

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
E DO AMBIENTE**

**CARACTERIZAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E
POR MICOTOXINAS EM DIFERENTES FASES DA
CULTURA DO AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.)
PRODUZIDO NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Michele Hoeltz

Dra. Isa Beatriz Noll
(orientadora)

Porto Alegre, RS, Brasil
Setembro, 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
E DO AMBIENTE**

**CARACTERIZAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E
POR MICOTOXINAS EM DIFERENTES FASES DA
CULTURA DO AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.)
PRODUZIDO NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Michele Hoeltz
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, ênfase em Microbiologia de Alimentos.

Porto Alegre, RS, Brasil
Setembro, 2009

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

H694c Hoeltz, Michele

Caracterização da contaminação fúngica e por micotoxinas em diferentes fases da cultura do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) produzido no Rio Grande do Sul, Brasil /Michele Hoeltz. – 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

Orientação: Prof^a. Isa Beatriz Noll

1. Micotoxinas 2. Fungos 3. *Aspergillus flavus* 4. *Aspergillus niger* 5. Contaminação 6. Amendoim I. Noll, Isa Beatriz, orient. II. Título.

CDU 579.64 (043)

AGRADECIMENTOS

À **Fundação para Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa de doutorado concedida.

Ao **Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA)**, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela estrutura disponibilizada.

À **EMATER/RS – ASCAR** das regiões de Ijuí, Santa Maria e Porto Alegre, pela parceria realizada e pelo interesse neste trabalho.

À amiga e colega **Ms. Juliane Elisa Welke** pela troca importante de experiências e pelo companheirismo dentro e fora do laboratório.

Ao professor **Dr. Horacio Alberto Dottori** pela dedicação ao desenvolvimento do fotômetro e pelos ensinamentos sobre a fotometria fotográfica.

Em especial à professora, orientadora e amiga, **Dra. Isa Beatriz Noll**, pela confiança depositada em mim e por propiciar grandes oportunidades para o meu crescimento pessoal e científico, além da dedicação e do carinho na condução deste trabalho.

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista, em especial,

Aos meus pais, **Hilton e Dirce Hoeltz**,
pelo incentivo constante, confiança e
amor.

A minha querida irmã, **Mirela Hoeltz**,
que sempre posso contar nas horas
mais confusas.

A minha orientadora, **Isa Beatriz Noll**, que mais uma
vez confiou em mim e esteve ao meu lado, me
incentivando e tornando tudo possível.

RESUMO

Caracterização da contaminação fúngica e por micotoxinas em diferentes fases da cultura do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) produzido no Rio Grande do Sul, Brasil

Michele Hoeltz¹, Isa Beatriz Noll²

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que podem contaminar os grãos em diferentes períodos de pré e pós-colheita. O objetivo desse trabalho foi avaliar a contaminação fúngica e por micotoxinas em diferentes períodos do cultivo do amendoim no Rio Grande do Sul, considerando diferentes regiões e cultivares, durante as safras 2006/2007 e 2007/2008 e, ainda, desenvolver um método eficiente de quantificação de aflatoxina B1, baseado na cromatografia em camada delgada com detector de carga acoplada. Foram coletadas nas regiões de Augusto Pestana e Ivorá, amostras dos cultivares Tatu e Paraguaio, em diferentes períodos da cultura: (1) solo pré-plantio, (2) enchimento dos grãos, (3) colheita, (4) pós-secagem e (5) solo pós-colheita. Os fungos contaminantes do solo foram quantificados pela técnica de diluição seriada e nos grãos, o percentual de incidência foi determinado pela técnica de plaqueamento direto. O potencial toxigênico de *Aspergillus* seção *Flavi* e *Aspergillus* seção *Nigri* foi verificado em Agar Coco e Agar Extrato de Levedura Sacarose, respectivamente. Aflatoxina B1 e ocratoxina A foram determinadas por cromatografia em camada delgada com detector de carga acoplada. As espécies predominantes em todas as amostras foram *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* var. *niger*. Entre as espécies de *A. flavus* e *A. parasiticus*, 89,3% e 39,2%, se mostraram produtoras de aflatoxina B1, respectivamente. Nenhum dos isolados de *A. niger* var. *niger* produziu ocratoxina nas condições testadas. Aflatoxina B1 foi detectada em 50% das amostras, com níveis entre 16 µg/Kg e 115 µg/Kg. Ocratoxina A foi detectada em 25% das amostras, com níveis entre 12,2 µg/Kg e 76,9 µg/Kg. Foi observada a ocorrência simultânea das duas micotoxinas em amostras do período pós-colheita. O método desenvolvido para quantificação de aflatoxina B1, baseado em procedimentos de fotometria fotográfica, se mostrou sensível, eficiente e prático, apresentando um limite de detecção de 0,4 ng por mancha, um limite de quantificação de 1,2 µg/kg e média de recuperação de 92%.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia de Alimentos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (122 p.) Agosto, 2009.

²Profa. Dra. Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ABSTRACT

Characterization of fungi and mycotoxins at different stages of peanut culture (*Arachis hypogaea* L.) produced in Rio Grande do Sul, Brazil

Michele Hoeltz¹, Isa Beatriz Noll²

Mycotoxins are secondary metabolites produced by filamentous fungi that can contaminate grains in different stages of pre and postharvest management. The objective of this study was to investigate the occurrence of fungi and mycotoxins at different maturation stages of peanut produced in different regions of south of Brazil during 2006/2007 and 2007/2008 harvests. Moreover, to develop an efficient quantification method of aflatoxin B1, based on thin-layer chromatography and charged coupled device detector. Peanut samples, Tatu and Paraguaio varieties, were obtained in regions of Augusto Pestana and Ivorá, in different stages of cultura: (1) soil before planting, (2) pod filling, (3) at harvest, (4) after drying, (5) soil after harvest. The soil contamination was quantified by serial dilution technique and the fungi incidence on grains was determined by direct planting technique. The toxigenic potential of *Aspergillus* section *Flavi* and *Aspergillus* section *Nigri* was verified in Coco Medium Ágar and Yeast Extract Sucrose agar medium, respectively. Aflatoxin B1 and ochratoxin A were determined by thin-layer chromatography and charged coupled device detector. The predominant species in all samples were *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* var. *niger*. Among the species of *A. flavus* and *A. parasiticus*, 89,3% e 39,2%, produced aflatoxin B1, respectively. None of *A. section Nigri* isolates were ochratoxin A producers in the conditions tested. Aflatoxin B1 was detected in 50% of samples, with levels of 16.0 µg/Kg to 115.0 µg/Kg. Ochratoxin A was detected in 25% of samples, with levels of 12.2 µg/Kg to 76.9 µg/Kg. It was observed the co-occurrence of both mycotoxins in samples of postharvest. The method developed for aflatoxin B1 quantification was sensitive, efficient and practical, with a detection limit of 0.4 ng per spot, a limit of quantification of 1.2 µg/kg and average recovery of 92%.

¹Doctoral thesis in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (122 p.) August, 2009.

² Profª. Dra. Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2 OBJETIVOS.....	04
2.1 Objetivo Geral.....	04
2.2 Objetivos específicos.....	04
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL.....	06
3.1 Cultura do amendoim.....	06
3.2 A produção de amendoim no Rio Grande do Sul.....	08
3.2.1 Características das regiões produtoras de amendoim analisadas na pesquisa.....	09
3.3 Micotoxinas.....	11
3.3.1 Aflatoxinas.....	13
3.3.2 Ocratoxina A.....	15
3.4 Micotoxinas em amendoim e produtos derivados.....	16
3.5 Contaminação fúngica e medidas de controle.....	19
3.6 Legislação Brasileira	23
3.7 Métodos Analíticos	24
4 ARTIGOS	26
ARTIGO 1 - Photometric procedure for quantitative analysis of aflatoxin B1 in peanuts by thin-layer chromatography using charge coupled device detector.....	26
ARTIGO 2 - Occurrence of aflatoxin B ₁ in peanuts and peanut products marketed in south of Brazil.....	47
ARTIGO 3 - <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> e aflatoxina B1 em diferentes estágios da cultura do amendoim no Rio Grande do Sul, Brasil.....	60
ARTIGO 4 - <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> and ochratoxin A in pre- and postharvest of peanut produced in the south of Brazil.....	80
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAIS.....	94
5.1 Contaminação fúngica do solo.....	94
5.2 Contaminação fúngica dos grãos durante a cultura do amendoim.....	98

5.3 Incidência e potencial toxigênico das espécies de <i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i> e <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i>.....	103
5.4 Micotoxinas nas amostras de amendoim.....	108
5.5 Desempenho do método para a quantificação de aflatoxina B1 e ocratoxina A nas amostras de amendoim.....	110
6 CONCLUSÕES	111
7 REFERÊNCIAS.....	113

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Planta de amendoim cultivado na região de Ivorá, RS.....	06
FIGURA 2. Série histórica de produção do amendoim no Brasil entre 1995 e 2008.	08
FIGURA 3. Série histórica de produção do amendoim no Rio Grande do Sul entre 1996 e 2008.	09
FIGURA 4. Localização do Município de Augusto Pestana, Rio Grande do Sul...10	
FIGURA 5. Localização do Município de Ivorá, Rio Grande do Sul.....	11
FIGURA 6. Estrutura química das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂ produzidas por espécies de <i>Aspergillus</i>	14
FIGURA 7. Estrutura química da Ocratoxina A.....	15
FIGURA 8. Desenvolvimento fúngico em grãos de amendoim.....	99
FIGURA 9. Comparação entre as contaminações fúngicas nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Tatu na região de Augusto Pestana, RS.	100
FIGURA 10. Comparação entre as contaminações fúngicas nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Paraguaio na região de Augusto Pestana, RS.	101
FIGURA 11. Comparação entre as contaminações fúngicas nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Tatu na região de Ivorá, RS.	102
FIGURA 12. Comparação entre as contaminações fúngicas nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Paraguaio na região de Ivorá, RS.	103
FIGURA 13. Manchas fluorescentes de aflatoxina B1 em placa cromatográfica produzidas por <i>Aspergillus flavus</i>	104
FIGURA 14. Comparação entre o número de colônias isoladas das espécies de <i>A. seção Flavi</i> e <i>A. seção Nigri</i> nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Tatu na região de Augusto Pestana, RS.	105
FIGURA 15. Comparação entre o número de colônias isoladas das espécies de <i>A. seção Flavi</i> e <i>A. seção Nigri</i> nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Paraguaio na região de Augusto Pestana, RS.....	106

FIGURA 16. Comparação entre o número de colônias isoladas das espécies de *A. seção Flavi* e *A. seção Nigri* nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Tatu na região de Ivorá, RS.107

FIGURA 17. Comparação entre o número de colônias isoladas das espécies de *A. seção Flavi* e *A. seção Nigri* nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Paraguaio na região de Ivorá, RS.107

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. Contaminação fúngica total e percentual de contaminação por *Aspergillus* seções *Flavi* e *Nigri* do solo nas safras de amendoim 2006/2007 e 2007/2008 analisadas em Augusto Pestana/RS.95
- TABELA 2. Contaminação fúngica total e percentual de contaminação por *Aspergillus* seções *Flavi* e *Nigri* do solo nas safras de amendoim 2006/2007 e 2007/2008 analisadas em Ivorá/RS.96
- TABELA 3. Comparação da contaminação total média do solo entre as safras de amendoim 2006/2007 e 2007/2008.96
- TABELA 4. Comparação da contaminação fungica média por *Aspergillus* seções *Flavi* e *Nigri* no solo entre as safras de amendoim 2006/2007 e 2007/2008, sem distinção de região e cultivar.....96
- TABELA 5. Comparação da contaminação total e por *Aspergillus* seções *Flavi* e *Nigri* do solo entre as regiões durante a safra 2006/2007 (cultivares Tatu e Paraguaio).....97
- TABELA 6. Comparação da contaminação total e por *Aspergillus* seções *Flavi* e *Nigri* do solo entre as regiões durante a safra 2007/ 2008 (cultivares Tatu e Paraguaio).98
- TABELA 7. Níveis de aflatoxina B1 e ocratoxina A encontrados nas amostras do cultivar Tatu, região de Augusto Pestana, nos diferentes períodos da cultura do amendoim nas safras 2006/2007 e 2007/2008.108
- TABELA 8. Níveis de aflatoxina B1 e ocratoxina A encontrados nas amostras do cultivar Paraguaio, região de Augusto Pestana, nos diferentes períodos da cultura do amendoim nas safras 2006/2007 e 2007/2008.109
- TABELA 9. Níveis de aflatoxina B1 e ocratoxina A encontrados nas amostras do cultivar Tatu, região de Ivorá, nos diferentes períodos da cultura do amendoim nas safras 2006/2007 e 2007/2008.109
- TABELA 10. Níveis de aflatoxina B1 e ocratoxina A encontrados nas amostras do cultivar Paraguaio, região de Ivorá, nos diferentes períodos da cultura do amendoim nas safras 2006/2007 e 2007/2008.....109

1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, o amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é cultivado, principalmente no sul e no sudeste, destacando-se, em especial, algumas regiões do estado de São Paulo. O Rio Grande do Sul, embora contribua com apenas cerca de 3% da produção nacional dessa oleaginosa, vem procurando ampliar o desenvolvimento dessa cultura como uma alternativa na substituição de monoculturas existentes no Estado.

O amendoim se destaca como um alimento altamente energético, consumido “in natura” e em diferentes produtos por grande parte da população brasileira, além de possuir altos teores de óleo que, da mesma forma, é aproveitado com diferentes finalidades.

A produção de amendoim gera significativa rentabilidade se comparada a outras culturas como a soja, proporcionando uma receita superior ao produtor. Além disso, com produção e oferta contínua de produto de elevada qualidade, o Brasil poderá conquistar importantes fatias do mercado internacional, competindo diretamente com a Argentina, que atualmente, é o maior exportador de amendoim no Hemisfério Sul.

Desde a década de 1960, um dos maiores problemas na cultura dessa oleaginosa é a intensa contaminação fúngica e a consequente presença de substâncias altamente tóxicas para seres humanos e animais, denominadas micotoxinas.

As aflatoxinas, formadas a partir do metabolismo secundário das espécies do gênero *Aspergillus* são consideradas carcinogênicas para os seres humanos, destacando-se na contaminação do amendoim em diferentes etapas dos manejos agrícolas.

Diferentes micotoxinas também podem estar presentes durante o desenvolvimento da cultura, mas ainda são pouco investigadas. A ocratoxina A, por exemplo, vem sendo encontrada em amendoim produzido na Argentina e possui diversas propriedades tóxicas, notavelmente nefrotóxicas, sendo classificada como possível carcinógeno humano.

No Brasil, com regiões de clima tropical a temperado, onde as variações de temperatura e umidade favorecem o desenvolvimento fúngico, os altos níveis de aflatoxinas encontrados em diferentes produtos derivados de amendoim, são bastante preocupantes e, por isso, considerados um problema de saúde pública. Esse fato estimula a pesquisa de maneiras eficientes de minimizar o problema, com base nas boas práticas agrícolas e no levantamento de pontos críticos na produção dessa oleaginosa, com a finalidade de elevar a produção nacional, oferecer um produto de qualidade ao consumo interno e também competitivo ao mercado externo.

No Rio Grande do Sul, a cultura de amendoim é desenvolvida em pequenas propriedades rurais e se destina principalmente ao consumo familiar

e/ou na fabricação de produtos derivados que são comercializados em suas regiões.

São escassas as pesquisas sobre a qualidade micotoxicológica do amendoim produzido no Estado e, por tanto, o perfil da contaminação em relação a fatores bióticos e abióticos não é conhecido.

Nesse contexto, a pesquisa sobre a contaminação fúngica e por micotoxinas na produção de amendoim no Rio Grande do Sul, se faz importante, uma vez que existe o risco da ingestão de produtos contaminados com essas substâncias pela população. Dessa forma, contribui-se para a implementação de sistemas eficientes dos manejos agrícolas, com base nas boas práticas agrícolas sugeridas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, visando, assim, a obtenção de um produto seguro do ponto de vista alimentar, favorecendo a posterior comercialização do amendoim e seus derivados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a contaminação fúngica e por micotoxinas na produção de amendoim em determinadas regiões do Rio Grande do Sul, Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar um levantamento de pontos críticos na produção de amendoim, em relação à contaminação fúngica e por micotoxinas, considerando: o tipo de cultivar, a região (Augusto Pestana e Ivorá) e os manejos pré e pós-colheita empregados.

- Enumerar a contaminação fúngica em amostras dessa oleaginosa coletadas durante os períodos pré e pós-colheita.

- Isolar das amostras espécies dos gêneros *Aspergillus* e detectar o potencial micotoxigênico das espécies identificadas como potencialmente produtoras de micotoxinas.

- Analisar a estrutura populacional de *A. flavus* com base nas suas características macro e microscópicas.

- Pesquisar a presença de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e ocratoxina A nas amostras de amendoim.

- Desenvolver um método de quantificação de aflatoxina B₁ por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com detector de carga acoplada (DCA), empregando técnicas de fotometria fotográfica.
- Determinar aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e ocratoxina A por CCD/DCA.
- Com a análise dos dados da pesquisa e em conformidade com o Regulamento Técnico de Boas Práticas Agrícolas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Portaria nº 65 de 10 de setembro de 2004), procurar contribuir para minimizar a contaminação fúngica e por micotoxinas na produção de amendoim.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

3.1 Cultura do amendoim

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma leguminosa com processo especial de frutificação, denominada geocarpia, em que uma flor aérea, após ser fecundada, produz um fruto subterrâneo. Suas flores são amarelas, agrupadas em número variável ao longo do ramo principal ou também de ramos secundários (Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1987) (Figura1).



FIGURA 1. Planta de amendoim cultivado na região de Ivorá, RS.

É uma planta originária da América do Sul, da região compreendida entre as latitudes de 10º e 30º sul, com provável centro de origem na região de Gran Chaco (Paraguai), incluindo os vales do Rio Paraná e Paraguai. A difusão do amendoim iniciou-se pelos indígenas para as diversas regiões da América Latina, América Central e México. No século XVIII foi introduzido na Europa. No século XIX difundiu-se do Brasil para a África e do Peru para as Filipinas, China, Japão e Índia (Fagundes, 2002).

O amendoim é a quarta maior cultura oleaginosa mundial, sendo que os principais países produtores são China, Índia, Estados Unidos, Nigéria, Indonésia e Senegal (CONAB, 2009).

O Brasil, até o início dos anos 70 do século passado, foi importante produtor de amendoim, ocupando papel expressivo tanto no suprimento interno de óleo vegetal quanto na exportação de subprodutos. A partir de 1974, devido entre outros fatores, à contaminação por aflatoxinas, o preço do produto nos mercados interno e externo caiu, desestimulando o plantio (Suassuna, et al. 2006).

A produção brasileira de amendoim é feita em duas épocas: a primeira, conhecida como safra das águas, representa 75% do volume total e corresponde aos plantios realizados em outubro/novembro, nas regiões Sudeste e Sul; a segunda, chamada de safra da seca, complementa o montante sendo os plantios realizados no mês de março nas regiões Sudeste e Nordeste (Suassuna et al., 2006).

Segundo dados da CONAB (2009), o Brasil vem aumentando consideravelmente a produção de amendoim na última década como pode ser observado na Figura 2.

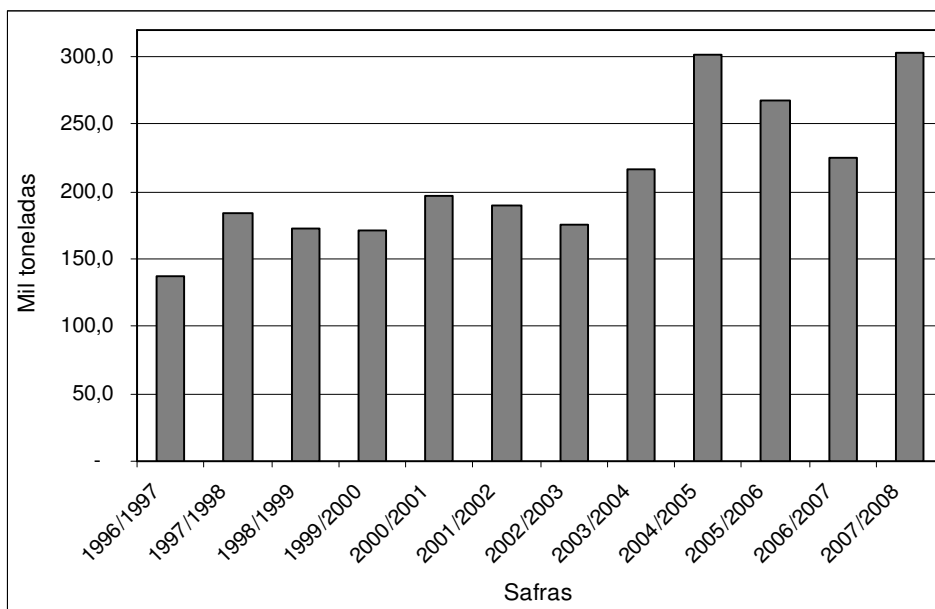


FIGURA 2. Série histórica de produção do amendoim no Brasil entre 1995 e 2008.

Fonte: adaptado da CONAB (2009).

Conforme Fagundes (2002), a importância econômica do amendoim está relacionada ao fato de suas amêndoas possuírem sabor agradável e serem ricas em óleo (aproximadamente 50%) e proteína (22 a 30%). Além disso, contêm carboidratos, sais minerais e vitaminas, constituindo-se em alimento altamente energético (585 calorias/100 gramas de sementes).

