

## ESTUDO DA AFLATOXINA NO AMENDOIM, DA COLHEITA À INDUSTRIALIZAÇÃO, NA REGIÃO DE FERNANDÓPOLIS, S.P.\*

HOMERO FONSECA \*\*

### RESUMO

Neste trabalho foi investigada, na região de Fernandópolis, SP, a incidência de aflatoxina no amendoim (*Arachis hypogaea* L.) em três estágios de seu ciclo de industrialização: a) ao ser entregue à fábrica, Épocas I e II; b) durante o seu armazenamento, Épocas III e IV e c) após a extração do óleo (farelo), Épocas V e VI. Em cada estágio foram feitas duas coletas de 10 amostras cada, num total de 40 amostras de amendoim e 20 de farelo.

Dos resultados pôde-se concluir que: 1) De todas as amostras apenas uma estava livre de aflatoxina; 2) o nível, em termos de aflatoxina B<sub>1</sub>, foi elevado, com 51,7% na categoria de toxidez "Alta" e 38,3% na categoria "Muito Alta"; 3) Os níveis cresceram da Época I até a Época IV, média de 0,54 até 2,14 ppm, decrescendo nas Épocas V e VI (farelo), média de 1,04 ppm; 4) Cinco amostras estavam excessivamente tóxicas, com mais de 10,00 ppm; 5) o lavrador entrega amendoim já tóxico e com elevada umidade à fábrica; 6) A indústria, por não promover secagem da matéria-prima com elevada umidade, contribui para a elevação dos níveis de aflatoxina.

### INTRODUÇÃO

Quando em 1960, cerca de 100.000 peruzinhos morreram nas granjas inglesas, atribuiu-se a causa a uma doença nova, batizada por BLOUNT (1961) de "doença "X" dos perus". Após intensas investigações verificou-se que o fator comum a todos os surtos era o uso de ração contendo torta de amendoim. ALLCROFT *et alii* (1961) demonstraram que a causa das mortes era uma toxina presente na torta de amendoim. SARGEANT *et alii* (1961) demonstraram ser o *Aspergillus flavus* o produtor da toxina, quando crescia sobre o amendoim após a colheita, tendo então recebido o nome de aflatoxina. Posteriormente constatou-se que a aflatoxina compunha-se, na realidade, de quatro substâncias que

\* Entregue para publicação em 10/12/1976

\*\* Departamento de Tecnologia Rural

apresentavam fluorescências azuis e esverdeadas tendo sido denominadas aquelas de B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e estas de G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (HARTLEY, 1963). Hoje sabe-se que aquele fungo produz outros metabólitos, alguns dos quais tóxicos (ALLCROFT *et alii*, 1966).

Investigações posteriores mostraram que o *A. flavus* produzia aflatoxina sobre inúmeros outros substratos tais como soja, feijão, sementes de algodão e de trigo (RICHMOND *et alii*, 1962), milho (AUST *et alii*, 1963), arroz (SHOTWELL *et alii*, 1966), mandioca (NARTEY, 1966), entre outros. Verificou-se também que a aflatoxina não estava restrita a determinadas áreas mas sim ocorria em praticamente todas as partes do globo. Foram relatadas ocorrências na Nigéria (Mc DONALD e HARKNESS, 1963), África do Sul (SELLSCHOP *et alii*, 1965), na Rodésia (BUSHNELL, 1965), no Brasil (TANGO *et alii*, 1967 e FONSECA, 1968) e em muitos outros.

Muitos autores pesquisaram a influência das práticas pós-colheita e das condições do tempo na produção da aflatoxina no amendoim. Dentre eles devemos citar os trabalhos de Mc DONALD e A'BROOK (1963), BAMPTON (1963), AUSTWICK e AYERST (1963), BURRELL *et alii* (1964) e ASHWORTH *et alii* (1965). Estes estudos levaram à conclusão de que no amendoim recém-colhido não há ocorrência de aflatoxina, a não ser que o mesmo tenha sido danificado de alguma maneira; que uma secagem adequada conduz à produção de amendoim praticamente isento de aflatoxina; que o excesso de chuvas na colheita pode levar à produção de elevado teor da toxina e que o armazenamento do amendoim ainda com teor de umidade elevado ou o reumidecimento do amendoim estocado geralmente leva à produção de elevados teores de aflatoxina.

