

FUNGOS E MICOTOXINAS EM CASTANHA DO BRASIL

BEATRIZ T. IAMANAKA¹; CAROLINA RUIZ²; THAIANE O. CALDERARI³; MARTA HIROMI TANIWAKI⁴

Nº 0901006

Resumo

Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) é um dos produtos de exportação mais importantes da floresta Amazônica e o Brasil é responsável por 75% do mercado desse produto. Um dos maiores problemas da produção de castanha do Brasil são os altos níveis de contaminação por fungos aflatoxigênicos e aflatoxinas. Os objetivos deste trabalho foram validar um método confiável para aflatoxinas neste produto e analisar a presença de aflatoxinas. Até o momento 13 amostras de castanha do Brasil do Estado do Amazonas (8) e de estabelecimentos comerciais da região de Campinas (5) foram analisadas. O método de análise de aflatoxinas foi validado obtendo-se valores de recuperação para aflatoxinas totais de 83,6%, 85,7% e 86,3% para os níveis de 0,50; 5,0 e 15 µg/Kg, respectivamente. O limite de detecção obtido foi de 0,03µg/Kg e o de quantificação de 0,2µg/Kg. A média de contaminação por aflatoxinas em geral foi baixa, com maiores níveis nas amostras do Amazonas, com média de 1,75µg/Kg (ND-2,73µg/Kg) e menores nas amostras comerciais de Campinas, com média de 0,06µg/Kg (ND-0,2µg/Kg).

Abstract

Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*) in one of the most important exportation product in Amazon forest and Brazil supplies 75% of this world market. One of the main problems in Brazil nut production is the high contamination by aflatoxigenic fungi and aflatoxins. The objectives of this work were validate a reliable methodology for aflatoxins in this product and analyze the presence of aflatoxins. Up to now, 13 Brazil nut samples from Amazon state (8) and commercial samples from Campinas region (5) were analyzed.

¹Orientador: Pesquisador Microbiologia/CCQA, Campinas/SP, e-mail: beatriz@ital.sp.gov.br

²Bolsista: Graduando PUC, Campinas/SP

³Colaborador: Estagiária Microbiologia/CCQA, Campinas/SP

⁴Colaborador: Pesquisador Microbiologia/CCQA, Campinas/SP

The methodology for aflatoxin evaluation was validated, obtaining recovery values for total aflatoxins of 83,6%, 85,7% and 86,3% for 0.50; 5.0 and 15.0µg/Kg levels, respectively. The detection limit found was 0.03µg/Kg and the quantification limit was 0.2µg/Kg. The aflatoxins contamination average was low with higher levels on Amazon samples, with average of 1.75µg/Kg (ND-2.73µg/Kg) and lower levels on commercial Campinas samples, with average of 0.06µg/Kg (ND-0.2µg/Kg).

Introdução

A castanha-do-Brasil pertence à família *Lecythidaceae*; gênero: *Bertholletia*; espécie: *excelsa*, também é conhecida como castanha-do-Pará e castanha-da-Amazônia. Compreende 325 tipos de árvores nos trópicos americanos e por isso é considerada a “rainha” da Floresta Amazônica pela beleza e esplendor que apresenta (PACHECO; SCUSSEL 2006).

A castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), é uma das mais importantes espécies de exploração extrativa da floresta Amazônica. O Brasil produz anualmente cerca de 26.000 toneladas de castanhas do Brasil, sendo predominante a exportação do produto “in natura”. Em 2004, o Brasil exportou 9.643 toneladas, com receita de US\$ 12,6 milhões. O Brasil é o segundo produtor mundial depois da Bolívia, com 38% da produção, sendo os estados do Acre, Amapá, Pará, Amazonas, Rondônia e Roraima os que englobam mais de 90 % da produção nacional. Desta forma, a castanha do Brasil é um produto de elevada importância para a economia dos Estados da Amazônia brasileira sendo, em alguns destes, o principal produto extrativista de exportação.

Contudo, o produto vem sofrendo restrições nesses mercados devido à contaminação das castanhas por fungos toxigênicos, isto é, produtores de toxinas acima do nível permitido (PINHEIRO, 2004). Em função desses fatores, as exportações do produto vêm despencando nos últimos anos, passando de 51.195 toneladas em 1990, para 26.505 toneladas em 1993, 19.301 toneladas em 1995/96, 17.230 toneladas em 2000 e 6.300 toneladas em 2003 (SIMÕES, 2004).