3.2 A produção de amendoim no Rio Grande do Sul

O Rio Grande do Sul contribuiu com 3% da produção nacional de amendoim na safra 2006/07 e com cerca de 2,3% na safra 2007/2008, representando aproximadamente 6,85 mil toneladas de amendoim produzidos em cada safra (Figura 3) (CONAB, 2009).

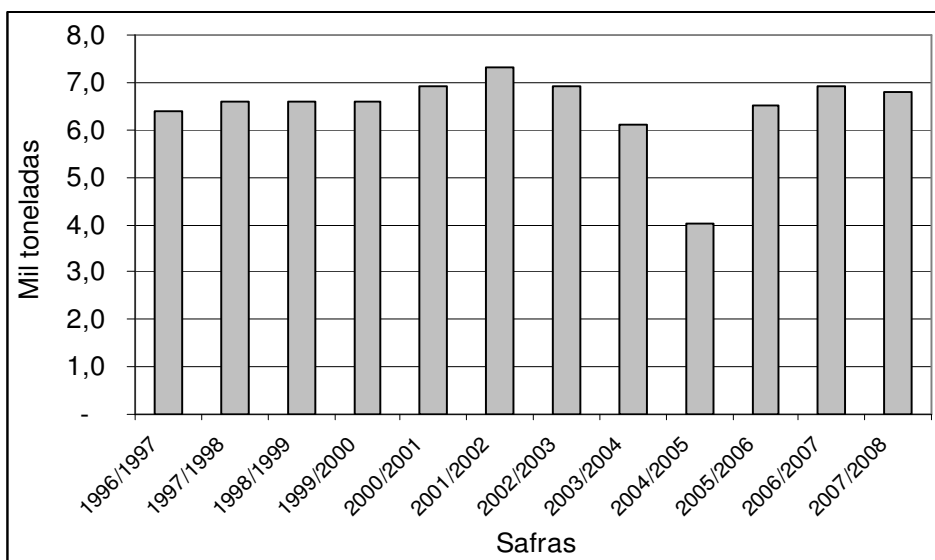


FIGURA 3. Série histórica de produção do amendoim no Rio Grande do Sul entre 1996 e 2008.

Fonte: adaptado da CONAB (2009).

Os municípios gaúchos que produzem amendoim acima de 100 toneladas são: Dom Pedro de Alcântara com 140 toneladas, Santa Clara do Sul com 136 toneladas, Paraíso do Sul com 133 toneladas, Cruzeiro do Sul com 115 toneladas e Canguçu com 108 toneladas (Atlas Sócio-Econômico do Rio Grande do Sul, 2009).

Em outras regiões do Estado, entretanto, a produção dessa oleaginosa é realizada em pequenas propriedades rurais baseada na agricultura familiar, sendo que o produto se destina principalmente ao consumo familiar e/ou na fabricação de produtos derivados que são comercializados em suas regiões (comunicação pessoal).

3.2.1 Características das regiões produtoras de amendoim analisadas na pesquisa

O município de Augusto Pestana localiza-se na zona do Planalto Médio na Região Noroeste do Estado, microrregião de Ijuí, a uma latitude 28°51'07" sul e a uma longitude 53°99'2" oeste, caracterizada por um clima

subtropical úmido (Figura 4). A atividade primária se dedica à produção de grãos como soja, trigo e milho, pecuária leiteira e de corte, piscicultura, hortigranjeiros e floricultura, despontando atualmente o cultivo do fumo, amendoim, alho, cana-de-açúcar parreiras e pepino. O número total é de cerca de 1.784 propriedades rurais, predominando a pequena propriedade com módulo de até 20 hectares (www.pmaugustopestana.com.br).



FIGURA 4. Localização do Município de Augusto Pestana, Rio Grande do Sul.

No município de Augusto Pestana, duas localidades foram escolhidas para serem analisadas nesta pesquisa: Marmeleiro e Ponte Branca. Em Marmeleiro foi analisada uma propriedade rural que destinou 0,6 ha da sua área para a produção de amendoim, com solo do tipo neossolo. Em Ponte Branca, a propriedade escolhida possui solo do tipo latossolo vermelho e destinou 0,25 ha para a cultura do amendoim.

O município de Ivorá localiza-se na mesorregião Centro Ocidental Rio-Grandense, microrregião de Restinga Seca, a uma latitude 29°31'13" sul e a uma longitude 53°34'50" oeste, caracterizada por um clima subtropical (Figura 5)(FAMURS, 2009).



FIGURA 5. Localização do Município de Ivorá, Rio Grande do Sul.

Nesse município foram analisadas propriedades rurais nas localidades de Barreiro e Formigueiro que destinaram 0,6 ha da sua área para a produção de amendoim, com solo do tipo neossolo.

3.3 Micotoxinas

As micotoxinas, contaminantes naturais de produtos e sub-produtos agrícolas, são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies fúngicas e representam atualmente uma das maiores áreas de interesse científico, tanto do ponto de vista social, pelos seus efeitos tóxicos, quanto econômico, por dificultar a exportação e diminuir a produtividade de insumos

agrícolas (Prado, 2001). Entretanto, o desenvolvimento dos fungos não está necessariamente associado com a produção de micotoxinas. O potencial micotoxigênico do fungo depende da cepa, bem como da composição física e química da matriz colonizada pelo fungo e de fatores ambientais (Papp et al., 2002).

Dados sobre a contaminação fúngica e níveis de micotoxinas em produtos agrícolas, alimentos processados e mesmo alimentos de origem animal, são de grande interesse, especialmente em países de clima tropical e subtropical e também aqueles que importam matéria prima para rações (Sabino, 2001). Atualmente já são conhecidas mais de 300 desses metabólitos fúngicos que podem contaminar produtos agrícolas em diferentes fases de produção e são considerados agentes de uma série de doenças em animais (Richard, 2007). Segundo Soares (2001), trata-se, portanto, de um problema de saúde pública uma vez que alimentos e rações contaminados por essas substâncias podem causar sérias intoxicações em seres humanos e em animais.

Na região sul do Brasil, as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de fungos com conseqüente produção de micotoxinas são freqüentes, além de condições precárias de produção, armazenamento e processamento dos grãos, poderem favorecer a contaminação. No caso especial do Rio Grande do Sul, períodos do ano com níveis de umidade acima de 70% e temperaturas oscilantes são comuns (Furlong, 2001).

A qualidade micotoxicológica do amendoim e seus derivados consumidos na região sudeste do Brasil é frequentemente monitorada (Nakai et

al., 2008; Rodriguez-Amaya & Sabino, 2002; Sabino et al., 1999; Sabino et al., 1999; Freitas & Brigido, 1998), mas esses resultados não podem ser generalizados a outros Estados, como o Rio Grande do Sul, onde as condições climáticas durante o cultivo do amendoim são consideravelmente diferentes.

O conhecimento das espécies fúngicas contaminantes pode indicar as micotoxinas potencialmente presentes em um dado alimento, em que condições podem ser produzidas e como podem ser prevenidas (Klich, 2007; Taniwaky, 2001).

3.3.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas foram as primeiras micotoxinas pesquisadas após a morte de mais de 100.000 perus jovens em uma fazenda da Inglaterra. O episódio conhecido como “Turkey disease” foi relacionado ao consumo de farinha de amendoim contaminada, proveniente do Brasil (Goldblat, 1969).

As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 6) são metabólitos secundários produzidos por linhagens toxigênicas de *Aspergillus* seção *Flavi* como *A. flavus* e *A. parasiticus* (Sulaiman et al., 2007; Conzane et al., 2002). Outras espécies produtoras, embora menos comuns, são *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombysis*, *A. parvisclerotigenus*, *A. ochraceoroseus*, *A. rambellii*, *Emericella venezuelensis* e *E. astellata* (Klich, 2007; Frisvad et al., 2005).

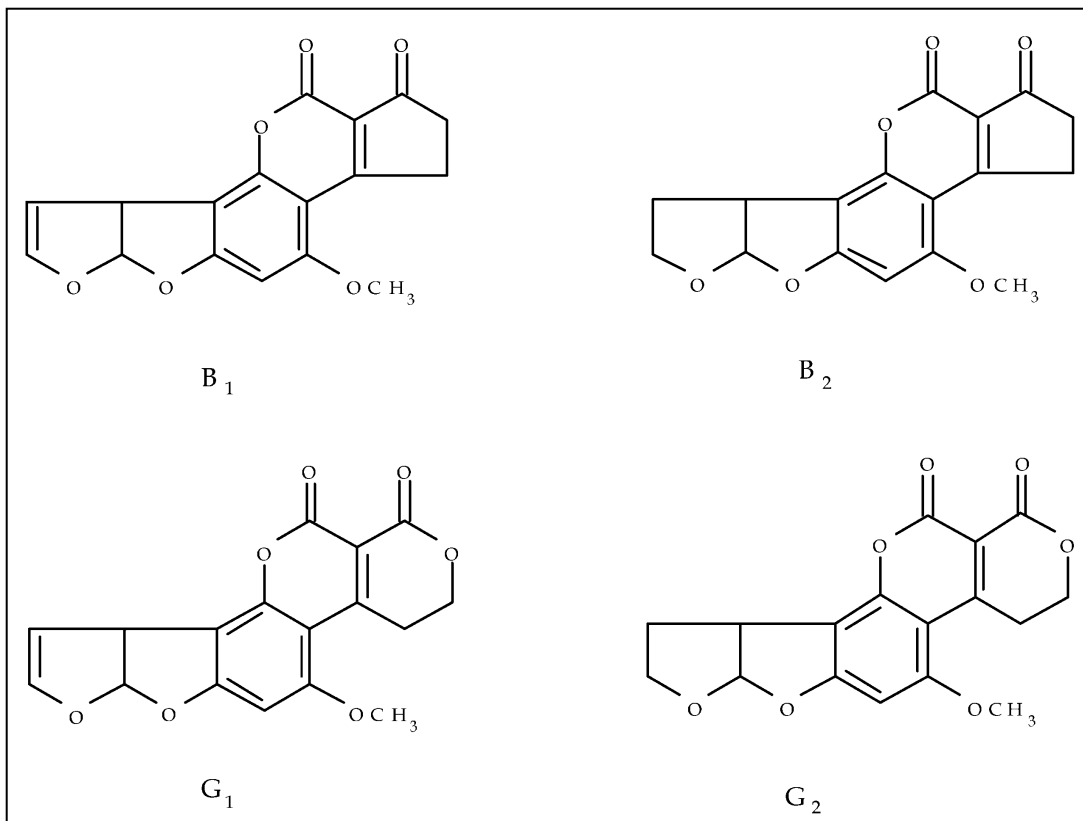


FIGURA 6. Estrutura química das aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 produzidas por espécies de *Aspergillus*.

As aflatoxinas são as micotoxinas mais estudadas mundialmente devido às suas propriedades marcadamente hepatocarcinogênicas e altamente tóxicas (Eizendeher, 2005).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2002), a mistura das aflatoxinas é carcinogênica para humanos (Grupo-1). A aflatoxina B_1 (AFB1) apresenta propriedades hepatotóxicas, teratogênicas e mutagênicas, causando danos como hepatite tóxica, hemorragia, edema, imunossupressão e carcinoma hepático em mamíferos (Nakai et al., 2008).

É incomum que produtos estejam contaminados com as aflatoxinas B_2 , G_1 e G_2 e não com a AFB1, sendo que a soma da concentração desses três primeiros compostos é geralmente menor que a concentração de AFB1. Por

essa razão, a análise de somente este composto (AFB1) parece ser eficiente, suficiente e mais prática (FAO, 2004).

3.3.2 Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) (Figura 7) é uma micotoxina produzida por várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* conhecidas por colonizar um grande número de produtos e é considerada uma preocupação para a saúde humana (Marin-Kuan et al., 2008; Magnoli et al., 2006). Pode ser produzida principalmente por *A. ochraceus* e *P. verrucosum*, mas em países da América do Sul, a presença de cepas de *Aspergillus* da seção *Nigri* (*aspergillus negros*) produtoras de OTA tem sido constantemente relatada (Astoreca et al., 2008; Magnoli et al., 2007; Magnoli et al., 2006, Romero et al., 2005; Rosa et al., 2002).

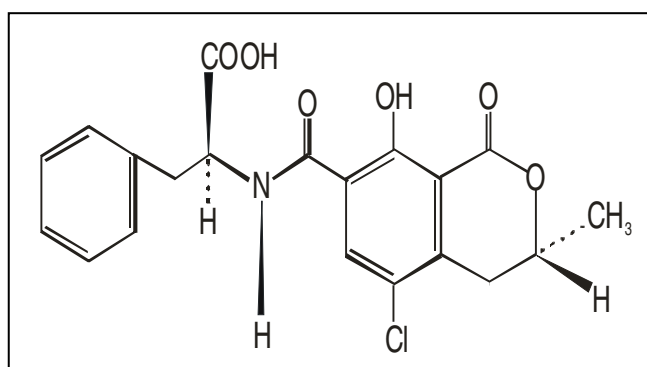


FIGURA 7. Estrutura química da Ocratoxina A.

Esta micotoxina foi associada à nefropatia endêmica dos Bálcãs, doença caracterizada por progressiva redução das funções renais. Em estudos com animais, a OTA tem demonstrado efeitos (Marin-Kuan et al., 2008; Brown et al., 2007), mutagênicos (Palma et al., 2007), teratogênicos (Balasaheb et al., 2007), imunossupressores (Rossiello et al., 2008), genotóxicos (Tozlovanu et

al., 2006) e neurotóxicos (Sava et al., 2006). Em virtude da evidente carcinogenicidade em animais, a OTA está classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer no grupo 2B, como possível carcinógeno humano (IARC, 1993).

OTA tem sido encontrada em diferentes produtos tais como: trigo (Riba et al., 2008), arroz (Nguyen et al., 2007), café (Leong et al., 2007), cerveja (Kawashima et al., 2007), queijo (Dall'Asta et al., 2008), pão (Zinedine et al., 2007), uva (Lasram et al., 2007) e vinhos (Burdaspal & Legarda, 2007).

Poucas pesquisas sobre a ocorrência de OTA em amendoim têm sido realizadas, mas recentemente alguns estudos mostraram a presença dessa micotoxina em sementes de amendoim estocadas na Argentina (Magnoli et al., 2007; Magnoli, et al. 2006).

3.4 Micotoxinas em amendoim e produtos derivados

A contaminação de amendoins ocorre tanto em condições de pré-colheita como na pós-colheita, sendo a concentração de aflatoxinas o maior problema na qualidade desses grãos (Craufurd, 2006).

Conforme Dorner et al. (2003), lotes de amendoins contaminados não devem ser utilizados para o consumo humano e também representam perdas econômicas para as indústrias que utilizam o amendoim “in natura” e seus produtos derivados.

A freqüente ocorrência dessas substâncias em amendoim ocorre, principalmente, em países em desenvolvimento, sendo uma conseqüência de manejos de produção e estocagem inadequados ou ineficientes, além de condições climáticas propícias para o desenvolvimento fúngico (Craufurd et al.,

2006; Hussein & Brasel, 2001; Neal et al., 2001; Sabino et al., 1999; Rustom, 1996).

Em um levantamento sobre a contaminação por aflatoxinas em amostras de amendoins processados e produtos derivados comercializados no Rio Grande do Sul e coletados pela Vigilância Sanitária Estadual entre os anos de 2001 e 2004, foram avaliadas 110 amostras, onde 34,6% das amostras de amendoim processado apresentaram teores de contaminação superior ao permitido pela legislação e 15,5% das amostras de derivados de amendoim apresentaram contaminação superior ao limite (Colvara, 2005).

Freitas (1998), analisando 35 amostras de amendoim, comercializados na cidade de Campinas/SP, encontrou 11 delas contaminadas com aflatoxinas, em níveis entre 304 e 1557 $\mu\text{g/Kg}$, ultrapassando a quantidade máxima permitida pela legislação brasileira.

Analisando 38 amostras de doces de amendoim e 6 de amendoim "in natura", comercializados no estado do Pará, Eizendeher et al. (2005) encontraram contaminação por aflatoxinas em 73,7% das amostras de doce, numa faixa de 25,95 a 350,02 mg/Kg ($B_1 + G_1$). Já no amendoim in natura, 26,30% das amostras apresentaram contaminação com 3420,84 mg/Kg , calculada pela soma das aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 .

Sabino et al. (1999), pesquisando a ocorrência de aflatoxinas em amendoim e derivados, comercializados no estado de São Paulo, nos anos de 1995 a 1997, encontraram níveis de contaminação entre 5,0 e 382,0 $\mu\text{g/Kg}$ para amostras de amendoim "in natura" e níveis entre 6,0 e 494,0 $\mu\text{g/Kg}$ em doces de amendoim. Nakai et al. (2008) estudando a ocorrência de AFB1 em

amostras de amendoim armazenado no estado de São Paulo, encontraram níveis de contaminação entre 7,0 µg/Kg e 116,0 µg/Kg.

Em uma revisão sobre as pesquisas brasileiras sobre micotoxinas nos anos de 1991 a 2000, Rodriguez-Amaya & Sabino (2002) encontraram níveis de contaminação em amendoim e produtos derivados entre 1,0 µg/Kg a 12.999,0 µg/Kg.

Ao analisar 664 amostras de derivados de amendoim no estado do Rio Grande do Sul, entre março de 2000 e abril de 2002, Mallmann et al. (2003) observaram que 31,3% das amostras, sendo a maioria proveniente de produtores informais que comercializam seu produto sem sofrerem fiscalização, apresentavam contaminação por aflatoxinas, com uma média de 92,1 µg/Kg e nível máximo de 5476,0 µg/Kg.

Estima-se que cerca de 35% dos casos de câncer humano estejam diretamente relacionados à dieta, e a presença de aflatoxinas em alimentos é considerada um fator importante na produção de câncer hepático, principalmente em países tropicais (Caldas et al., 2002).

Há poucos trabalhos relatando a presença de Ocratoxina A em amendoim (Astoreca et al., 2008). Magnoli et al. (2006, 2007) analisando a ocorrência de ocratoxina A em amostras de amendoim armazenadas em Córdoba, Argentina, durante os anos de 2006 e 2007, encontraram essa micotoxina em 32% das amostras com níveis entre 0,5 ng/g e 170,0 ng/g.

Os raros trabalhos sobre a presença de ocratoxina A em amendoim mostram a necessidade de mais pesquisas e monitoramento freqüente dos níveis dessa micotoxina uma vez que, indicam a possibilidade de exposição

humana e animal a OTA através da ingestão de amendoim e seus derivados (Magnoli et al. 2007).

3.5 Contaminação fúngica e medidas de controle

O amendoim é reconhecido como um dos principais substratos para a colonização de espécies fúngicas produtoras de micotoxinas. (Juan et al., 2008). Prado et al. (1999), testando amostras de amendoim de quatro genótipos diferentes encontraram os seguintes gêneros fúngicos: *Penicillium* spp. (50%), *Geothrichum* (50%), *Fusarium* spp. (12,5%) e *Cladosporium* (12,5%). Não isolaram o gênero *Aspergillus* em nenhuma das amostras.

Gonçalez et al. (2008) isolaram de sementes de amendoim (variedade Runner IAC 886) produzidas em Junqueirópolis, estado de São Paulo, a seguinte micobiota: fungos não esporulados (36%), *Penicillium* spp. (15%), *Rhizopus* spp. (11%), *Fusarium* spp. (8%), *Phoma* spp. (7%), *Trichoderma* spp. (7%) *Cladosporium* spp. (4%), *A. flavus* (3%), *A. niger* (3%), *A. terreus* (2%) e *Fusarium verticillioides* (1%).

Em amostras de amendoim (variedade Runner IAC 886) armazenadas na cidade de Tupã, estado de São Paulo, Nakai et al. (2008) encontraram *Fusarium* spp. (25,8%), *Aspergillus* spp. (21,8%) sendo as espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. niger* de maior ocorrência e ainda, a presença de outros cinco gêneros fúngicos.

Ao avaliar a contaminação fúngica de grãos de amendoim (cultivar Botucatu) armazenados em câmara seca, Rossetto et al. (2005) encontraram contaminação por *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp.

Pesquisando fungos contaminantes do solo utilizado para o cultivo de amendoim, Craufurd et al. (2006) concluíram que mais de 90% da população fúngica presente era de *A. flavus*, sendo também isoladas outras espécies como *A. niger*, *A. parasiticus*, *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp.

Conforme Rustom (1996), o conteúdo de umidade mínimo necessário para o crescimento de *A. flavus* em amendoim é entre 8 e 10% com uma umidade relativa de 82%, e a para a produção de aflatoxinas o conteúdo de umidade ótimo está na faixa de 15 a 35%. Além disso, a grande contaminação do amendoim pode estar relacionada com o fato do *A. flavus* e *A. parasiticus* serem as espécies dominantes em campos de produção dessa oleaginosa, contaminando o grão durante o seu processo de maturação, principalmente quando cultivado em regiões de clima tropical ou subtropical a temperado (Dorner, 2008).

Gonçalez et al. (2008) isolaram do solo utilizado para o cultivo de amendoim os fungos *Penicillium* spp. (100%), *Fusarium* spp. (84%), *A. terreus* (76%), *Mucor* spp. (28%), fungos não esporulados (20%), *Cladosporium* spp. (16%), *A. flavus* (8%), *A. niger* (8%) e *Trichoderma* spp. (8%). E de amostras do amendoim cultivado isolaram *Fusarium* spp. (26%), *A. flavus* (17%), *A. terreus* (9,5%), *Penicillium* spp. (5%), *Rhizopus* spp. (4%), *A. parasiticus* (2,3%), *Curvularia* spp. (0,9%), *Beltrania* spp. (0,3%), *Mucor* spp. (0,3%), *A. niger* (0,3%) e *F. verticillioides* (0,3%).