Em virtude da importância deste problema para o país, resolvemos levar adiante nossos estudos procurando conhecer qual estágio da agro-indústria do amendoim, dentro das condições prevalecentes em nosso Estado, em que havia maior incidência da aflatoxina: se com o lavrador — desde a colheita até o momento da entrega do amendoim à fábrica — ou se nas mãos da indústria — durante o armazenamento da matéria-prima — e até o sub-produto, que pode ser torta ou farelo.

A região escolhida para esta investigação foi a Araraquarense, pelo fato de, em pesquisa anterior (FONSECA, 1968), ter apresentado níveis de aflatoxina mais elevados que em outras regiões, como também por ter sido constatada uma incidência mais elevada das aflatoxinas G.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado neste trabalho constou de amostras de amendoim em casca e farelo de amendoim da safra das águas de 1967/68

coletadas na fábrica de óleo localizada no município de Fernandópolis. A fábrica e as práticas agrícolas da região em que está situada tem as seguintes características predominantes: a fábrica tem capacidade de processamento de 45 toneladas diárias de amendoim em casca. O armazenamento é feito ensacado, e no geral satisfatório, à exceção da parcela que aguarda o imediato processamento e que fica num galpão coberto apenas na parte superior estando as laterais sujeitas à chuva. A colheita do amendoim é feita arrancando-o com o auxílio de sulcadores e dispondo-o horizontalmente na leira até tomar alguns dias de sol, após o que é batido e ensacado. Alguns lavradores usam, após a colheita, batê-lo e secá-lo em terreiros, revolvendo-o várias vezes por dia à maneira do café. Se chover, o amendoim é juntado e coberto com encerados.

As seis amostragens foram feitas nas seguintes datas:

Época I: 15/2/1968 (amendoim em casca)  
Época II: 7/3/1968 (amendoim em casca)  
Época III: 27/3/1968 (amendoim em casca)  
Época IV: 10/4/1968 (amendoim em casca)  
Época V: 3/5/1968 (farelo de amendoim)  
Época VI: 21/5/1968 (farelo de amendoim)

Em cada Época foram coletadas 10 amostras e numeradas, pela ordem de recolhimento, de 1 a 10 dando um total geral de 60 amostras. Nas Épocas I e II as 10 amostras foram retiradas de 10 caminhões diferentes, à medida de sua chegada à fábrica. De cada um deles foi retirada uma amostra média, representando no mínimo 10 sacos. Estas duas Épocas estão compreendidas no Estágio 1.

Nas Épocas III e IV as amostras foram tomadas da matéria-prima estocada nos armazéns tendo-se o cuidado de retirar parcelas do maior número de sacos possível. Estas duas Épocas constituem o Estágio 2.

Nas Épocas V e VI foi utilizado o mesmo critério anterior, porém, foram colhidas amostras de farelo de amendoim. Estas duas Épocas compõem o Estágio 3.

Cada amostra de amendoim em casca foi constituída aproximadamente de 5 kg e as de farelo, entre 2 e 3 kg. As amostras foram descascadas e as amêndoastrituradas em máquina de moer carne, bem homogeneizadas e peneiradas em peneira de crivo de 1680 micra (10 "mesh") e a seguir desengorduradas em extrator de Soxhlet por 8 horas. Os farelos foram triturados em moinho de discos e peneirados.

A toxina foi extraída de acordo com o método de LEE (1965) e dosada pelo método de COOMES e FEUELL (1965). As amostras foram analisadas em triplicata e os resultados expressam a média obtida nas três determinações.

Para enquadramento das amostras quanto à sua toxidez foi utilizada a tabela do TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE (1962) e que está baseada nos efeitos de testes biológicos com marrequinhas de um dia (QUADRO I);

QUADRO I — Relação entre concentração de aflatoxina B<sub>1</sub> e toxidez.

NÍVEL DE AFLATOXINA B <sub>1</sub>	CATEGORIA DE TOXIDEZ
Abaixo de 0,05 ppm	Baixa ou negativa
Entre 0,05 e 0,25 ppm	Média
Entre 0,25 e 1,00 ppm	Alta
Acima de 1,00 ppm	Muito Alta

A unidade das amostras foi determinada em balanças do tipo ULTRA X, com raios infra-vermelhos.

Para a análise da variância dos resultados, em termos da aflatoxina B<sub>1</sub>, foram tomados em cada amostra os valores encontrados para a aflatoxina B<sub>1</sub> somados à metade dos valores de G<sub>1</sub>, visto que esta tem cerca de 50% da toxidez de B<sub>1</sub> (CARNAGHAN *et alii*, 1963). Estas variáveis (y) foram transformadas em  $\log_{10} (y + 1)$ , de acordo com SNEDECOR (1956) e STEEL e TORRIE (1960) pois os valores encontrados eram de magnitudes muito diferentes e incluíam também valores iguais a zero.

