinas B₁ e G₁ em amendoim comercializado em Goiânia-Go, Brasil. *Rev. Microbiol.* **22**:319-322, 1991.
11. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Micotoxinas. In: Criterios de salud ambiental 11. OPAS/OMS, 1983, p.1.
12. PRADO, G.; MATTOS, S.V.M.; PEREIRA, E.C. Níveis de aflatoxinas em alguns alimentos consumidos em Belo Horizonte no período de 1983 a 1988. *Ci. Tecnol. Alimentos*, **9**:138-147, 1989.
13. ROSA, C.A.R. Ocorrência de micotoxinas em produtos vegetais e animais. In: A Importância do Monitoramento dos Níveis de Contaminação dos Alimentos por Micotoxinas. Seminário promovido pelo Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal/Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasília, setembro 1996.
14. SABINO M.; INOMATA, E.I.; LAMARDO, L. C. A. Variação dos níveis de aflatoxina B em pasta de amendoim e paçoca consumidos no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **42**:39-44, 1982.
15. SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Mycotoxin research in Brazil. *Ciência e Cultura*, **45**:359-571, 1993.
16. SABINO, M.; ZORZETTO, M.A.; PEDROSO, M.A.; 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**:41-44, 1989.
17. SARGEANT, K.; SHERIDAN, A.; ORELLY, J.; CARNAGHAN, R.B.A. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, **192**:1096-1097, 1961.
18. 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. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**:22-26, 1989.
19. STAHL, E. Dunnschicht-Chromatographie. C. Desaga GmbH, Heidelberg, Germany. Manual de preparação de placas para cromatografia camada fina.
20. SUTABHAHA, S.; SUTAJIT, M., NIYOMCA, P. Studies of aflatoxins in Chiang Mai, Thailand. *Kitasato-Arch. Exp. Med.*, **65**:45-52, 1992.
21. VAN RENSBURG, S.J. Epidemiologic and dietary evidence for a specific nutritional predisposition to esophageal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **67**:243-251, 1981.
22. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Mycotoxins. In: Environmental Health Criteria 11. Geneva, WHO, 1979, p.127.
23. WOGAN, G.N. Dietary factors and special epidemiological situations of liver cancer in Thailand and Africa. *Cancer Res.*, **35**:499-3502, 1975.