O estresse hídrico acompanhado de elevadas temperaturas durante o desenvolvimento das sementes de amendoim promovem a invasão fúngica e a conseqüente contaminação por micotoxinas (Klich, 2007; Dorner, 2002).

Experimentos realizados após 85-100 dias da semeadura de amendoim demonstraram que o estresse hídrico e temperaturas de 29°C aumentam os níveis de colonização fúngica e de aflatoxinas (Cole et al., 1985).

A formação de algumas fitoalexinas é inibida pelo estresse hídrico e em amendoim imaturo, as aflatoxinas não são formadas até que a produção de fitoalexinas cesse durante esse período de estresse (Dorner et al., 1989). Outro fato documentado é em relação aos fungos que normalmente competem com *A. flavus* no solo, sendo que com alta temperatura e umidade competidores comuns como *A. niger* são eliminados (Klich, 2007; Dhingra & Coelho Netto, 1998).

Dados de diferentes áreas geográficas demonstram diferenças regionais na contaminação de amendoim por aflatoxinas e relacionam esse fato à existência de uma grande variabilidade no potencial de produção dessas substâncias por *A. flavus* (Pildain et al., 2004). Isso indica que outros fatores além do cultivo e das práticas agrícolas influenciam a distribuição das populações de *A. flavus* (Klich, 2007).

Segundo Barros et al. (2003, 2006), o conhecimento das características ecofisiológicas das populações de *A. flavus* e *A. parasiticus*, sua diversidade genética e toxigênica pode ser utilizados como uma ferramenta no desenvolvimento de estratégias para o controle da produção de aflatoxinas.

Muitas das práticas que tem sido empregadas para obter a máxima produção e qualidade do amendoim também têm reduzido a susceptibilidade à infecção por *A. flavus* e contaminação por aflatoxinas, tais como: o plantio de cultivares adaptados às regiões, o emprego de fertilização adequada, a

diminuição dos ataques de insetos, o uso de irrigação quando necessário e a colheita feita tão logo atingida a maturidade da cultura. Infelizmente, essas práticas nem sempre são possíveis de serem empregadas e nem sempre são suficientes para prevenir a formação de aflatoxinas (Klich, 2007).

O controle biológico tem se mostrado uma ferramenta promissora para a redução da contaminação de amendoim no pré e pós-colheita, onde reduções nos níveis de aflatoxinas são conseguidas pela aplicação de cepas de *A. flavus* não toxigênicas no solo que excluem competitivamente as cepas toxigênicas presentes (Dorner, 2005; Dorner et al., 2003).

A aplicação de inseticidas durante a produção de amendoim tem reduzido a infecção por *Aspergillus* (Bowen & Mack, 1993), assim como a utilização de amendoim transgênico com o gene Bt (Amézqueta et al., 2008). Mas não há nenhuma cultivar de amendoim totalmente resistente a contaminação por micotoxinas disponível comercialmente (Klich, 2007).

Ainda assim, permanece a preocupação em relação à contaminação do amendoim por aflatoxinas que ocorre durante o armazenamento, normalmente relacionada à inabilidade de manter o produto com um teor de umidade adequado durante o período de estocagem (Dorner, 2002).

Assim como espécies de *Aspergillus* seção *Flavi*, produtoras de aflatoxinas fazem parte da população comum em solos utilizados para o cultivo de amendoim, espécies de *Aspergillus* seção *Nigri*, produtoras de OTA, são encontradas abundantemente no solo e, por isso, isoladas freqüentemente de amendoim (Astoreca et al., 2008; Magnoli et al., 2007; Magnoli et al., 2006).

Pesquisas sobre a contaminação fúngica de amendoim armazenado na Argentina no ano de 2006, mostraram uma incidência de *A. niger* var. *niger* de 89%, seguidas de *A. niger* var. *awamori* (68%) e *A. carbonarius* (4%), sendo 27% desses isolados produtores de OTA (Magnoli et al., 2006). Já no ano de 2007, a contaminação do amendoim por *A. seção Nigri* foi de 100% das amostras, sendo 32% dos isolados produtores de OTA (Magnoli et al., 2007).

Para se alcançar o menor nível de contaminação possível, devem ser combinadas todas as estratégias de controle e prevenção viáveis a fim de assegurar e manter o amendoim seguro enquanto alimento (Dorner, 2008).

3.6 Legislação Brasileira

A legislação brasileira, através do Ministério da Saúde, Resolução RDC nº274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, estabelece o limite máximo de 20 ppb (soma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂) em amendoim e pasta de amendoim (Brasil, 2002).

O Ministério da Agricultura através da Portaria nº183 de 21 de março de 1996, estabelece o limite de 20 ppb (B₁+B₂+G₁+G₂) em alimentos para consumo humano, internacionalizando as normas do Mercosul GMC/RES N° 56/94 (Brasil, 1996).

Em janeiro de 2001, a Associação Brasileira da Indústria do Chocolate, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (ABICAB), iniciou um trabalho chamado Pró-Amendoim, para o monitoramento da presença de aflatoxinas no amendoim processado pela indústria. O principal objetivo desse

programa é controlar a qualidade dos produtos à base de amendoim presentes no mercado, de forma sistemática e metódica (Pró-Amendoim, 2009).

Embora esse projeto tenha alcançado grandes resultados positivos nos últimos anos, ainda existe a preocupação em relação à contaminação de amendoins por parte da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que tem trabalhado de forma conjunta com a indústria para controlar o nível de aflatoxinas no produto, envolvendo atenção especial com o armazenamento, o controle de insetos e roedores, o controle da umidade no produto, entre outras medidas (ANVISA, 2006).

A legislação brasileira não estabelece limites de Ocratoxina A em nenhum tipo de alimento. A União Européia e os Estados Unidos da América propuseram limites máximos dessa micotoxina de 2 µg/kg e 5 µg/kg em cereais, mas não estabeleceram limites para amendoim e seus derivados (Van Egmond, 2004; EC, 2002).

3.7 Métodos Analíticos

A detecção de micotoxinas pode ser realizada por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), testes imuno-enzimáticos (ELISA) ou por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC/MS) (Fu et al., 2008; Gilbert & Anklam, 2002). Embora esses métodos analíticos sejam amplamente utilizados e aceitos para análises, eles trazem algumas desvantagens (Fu et al., 2008; Taniwaki & Silva, 2001).

Em relação à CCD, o principal problema é o fato de ser um método semi-quantitativo, dependendo muito do treinamento do analista. Além disso, faz-se necessário o emprego de uma grande quantidade de solventes, na

maioria das vezes, altamente tóxicos e voláteis (Soares & Rodriguez-Amaya, 1989). A CLAE é um método muito sensível na detecção e quantificação de micotoxinas, mas seu emprego exige aparelhagem complexa e com custo bastante elevado. O emprego de grandes quantidades de solventes também é necessário, bem como a injeção de uma grande quantidade de amostra (Peña, 2005, Stroka & Anklam, 2002). Métodos como ELISA tem a desvantagem da impossibilidade de confirmação definitiva da existência da toxina, além de não ser quantitativo (Fu et al., 2008).

Entre todos os métodos analíticos citados, a CCD é sem dúvida o método mundialmente escolhido para as análises de micotoxinas, sendo especialmente relevante em países em desenvolvimento (Gilbert & Anklam, 2002). Como alternativa às medidas semiquantitativas tradicionais realizadas a olho nu na CCD, outros métodos vem sendo desenvolvidos como a densitometria (Braicu et al., 2008) e a utilização da fotometria fotográfica através da captura de imagens com detectores de carga acoplada (DCA) (Zhang & Lin, 2006; Liang et al. 1996).

As vantagens de um sistema fotométrico é que a sensibilidade dos DCA é muito maior que a do olho, além de que a sua resposta é linear, enquanto que a resposta do olho é logarítmica (lei fisiológica de Fechner). Assim sendo, o DCA permite fazer acumulação da luz, em exposições longas. Em conseqüência, num processo de contagem dos fótons acumulados pelo DCA, podem-se quantificar as medidas realizadas através dos padrões e, assim, calcular os erros inerentes às medidas. Com a realização de várias medidas os erros podem ser determinados com maior precisão (Dottori, 1998).

4 ARTIGOS

ARTIGO 1

Aceito para publicação no periódico: Química Nova

**Photometric procedure for quantitative analysis of aflatoxin B1 in peanuts
by thin-layer chromatography using charge coupled device detector**

**PHOTOMETRIC PROCEDURE FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF
AFLATOXIN B1 IN PEANUTS BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY
USING CHARGE COUPLED DEVICE DETECTOR**

Michele Hoeltz¹, Juliane Elisa Welke, Isa Beatriz Noll

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91570-901, Porto Alegre, RS, Brasil

Horacio Alberto Dottori

Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91570-901, Porto Alegre, RS, Brasil

¹ e-mail: michelehoeltz@yahoo.com.br

PHOTOMETRIC PROCEDURE FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF AFLATOXIN B₁ IN PEANUTS BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY USING CHARGE COUPLED DEVICE DETECTOR.

A photometric procedure was developed for determination of aflatoxin B₁ in peanuts by TLC-CCD technique. The quantification and detection limit were 1.2 µg kg⁻¹ and 0.4 ng per spot, respectively, with mean recovery of 98%. The CCD camera is sufficiently sensitive to detect small changes in spots fluorescence intensity and the results for performance confirmed the efficiency of the method. Another important property of CCD detector is its linearity for a wide range of luminous stimulus determined by analysis of five-point calibration curves using the intensity of AFB₁ fluorescence versus AFB₁ concentration (0.8 to 4.8 ng per spot). The method was applied to the analysis of thirty nine peanut samples and aflatoxin B₁ levels ranged from 16 to 115 µg kg⁻¹. The TLC-CCD and the photometric procedure developed in this study demonstrated to be a simple and efficient tool for quantitative analyses of AFB₁ in peanut samples.

Keywords: aflatoxin B₁; photometric procedure; TLC-CCD

INTRODUCTION

Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ are difuranocoumarin derivatives produced by a polyketide pathway by many strains of *Aspergillus flavus* Link. ex Fries, *A. parasiticus* Speare and *A. nomius* Kurtzman, B.W.¹ These mycotoxins have been found in different food such as corn, peanut, rice and walnut.^{2,3}

Crops in tropical and subtropical areas are more susceptible to contamination than those in temperate regions, since the high humidity and temperature in these areas provide optimal conditions for toxin formation. Poor harvesting practices, improper storage and less than optimal conditions during transportation, marketing and processing can also contribute to fungal growth and increase the risk of mycotoxin production.⁴ Peanuts are known to be a major substrate for aflatoxigenic fungal species.⁵

It is most unlikely that commodities will contain aflatoxins B₂, G₁ and G₂ and not aflatoxin B₁⁶, and the concentration of the sum of the aflatoxins B₂, G₁ and G₂ is generally less than the concentration of aflatoxin B₁ alone. For that reason, analysis of one target component (AFB₁) seems to be efficient, sufficient and more practical.⁶

Aflatoxin B₁ (AFB₁) (Figure 1) is the most toxic form of mycotoxin for mammals and presents hepatotoxic, teratogenic and mutagenic properties, causing damage such as toxic hepatitis, hemorrhage, edema, immunosuppression and hepatic carcinoma.⁷ It has been classified as class 1 carcinogenicity for humans by the International Agency for Research on Cancer.⁸

Contamination levels vary worldwide. Craufurd *et al.*⁹ in a study about aflatoxin on peanut in Niger, found values ranged from 34 to 208 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Wang and Liu¹⁰ analyzing the contamination of aflatoxins in different kinds of foods in China, found highest level of 28.39 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in peanuts. Sulaiman *et al.*² studying the occurrence of aflatoxins in raw shelled peanut samples from three districts of Perak, Malaysia, found the range of incidence of the AFB1 from 0.85 to 547.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. In a review about mycotoxin research in Brazil from years 1991 to 2000, Rodriguez-Amaya and Sabino¹¹ reported aflatoxins contamination in peanuts and peanut products from 1 to 13000 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

In general the aflatoxins regulation varies between different countries with limits from 0 to 35 $\mu\text{g kg}^{-1}$. In European Union the maximum level allowed for AFB1 in food is 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and for the sum of aflatoxins is 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$.¹² Brazilian regulatory limit in peanuts is 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for the sum of the concentrations of aflatoxins B₁, G₁, B₂ and G₂.¹³

Several methods for the aflatoxins determination in various samples have been already developed and reported in the literature. The more common methods used for aflatoxins determination step include thin-layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) with various detection systems.^{5,7,14} HPLC is used worldwide because it offers good sensitivity and precision, coupled with ease of automation. However, HPLC is expensive in initial capital investment and requires skilled and experienced staff to operate and maintain equipment. By contrast, TLC is a simple and robust technique¹⁹, which is relatively inexpensive to establish in a testing laboratory, and most laboratories in developing countries have

considerable expertise and experience with it.²⁰ The major problem in TLC method is the quantification that usually is done by visual comparison, however other techniques can be employed to improve the analytical performance, such as densitometry.²¹

Charge-coupled devices (CCDs) are two-dimensional detectors containing an array of sensors that can image an area in fraction of seconds or real time.²² The output from each sensor pixel on the CCD is a voltage, which is proportional to the intensity of light falling on the sensor and the exposure time. These series of voltages are digitized and transferred to a computer for storage and data processing.²²

By coupling CCD detection with TLC, the entire chromatographic plate can be imaged in a single exposure yielding rapid quantification in shorter analysis time than of slit scanning densitometers.²³ CCD detectors have demonstrated extremely low dark current and read noise characteristics, high sensitivity and excellent linearity. These features have made the CCD an excellent detector for many imaging applications in chemical analysis, such as fluorescence detection.^{19,20}

ImageJ is one of the many image processing tools available and is required for the analysis of images generated by the CCD camera and to carry out the necessary operations. It is a versatile software, which offers a wide array of functionalities that can be customized to meet specific requirements.²² The package is freely available (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) and very appropriate for the current application.²³

The aim of this study was to develop a photometric procedure for determination of aflatoxin B₁ in peanuts by TLC through the fluorescence images from UV lamp recorded by a CCD camera.

EXPERIMENTAL

Samples

A total of 39 samples of peanuts ready for consumption were analyzed for determination of AFB₁. Several brands were collected at random at supermarkets and rural fairs in different regions of the States of Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

Aflatoxin B₁ Standard Solution

The concentration and purity of aflatoxin standard were determined by the technique of the Association of Official Analytical Chemists.²⁴ A stock standard solution of AFB₁ was prepared by dissolving 1 mg of pure crystalline AFB₁ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in toluene:acetonitrile (9:1, v/v) at concentration of 80 µg mL⁻¹. The concentration of the AFB₁ stock solution was determined by measuring the UV absorbance at 348 nm and calculated by using the molar extinction coefficient ϵ of 19300. The concentration of working standard solution in toluene: acetonitrile (9:1, v/v) was 0.8 µg mL⁻¹.²⁵ The standard and working solutions were kept frozen (-18 °C). The purity of aflatoxin B₁ was 92%.

Aflatoxin B₁ extraction

The samples weighing approximately 1 kg were ground and homogenized and a subsample of 50 g was removed for analysis in duplicate.

AFB1 was determined according to the method described by Soares and Rodriguez-Amaya.²⁶ Firstly, 50 g of each sample was extracted with 270 mL methanol and 30 mL 4% (w/v) potassium chloride. Samples were blended at high speed (Blender, Walita, 550 W) for 5 min and filtered, 150 mL of the filtrate was collected. After that, 150 mL 10% (w/v) copper sulfate and 5 g diatomaceous earth were added, followed by moderate stirring and filtration. 150 mL of the filtrate was transferred to a separation funnel with 150 mL of distilled water, and AFB1 was extracted twice with 10 mL chloroform. The chloroform extracts were collected and submitted to solvent evaporation in water bath at 60 °C.

Chromatography

The extracts were resuspended in 100 µL chloroform and submitted to thin-layer chromatography (TLC). Three, six and nine microliter aliquots of sample extract and two, four and six microliter aliquots of AFB1 standard solution ($0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$) were spotted 1 cm apart on precoated silica gel plates ($10 \times 10 \text{ cm}^2$) (Merck, Germany). The spots were dried, and the plates developed in a saturated chamber with chloroform:acetone (99:1, v/v). Aflatoxins spots were observed under long-wave ultraviolet light ($\lambda = 366 \text{ nm}$) and identified by comparison with AFB1 standard. Confirmatory tests for AFB1 were carried out using trifluoroacetic acid.²⁷

CCD Imaging System

Mycotoxins naturally fluorescent, separated on a chromatographic plate can be quantitatively analyzed through a photometric procedure that compares the sample spots and the standard solution spots in different concentrations.

The way to carried out this evaluation can be defined as a photometric procedure. In this case, AFB1 fluorescence intensities from UV lamp were recorded by a CCD camera (Sony, Tokyo, Japan).

The TLC plate was positioned in system and CCD camera was aligned for optimal pixel resolution of CCD images. Five images were taken in each experiment and were analyzed using package ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).²⁸

Photometric procedure

A photometer was design to ensure that every area element on the plate will get the same number of photons, within desired errors. One important concept is that the light source, the detector and the plate be on the same axis, as shown in Figure 2. The illumination uniformity on a square area of size ℓ can be achieved by an optical device or by the geometric distribution of the components previously described, by controlling the distance L between the source and the chromatographic plate. We choose the geometric design. Furthermore, the light sources and the CCD sensor were set on the same plane, perpendicular to the set axis of symmetry, and consequently parallel to plate plane. As an example, a uniformity of 1-2% can be reached in the illumination of an area of $10 \times 10 \text{ cm}^2$ by distributing 4 UV lamps of 17 cm around the entrance of the CCD camera, putting them at 100 cm from the putative area of the chromatographic plate. Appropriate distribution of deckers help to avoid spurious light resulting from rays reflected on the instrument walls.

Processing the CCD images

Two different software can be used to analyze the CCD images: ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)²⁸ and IRAF (<http://iraf.noao.edu/>)²⁹. ImageJ is widely used in medicine^{30,31} and IRAF (Image Reduction Astronomical Facility) is practically the universal package for photometric reduction in Astronomy.³² The simplest way to measure the spots brightness is with the so called diaphragm photometry. In that mode one choose the diaphragm size and form (we adopted circular diaphragms due to the spots symmetry). Embracing a spot with this diaphragm one get the total number of pixel elements, the pixel mean brightness, the total brightness and its mean deviation. To discount the background, several backgrounds around every spot were measures with the same diaphragm.

Performance of the analytical method

The performance of the proposed quantitative method was evaluated based on the following parameters: linearity, recovery percentage, precision, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ).

The sensitivity of the TLC-CCD technique was evaluated by determining LOD for AFB1. Decreasing concentrations of AFB1 standard solution (1.0, 0.8, 0.6, 0.4 and 0.2 ng per spot) were analyzed and the LOD was derived from the AFB1 standard fluorescence with the lowest detectable signals. Linearity was determined by analysis of five-point calibration curves using the intensity of AFB1 fluorescence versus AFB1 concentration. The precision was evaluated by taking five successive chromatographic plate images by CCD camera of ten plates containing 0.8, 1.6, 2.4, 3.2 and 4.8 ng per spot of standard solution. The

fluorescence of each spot was measured three times. The repeatability of AFB1 extraction method and accuracy of TLC-CCD technique were assessed by measuring the percent recovery of uncontaminated samples spiked with 16, 20 and 32 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of AFB1 in triplicate. The samples were spiked with the desired amount of standard solution at different points on the center top of the mass (50 g) and kept to dry naturally overnight. Within-day precision was determined by analyzing 4 replicates of spiked peanuts sample, and between-day precision was determined by analyzing 5 replicates during 5 days consecutives. The precision of the method was calculated from the relative standard deviation (RSD). The LOQ was obtained by spiking samples with decreasing concentrations of AFB1 standard solution (2.4, 2.0, 1.6, 1.2 and 0.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$) being considered the least amount of AFB1 in samples that can be quantitatively determined with accuracy and precision.

RESULTS AND DISCUSSION

A chromatogram can be generated from fluorescent spots which correspond to different AFB1 levels by ImageJ software, showing the ability of the CCD camera to take analytical information (Figure 3). Each peak corresponds to a concentration of standard solution (2.4, 4.8, 7.2, 9.6 and 12 ng) spotted on chromatographic plate. The CCD camera is sufficiently sensitive to detect changes in spots fluorescence intensity caused by small differences in mycotoxin concentration under a homogeneous illumination from a UV light source. The change in fluorescence signal intensity corresponds to the different concentrations of AFB1 standard.

The photometric procedure developed in this study is based in a CCD camera. The light beam is composed by ionizing and non-ionizing photons. Ionizing photons incident on the spots will produce fluorescence, that is, the photons leaving the spots will have lower energy/frequency than the incident ones. The lower frequency photons will be registered by the CCD camera. The ionizing photons that strike outside the spots will be reflected with the same frequency of incidence. Since they are UV photons outside the CCD sensibility range, they will be not registered by the sensor. The non-ionizing photons will be similarly reflected by the whole chromatographic plate, that is, by the spots and by the adjacent areas. Within this spectrum, the photons within the CCD range of sensibility will be detected by the device inside and outside the spots. That will constitute the background light, undesirably contributing to the spots brightness. This subsidiary brightness has to be discounted from the spot by measuring nearby areas to them. One caveat of this procedure step would be the lack of uniformity of the light beam focusing on the chromatographic plate. That seems to be the case of the photometer used by Zhang and Lin²⁶ where the light focus on the chromatographic plate clearly is not uniformly distributed. In the study of these authors, the number of ionizing photons falling on one spot at the plate center is 60% larger than those incidents at the border. In cases like that part of the spots brightness difference may be due to the non homogeneity of the light beam, provided that the number of falling ionizing photons on the less illuminated spot is not enough to excite the whole mycotoxin sample. In that case, a mathematical procedure must be done to correct the background differences between the center and the border.