Foi efetuado também um estudo da evolução do teor de aflatoxina nas amostras em função do tempo, por meio de regressão. A Soma dos Quadrados (S.Q.), para tempo, foi desdobrada num componente linear, num componente de 2.º grau e em desvios de regressão. Paralelamente foram estimadas as constantes de uma equação de regressão do tipo:

$$\log_{10} (y+1) = a + bx + cx^2 \text{ (SNEDECOR, 1956)}$$

onde x = n.º de dias a partir do início das coletas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> encontram-se nos QUADROS II e III, os da unidade no QUADRO IV e os das análises estatísticas nos QUADROS V, VI e VII.

QUADRO II — Teor das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> nas amostras de amendoim e farelo de amendoim nas diversas épocas (expresso em ppm)

Amostra	Época I		Época II		Época III		Época IV		Época V		Época VI	
	B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	G <sub>1</sub>
1	0,08	0,0	15,00	0,28	0,75	0,28	0,02	0,01	1,75	0,12	0,30	0,12
2	0,75	0,0	0,30	0,03	0,30	0,03	0,75	0,01	0,75	0,12	0,30	0,12
3	0,02	0,0	3,75	0,01	15,00	0,66	7,50	2,81	1,75	0,12	1,75	0,12
4	0,30	0,12	3,75	1,41	7,50	2,81	7,50	0,0	0,75	0,12	1,75	0,12
5	0,08	0,0	0,30	0,01	0,30	0,03	0,30	0,28	0,75	0,12	0,75	0,12
6	0,75	0,12	0,75	0,12	3,75	0,01	0,75	0,01	0,30	0,01	0,75	0,12
7	0,0	0,0	0,30	0,03	0,30	0,03	15,00	0,01	0,75	0,01	0,75	0,12
8	3,75	1,41	0,75	0,12	1,75	0,28	0,08	0,01	0,75	0,12	0,30	0,12
9	0,30	0,28	0,75	0,28	0,30	0,12	7,50	0,0	0,75	0,12	1,75	0,12
10	0,30	0,12	0,75	0,28	1,75	0,28	0,30	0,01	1,75	0,12	1,75	0,12

QUADRO III — Médias parciais e geral da aflatoxina (B<sub>1</sub> + ½ G<sub>1</sub>) por Épocas e por Estágios (expressas em ppm).

ÉPOCA						Média Geral
I	II	III	IV	V	VI	
0,54	1,63	1,98	2,14	1,04	1,04	1,33
ESTÁGIO 1 1,02		ESTÁGIO 2 2,06		ESTÁGIO 3 1,04		

QUADRO IV — Teor de umidade das amostras (expressa em percentagem).

Amostra	ÉPOCA					
	I	II	III	IV	V	VI
1	12,4	13,4	8,9	7,1	7,2	8,7
2	12,0	6,9	7,8	7,9	7,2	8,4
3	10,0	8,4	9,2	8,7	7,6	7,9
4	14,1	13,0	8,4	9,2	5,2	8,2
5	8,6	10,2	8,8	7,4	8,8	8,0
6	19,1	9,4	8,9	8,2	9,0	8,5
7	11,4	11,8	9,4	9,8	8,2	6,5
8	14,2	10,9	7,9	7,5	9,0	6,8
9	10,4	9,9	9,2	7,9	8,7	8,0
10	13,3	9,7	10,1	8,4	7,5	6,4

QUADRO V — Distribuição das amostras por níveis de aflatoxina ( $B_1 + \frac{1}{2} G_1$ ) e respectivas categorias de toxidez, em números absolutos (n) e percentagens..

NÍVEIS (ppm)	n	%	CATEGORIA DE TOXIDEZ
0,0 — 0,05	3	5,00	Baixa ou Negativa
0,05 — 0,25	3	5,00	Média
0,25 — 1,00	31	51,67	Alta
1,00 — 2,50	11	18,33	Muito Alta
2,50 — 5,00	3	5,00	
5,00 — 10,00	4	6,67	
Acima de 10,00	5	8,33	
TOTAL	60	100,00	

QUADRO VI — Valores de F obtidos na análise da variância.

Tratamento	Graus de Liberdade	F
Épocas	(5)	1,51
E. Estágios	2	2,31 **
D. Estágio 1	1	2,91 **
D. Estágio 2	1	0,03
D. Estágio 3	1	0,00

\*\* Significância ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO VII — Valores de F referentes à aplicação de regressão no estudo do efeito de Época.