Esse quadro traz uma grande preocupação com relação à segurança alimentar e a saúde do consumidor em relação à contaminação dos produtos consumidos no Brasil. Eles podem se constituir em grande risco para a saúde da população brasileira que consome a castanha e seus produtos derivados. Além disso, as informações sobre a

contaminação de nossa produção castanheira por fungos produtores de toxinas, como aflatoxinas são insuficientes. No contexto atual em que a globalização da economia é uma realidade, aspectos gerais de qualidade e principalmente higiênico-sanitários são fundamentais na aceitação de qualquer produto, especialmente os destinados à alimentação humana. Nestas condições o presente projeto tem por objetivo investigar a incidência de fungos produtores de aflatoxinas em castanhas do Brasil desde o campo até o produto final, bem como de verificar o nível de contaminação por aflatoxinas neste produto.

Material e Métodos

Amostras

As castanhas foram provenientes do Estado do Amazonas no mês de junho de 2008, e compradas em estabelecimentos comerciais da região de Campinas no mês de setembro de 2008.

Metodologia para análise de aflatoxinas em castanha o Brasil

A metodologia utilizada foi baseada em Stroka et al., 2000. Vinte e cinco gramas de amostra moída foram adicionadas de dois gramas de NaCl e extraídas com 100mL de uma solução de metanol:água (8:2, v/v) em homogeneizador Ultra-Turrax (Polytron, Suíça) a 10.000rpm por 3 minutos. Esta solução homogeneizada foi duplamente filtrada através dos filtros Whatman nº2 e Whatman A-H de microfibra de vidro. Em seguida, 10mL do filtrado foram diluídos em 60mL de PBS e aplicados em colunas de imunoafinidade específicas para aflatoxinas (Aflatest WB-Vicam) com fluxo de 2-3 mL/min e seguindo-se à lavagem da coluna com 30mL de água destilada. As aflatoxinas (AF) foram eluídas com 1250µL de metanol em frasco âmbar e em seguida diluída com água Milli Q até completar 3mL.

Foi utilizado um sistema Shimadzu LC-10VP HPLC system (Shimadzu, Japão) com detector de fluorescência à 362nm de excitação e 455nm de emissão para aflatoxinas G₁ e G₂ e 425nm de emissão para aflatoxinas B₁ e B₂. Uma coluna guarda Shimadzu CLC G-ODS (5µm, 4x10mm) e uma coluna Shimadzu Shimpack ODS (5µm, 4,6x250mm) foram empregadas para separação dos produtos. O sistema estava associado com um reator eletroquímico Kobracell (R-Biopharm) para derivatização pós-coluna das aflatoxinas B₁ e G₁, ligado a uma corrente de 100µA. A fase móvel utilizada foi água:acetonitrila:metanol (6:2:3, v/v/v), adicionada de 119mg de KBr e 350µL de ácido nítrico 4M por litro, em um fluxo de 1mL/min.

Um padrão de aflatoxinas (Sigma) foi utilizado para a construção da curva padrão com

a área dos picos *versus* a concentração ($\mu\text{g/L}$). A concentração das aflatoxinas no extrato da amostra foi determinada pela interpolação da área do pico resultante no gráfico de calibração. O volume de injeção foi de $100\mu\text{L}$.

Para a validação da metodologia foram realizados testes de recuperação e calculados os limites de detecção e quantificação. Para a recuperação das aflatoxinas utilizou-se a metodologia descrita acima, realizando-se a contaminação de uma amostra de castanha isenta da micotoxina nos níveis de 0,5; 5,0; e 15,0 $\mu\text{g/Kg}$ respectivamente de aflatoxinas totais, em triplicata.

Para determinação do limite de detecção (LOD) foram realizadas 8 extrações paralelas e após quantificação foi calculado o desvio padrão entre as mesmas. O limite de detecção foi determinado conforme recomendações do Eurachem Guide (1998), com valor t unilateral de 2,998 para 7 graus de liberdade e com 99% de confiança.

Resultados e Discussão

Neste trabalho foi validada a metodologia para detecção de aflatoxinas nas amostras de castanha do Brasil, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e detector de fluorescência. O método foi inicialmente validado e a Tabela 1 apresenta os resultados obtidos de recuperação para os três níveis testados de 0,5; 5,0 e 15,0 $\mu\text{g/Kg}$.

Tabela 1. Resultados dos ensaios de recuperação de aflatoxinas em castanha do Brasil nos três níveis testados (0,5; 5,0 e 15,0 $\mu\text{g/Kg}$).

Aflatoxinas totais ($\mu\text{g/Kg}$)	Repetições	Recuperação (%)
0,5	1	70,68
	2	84,64
	3	95,53
	Média	83,62
5,0	1	85,81
	2	87,13
	3	84,07
	Média	85,67
15,0	1	89,66
	2	84,87
	3	84,47
	Média	86,33

Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,03 $\mu\text{g/Kg}$ e 0,2 $\mu\text{g/Kg}$ para aflatoxinas totais respectivamente.