A uniform illumination of the spots was achieved, in this study, by an adequate design of the photometer (Figure 2), the device mounted to carry out the photometric procedure.

The effectivity and selectivity of TLC-CCD method can be seen in figure 4. Peaks 1, 2 and 3 of the chromatogram correspond to three, six and nine microliter aliquots of sample extract while peaks 4 and 5 correspond to two and four microliter aliquots of AFB1 standard solution ($0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$). All interferences from the sample are in the baseline of the chromatogram (gray line), not compromising the image analysis.

The LOD was 0.4 ng per spot and the LOQ was $1.2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Linearity was determined by analyzing five-point calibration curves within the concentration of 0.8, 1.6, 2.4, 3.2 and 4.8 ng per spot . The linear regression coefficient of standard solution curve ($y = 40255x - 1894.8$) was 0.998.

Recovery rates of AFB1 obtained by spiking peanut samples with 16, 20 and $32 \mu\text{g kg}^{-1}$ in triplicate were 94, 97 and 102%, respectively, and the relative standard deviation (RSD) for repeatability was 4.2, 4.0 and 5.6, respectively. The results of the within and between-day precision of the assay (Table 1) show that the method has good precision, with RSDs ≤ 5.2 .

The applicability of this method was tested analyzing 39 peanut samples and the Table 2 shows the levels of AFB1 found. Of the 39 samples analyzed, AFB1 was not detected in 84.6% of them and 15.4% showed levels from $16 \mu\text{g kg}^{-1}$ to $115 \mu\text{g kg}^{-1}$.

The high levels of AFB1 contamination in peanuts marketed in southern Brazil are in disagreement with the current Brazilian regulation exceeding the

tolerance level of $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ and become important because the toxic effects of aflatoxins represent a severe health risk for consumers and also a risk factor for the economy since the product does not satisfy the requirements for export.

Nakai *et al.*⁷ used TLC to determine the occurrence of aflatoxins in stored peanut samples from State of São Paulo, Brazil, found mean levels of AFB1 from 7.0 to $116 \mu\text{g kg}^{-1}$ and the detection limit was $2 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Sabino *et al.*³³ researching about the occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the State of São Paulo, Brazil, found the maximum level of contamination of $536 \mu\text{g kg}^{-1}$, using TLC technique by visual comparison with the quantification limit of $5 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Usually, the detection limits achieved for the determination of AFB1 in different samples by TLC technique are higher than that found in this study (0.4 ng per spot).^{7,33} This probably occurs because the TLC techniques for quantification usually use the visual comparison of fluorescent spots of the samples with fluorescent spots of the standard solution in different concentrations and it is known that the sensitivity of the human eye can not be compared to a photographic image as proposed in this study. Furthermore, the ability to view differs from person to person and results may differ when analyzed by different analysts.

Using TLC and densitometry for determination of AFB1, Prado *et al.*²¹ obtained mean recoveries of 93.2% for pepper and 82.5% for oregano. LOQ were $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ for pepper and $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ for oregano. Comparing TLC - densitometry and the TLC-CCD with the photometric procedure applied in our

study, it can be seen that TLC-CCD showed a better performance of the analytical method with LOQ of $1.2 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Considering that TLC is the method of choice in many parts of the world, especially in developing countries, the photometric procedure developed in this study demonstrated to be a simple, efficient and low cost tool for quantitative analyses of AFB1 in peanut samples by TLC-CCD technique.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Toxicology Laboratory at the Institute of Food Science and Technology of the Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Graduate Course of Environmental and Agriculture Microbiology - UFRGS and Coordenadoria para Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for the graduate scholarships.

REFERENCES

1. Sherif, O. S.; Emad, E. S.; Mosaad, A. A.; *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2009**, *212*, 347.
2. Sulaiman, M. R.; Chye, F. Y.; Hamid, A.; Yatim, A. M.; *EJEAF Che.* **2007**, *6*, 2045.
3. Conzane, R. S.; Stenzel, W. R.; Kroh, L. W.; *Dtsch. Lebensmitt. Rundsch.* **2002**, *98*, 289.
4. Thompson, C.; Henke, S. E.; *J. Wildl. Dis.* **2000**, *36*, 172.
5. Juan, C.; Zinedine, A.; Moltó, J. C.; Idrissi, L.; Mañes, J.; *Food Control* **2008**, *19*, 849.
6. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); *Food and Nutrition Papers* **2004**, *81*, 180.
7. Nakai, V. K.; Rocha, L. O.; Gonçalez, E.; Fonseca, H.; Ortega, E. M. M.; Corrêa, B.; *Food Chem.* **2008**, *106*, 285.

8. International Agency for Research on Cancer (IARC). In *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, Lyon, 1993, 56, 397.
9. Craufurd, P. Q.; Prasad, P. V. V.; Waliyar, F.; Taheri, A.; *Field Crops Res.* **2006**, 98, 20.
10. Wang, J.; Liu, X. M.; *Biomed. Environ. Sci.* **2007**, 20, 483.
11. Rodriguez-Amaya, D. B.; Sabino, M.; *Braz. J. Microbiol.* **2002**, 33, 1.
12. KOE, W. J.; *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **1999**, 50, 37.
13. Brasil, *Diário Oficial da União*, 2002, RDC nº 274.
14. Sheibani, A.; Ghaziaskar, H. S.; *Food Control* **2009**, 20, 124.
15. Leming, L.; Zhang, L. J.; Wang, P.; Wang, Y.; Chen, J.; *J. Chromatogr., A* **1998**, 3, 815.
16. Gilbert, J.; Anklam, E.; *Trends Analyt. Chem.* **2002**, 21, 468.
17. Lancaster, M.; Goodall, D. M.; Bergstrom, E. T.; Mccrossen, S.; Myers, P. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 905.
18. Hayakawa, T.; Hirai, M.; *Anal. Chem.* **2003**, 75, 6728.
19. Zhang, L.; Lin, X.; *J. Chromatogr., A* **2006**, 1109, 273.
20. Liang, Y.; Baker, M. E.; Yeager, T.; Denton, M. B.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3885.
21. Prado, G.; Oliveira, M. S.; Moreira, A. P. A.; Lima, A. S.; Souza, R. A.; Alves, M. C.; *Quim. Nova.* **2008**, 31, 514.
22. Omar, S. N.; Manoj, K. M.; DheevatsaMudigere, B. E.; *J. Bodywork Mov. Ther.* **2007**, 11, 231.
23. Moodley, K.; Murrell, H.; *Comput. Geosci.* **2004**, 30, 609.
24. Scott, P. M.; In *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, Virginia, 1995, 3.
25. Aflatoxins. In *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, Virginia, 1995, 3.
26. Soares, L. M. V.; Rodriguez-Amaya, D. B.; *J. AOAC Int.* **1989**, 72, 22.

27. Przybylski, W.; *J. AOAC Int.* **1975**, *58*, 163.
28. Rasband, W.; *ImageJ; Image Processing and Analysis in Java*; National Institute of Mental Health, USA, 1997.
29. Barnes, J.; *IRAF Version 2.10; A Beginner's Guide to Using IRAF*; National Optical Astronomy Observatories (NOAO), USA, 1993.
30. Sheffield, L. B.; *Microsc. Microanal.* **2008**, *14*, 898.
31. Vejchapipat, P.; Poomsawat, S.; Imvised, T.; Chongsrisawat, V.; Chittmittrapap, S.; Poovorawan, Y.; *Hepatology Researc* **2008**, *38*, 1018.
32. Smriglio, F.; Dasgupta, A. K.; Boyle, R. P.; *Astronomy and Astrophysics* **2006**, *458*, 767.
33. Sabino, M.; Milanez, T. V.; Lamardo, L. C. A.; Inomata, E. I.; Zorzetto, M. A. P.; Navas, S. A.; Stofer, M.; *Rev. Microbiol.* **1999**, *30*, 85.
34. Gnonlonfin, G. J. B.; Hell, K.; Fandohan, P.; Siame, A. B.; *Int. J. Food Microb.* **2008**, *122*, 140.

Table 1. Precision of the extraction method and TLC-CCD technique for determination of AFB1 in peanut samples.

AFB1 spiked ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Within-day			Between-day		
	Recovery ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recovery %	RSD ^a (%)	Recovery ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recovery %	RSD ^a (%)
16	15.2	95.0	4.1	15.6	97.5	4.9
20	19.2	96.0	3.8	19	95.0	3.9
32	30.6	95.6	5.2	30.1	94.1	4.5

^aRSD = Relative standard deviation

Table 2. AFB1 levels in peanut samples marketed in south of Brazil determined by TLC-CCD technique in duplicate.

Sample no.	AFB1 ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	RSD ^a (%)
1	38	7.4
2	45	12.5
3	29	3.6
4	115	1.3
5	65	4.3
6	16	8.8

^aRSD = Relative standard deviation

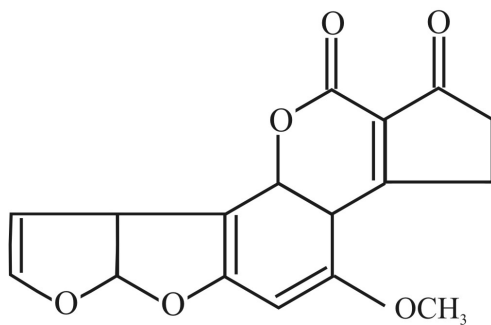


Figure 1. Molecular structure of aflatoxin B1 (AFB1).

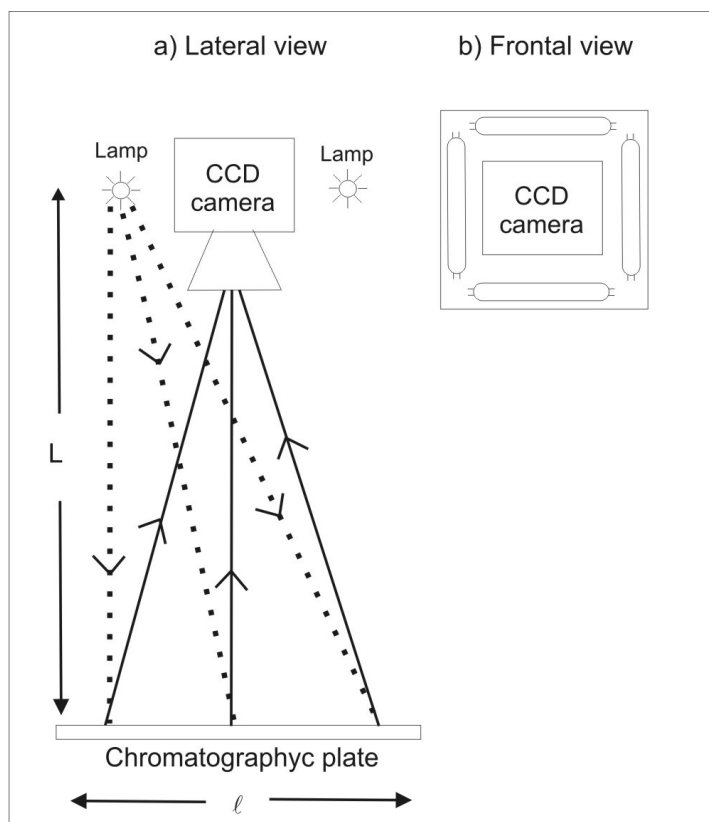
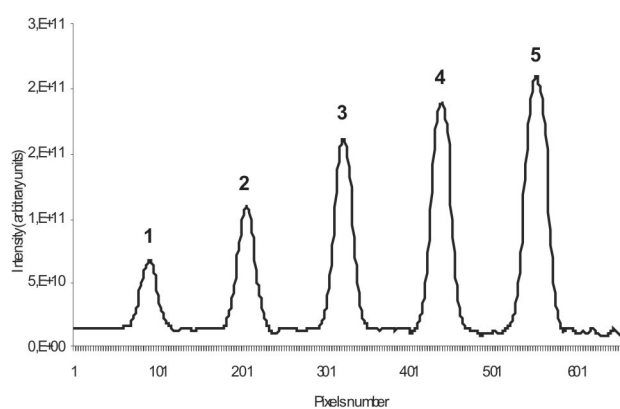


Figure 2. (a) Lateral view of photometer design with perspective of light and (b) Frontal view of photometer design showing the location of lamps.

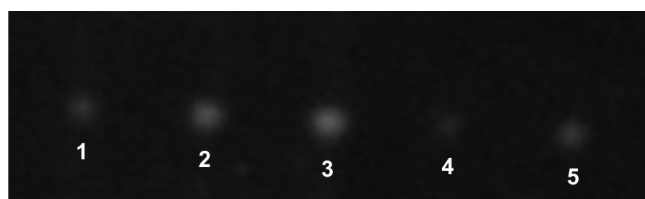


(a)

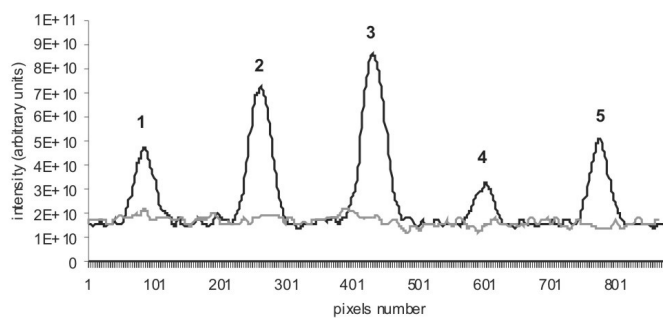


(b)

Figure 3. (a) Image of chromatographic plate obtained by the CCD camera with (1) 2.4, (2) 4.8, (3) 7.2, (4) 9.6 and (5) 12 ng of aflatoxin B₁ standard solution and (b) Chromatogram obtained from chromatographic plate image by CCD camera with the same concentrations of aflatoxin B₁.



(a)



(b)

Figure 4. (a) Image of chromatographic plate obtained by the CCD camera with (1) three, (2) six, (3) nine microliters aliquots of sample extract, (4) two and (5) four microliter aliquots of aflatoxin B1 standard solution ($0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$); (b) Chromatogram obtained from chromatographic plate image by CCD camera with the same concentrations of sample extracts and aflatoxin B1 standard solution showing the interferences from the sample in the baseline of the chromatogram (gray line).

ARTIGO 2

Submetido no periódico: Journal of Food Quality

**Occurrence of aflatoxin B₁ in peanuts and peanut products marketed in
south of Brazil**

**OCCURRENCE OF AFLATOXIN B₁ IN PEANUTS AND PEANUT PRODUCTS
MARKETED IN SOUTH OF BRAZIL**

M. Hoeltz^{1,4}, J. E. Welke², T. C. Einloft², H. A. Dottori³, I. B. Noll²

¹Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente,
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, CEP 91570-901, Porto Alegre, Brasil.

²Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, 91570-901, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul (UFRGS), RS, Brasil.

⁴ Corresponding author. TEL: +55 51 33087242; FAX: +55 51 33087048.

EMAIL: michelehoeltz@yahoo.com.br

ABSTRACT

This study investigated the occurrence of aflatoxin B₁ in peanuts and their products marketed in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Seventy three samples of peanuts and peanut products were collected and analyzed by thin layer chromatography method using a charge-coupled device system. Aflatoxin B₁ was present in 11% of analyzed samples. The concentration in peanut samples ranged from 38.0 to 87.5 µg/Kg and in peanut products was from 22.0 to 72.5 µg/Kg. All the samples exceeded the limits of the Brazilian regulation (20.0 µg/Kg for aflatoxins B₁+G₁+B₂+G₂). The results suggest that aflatoxins contamination in peanuts marketed in south of Brazil can be lower than that found in other Brazilian regions, but is still a serious problem to human health and economy.

PRACTICAL APPLICATIONS

Aflatoxins contamination is the most important quality problem in peanuts worldwide. The high levels usually found in peanuts and their products represent a severe health risk for consumers and also a risk factor for the economy since the product does not satisfy the requirements for export. Only through the constant monitoring of the peanut quality and data divulgation it can be establish the occurrence and levels of AFB₁ in peanuts and their as well the agricultural practices applied by farmers in order to minimize field, harvest and post-harvest contamination.

KEY-WORDS: peanuts, peanut products, aflatoxin B₁, Brazil.

INTRODUCTION

Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ are secondary metabolites produced by toxigenic strains of *Aspergillus flavus* Link. ex Fries, *A. parasiticus* Speare and *A. nomius* Kurtzman, B.W. Horn & Hesselt. These mycotoxins have been found in different food such as corn, peanut, rice and walnut (Sulaiman *et al.* 2007). Peanuts are known to be a major substrate for these fungal species (Juan *et al.* 2008).

Aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most toxic form of mycotoxin for mammals and presents hepatotoxic, teratogenic and mutagenic properties, causing damage such as toxic hepatitis, hemorrhage, edema, immunosuppression and hepatic carcinoma (Nakai *et al.* 2008). It has been classified as class 1 carcinogenicity for humans by the International Agency for Research on Cancer (IARC 1993).

The commodities may be contaminated in the field or after harvest during storage, processing, transport and they become not only a public health hazard but also a financial loss (Craufurd *et al.* 2006; Hussein and Brasel 2001; Sabino *et al.* 1999).

In Brazil, the peanut production is concentrated in the southeast region and the State of São Paulo is the greatest producer with the production estimated to be 236.4 thousand tons during the 2008/2009 harvests representing 77.5% of the national production (CONAB 2008). The quality of peanuts e their products consumed in southeast region of Brazil is frequently monitored (Nakai *et al.* 2008; Rodriguez-Amaya and Sabino 2002; Sabino *et al.* 1999; Freitas and Brigido 1998), but these results of contamination can not be

generalized to others States of the country where the climate conditions to peanuts production are considerably different.

Rio Grande do Sul is the southernmost state of Brazil and contributes with approximately 2.3% of the national peanuts production (CONAB 2008). In this region, peanuts are cultivated in small scale by rural producers. The raw peanuts and peanuts containing foods such as candies are market in local fairs or sold to local industries.

Brazilian regulatory limit in peanuts is 20.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ for the sum of the concentrations of aflatoxins B_1 , G_1 , B_2 and G_2 (Brasil 2002) and this is harmonized with regulations for aflatoxins exist in MERCOSUR (Southern Common Market), a trading block consisting of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay (MERCOSUL/ GMC 1994). However, it should be emphasized that, in practice and for precaution, a lower value should be considered because of the high variability of aflatoxin occurrence in different products and the importance of international trade (Fonseca 2002).

In general the aflatoxins regulation varies between different countries with limits from 0 to 35.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. In European Union the maximum level allowed for AFB1 in food is 2.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ and for the sum of aflatoxins is 4.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Koe 1999).

It is most unlikely that commodities will contain aflatoxins B_2 , G_1 and G_2 and not AFB1 (Yabe and Nakajima 2004), and the concentration of the sum of the aflatoxins B_2 , G_1 and G_2 is generally less than the concentration of AFB1 alone. For that reason, analysis of one target component (AFB1) seems to be efficient, sufficient and more practical (FAO 2004).

Although extend and levels found have been generally low, the presence of aflatoxins in peanuts and peanut products continue to be an alarming problem in Brazil (Rodriguez-Amaya and Sabino 2002). Considering that peanuts are an important food commodity and AFB₁ is toxic for humans and animals, the present investigation studied the occurrence of this mycotoxin in peanuts and their products marketed in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, contributing to the evaluation of the potential risk to consumers.

MATERIALS AND METHODS

Samples

A total of 73 samples of products ready for consumption were analyzed for determination of AFB₁. Thirty nine samples corresponding to peanuts and Thirty four to peanut products (peanut candies) of several brands collected at random at supermarkets and rural fairs in four cities of the State of Rio Grande do Sul, Brazil including Porto Alegre, Santa Cruz do Sul, Santa Maria and Ijuí.

The period of sampling was from June to August of 2008 and from May to July of 2009, when the supply and consumption are considerably increased because typical Brazilian festivities (Fechino and Netto 2004).

Determination of aflatoxin B₁

The samples weighing approximately 1 kg were ground and homogenized and a subsample of 50 g was removed for analysis in duplicate.

AFB₁ was determined according to the method described by Soares and Rodriguez-Amaya (1989). Firstly, 50 g of each sample was extracted with 270 ml methanol and 30 ml 4% potassium chloride. Samples were blended at high

speed for 5 min and filtered, and 150 ml of the filtrate was collected. After that, 150 ml 10% copper sulfate and 50 ml diatomaceous earth were added, followed by moderate stirring and filtration. The filtrate was again recovered up to 150 ml and transferred to a separation funnel, and AFB1 was extracted twice with 10 ml chloroform. The chloroform extracts were collected and submitted to solvent evaporation in water bath at 60 °C.