Graus de Liberdade	Tratamento	F
Épocas	(5)	1,51
Linear	1	0,11
Quadrático	1	6,82 **
Desvio Regressão	3	0,64
Resíduo	54	—

\*\* Significância ao nível de 1% de probabilidade.

Pelos resultados pode-se observar que apenas uma mostra estava isenta e que outras duas, representando 3,33% do total, apresentaram níveis baixos. A grande maioria das amostras (90%) enquadrou-se nas categorias de toxidez “Alta” (51,67%) e “Muito Alta” (38,33%) (QUADRO V). Saliente-se ainda que cinco amostras continham mais de 10,00 ppm de aflatoxina, teor excessivamente elevado.

O nível de aflatoxina cresceu da Época I até a Época IV: de 0,54 até 2,14 ppm, decrescendo nas Épocas V e VI: 1,04 ppm em ambas (QUADRO III). A média geral foi de 1,33 ppm.

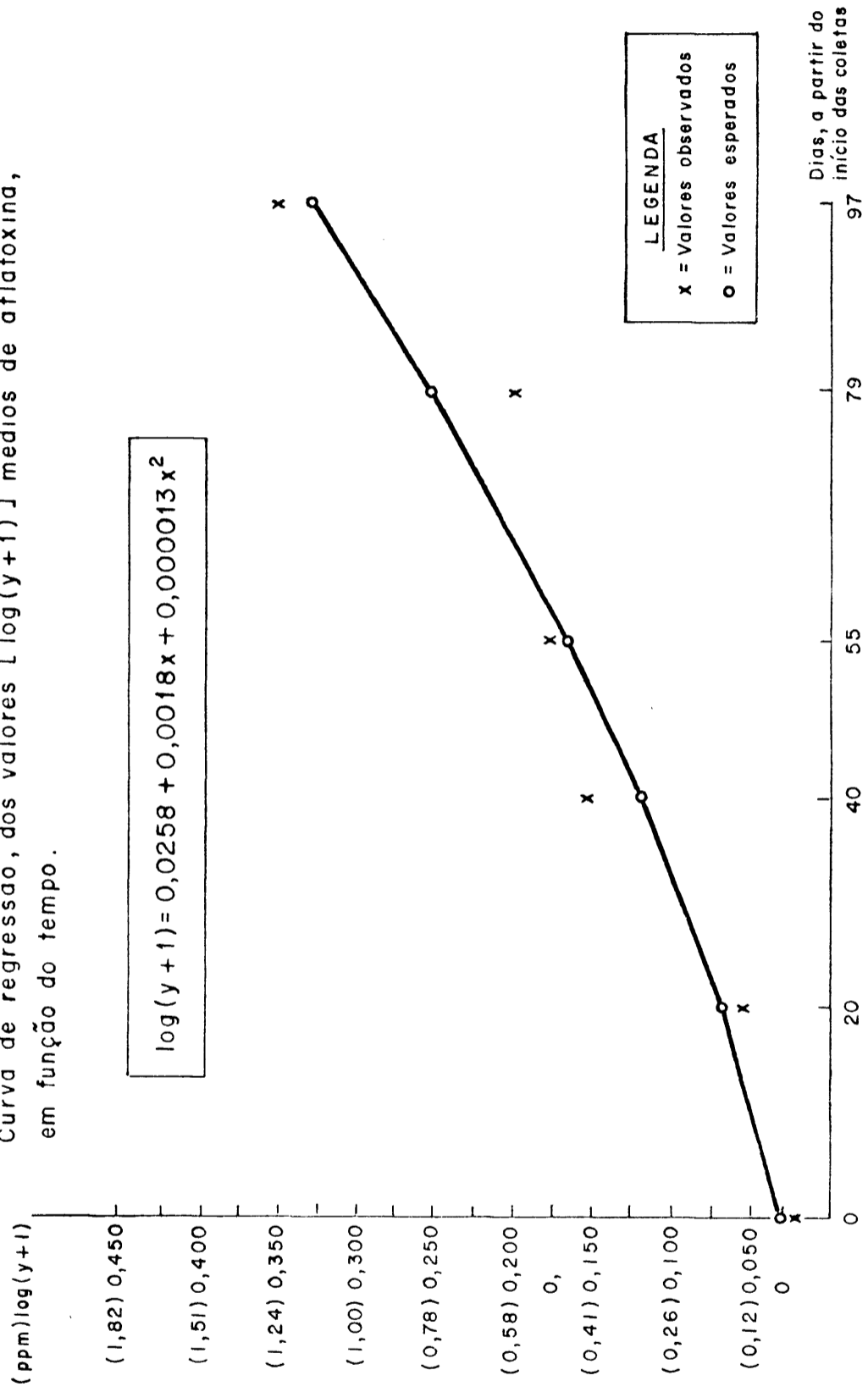
Como pode-se observar as amostras da Época II já entraram na fábrica com um nível elevado de aflatoxina (média de 1,63 ppm) mas as amostras armazenadas à espera da prensagem apresentaram níveis ainda elevados significando, a nosso ver, que o teor de umidade acima do limite seguro (11%) que grande número de amostras apresentaram nas Épocas I e II, dando condições de crescimento ao *A. flavus* deve ter contribuído para o aumento do teor de aflatoxina nas Épocas III e IV. A indústria, por sua vez, não proporciona secagem do material úmido antes de armazená-lo.