Considerando-se os resultados obtidos, a metodologia utilizada para a detecção de aflatoxinas em castanha do Brasil, mostrou-se adequada, permitindo ser utilizada para análise das amostras em estudo.

A Tabela 2 apresenta os resultados de aflatoxinas nas amostras analisadas da região

do Amazonas e de estabelecimentos comerciais em Campinas.

Tabela 2. Níveis de aflatoxinas nas amostras de castanha do Brasil avaliadas.

Nº amostras	Origem	Aflatoxinas (µg/Kg)				
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Total
1	Amazonas	0,59	ND*	1,83	ND*	2,42
2	Amazonas	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
3	Amazonas	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
4	Amazonas	0,39	ND*	2,34	ND*	2,73
5	Amazonas	0,26	ND*	1,95	ND*	2,21
6	Amazonas	0,38	ND*	2,04	ND*	2,42
7	Amazonas	0,25	ND*	1,86	ND*	2,11
8	Amazonas	0,40	ND*	1,69	ND*	2,09
Média						1,75
1	Comércio Campinas	<LD**	ND*	<LD**	ND*	<LD**
2	Comércio Campinas	0,07	ND*	0,02	ND*	0,09
3	Comércio Campinas	<LD**	ND*	<LD**	ND*	<LD**
4	Comércio Campinas	0,17	0,03	ND*	ND*	0,20
5	Comércio Campinas	<LD**	ND*	<LD**	ND*	<LD**
Média						0,06

* Não detectado

** Menor que o limite de detecção do método.

De acordo com a Tabela 2 é possível verificar a maior a contaminação por aflatoxinas nas amostras provenientes da região do Amazonas. Esses resultados estão de acordo com a alta incidência de fungos filamentosos do grupo Flavi isolados dessas amostras e mostrado em trabalho anterior. Não houve uma relação direta entre a porcentagem de infecção fúngica e a presença das aflatoxinas nas amostras da região do Amazonas, já que algumas apresentaram contaminação por aflatoxinas, mas não por fungos. Esse fato por ser explicado pela morte dos fungos ao longo da cadeia produtiva da castanha.

Os níveis de aflatoxinas nas amostras de castanha do Brasil coletados no comércio de Campinas foram mais baixos e esse fato pode ser explicado pelo processamento que essas amostras foram submetidas até chegar ao comércio. Essas amostras já foram secas e apresentaram menor atividade de água, todas estavam descascadas e passaram por um processo de seleção e tratamento nas indústrias de beneficiamento, condições essas responsáveis pela baixa incidência de fungos e aflatoxinas.

CONCLUSÕES

A metodologia de análise de aflatoxinas em castanhas do Brasil utilizando colunas de imunoafinidade e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de fluorescência foi eficiente para detecção e quantificação de aflatoxinas nessa matriz.

A contaminação das amostras de castanha do Brasil analisadas até o momento, em geral foi baixa (máxima de 2,73 µg/Kg). Verificou-se uma maior contaminação das

amostras provenientes do Estado do Amazonas, o que coincidiu com uma maior infecção fúngica. O contrário ocorreu com as amostras de mercado da região de Campinas cuja contaminação por fungos e aflatoxinas foi baixa. A influência do processamento, principalmente a secagem, a retirada de casca e o tratamento térmico pela qual as castanhas são submetidas, são práticas que, quando adotadas, são as responsáveis pela redução na contaminação fúngica e por aflatoxinas

Esse trabalho encontra-se em andamento e novas amostras de diferentes regiões do Amazonas estão sendo avaliadas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro e bolsa PIBIC concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EURACHEM GUIDES, The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 1998

PACHECO A.M; SCUSSEL V.M. *Castanha-do-Brasil – Da floresta tropical ao consumidor*. Florianópolis: Editograf, 2006. 176p.

PINHEIRO, M.R.R. Estudo de Variabilidade Genética de *Aspergillus flavus* como base para o Desenvolvimento de PCR múltiplex para detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha do Brasil e castanha de caju. Brasília, 2004. Disponível em: <http://www.bdt.d.uec.br/tede/tde_arquivos/13>. Acesso em: 19 mar. 2008.

SIMÕES, A.V. “Impactos de tecnologias e do manejo da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*, HUMB & MONPL. 1808) no controle da contaminação por aflatoxina em sua cadeia produtiva”. 2004. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias. Manaus, 2004.

STROKA, J.; ANKLAM, E.; JORISSEN, U.; GILBERT, J. 2000. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-Column Bromination for Determination of Aflatoxins in Peanuts Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder: Collaborative Study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists International, Baltimore, v.83, n.2, p.320-340, 2000.