The extracts were resuspended in 100 µl chloroform and submitted to thin-layer chromatography (TLC). Different concentrations of extracts and AFB1 standard were applied on precoated silica gel plates (Merck, Germany). The plates were developed in a saturated chamber with chloroform:acetone (99:1, v/v). Aflatoxins spots were observed under long-wave ultraviolet light ($\lambda=366\text{nm}$) and identified by comparison with AFB1 standard. The concentration and purity of aflatoxin standard were determined by the technique of the Association of Official Analytical Chemists (Scott 1990). Confirmatory tests for AFB1 were carried out using trifluoroacetic acid (Przybylski 1975).

Quantitative analyses were performed according method described by Welke *et al.* (2009) with some modifications. The quantification of the fluorescence intensities from UV lamp were recorded by a charge-coupled device (CCD) camera (Sony, Tokyo, Japan). The TLC plate was positioned in system and CCD camera was aligned for optimal pixel resolution of CCD images. Five images were taken in each experiment and were analyzed using ImageJ 1.40 software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Performance of the analytical method

Validation of the analytical method was based on the following parameters: linearity, recovery percentage, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ).

Linearity was determined by analysis of five-point calibration curves using the intensity of aflatoxin fluorescence versus aflatoxin concentration. Recovery and precision were determined by analyzing of 3 peanut and peanut products samples spiked with 16.0, 20.0 and 32.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ of AFB1. The LOD was derived from the AFB1 standard fluorescence with the lowest detectable signals. The LOQ was obtained as the least amount of AFB1 in samples that can be quantitatively determined with accuracy and precision.

RESULTS AND DISCUSSION

The method used for AFB1 determination was efficient. Recovery rates of AFB1 obtained by spiking peanut samples with 16.0, 20.0 and 32.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ in duplicate were 94, 97 and 102%, respectively and the relative standard deviation (RSD) for repeatability was 4.24, 4.03 and 5.65 respectively. Recovery rates of AFB1 obtained by spiking peanut products samples with 16.0, 20.0 and 32.0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ in duplicate were 87.5, 84.7 and 97.5%, respectively and the relative standard deviation (RSD) for repeatability was 10.2, 7.0 and 7.9% respectively. The limit of detection was 0.4 ng per spot and the limit of quantification was 1.2 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Linearity was determined by analyzing ten calibration standards within the concentration ranging from 0.8 ng to 4.8 ng. The correlation coefficient was 0.998.

Of the 73 samples analyzed, AFB1 was not detected in 89% of them and 11% showed levels above 20.0 µg/Kg. These high levels are in disagreement with the current Brazilian regulation (Brasil 2002).

In peanuts only 3 samples were contaminated with levels of 38.0, 45.0 and 87.5 µg/Kg. In peanut products 5 samples presented AFB1 contamination with levels of 22.0, 30.5, 31.8, 69.8 and 72.5 µg/Kg. The found AFB1 levels demonstrate a risk factor for consumer health and for the Brazilian economy, even if the number of contaminated samples is low.

Studies developed in Brazil, especially in the southeast region, analyzing the occurrence of aflatoxins in peanuts and their products usually reported higher levels than those observed in the present study. Nakai *et al.* (2008) studying the occurrence of aflatoxins in stored peanut samples from State of São Paulo, Brazil, found mean levels of AFB1 from 7.0 to 116.0 µg/Kg.

In a review about mycotoxin research in Brazil from years 1991 to 2000, Rodriguez-Amaya and Sabino (2002) reported aflatoxins contamination in peanuts and peanut products from 1.0 to 12.9 µg/Kg. Sabino *et al.* (1999) researching about the occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the State of São Paulo, Brazil, concluded that aflatoxins contamination in peanuts is decreasing but remains a problem because the maximum level of contamination found was 536.0 µg/Kg.

In the southernmost region of Brazil, these researches are very few. Mallmann *et al.* (2003) analyzing 664 samples of peanuts and their products available in the State of Rio Grande do Sul during two years (from March 2000

to April 2002), found aflatoxins in 31.3% of samples in mean levels of 92.1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ and maximum level of 5476.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Worldwide the levels of contamination are variables, but in some cases even largest that found in this study. Craufurd *et al.* (2006) in a study about aflatoxin on peanut in Niger, found values ranged from 34.0 to 208.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Wang and Liu (2007) analyzing the contamination of aflatoxins in different kinds of foods in China, found highest level of 28.39 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ in peanuts. Sulaiman *et al.* (2007) studying the occurrence of aflatoxins in raw shelled peanut samples from three districts of Perak, Malaysia, found the range of incidence of the AFB1 from 0.85 to 547.51 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

In this study, peanut samples had lower contamination compared to that found in the products, an important aspect if we consider that the products are widely consumed and this observation suggests that poorer quality peanuts are used for processing. Similar data have been reported in previous studies (Sabino *et al.* 1999; Freitas and Brigido 1998) suggesting that peanuts used for processing are of low quality.

CONCLUSIONS

The present study demonstrated high levels of AFB1 contamination in peanuts and peanut products marketed in south of Brazil. The maximum level was 87.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, and all contaminated samples are in disagreement with the current Brazilian regulation exceeding the tolerance level of 20.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. The toxic effects of aflatoxins represent a severe health risk for consumers and also a risk factor for the economy since the product does not satisfy the

requirements for export. New studies should be conducted to establish the occurrence and levels of AFB1 in peanuts and their products in south of Brazil as well the agricultural practices applied by producers farmers in order to minimize field, harvest and post-harvest contamination.

REFERENCES

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC no 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. (2008). Série histórica de produção de amendoim. <<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php>>

CRAUFURD, P. Q., PRASAD, P. V. V., WALIYAR, F. and TAHERI, A. 2006. Drought, pod yield, pre-harvest *Aspergillus* infection and aflatoxin contamination on peanut in Niger. *Field Crop Res.*, 98, 20-29.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *Food and Nutrition Papers*, 81, 180.

FECHINO, R. and NETTO, G. U. 2004. Pró-amendoim, três anos que mudaram o setor. <http://www.proamendoim.com.br/pro/News_web.pdf>

FONSECA, H. 2002. Sampling plan for the analysis of aflatoxin in peanuts and corn: an update. *Braz. J. Microbiol.*, 33, 97-105.

FREITAS, V. P. S. and BRIGIDO, B. M. 1998. Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in peanuts and their products marketed in the region of Campinas, Brazil in 1995 and 1996. *Food Addit. Contam., Part A*, 15, 807-811.

HUSSEIN, S.H. and BRASEL, J.M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, *167*, 101–134.

IARC – International Agency for Research on Cancer. (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Geneva, *56*, 489–521.

JUAN, C., ZINEDINE, A., MOLTÓ, J. C., IDRISSE, L. and MAÑES, J. 2008. Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Salé area, Morocco. *Food Control*, *19*, 849-853.

KOE, W. J. 1999. Regulations of the European Union for mycotoxins in foods. *Arh Hig Rada Toksikol*, *50*, 37–46.

MALLMANN, C. A., KAWALSKI, C. H., ALMEIDA, C. A., MÜRMAN, L. and SILVEIRA, V. G. 2003. Prevalência de aflatoxinas em amendoim e seus derivados, destinados ao consumo humano, no estado do Rio Grande do Sul. <<http://www.lamic.ufsm.br/artigos.html>>

MERCOSUL/ GMC. Grupo Mercado Comum. Regulamento Técnico sobre Limites Máximos de Aflatoxinas, Resolução n° 56/94, 1994. <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>

NAKAI, V. K., ROCHA, L. O., GONÇALEZ, E., FONSECA, H., ORTEGA, E. M. M. and CORRÊA, B. 2008. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. *Food Chem.*, *106*, 285-290.

PRZYBYLSKI, W. 1975. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. *J. AOAC Int.*, *58*, 163-164.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. and SABINO, M. 2002. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. *Braz. J. Microbiol.*, *33*, 1-11.

SABINO, M., MILANEZ, T. V., LAMARDO, L. C. A., INOMATA, E. I., ZORZETTO, M. A. P., NAVAS, S. A., et al. 1999. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the state of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. *Rev. Microbiol.*, *30*, 85–88.

SCOTT, P. M. 1990. Natural poisons. In K. Helrich (Ed.), *Official methods of analysis* (16th ed.). Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.

SOARES, L. M. V. and RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1989. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multitoxin thin layer chromatographic method. *J. AOAC.*, *72*, 22-26.

SULAIMAN, M. R., CHYE, F. Y., HAMID, A. and YATIM, A. M. 2007. The occurrence of aflatoxins in raw shelled peanut samples from three districts of Perak, Malaysia. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chem.*, *6*, 2045-2052.

WANG, J. and LIU, X. M. 2007. Contamination of aflatoxins in different kinds of foods in China. *Biomed. Environ. Sci.*, *20*, 483-487.

WELKE, J. E., HOELTZ, M., DOTTORI, H. A. and NOLL, I. B. 2009. Quantitative analysis of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using a charge coupled device detector. *Food Addit. Contam., Part A*, *26*, 754-758.

YABE, K. and NAKAJIMA, H. 2004. Enzyme reactions and genes in aflatoxins biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *64*, 745-755.

ARTIGO 3

***Aspergillus* seção *Flavi* e aflatoxina B1 em diferentes estágios da cultura
do amendoim no Rio Grande do Sul, Brasil**

***Aspergillus* seção *Flavi* e aflatoxina B1 em diferentes estágios da cultura do amendoim no Rio Grande do Sul, Brasil**

Michele Hoeltz^{1,2}, Juliane E. Welke², Horacio A. Dottori³, Isa B. Noll²

¹Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91570-901, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91570-901, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91570-901, Porto Alegre, RS, Brasil.

Resumo

No Brasil, a presença de aflatoxinas no amendoim e produtos derivados é um problema alarmante devido aos altos níveis encontrados. Essas micotoxinas são produzidas por espécies de *Aspergillus* seção *Flavi*. Esse trabalho analisou a incidência de espécies de *A.* seção *Flavi* e aflatoxina B1 durante o cultivo do amendoim no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Os resultados mostraram alta incidência de *A. flavus* na amostras de solo pré e pós-plantio, no período de enchimento dos grãos, na colheita e após a secagem. Dos isolados de *A. flavus* e *A. parasiticus*, 89,3% e 39,2%, respectivamente, se mostraram produtores de aflatoxina B1. Foi detectada aflatoxina B1 em 50% das amostras, com níveis entre 16 µg/Kg e 115 µg/Kg, nos períodos da colheita e após a secagem dos grãos. Esta é a primeira

² Autor para correspondência: e-mail: michelehoeltz@yahoo.com.br

pesquisa sobre a contaminação fúngica e por aflatoxina B1 durante o cultivo do amendoim no estado do Rio Grande do Sul. Mais estudos devem ser realizados para o estabelecimento dessa ocorrência.

Palavras-chave: amendoim, aflatoxina B1, *Aspergillus* seção *Flavi*, manejos pré e pós-colheita, Brasil

Abstract

In Brazil, the presence of aflatoxins in peanuts and peanut products has been an alarming problem due to the high levels found. These mycotoxins are produced by *Aspergillus* section *Flavi* species. This study analyzed the incidence of *A.* section *Flavi* species and aflatoxin B1 during the stages of peanut development in the Rio Grande do Sul state, Brazil. The data showed high incidence of *A. flavus* at pre and postharvest soil samples, at pod filling stage, at harvest time and after drying. Of *A. flavus* and *A. parasiticus* isolates, 89.3% e 39.2%, respectively, showed capability to produce aflatoxin B1. It was detected aflatoxin B1 in 50% of the samples at harvest time and after drying, with levels of 16 µg/Kg to 115 µg/Kg. This is the first research about the fungi contamination and aflatoxin B1 presence in peanut cultivated in the Rio Grande do Sul. More studies should be conducted to establish this occurrence.

Key-words: peanut, aflatoxin B1, *Aspergillus* section *Flavi*, pre and postharvest managements, Brazil

Introdução

Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ são metabólitos secundários produzidos por cepas toxigênicas de *Aspergillus* seção *Flavi* como *A. flavus* e *A. parasiticus* (Sulaiman et al., 2007; Conzane et al., 2002). O conhecimento das

características ecofisiológicas das populações de *A. flavus* e *A. parasiticus*, sua diversidade genética e toxigênica podem ser utilizadas como uma ferramenta no desenvolvimento de estratégias para o controle da produção de aflatoxinas (Barros et al. 2003, 2006).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2002), a mistura de aflatoxinas de ocorrência natural é classificada como carcinogênica para humanos (Grupo 1). A aflatoxina B1 (AFB1) apresenta propriedades hepatotóxicas, teratogênicas e mutagênicas, causando danos como hepatite tóxica, hemorragia, edema, imunossupressão e carcinoma hepático em mamíferos (Nakai et al., 2008).

A freqüente ocorrência dessas substâncias em amendoim ocorre, principalmente, em países em desenvolvimento, sendo uma conseqüência de manejos de produção e estocagem inadequados ou ineficientes, além de condições climáticas propícias para o desenvolvimento fúngico (Craufurd et al., 2006; Hussein & Brasel, 2001; Sabino et al., 1999; Neal et al., 2001; Rustom, 1996).

A legislação brasileira, através do Ministério da Saúde, Resolução RDC nº274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, estabelece o limite máximo de 20 ppb (soma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂) em amendoim e pasta de amendoim (Brasil, 2002). Entretanto, na União Européia, o limite máximo de AFB1 permitido em alimentos é de 2 µg/kg e para a soma das aflatoxinas o limite é de 4 µg/kg. Conforme Dorner et al. (2003), lotes de amendoins contaminados não devem ser utilizados para o consumo humano e também representam perdas econômicas para as indústrias processadoras.

A produção de amendoim brasileira se concentra na região sudeste e o estado do Rio Grande do Sul contribui com apenas cerca de 3% da produção nacional (CONAB, 2009). Nesse Estado, a cultura do amendoim é realizada em pequenas propriedades rurais baseada na agricultura familiar, sendo que o produto se destina principalmente ao consumo familiar e/ou na fabricação de produtos derivados que são comercializados em suas regiões (EMATER/ASCAR, 2008).

Em um levantamento sobre a contaminação por aflatoxinas em amostras de amendoins processados e produtos derivados comercializados no Rio Grande do Sul e coletados pela Vigilância Sanitária Estadual entre os anos de 2001 e 2004, foram avaliadas 110 amostras, onde 34,61% e 15,51% das amostras de amendoim processado e produtos processados, respectivamente, apresentaram teores de contaminação superior ao permitido pela legislação brasileira (Colvara, 2005).

Freitas (1998), analisando 35 amostras de amendoim, comercializados na cidade de Campinas/SP, encontrou 11 delas contaminadas com aflatoxinas, em níveis entre 304 e 1557 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, ultrapassando a quantidade máxima permitida pela legislação brasileira.

Analisando 38 amostras de doces de amendoim e 6 de amendoim “in natura”, comercializados no estado do Pará, Eizendeher et al. (2005) encontraram contaminação por aflatoxinas em 73,68% das amostras de doce, numa faixa de 25,95 a 350,02 mg/Kg ($B_1 + G_1$). Já no amendoim in natura, 26,31% das amostras apresentaram contaminação com 3420,84 mg/Kg , calculada pela soma das aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 .

Devido, principalmente, à escassez de pesquisas sobre a qualidade micotoxicológica do amendoim produzido no Rio Grande do Sul, este trabalho teve como objetivo analisar a presença de *Aspergillus* seção *Flavi* e aflatoxina B1 durante o cultivo do amendoim em diferentes regiões do Estado.

Materiais e Métodos

Regiões pesquisadas e amostragem

As amostras foram obtidas de quarto propriedades rurais localizadas nas regiões dos municípios de Augusto Pestana e Ivorá, durante o cultivo do amendoim nas safras 2006/2007 e 2007/2008. A área de cada propriedade (aproximadamente 0,6 hectares) foi dividida em parcelas uniformes de 40 m² e as amostras retiradas de quatro delas.

Foram retiradas amostras de solo, em duplicatas, antes do plantio e após a colheita dos grãos para analisar a contaminação fúngica.

Amostras de grão foram retiradas, em duplicatas, nos períodos de enchimento do grão, na colheita e após a secagem dos grãos para análise da contaminação fúngica e por aflatoxina B1.

Análise da contaminação fúngica do solo

A contagem da contaminação fúngica do solo foi realizada pelo método de diluição seriada (Horn & Dorner, 1998). Primeiramente, cada amostra de solo (10 g) foi diluída com 90 mL de água peptonada (0,1%) e deixada em temperatura ambiente por cerca de 20 minutos. Essa suspensão foi então agitada e as demais diluições decimais de 10⁻² e 10⁻³ preparadas. Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição, em triplicata, foi espalhada na superfície de placas contendo dois meios de cultura diferentes: Agar Dicloran Rosa de Bengala

Cloranfenicol (DRBC) e Agar Dicloran Glicerol 18% (DG18) (Barros et al., 2003). As placas foram incubadas a 25°C por 5-7 dias e a média do número de colônias foi determinada e o resultado expresso em unidades formadas de colônia por grama de solo (UFC/g). O isolamento e a identificação das espécies foram realizados de acordo com Pitt & Hocking (1997).

Análise da contaminação fúngica dos grãos de amendoim

O percentual de contaminação fúngica dos grãos foi realizado através da técnica de plaqueamento direto. De cada amostra foram retirados 100 grãos que passaram, primeiramente, por uma lavagem superficial com hipoclorito de sódio (0,1%), sendo então, colocados na superfície de placas contendo os meios DRBC e DG18. O número de grãos infectados foi verificado e expresso em percentual de grãos contaminados. O número de colônias de *Aspergillus* seção *Flavi* também foi determinado e o resultado expresso em percentual de incidência. As colônias suspeitas de serem *A. flavus* e *A. parasiticus* foram inoculadas em meio AFPA (Agar *Aspergillus flavus/parasiticus*) para confirmação (Pitt, Glenn, Hocking, 1983), sendo posteriormente identificadas de acordo com Pitt & Hocking (1997).

Análise do potencial toxigênico de A. seção *Flavi*

A determinação da capacidade de cada isolado de produzir aflatoxina B1 foi testada em dois meios distintos: Agar Coco (Lin & Dianese, 1976) e Agar Extrato de Malte (Geisen, 1996). Uma suspensão de esporos foi inoculada na parte central de placas contendo os meios de cultura que foram incubadas a 27°C por 7 dias. Após esse período, a parte central do meio de cultura foi retirada e macerada com 1 mL de clorofórmio. O extrato foi aplicado em uma

placa cromatográfica (Merck) e submetido a cromatografia em camada delgada (CCD) com a fase móvel composta de tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (35:25:25:10). As manchas fluorescentes dos extratos foram comparadas ao padrão de AFB₁, sob luz ultravioleta (366 nm). A confirmação da identidade do composto foi realizada por derivatização com ácido trifluoracético (Przybylski, 1975).

Determinação de aflatoxina B₁

AFB₁ foi extraída das amostras através da técnica multitoxinas de Soares & Rodriguez-Amaya (1989). A determinação do composto foi feita por CCD sendo a confirmação da identidade realizada por derivatização com ácido trifluoracético. (Przybylski, 1975). A quantificação dos níveis de AFB₁ nas amostras positivas foi realizada por CCD com detector de carga acoplada (DCA) através da aplicação de procedimentos fotométricos (Hoeltz et al., 2009).

Análise estatística

Os resultados da contaminação fúngica do solo e dos grãos não seguiram uma distribuição normal e por isso foram analisados utilizando os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Resultados e Discussão

Contaminação fúngica do solo

Foram detectadas e isoladas de todas as amostras de solo (pré- e pós-plantio) colônias fúngicas dos gêneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. Espécies do gênero

Aspergillus foram, no geral, as mais abundantes, destacando-se *A. flavus* como a espécie prevalente.

Na região de Augusto Pestana, a contaminação fúngica total do solo para os dois cultivares analisados foi de $9,36 \times 10^3$ UFC/g na safra 2006/2007 e de $1,5 \times 10^4$ UFC/g na safra 2007/2008 (Figura 1). Na região de Ivorá (região 2), a contaminação fúngica total do solo para os dois cultivares analisados foi de $4,93 \times 10^3$ UFC/g na safra 2006/2007 e de $6,41 \times 10^3$ UFC/g na safra 2007/2008 (Figura 2).

Quando comparada a contaminação fúngica total do solo entre safras e sem distinção de região e cultivar, foi observado que houve diferença significativa entre as médias de contaminação, comparando as safras 2006/2007 e 2007/2008 ($p < 0,05$).

Considerando os cultivares de amendoim analisados e as regiões durante a safra de 2006/2007, foi observado que para o cultivar Tatu não houve diferença significativa entre a média de contaminação fúngica total do solo comparando as regiões de Augusto Pestana e Ivorá ($p < 0,05$). Já, para o cultivar Paraguaio, foi observada diferença significativa entre a média de contaminação fúngica total do solo, sendo que Augusto Pestana apresentou maior contaminação total. ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Na safra 2007/2008 os resultados não se repetiram (Tabela 2). Para o cultivar Tatu foram observadas diferenças significativas entre a média de contaminação fúngica total do solo, maior em Augusto Pestana ($p > 0,05$). Para o cultivar Paraguaio não houve diferença significativa entre a média de contaminação fúngica no solo das duas regiões ($p > 0,05$).

Barros et al. (2003), pesquisando a contaminação fúngica do solo em regiões de cultura de amendoim na Argentina, também encontraram a prevalência de *A. flavus*. Gonzalez et al. (2008) encontraram em amostras de solo antes do plantio de amendoim espécies de *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Aspergillus*, sendo que *A. flavus* foi detectado em 8% das amostras.

Como o solo é o reservatório primário de *A. flavus* e *A. parasiticus*, a determinação da população fúngica pode ser importante na elaboração de medidas de controle com o objetivo de reduzir a contaminação do amendoim por aflatoxinas no período pré-colheita (Horn & Dorne, 1999; Barros et al., 2003).