O farelo (Épocas V e VI) apresentou níveis mais baixos e mais homogêneos de aflatoxina. Este nível mais baixo pode talvez ser atribuído à degradação térmica parcial durante o processamento quando, imediatamente antes da prensagem, o material é aquecido a quase 100°C.

A análise estatística revela que a variação entre as Épocas não foi significativa mas que entre os Estágios e dentro do Estágio 1 houve diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade. Dentro dos outros Estágios não houve diferença significativa.

O estudo da variação da aflatoxina, empregando-se regressão, revelou que a variação entre as Épocas também não foi significativa, porém, a pequena variação registrada teve tendência para curva, com um valor

FIGURA - 1  
 Curva de regressão, dos valores [  $\log(y+1)$  ] médios de aflatoxina,  
 em função do tempo.





de F', para o efeito quadrático, significativo ao nível de 1% de probabilidade, enquadrando-se numa equação de segundo grau, do tipo da parábola. A curva de regressão correspondente é a da FIG. 1. O desvio da regressão não foi significativo o que indica que a equação foi adequada.

## CONCLUSÃO

Dos resultados obtidos e dentro do âmbito deste trabalho, pôde-se chegar às seguintes conclusões:

1) De todas as amostras analisadas apenas uma estava livre de aflatoxina.

2) O nível, em termos de aflatoxina B<sub>1</sub>, foi elevado, com 51,7% na categoria de toxidez "Alta" e 38,3% na categoria "Muito Alta";

3) Os níveis de aflatoxina cresceram da Época I até a Época IV (médias de 0,54 até 2,14 ppm) decrescendo nas Épocas V e VI (farelo, média de 1,04 ppm em ambas).

4) Cinco amostras estavam excessivamente tóxicas com mais de 10,00 ppm.

5) O lavrador entrega amendoim já tóxico e com elevada umidade à fábrica.

6) A indústria, por não promover secagem da matéria-prima com elevada umidade, contribui para a elevação dos níveis de aflatoxina.

## SUMMARY

### STUDY OF AFLATOXIN IN PEANUTS, FROM HARVEST TO INDUSTRIALIZATION, IN THE REGION OF FERNANDÓPOLIS, S.P.

In the present work the occurrence of aflatoxin in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in the region of Fernandópolis, S.P., was investigated in three Stages, from harvest to industrialization: a) by the time the grower sells it to the oil mill: Epochs I and II; b) during its storage prior to milling: Epochs III and IV, and c) after oil extraction (peanut flour): Epochs V and VI. In each Stage two collections, of 10 samples each, were made in a total of 40 samples of peanuts and 20 samples of peanut flour.

From the results the following conclusions could be drawn: 1) all samples were toxic, except one; 2) the toxicity level in terms aflatoxin B<sub>1</sub> was high, for 51.7% of the samples were in the category "High" and 38.3% in the category "Very High"; 3) the levels of aflatoxin in the samples grew from Epoch I to Epoch IV: mean values of 0.54 to 2.14 ppm, decreasing in Epoch V and VI: 1.04 ppm; 4) Five samples were excessively toxic with more than 10.00 ppm; 5) aflatoxin and high moisture content are present in most raw material when the grower takes it to the oil mill; 6) the miller does not take action to dry the moist material, contributing, this way, to permit an increase in the aflatoxin levels, during storage.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPESP pelo auxílio financeiro concedido e ao Prof. Roland Vencovsky pela orientação recebida na execução das análises estatísticas.

