

OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM CASTANHAS DO PARÁ (*Bertholletia excelsa*, HUMB. & BONPL., 1808). (\*)

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 BI médio (0,1 ppm) e muito elevado (2,25 ppm) e, em GI, 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 (ourigo, 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: CIE X (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, qua-  
lidade 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 gran-  
de 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 Micoto-  
xinas (PMC - Micotoxinas), São Paulo, procedente do "Agriculture Research" de New Orleans,  
Louisiana, 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 (tama-  
nho), 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 elítico (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 aspensão 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. Sabbã (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 afíndos, 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 ethy lalcohol 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. Recomendated 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).
- Dollear, 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 Bio-ta 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 Reichart. 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.; Verbülsoonk, 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 )