Contaminação fúngica dos grãos

Nas safras 2006/2007 e 2007/2008, na região de Augusto Pestana foram isoladas 163 colônias de *A. seção Flavi*, sendo 68,7% identificadas como *A. flavus* e 31,3% como *A. parasiticus*. Dos isolados de *A. flavus* 89,3% se mostraram produtores de aflatoxina B1 e dos isolados de *A. parasiticus*, 39,2% produziram aflatoxina B1 nas condições testadas.

Na região de Augusto Pestana, safras 2006/2007 e 2007/2008, a incidência média de *A. seção Flavi* foi de 27,2%, sendo maior no período da colheita dos grãos em ambas as safras (Figura 3).

Na região de Ivorá, a incidência média de *A. seção Flavi* foi de 61,3%, em ambas as safras. Na safra 2006/2007, a contaminação também foi maior no período da colheita dos grãos e na safra 2007/2008, a maior incidência foi observada no período pós-colheita (Figura 4).

Nas safras analisadas, na região de Augusto Pestana foram isoladas 163 colônias de *A. seção Flavi*, sendo 68,7% identificadas como *A. flavus* e 31,3% como *A. parasiticus*. Dos isolados de *A. flavus* 89,3% se mostraram produtores de aflatoxina B1 e dos isolados de *A. parasiticus*, 39,2% produziram aflatoxina B1 nas condições testadas. Nas safras 2006/2007 e 2007/2008, na região de Ivorá, foram isoladas 368 colônias de *A. seção Flavi*, sendo 93,2% identificadas como *A. flavus* e 6,8% como *A. parasiticus*. Dos isolados de *A. flavus* 70,3% se mostraram produtores de aflatoxina B1 e dos isolados de *A. parasiticus*, 32% produziram aflatoxina B1 nas condições testadas (Tabela 3).

Os resultados encontrados nessa pesquisa estão de acordo com Gonzalez et al. (2008) que analisando a contaminação fúngica em diferentes estágios de maturação do amendoim cultivado em Junqueirópolis, estado de São Paulo, também encontraram alta incidência de *A. flavus* durante os períodos de pré- e pós-colheita, detectando, ainda, a maior incidência de *A. parasiticus* após a secagem dos grãos.

Determinação de aflatoxina B1 nos grãos de amendoim

Aflatoxina B1 foi detectada em 50% das amostras, com níveis entre 16 µg/Kg e 115 µg/Kg. O maior número de amostras contaminadas foi observado na região de Ivorá (Tabela 4). Entretanto, o maior nível de 115 µg/Kg foi observado na região de Augusto Pestana (Tabela 5). AFB1 foi detectada nos períodos da colheita e após a secagem dos grãos.

O fato de AFB1 não ter sido detectada no período de enchimento dos grãos pode ser explicado porque grãos imaturos, com alta atividade de água,

são mais resistentes a contaminação fúngica e por aflatoxinas uma vez que produzem mais fitoalexinas que em grãos maduros (Dorner et al., 1989).

Gonçalez et al. (2008), não detectaram aflatoxinas nos estágios iniciais de maturação dos grãos de amendoim, sendo detectada AFB1, com níveis de 3,79 µg/Kg a 125,07 µg/Kg, nos períodos da colheita e após a secagem dos grãos. O mesmo foi observado nesse estudo.

Esse trabalho evidencia os altos níveis de contaminação do amendoim com AFB1, em discordância com a legislação brasileira e internacional. Além disso, o início dessa contaminação se inicia durante a maturação dos grãos próximo do período da colheita e tende a aumentar após a secagem dos grãos em função, principalmente, da prevalência de fungos aflatoxigênicos submetidos ao estresse hídrico (Horn et al., 1994).

Esta é a primeira pesquisa sobre a contaminação fúngica e por aflatoxina B1 durante o cultivo do amendoim no estado do Rio Grande do Sul. Considerando que existe o risco da ingestão de produtos contaminados com essa substância pela população, mais estudos devem ser realizados com o objetivo de monitorar e estabelecer os principais pontos críticos de contaminação, contribuindo na implementação de sistemas eficientes de manejos agrícolas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFRGS e

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de doutorado.

Referências

AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. 16.ed. 4th ver. 1998. (Software Adobe and E-DOC/CJS).

Barros, G. G. et al. Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strain isolated from peanut-cropped soils in Argentina. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 38, p. 145-152, 2006.

Barros, G.; Torres, A.; Palacio, G.; Chulze, S. *Aspergillus* species from section *Flavi* isolated from soil at planting and harvest time in peanut-growing regions of Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.83, 1303-1307, 2003.

Brasil (2002), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 274 de 15 do outubro de 2002, publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002.

Colvara, M. E. C. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados, no estado do Rio Grande do Sul, no período de 2001 a 2004. 2005. 47 f. Monografia (Especialização) – Curso de Especialização em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Série histórica de produção de amendoim. Acessado em 10 maio 2009. Online. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=131>

Conzane, R.S. et al. Detection and determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in peanuts from Mozambique using HPLC. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, v.98, n.8, p.289-295, 2002.

Craufurd, P. Q. et al. Drought, pod yield, pre-harvest *Aspergillus* infection and aflatoxin contamination on peanut in Niger. *Field Crops Research*, v.98, n 1, p.20-29, 2006.

Dorner, J. W. et al. Evaluation of biological control formulations to reduce aflatoxina contamination in peanuts. *Biological Control*, v. 26, p. 318-324, 2003.

Dorner, J. W.; Cole, R. J.; Sanders, T. H.; Blankenship, P. D. Interrelationship of kernel water activity, soil temperature, maturity, and phytoalexin production in preharvest aflatoxin contamination of drought-stressed peanuts. *Mycopathologia*, v. 105, 117-128, 1989.

Eizendeher, L. B. Incidência de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em doces de amendoim e amendoim *in natura* comercializados no estado do Paraná. *Higiene Alimentar*, v. 19, n. 129, p. 101-104, 2005.

Freitas, V. P. S.; Brigido, B. M. Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in peanuts and their products marketed in the region of Campinas, Brazil in 1995 and 1996. *Food Additives and Contaminants*, v.15, n.7, p.807-811, 1998.

Geisen, R. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing-fungi. *Applied Microbiology*, v. 19, 388-392, 1996.

Gonçalez, E.; Nogueira, J. H. C.; Fonseca, H.; Felício, J. D.; Pino, F. A.; Corrêa, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazillian peanut kernels from sowing to harvest. *International Journal of Food Microbiology*, v. 123, 184-190, 2008.

- Hoeltz, M., J. E. Welke, H. A. Dottori and I. B. Noll (2009), Photometric procedure for quantitative analysis of aflatoxin b1 in peanuts by thin-layer chromatography using charge coupled device detector, *Química Nova*, in press.
- Horn, B. W.; Dorner, J. W. Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied Environmental Microbiology*, v. 65, 1444-1449, 1999.
- Horn, B. W.; Dorner, J. W. Soil population of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanuts-growing regions of the United States. *Mycologia*, v. 90, 767-776, 1998.
- Horn, B. W.; Dorner, J. W.; Greene, R. L.; Blankenship, P. D.; Cole, R. J. Effect of *Aspergillus parasiticus* soil inoculum on invasion of peanut seeds. *Mycopathologia*, v. 125, 179-191, 1994.
- Hussein, S.H.; Brasel, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, v.167, p.101–134, 2001.
- IARC – International Agency of Research on Cancer - Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: OMS, v. 82, 2002.
- Lin, M. T.; Dianese, J. C. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology*, Washington, p. 1466-1469, dez. 1976.
- Nakai, V. K. et al. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. *Food Chemistry*, v.106, p.285-290, 2008.

- Neal, G. E. et al. Differences detected in vivo between samples of aflatoxina-contaminated peanut meal, following decontamination by two ammonia-based processes. *Foods Additives and Contaminants*, v. 18, n. 2, p. 137-149, 2001.
- Pitt, J. I.; Hocking, A. D. *Fungi and Food Spoilage*, vol. 2. Blackie Academic and Professional, London, 1997.
- Pitt, J. I.; Glenn, D. R.; Hocking, A. D. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 54, 109-114, 1983.
- Przybylski, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, v. 58, n. 1, p. 163-164, 1975.
- Rustom, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, v. 59, p. 57-67, 1999.
- Sabino, M. et al. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the state of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. *Revista de Microbiologia*, v.30, p.85-88, 1999.
- Soares, L. M. V.; Rodriguez-Amaya, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multitoxin thin layer chromatographic method. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, v.72, p.22-26, 1989.
- Sulaiman, M.R. et al. The occurrence of aflatoxins in raw shelled peanut samples from three districts of Perak, Malaysia. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, v.6, n.5, p.2045-2052, 2007.

Tabela 1. Comparação da contaminação total do solo entre as regiões durante a safra 2006/2007 (cultivares Tatu e Paraguaio).

Cultivares	Regiões	Contaminação	n	Media	dp ^a	p*
Tatu	Augusto Pestana	Total Solo	40	11050	18549,75	0,468
	Ivorá		40	7468,75	2140,94	
Paraguaio	Augusto Pestana	Total Solo	40	7662,5	4267,38	0
	Ivorá		40	2387,5	616,31	

*Teste de Mann-Whitney, a 5% de significância; ^a Desvio-padrão

Tabela 2. Comparação da contaminação total do solo entre as regiões durante a safra 2007/2008 (cultivares Tatu e Paraguaio).

Cultivares	Regiões	Contaminação	n	Media	dp ^a	p*
Tatu	Augusto Pestana	Total Solo	40	9081,25	5470,43	0
	Ivorá		40	3637,5	1689,92	
Paraguaio	Augusto Pestana	Total Solo	40	12000	8128,55	0,956
	Ivorá		40	9150	2981,27	

*Teste de Mann-Whitney, a 5% de significância; ^a Desvio-padrãoTabela 3. Percentuais de incidência de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* nos diferentes períodos da cultura do amendoim nas duas regiões durante as safras 2006/2007 e 2007/2008.

Safras	Períodos	Augusto Pestana		Ivorá	
		<i>A. flavus</i> (%)	<i>A. parasiticus</i> (%)	<i>A. flavus</i> (%)	<i>A. parasiticus</i> (%)
2006/2007	Enchimento				
	grão	24	0	57	0
	Colheita	23	15	81	9
2007/2008	Pós-colheita	15	14	77	7
	Enchimento				
	grão	25	0	25	0
	Colheita	17	14	45	3
	Pós-colheita	8	8	58	6

Tabela 4. Níveis de aflatoxina B1 encontrados nas amostras dos cultivares Paraguaio e Tatu, região de Ivorá, nos diferentes períodos da cultura do amendoim nas safras 2006/2007 e 2007/2008.

Períodos	2006/2007 Aflatoxina B1(µg/Kg)		2007/2008 Aflatoxina B1(µg/Kg)	
	Tatu	Paraguaio	Tatu	Paraguaio
Enchimento grãos	ND*	ND*	ND*	ND*
Colheita	72,5	51,8	16	ND*
Pós-colheita	97,3	63	43	31,5

Tabela 5. Níveis de aflatoxina B1 encontrados nas amostras dos cultivares Paraguaio e Tatu, região de Augusto Pestana, nos diferentes períodos da cultura do amendoim nas safras 2006/2007 e 2007/2008.

Períodos	2006/2007 Aflatoxina B1(µg/Kg)		2007/2008 Aflatoxina B1(µg/Kg)	
	Tatu	Paraguaio	Tatu	Paraguaio
Enchimento grãos	ND*	ND*	ND*	ND*
Colheita	ND*	ND*	63,7	ND*
Pós-colheita	115	23	92,4	43,2

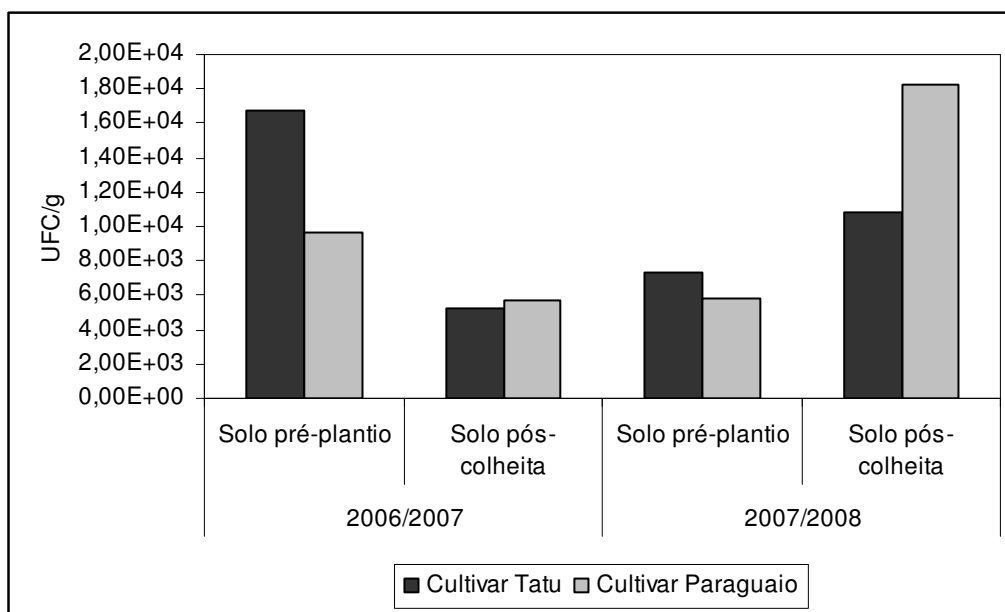


Figura 1. Contaminação fúngica total do solo nas safras de amendoim 2006/2007 e 2007/2008 analisadas na região de Augusto Pestana, RS.

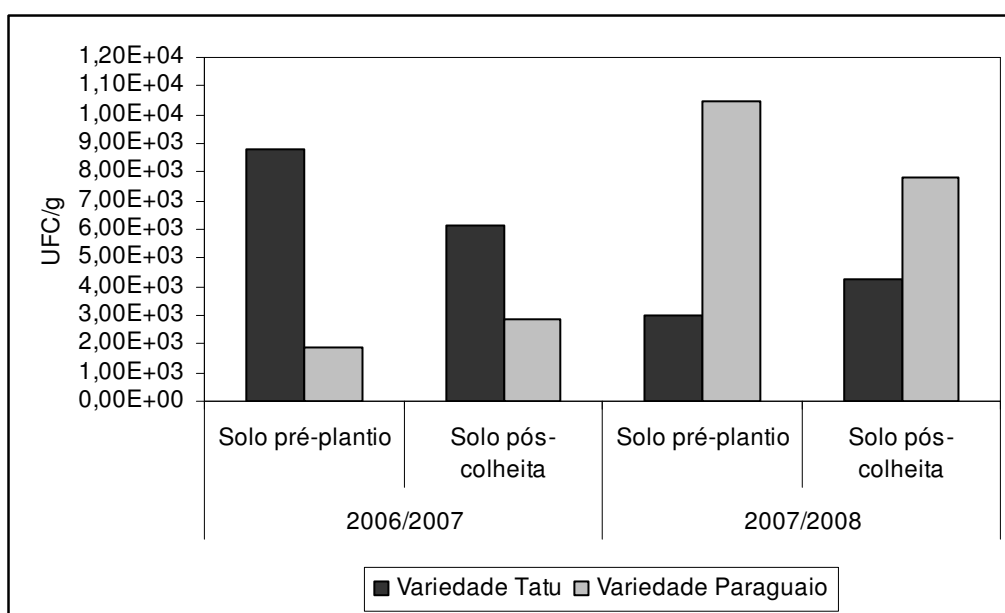


Figura 2. Contaminação fúngica total do solo nas safras de amendoim 2006/2007 e 2007/2008 analisadas na região de Ivorá, RS.

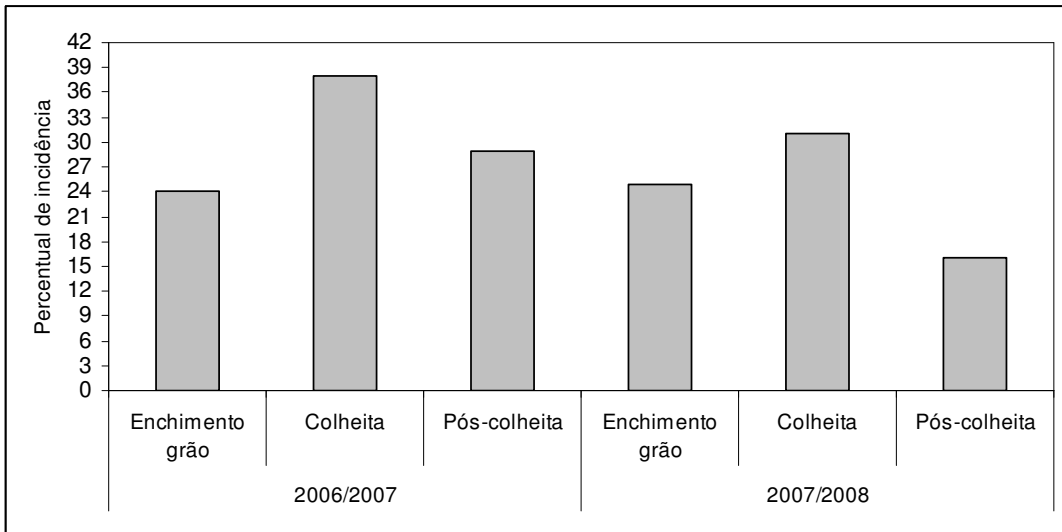


Figura 3. Percentual de incidência de *Aspergillus* seção *Flavi* nos diferentes períodos da cultura do amendoim na região de Augusto Pestana, RS.

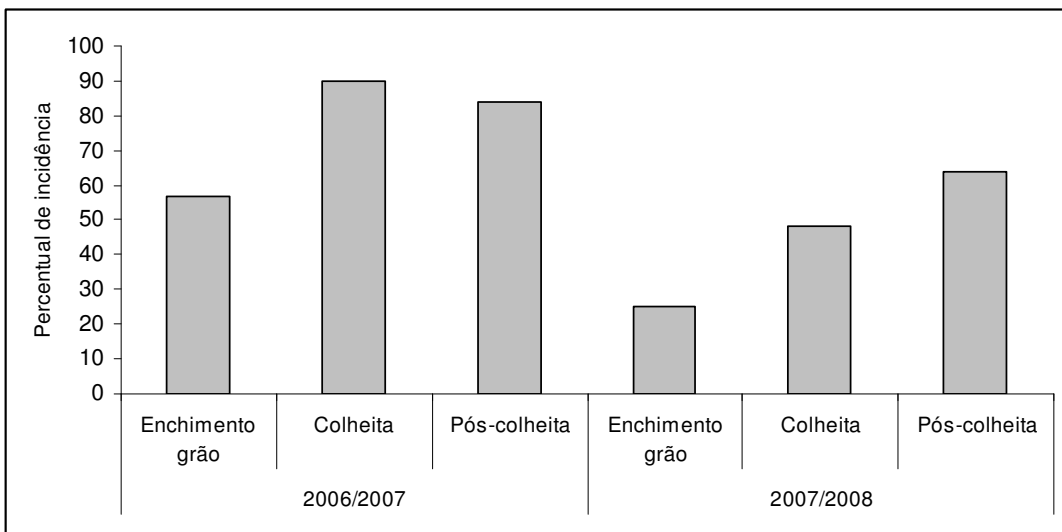


Figura 4. Percentual de incidência de *Aspergillus* seção *Flavi* nos diferentes períodos da cultura do amendoim na região de Ivorá, RS.

ARTIGO 4

***Aspergillus* section *Nigri* and ochratoxin A in pre- and postharvest of
peanut produced in the south of Brazil**

***Aspergillus* section *Nigri* and ochratoxin A in pre- and postharvest of
peanut produced in the south of Brazil**

Michele Hoeltz^{1,3}, Juliane Elisa Welke¹, Horacio Alberto Dottori², Isa Beatriz Noll¹

¹Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91570-901, Porto Alegre, RS, Brazil, ²Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91570-901, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

Ochratoxin A (OTA) contamination is receiving increasing attention worldwide because of the hazard to human and animal health. It is produced mainly by strains belonging to the *A. niger* aggregated. The objective of this study was to investigate the occurrence of OTA in pre- and postharvest of peanut produced in south of Brazil during 2006/2007 and 2007/2008 harvests. The samples were obtained from different farms located at two regions in Rio Grande do Sul State, Brazil. The grains were sampled in two different maturity stages and after drying. *Aspergillus* section *Nigri* species were isolated and the ochratoxigenic potential was tested. OTA was analyzed by thin-layer chromatography with charged coupled device detector. *A.* section *Nigri* species were detected in 100% of the samples, but none of 680 colonies were ochratoxin A producers. However, OTA was detected in 25% of the samples,

³ Corresponding author: Michele Hoeltz. E-mail: michelehoeltz@yahoo.com.br

with mean levels of 34.8 µg/Kg. This study is the first report of the occurrence of OTA in peanuts from Brazil and new researches should be conducted to found out its incidence.

Key-words: ochratoxin A, peanuts, pre-harvest, post-harvest

Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin considered of concern for human health. It is produced by a number of *Aspergillus* and *Penicillium* fungal species known to colonize a range of food commodities (Magnoli et al., 2006; Marin-Kuan et al, 2008). It is produced mainly by strains belonging to the *A. niger* aggregate and these fungi are worldwide the most common fungi causing food spoilage and biodeterioration of many commodities (Astoreca et al. 2008).