## LITERATURA CITADA

- ALLCROFT, R.B.; A. CARNAGHAN; K. SARGEANT e J.O'KELLY, 1961. A toxic factor in Brazilian groundnut meal. *Vet. Rec.* **74** (31):863-4.
- ALLCROFT, R.; H. ROGERS; G. LEWIS; J. NABNEY e P.E. BEST, 1966. Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the "milk toxin". *Nature*, **209**:154-5.
- ASHWORTH Jr.; L.J.; H.W. SCHROEDER e B.C. LANGLEY, 1965. Aflatoxins: environmental factors governing occurrence in Spanish peanut. *Science*, **148**:1228-1299.
- AUST, S.D.; J.L. ALBRIGHT; R.E. OLSEN; J.H. BYERS e H.P. BROQUIST, 1963. Observations on moldy corn toxicosis. *J. Anim. Sci.* **22**:831-2.
- AUSTWICK, P.K.C. e G. AYERST, 1963. Toxic products in groundnuts. *Chem. Ind. (Lond)*, **2**:55-61.
- BAMPTON, S.S., 1963. Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in groundnuts. Part I. *Trop. Sci.* **5** (2):74-81.
- BLOUNT, W.P., 1961. Turkey "X" disease. *Turkeys*, **9**(2):52-67.
- BURRELL, N.J., J.K. GRUNDEY e C. HARKNESS, 1964. Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in groundnuts. Part V. *Trop. Sci.* **6** (2):74-90.
- BUSHNELL, D.G., 1965. The incidence of aflatoxin in the Rhodesian groundnut crop. *Rhod. Agric. J.*, **62** (5):94-96, 98.
- CARNAGHAN, R.B.A., R.D. HARTLEY e J. O'KELLY. 1963 — Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. *Nature*, **200**:1101.
- COOMES, T.J. e A.J. FEUELL, 1965 — Recommended procedures for the detection and estimation of aflatoxin B<sub>1</sub> in groundnuts and groundnut materials. Tropical Products Institute Report G 13, Londres.
- 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". ESALQ/USP, Piracicaba, 65 p. Tese de Doutorado.
- HARTLEY, R.D., B.F. NESBITT e J. OKELLY, 1963 — Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, **198**:1056-8.
- LEE, W.V., 1965 — Quantitative determination of aflatoxin in groundnut products. *Analyst*, **90**:305-7.
- Mc DONALD, D. e J. A'BROOK, 1963 — Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in groundnuts. Part III. *Trop. Sci.*, **5**(4):208-14.
- Mc DONALD, D. e C. HARKNESS, 1963 — Growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in groundnuts. Part. II. *Trop. Sci.*, **5**(3):143-154.

- NARTEY, F., 1966 — Aflatoxins of *Aspergillus flavus* grown on cassava. *Physiol. Plantarum*, **19**(31):818-22.
- RICHMOND, J.W., N. SUTCLIFFE, N.W.R. DANIELS, P.W. RUSSEL-EGGIT e J.B.M. COPOCK, 1962 — Factors other than groundnut relating to Turkey "X" disease. *Vet. Rec.*, **74**(18):544-5.
- SARGEANT, K., A. SHERIDAN, J. O'KELLY e R.B.A. CARNAGHAN, 1961 — Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, **192**:1096-7.
- SELLSCHOP, J.P.F., N.P.J. KRIEK e J.C.G. du PREEZ, 1965 — Distribution and degree of occurrence of aflatoxin in groundnuts and groundnut products, Symp. Mycotoxins Foodstuffs, Agric. Aspect, Febr. 1965, Pretoria South Africa: 9-17.
- SHOTWELL, O.L., C.W. HESSELTINE, R.D. STUBBLEFIELD e W.G. SORENSON, 1966 — Production of aflatoxin in rice *Appl. Microbiol.* **14**(3):425-8.
- SNEDECOR, G.W., 1956 — "*Statistical Methods*", 5.<sup>a</sup> ed. the Iowa State College Press, Ames, Ia. 534 pp.
- STEEL, R.G.D. e J.H. TORRIE, 1960 — *Principles and Procedures of Statistics*. McGraw-Hill Book Co., N. York, 481 pp.
- TANGO, J.S., T.J.B. MENEZES e C.G. TEIXEIRA, 1967 — Levantamento da ocorrência da aflatoxina em sementes de amendoim, nas safras das águas e da seca de 1965. XIX Reunião Anual da S.B.P.C., Rio de Janeiro, R.J.
- 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, Londres.