OTA has been suspected to be an etiological agent in the human disease Balkan Endemic Nephropathy (BEN) increasing the incidence of urinary tract tumours (UTT) (Marin-Kuan et al, 2008). This toxin is very persistent in human beings due to unfavourable toxicokinetic elimination that may impose serious damage to kidneys and it has been classified by the International Agency for Research on Cancer as a possibly carcinogenic (group 2B) for humans (IARC, 1993), meaning that steady toxin exposure must be considered as a cause for serious concern.

Ochratoxin A has been found in different products such as wheat (Riba et al., 2008), rice (Nguyen et al., 2007), coffee (Almeida, 2007), beer (Kawashima et al., 2007), cheese (Dall'Asta et al., 2008), bread (Zinedine et al.,

2007), grape (Lasram et al.,2008) and wine (Burdaspal & Legarda, 2007). Since the toxin is ingested with almost every meal, humans may not be free of toxin for very long periods (Petzinger & Weidenbach, 2002).

In Brazil, the peanut production is concentrated in the southeast region and the São Paulo State is the greatest producer with the production estimated to be 236.4 thousand tons during the 2007/2008 harvest representing 77.5% of the national production (CONAB, 2009). Rio Grande do Sul is the southernmost state of Brazil and contributes with approximately 2.3% of the national peanuts production (CONAB, 2009). In this region, peanuts are cultivated in small scale by rural producers. The raw peanuts and peanuts containing foods such as candies are market in rural fairs or sold to local industries.

Few surveys on the natural occurrence of OTA in peanuts have been reported, but recently some research has shown the occurrence of this mycotoxin in stored peanuts seeds from Argentina (Magnoli, et al. 2006; Magnoli et al., 2007).

The quality of peanuts and their products consumed in southeast region of Brazil is frequently monitored for the presence of aflatoxins (Nakai et al., 2008; Rodriguez-Amaya & Sabino, 2002; Sabino et al., 1999), however there is no available information about the OTA contamination of peanuts. The objective of this study was to investigate the occurrence of *A. section Nigri* species and OTA on pre-harvest and post-harvest of peanut produced in different regions of south of Brazil during 2006/2007 and 2007/2008 harvests.

Materials and methods

Sampling

Peanut samples were obtained from four different farms located at two distinct regions in Rio Grande do Sul State, Brazil: Augusto Pestana and Ivorá during 2006/2007 and 2007/2008 harvests. Each farm area was divided into uniform parcels of 40 m², and four parcels were chosen for each sampling.

The peanut grains (Paraguaio and Tatu varieties) were sampled in two different maturity stages and after drying: (1) pods at pod filling, (2) pods at harvest and (3) pods after drying. For ochratoxin A analysis, shells of the pods were removed.

Isolation and identification of mycoflora

Direct planting technique was used to assess the mycobiota. One hundred peanut grains were surface disinfected and placed onto the surface of agar plates containing Dichloran 18% Glycerol agar (DG18) or Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar media (DRBC) (Pitt & Hocking, 1997). The plates were incubated at 25°C for 7 days and the colonies transferred to plates containing Malt Extract Agar (MEA). The percentage of each peanut grain with *Aspergillus* section *Nigri* was recovered and identified according Pitt and Hocking (1997).

Ochratoxin A production

The toxigenic potential of *A.* section *Nigri* strains was tested in Yeast Extract Sucrose agar medium (YES) at 30° for 7 days of incubation (Bragulat et al., 2001). The culture media was then macerated with 1 ml of chloroform and the extract was applied in a chromatography plate. The chromatographic plates

were developed in a saturated chamber with toluene: ethyl acetate: formic acid (60:30:10, v/v). OTA spots were observed under long-wave ultraviolet light ($\lambda=366\text{nm}$) and identified by comparison with OTA standard.

Ochratoxin A analysis

The samples of peanut grains weighing approximately 1kg were ground and homogenized and a subsample of 50 g was removed for analysis in duplicate.

OTA was determined according to the method described by Soares & Rodriguez-Amaya (1989). Firstly, 50 g of each sample was extracted with 270 ml methanol and 30 ml 4% potassium chloride. Samples were blended at high speed for 5 min and filtered, and 150 ml of the filtrate was collected. After that, 150 ml 10% copper sulfate and 50 ml diatomaceous earth were added, followed by moderate stirring and filtration. The filtrate was again recovered up to 150 ml and transferred to a separation funnel, and OTA was extracted twice with 10 ml chloroform. The chloroform extracts were collected and submitted to solvent evaporation in water bath at 60 °C.

The extracts were resuspended in 100 μl chloroform and submitted to thin-layer chromatography (TLC). Different concentrations of extracts and OTA standard were applied on precoated silica gel plates (Merck, Germany). The plates were developed in a saturated chamber with toluene: ethyl acetate: formic acid (60:30:10, v/v). OTA spots were observed under long-wave ultraviolet light ($\lambda=366\text{nm}$) and identified by comparison with OTA standard. The concentration and purity of OTA standard were determined by the technique of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1998).

Confirmatory tests for OTA were carried out using alcoholic solution of sodium bicarbonate.

Quantitative analyses were performed according method described by Welke et al. (2009) with some modifications. The quantification of the fluorescence intensities from UV lamp were recorded by a charge-coupled device (CCD) camera (Sony, Tokyo, Japan). The TLC plate was positioned in system and CCD camera was aligned for optimal pixel resolution of CCD images. Five images were taken in each experiment and were analyzed using ImageJ 1.40 software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The limit of detection was 0.32 ng per spot, the limit of quantification was 2.4 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ and the mean recovery rate was 89%.

Results and discussion

The mycotoxin analysis showed that OTA was present in 25% of the samples, including 8% in pods at harvest and 17% in dried pods stages. The levels found were from 12.16 $\mu\text{g/Kg}$ to 76.9 $\mu\text{g/Kg}$. During the pod filling, OTA was not detected in any of the samples analyzed.

In the region of Augusto Pestana, OTA was detected in Tatu and Paraguaio varieties during 2006/2007 season at harvest time and after drying. However, in 2007/2008 harvest, OTA was only detected in the sample of Tatu variety, after drying (Table 1). In the region of Ivorá, OTA was detected only in one sample of dried pods, in Paraguaio varitie during the 2007/2008 harvest (Table 2).

It is the first report of the occurrence of OTA in peanuts from Brazil and this information indicates a possible human exposure through the ingestion of peanut and their products.

Aspergillus section *Nigri* was found in 100% of the peanut grains samples and the *A. niger* var *niger* was the most frequent specie isolated. None of 680 colonies of *A.* section *Nigri* were ochratoxin A producers in the conditions tested. It is important to note that it is possible to detect OTA without the presence of the producing mold since chemical processes or environmental changes can inactivate the mold spores but not alter the toxin that remains in the substratum (Amézqueta et al. 2008).

In the region of Augusto Pestana, the means of contamination were of 51.5% and 48.5%, during the 2006/2007 and 2007/2008 harvests, respectively (Figure 1). High frequency of *A.* section *Nigri* species was found at pod filling and harvest time in Paraguaio variety, during 2007/2008 harvest.

In the region of Ivorá, the means of contamination were of 42% and 58%, during the 2006/2007 and 2007/2008 harvests, respectively (Figure 2). High frequency of *A.* section *Nigri* species was found at pod filling and harvest time in Tatu variety, during 2007/2008 harvest.

The establishment of a pattern of contamination by *A.* section *Nigri* and the presence of OTA was not possible, probably because the environmental conditions were not stable between the periods examined (data not shown).

Magnoli et al. (2007) investigating the occurrence of *Aspergillus* section *Nigri* and OTA in storage peanuts, found the mycotoxin in 50% of the peanut samples, with mean values ranging from 5.6 to 130 ng/g. From the section

Nigri, the species belonging to *A. niger* aggregate were isolate in 100% of the samples and 32% out of 322 strains were OTA producers in culture.

The fact of OTA be detected in storage peanuts may be related to contamination during the harvest (Barros et al., 2003) and can indicate poor agricultural practices.

European countries and USA have proposed OTA limits from to 2 to 5 ug/Kg in cereals and wine (EC, 2002; EC, 2006), but there are no established limits for peanuts and their products. The same happens in Brazil and other countries of South America.

More studies must be conducted on OTA occurrence in peanuts produced in Brazil. Since production and consumption in this country is increasing, control the levels of OTA is necessary. Moreover, knowledge of the extent of OTA contamination in Brazilian peanuts is important to establish national regulations and to implement strategies of good agricultural practices to prevent toxin accumulation during the peanut crop.

Conclusions

Good management of the agricultural environment may be a way to reduce mycotoxins and toxigenic fungal contamination in peanuts once the pods are exposed to different environmental conditions during their formation, and the optimal conditions for mycotoxin production and fungal growth are frequently found in the crop fields, mainly in warmer regions. This study is the first report of the occurrence of OTA in peanuts from Brazil and new researches should be conducted to found out its incidence.

Acknowledgements

The authors thank Toxicology Laboratory at the Institute of Food Science and Technology of the Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Graduate Course of Environmental and Agriculture Microbiology - UFRGS and Coordenadoria para Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for the graduate scholarships.

References

- Almeida, A. P. et al. Ochratoxin A in brazilian instant coffee. *Brazillian Journal of Microbiogyl.*, v.38, no.2, 300-303, 2007.
- Amézqueta, S.; González-Peñas, E.; Murillo-Arbizu, M.; Cerain, A. L. Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control*, 2008, doi:10.1016/j.foodcont.2008.05.017
- Astoreca, A.; Barberis, C.; Magnoli, C.; Combina, M.; Dalcero, A. Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains on irradiated peanut seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.002.
- AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. 16.ed. 4th ver. 1998. (Software Adobe and E-DOC/CJS).
- Barros, G.; Torres, A.; Palacio, G.; Chulze, S. *Aspergillus* species from section *Flavi* isolated from soil at planting and harvest time in peanut-growing regions of Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.83, 1303-1307, 2003.

Bragulat, M.R; Abarca, M.L; Cabañes, F.J. An easy screening method for fungi production Ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, v. 71, n. 2, p. 139-144, 2001.

Burdaspal, P.; Legarda, T. Occurrence of ochratoxin A in sweet wines produced in Spain and other countries. *Food Additives and Contaminants*, v. 24, n. 9, p. 976-986, 2007.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Série histórica de produção de amendoim. Acessado em 10 maio 2009. Online. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=131>

Dall'asta, C.; J. De Dea Lindner, G.; Galaverna, A.; Dossena, E. ; R. Marchelli. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. *Food Chemistry*, v. 2, 729-734, 2008.

European Commission (EC). Commission regulation (EC9 no. 472/2002 of March 2002, amending regulation no. 466/2002 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 75, 18-20, 2002.

European Commission (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 364, 5–24, 2006.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: World Health Organization, v.56, p.489, 1993.

Kawashima, L. M.; Vieira, A. P.; Soares, L. M. V. Fumonisin B1 and ochratoxin A in beers made in Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, no. 2, 317-323, 2007.

Lasram, S. et al. Evolution of ochratoxin A content during red and rose vinification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 88, n. 10, p. 1696-1703, 2008.

Magnoli, C.; Astoreca, A.; Ponsone, M. L.; Fernández-Juri, M. G.; Barberis, C.; Dalcerro, A. M. Ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in peanut seeds at different months of storage in Córdoba, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, v.119, 213-218, 2007.

Magnoli, C.; Astoreca, A.; Ponsone, L.; Chiacchiera, S.; Dalcerro, A. Ochratoxin A and ochratoxin A producing fungi in stored peanut seeds from Córdoba Province, Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, 2369-2373, 2006.

Marin-Kuan, M.; Cavin, C.; Delatour, T.; Schilter, B. Ochratoxin A carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanisms. *Toxicol*, 52, 195–202, 2008.

Nakai, V. K. et al. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. *Food Chemistry*, v.106, 285-290, 2008.

Nguyen, M.T. et al. Occurrence of aflatoxin B₁, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry, Japan*, v.105, 42-47, 2007.

Petzinger, E.; Weidenbach, A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science*, v. 76, 245-250, 2002.

Pitt, J. I.; Hocking, A. D. *Fungi and Food Spoilage*, vol. 2. Blackie Academic and Professional, London, 1997.

Riba, A., S. Mokrane, F. Mathieu, A. Lebrihi and N. Sabaou (2008), Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat, *International Journal of Food Microbiology*, v. 122 , 85-92.

Rodriguez-Amaya, D. B.; Sabino, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.33, 1-11, 2002.

Sabino, M. et al. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the state of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. *Revista de Microbiologia*, v.30, 85-88, 1999.

Soares, L. M. V.; Rodriguez-Amaya, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multitoxin thin layer chromatographic method. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, v.72, 22-26, 1989.

Welke, J. E.; Hoeltz, M.; Dottori, H. A.; Noll, I. B. Quantitative analysis of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using charge coupled device detector, *Food Additives and Contaminants*, v. 26, 754-458, 2009.

Zinedine, A.; Juan, C.; Idrissi, L.; Mañes, J. Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco. *Microchemical Journal*, v. 87, 154-158, 2007.

Table 1. Levels of ochratoxin A found at different maturity stages and after drying of peanuts during the 2006/2007 and 2007/2008 harvests, at region of Augusto Pestana, Brazil.

Samplings	Tatu variety		Paraguaio variety	
	2006/2007	2007/2008	2006/2007	2007/2008
Pod filling	ND*	ND*	ND*	ND*
At harvest	12.16 µg/Kg	ND*	17.8 µg/Kg	ND*
After drying	76.9 µg/Kg	21.0µg/Kg	19.4 µg/Kg	ND*

*Not detected

Table 2. Levels of ochratoxin A found at different maturity stages and after drying of peanuts during the 2006/2007 and 2007/2008 harvests, at region of Ivorá, Brazil.

Samplings	Tatu variety		Paraguaio variety	
	2006/2007	2007/2008	2006/2007	2007/2008
Pod filling	ND*	ND*	ND*	ND*
At harvest	ND*	ND*	ND*	ND*
After drying	ND*	ND*	ND*	61.5 µg/Kg

*Not detected

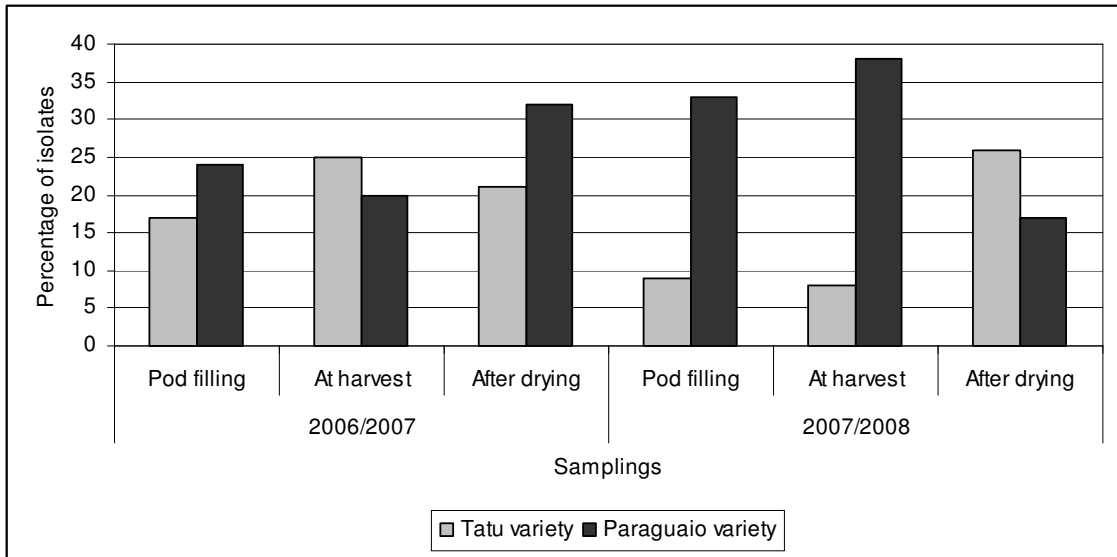


Figure 1. Percentage of *Aspergillus* section *Nigri* isolated in different stages of peanut culture of Tatu and Paraguaio varieties during 2006/2007 and 2007/2008 harvests, in the region of Augusto Pestana, Brazil.

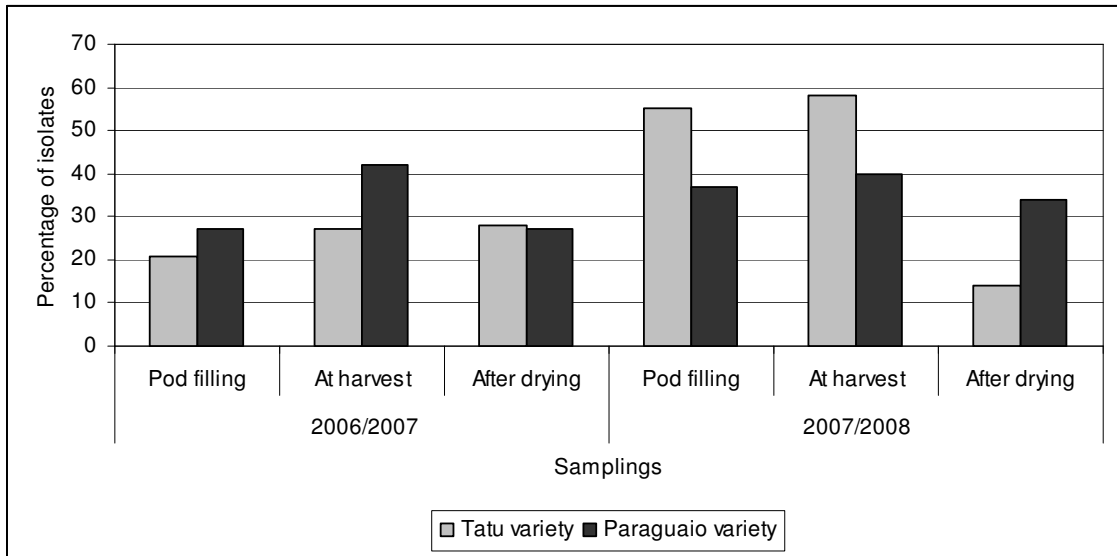


Figure 2. Percentage of *Aspergillus* section *Nigri* isolated in different stages of peanut culture of Tatu and Paraguaio varieties during 2006/2007 and 2007/2008 harvests, in the region of Ivorá, Brazil.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAIS

5.1 Contaminação fúngica do solo

Foram detectadas e isoladas de todas as amostras de solo (pré- e pós-plantio) colônias fúngicas dos gêneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. Espécies do gênero *Aspergillus* foram, no geral, as mais abundantes, destacando-se *Aspergillus* seção *Flavi* (*A. flavus* e *A. parasiticus*) e *Aspergillus* seção *Nigri* (*A. niger* var. *niger*, *A. niger* var. *awamori*, etc.).

Na região de Augusto Pestana (Tabela 1), a contaminação fúngica total do solo para os dois cultivares analisados foi de $9,36 \times 10^3$ UFC/g na safra 2006/2007 e de $1,5 \times 10^4$ UFC/g na safra 2007/2008. Na última safra pode-se observar que a contaminação do solo antes do plantio do amendoim foi significativamente menor que aquela encontrada no solo após a colheita.

Em relação ao percentual de contaminação por cepas de *A.* seção *Flavi*, na safra 2006/2007 foi observado um índice de 15,65% e de 9,62% na safra 2007/2008. Em ambos os períodos, a contaminação foi menor no solo antes do plantio, aumentando consideravelmente na pós-colheita.

Os percentuais de incidência por *A.* seção *Nigri* não oscilaram muito durante todos os períodos analisados com uma contaminação média de

12,02% na safra 2006/2007 e de 9,52% na safra 2007/2008. Ainda assim, a presença de *A. seção Nigri* foi menor quando comparada a *A. seção Flavi* em ambas as safras. Outro fato considerável é que, embora as diferenças sejam pequenas, foi notada uma diminuição das espécies de *A. seção Nigri* no solo, entre os períodos de pré-plantio e pós-colheita.

TABELA 1. Contaminação fúngica total e percentual de contaminação por *Aspergillus* seções *Flavi* e *Nigri* do solo nas safras de amendoim 2006/2007 e 2007/2008 analisadas em Augusto Pestana/RS.

Cultivares	Safras	Períodos	Contaminação Total (UFC/g)	<i>A.seção Flavi</i> (%)	<i>A. seção Nigri</i> (%)
Tatu	2006/2007	Solo pré-plantio	$1,68 \times 10^4$	9,7	10,1
		Solo pós-colheita	$5,29 \times 10^3$	21,0	12,9
	2007/2008	Solo pré-plantio	$7,33 \times 10^3$	9,7	10,1
		Solo pós-colheita	$1,08 \times 10^4$	15,2	7,6
Paraguaio	2006/2007	Solo pré-plantio	$9,69 \times 10^3$	12,3	12,7
		Solo pós-colheita	$5,64 \times 10^3$	19,6	12,5
	2007/2008	Solo pré-plantio	$5,84 \times 10^3$	3,9	12,8
		Solo pós-colheita	$1,82 \times 10^4$	9,7	7,6

Na região de Ivorá (Tabela 2), a contaminação fúngica total do solo para os dois cultivares analisados foi de $4,93 \times 10^3$ UFC/g na safra 2006/2007 e de $6,41 \times 10^3$ UFC/g na safra 2007/2008.

A presença de cepas de *A. seção Flavi* foi significativamente maior na safra 2006/2007 com 22,1% se comparada à safra 2007/2008 com 8,3%. Os percentuais de contaminação por *A. seção Nigri* também nessa região não oscilaram muito durante todos os períodos analisados com uma contaminação média de 18,8% na safra 2006/2007 e de 18,5% na safra 2007/2008.

TABELA 2. Contaminação fúngica total e percentual de contaminação por *Aspergillus* seções *Flavi* e *Nigri* do solo nas safras de amendoim 2006/2007 e 2007/2008 analisadas em Ivorá/RS.

Cultivares	Safras	Amostras	Contaminação Total (UFC/g)	A.seção <i>Flavi</i> (%)	A.seção <i>Nigri</i> (%)
Tatu	2006/2007	Solo pré-plantio	8,79x10 ³	29,6	18,1
		Solo pós-colheita	6,15x10 ³	22,7	19,7
Paraguaio	2007/2008	Solo pré-plantio	2,99x10 ³	10,9	16
		Solo pós-colheita	4,29x10 ³	8,6	14,4
	2006/2007	Solo pré-plantio	1,90x10 ³	18,4	18,9
		Solo pós-colheita	2,88x10 ³	17,6	18,6
2007/2008	Solo pré-plantio	1,05x10 ⁴	3,9	21,4	
	Solo pós-colheita	7,84x10 ³	9,7	22,2	

Quando comparada a contaminação fúngica total do solo entre safras e sem distinção de região e cultivar (Tabela 3), foi observado que houve diferença significativa entre as médias de contaminação, comparando as safras 2006/ 2007 e 2007/ 2008 ($p < 0,05$).

TABELA 3. Comparação da contaminação total média do solo entre as safras de amendoim 2006/2007 e 2007/2008.

Variável	Safra	n	Media	Desvio-padrão	p*
<i>Cont. fúngica Total</i>	2006/ 2007	64	7,14E+03	9,86E+03	0,000
	2007/ 2008	64	8,47E+03	5,91E+03	

*Teste de Mann-Whitney, a 5% de significância

O percentual de contaminação por *A. seção Flavi* total do solo entre as safras e sem distinção de região e cultivar (Tabela 4) também mostrou diferença significativa, sendo a safra 2006/2007 a que apresentou maior contaminação. Já para a presença de *A. seção Nigri* total não foi observada diferença significativa entre as safras analisadas ($p < 0,05$).

TABELA 4. Comparação da contaminação fungica média por *Aspergillus* seções *Flavi* e *Nigri* no solo entre as safras de amendoim 2006/2007 e 2007/2008, sem distinção de região e cultivar.

Variável	Safra	n	Media (%)	Desvio-padrão	p*
<i>A. seção Flavi</i>	2006/ 2007	64	18,88	6,84	0,000
	2007/ 2008	64	9,75	4,04	
<i>A. seção Nigri</i>	2006/ 2007	64	15,45	5,19	0,166
	2007/ 2008	64	13,97	6,18	

*Teste de Mann-Whitney, a 5% de significância

Considerando os cultivares de amendoim analisados e as regiões durante a safra de 2006/2007 (Tabela 5), foi observado que para o cultivar Tatu não houve diferença significativa entre a média de contaminação fúngica total do solo comparando as regiões de Augusto Pestana e Ivorá, mas quando analisada a presença de *A. seções Flavi* e *Nigri* foi observada diferença significativa entre as duas regiões, sendo a contaminação maior na região de Ivorá ($p > 0,05$). Já, para o cultivar Paraguaio, foi observada diferença significativa entre a média de contaminação fúngica total do solo sendo que Augusto Pestana apresentou maior contaminação total. ($p < 0,05$). A presença de *A. seção Flavi* no solo não diferiu significativamente entre as duas regiões, mas *A. seção Nigri* foi mais observado na região de Ivorá ($p < 0,05$).

TABELA 5. Comparação da contaminação total e por *Aspergillus seções Flavi* e *Nigri* do solo entre as regiões durante a safra 2006/2007 (cultivares Tatu e Paraguaio).

Cultivares	Regiões	Contaminação	n	Media	DP ^a	p*
Tatu	Augusto Pestana Ivorá	Total Solo	40	11050,00	18549,75	0,468
			40	7468,75	2140,94	
	Augusto Pestana Ivorá	A. Flavi Solo %	40	15,38	7,29	0,000
			40	26,19	5,53	
	Augusto Pestana Ivorá	A. Nigri Solo%	40	11,50	5,23	0,000
			40	18,94	4,14	
Paraguaio	Augusto Pestana Ivorá	Total Solo	40	7662,50	4267,38	0,000
			40	2387,50	616,31	
	Augusto Pestana Ivorá	A. Flavi Solo %	40	15,97	5,17	0,160
			40	18,00	2,53	
	Augusto Pestana Ivorá	A. Nigri Solo%	40	12,63	3,24	0,000
			40	18,75	2,86	

*Teste de Mann-Whitney, a 5% de significância; ^a Desvio-padrão

Na safra 2007/2008 os resultados não se repetiram (Tabela 6). Para o cultivar Tatu foram observadas diferenças significativas entre a média de

contaminação fúngica total do solo, maior em Augusto Pestana e a média de contaminação por *A. seção Nigri*, maior em Ivorá ($p > 0,05$).

Para o cultivar Paraguaio foram observadas diferenças significativas entre a média de contaminação fúngica no solo por *A. seção Flavi* e a média de contaminação fúngica por *A. seção Nigri*, sendo nos dois casos maior na região de Ivorá ($p > 0,05$).

TABELA 6. Comparação da contaminação total e por *Aspergillus* seções *Flavi* e *Nigri* do solo entre as regiões durante a safra 2007/ 2008 (cultivares Tatu e Paraguaio).

Cultivares	Regiões	Contaminação	n	Media	DP ^a	p*
Tatu	Augusto Pestana Ivorá	Total Solo	40	9081,25	5470,43	0,000
			40	3637,50	1689,92	
	Augusto Pestana Ivorá	A. Flavi Solo %	40	12,50	5,47	0,160
			40	9,75	1,84	
	Augusto Pestana Ivorá	A. Nigri Solo%	40	8,88	4,11	0,000
			40	15,19	2,43	
Paraguaio	Augusto Pestana Ivorá	Total Solo	40	12000,00	8128,55	0,956
			40	9150,00	2981,27	
	Augusto Pestana Barreiro - Ivorá	A. Flavi Solo %	40	6,81	3,94	0,008
			40	9,94	1,61	
	Augusto Pestana Ivorá	A. Nigri Solo%	40	10,00	4,43	0,000
			40	21,81	2,48	

*Teste de Mann-Whitney, a 5% de significância; ^a Desvio-padrão

5.2 Contaminação fúngica dos grãos durante a cultura do amendoim

Foram detectadas e isoladas de todas as amostras de grãos (períodos de enchimento do grão, colheita e após a secagem) colônias fúngicas dos gêneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. Espécies do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* foram, no geral, as mais abundantes, destacando-se *A. seção Flavi* (*A. flavus* e *A. parasiticus*) e *A. seção Nigri* (*A. niger* var. *niger*, *A. niger* var. *awamori*, etc.) (Figura 8).

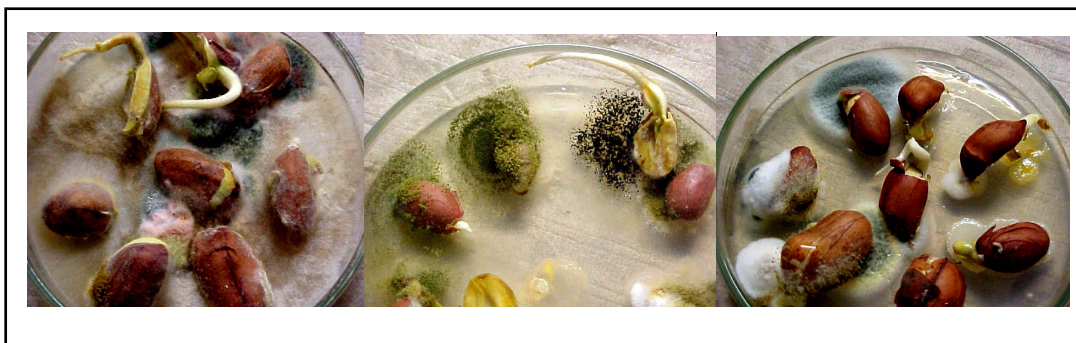


FIGURA 8. Desenvolvimento fúngico em grãos de amendoim.

Na região de Augusto Pestana, safra 2006/2007, a média da contaminação fúngica total dos grãos de amendoim do cultivar Tatu (Figura 9) foi de 91,7% e se manteve estável entre os períodos analisados. As incidências de *A. seção Flavi* e *A. seção Nigri* foram, respectivamente, de 12,8% e 21,3%, sendo maior no período da colheita dos grãos e menor no período de enchimento dos grãos, em ambos os grupos. Na safra 2007/2008, foi observado um aumento gradativo da contaminação fúngica total com uma média de 84,0%. As frequências de *A. seção Flavi* e *A. seção Nigri* foram, respectivamente, 12,2% e 14,7%, sendo a maior contaminação por *A. seção Flavi* observada no período da colheita dos grãos e por *A. seção Nigri* após a secagem dos mesmos.

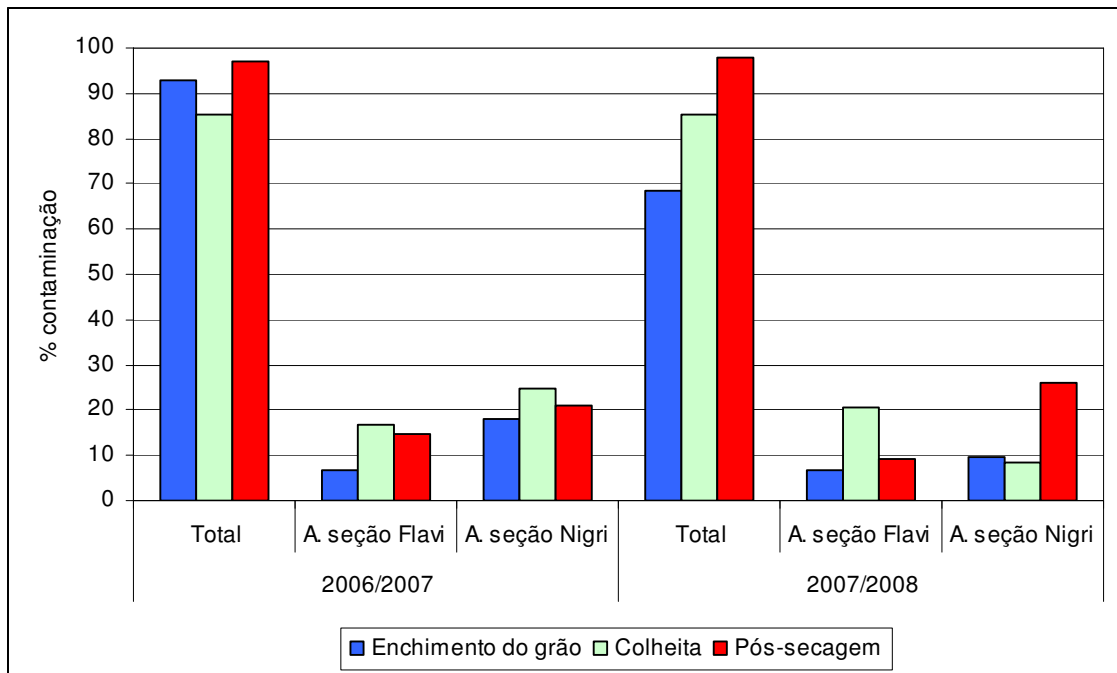


FIGURA 9. Comparação entre as contaminações fúngicas nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Tatu na região de Augusto Pestana, RS.

Nessa mesma região, safra 2006/2007, a média da contaminação fúngica total dos grãos de amendoim do cultivar Paraguaio (Figura 10) foi de 92,8%, apresentando um aumento ao longo dos períodos analisados. A freqüência de *A. seção Flavi* foi de 20,1%, sendo maior no período da colheita. A freqüência de *A. seção Nigri* foi de 26,0%, sendo maior no período de pós-colheita. Na safra 2007/2008, a contaminação total dos grãos foi de 92,0% e não foi observada variação ao longo dos períodos analisados. As freqüências de *A. seção Flavi* e *A. seção Nigri* foram, respectivamente, 13,7% e 17,4%; a maior contaminação por *A. seção Flavi* observada no período do enchimento dos grãos e por *A. seção Nigri* na colheita dos mesmos. A contaminação por *A. seção Flavi* foi menor no período de enchimento dos grãos quando comparada com *A. seção Nigri*, em ambas as safras. No período da colheita, a safra 2006/2007 apresentou maior incidência de *A. seção Nigri* enquanto que na

safrá 2007/2008 a incidência foi maior de *A. seção Flavi*. Nas duas safras, foi verificada maior contaminação por *A. seção Nigri* após a secagem dos grãos.

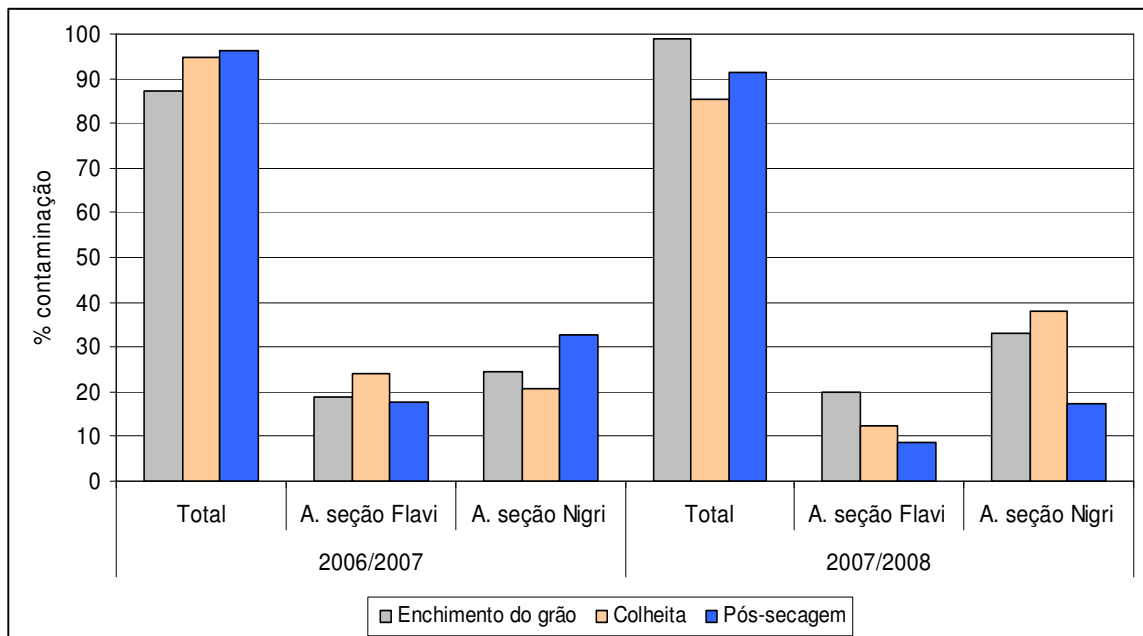


FIGURA 10. Comparação entre as contaminações fúngicas nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Paraguaio na região de Augusto Pestana, RS.

Na região de Ivorá, safra 2006/2007, a média da contaminação fúngica total dos grãos de amendoim do cultivar Tatu (Figura 11) foi de 97,8% e se manteve estável entre os períodos analisados. As frequências de *A. seção Flavi* e *A. seção Nigri* foram, respectivamente, 58,6% e 25,6%, sendo a maior contaminação por *A. seção Flavi* observada no período da colheita dos grãos. Na safra 2007/2008, foi observada uma diminuição da contaminação fúngica total entre os períodos, com uma média de 75,3%. A frequência de *A. seção Flavi* foi 36,1%, com um aumento gradativo ao longo dos períodos analisados. A frequência de *A. seção Nigri* foi de 43,4%, destacando-se os períodos de enchimento e colheita dos grãos. No geral, foi verificada a prevalência de *A.*

seção *Nigri* nas duas safras. Somente no período da colheita dos grãos na safra 2006/2007, pode-se observar uma maior incidência de *A. seção Flavi*.

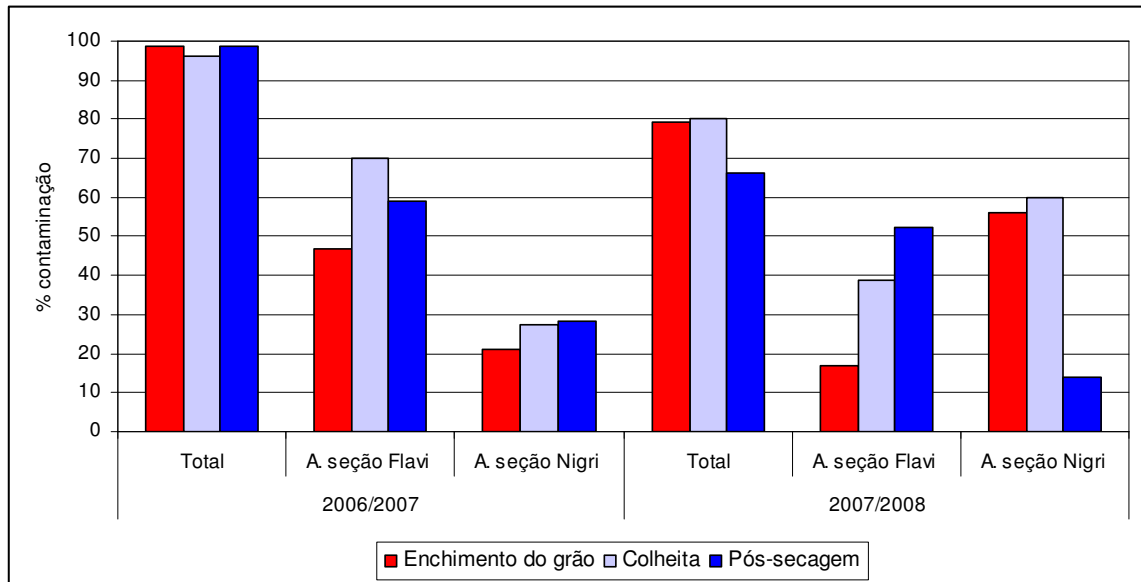


FIGURA 11. Comparação entre as contaminações fúngicas nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Tatu na região de Ivorá, RS.

Nessa mesma região, safra 2006/2007, a média da contaminação fúngica total dos grãos de amendoim do cultivar Paraguaio (Figura 12) foi de 87,7% com uma diminuição ao longo dos períodos analisados. A frequência de *A. seção Flavi* foi 19,6% e maior no período da pós-colheita. A frequência de *A. seção Nigri* foi 33,1%, predominando no período de enchimento dos grãos. Na safra 2007/2008, a contaminação total dos grãos foi de 77,2% sem variação ao longo dos períodos analisados. A frequência de *A. seção Flavi* foi 10,8%, sendo observado um pequeno aumento ao longo dos períodos. Enquanto *A. seção Nigri* foi observado em 38,4% dos grãos, destacando-se no período da colheita. No geral, foi observada uma prevalência de *A. seção Nigri* em todos os períodos analisados, em ambas as safras.

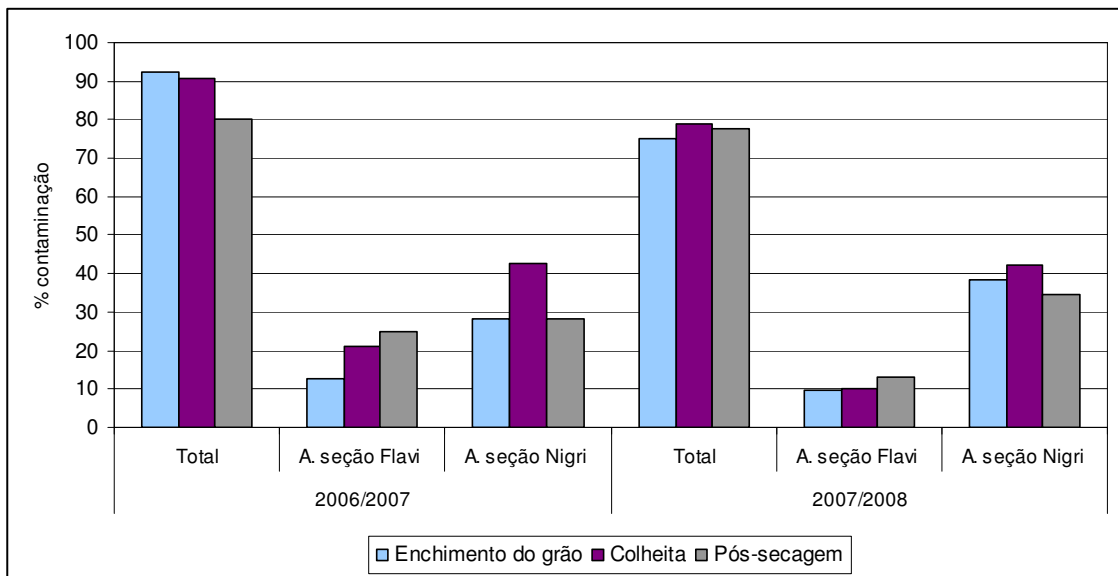


FIGURA 12. Comparação entre as contaminações fúngicas nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Paraguaio na região de Ivorá, RS.

De forma geral, a distribuição das contaminações por *A. seção Flavi* e *A. seção Nigri* variaram muito entre as safras e os períodos analisados, não permitindo o estabelecimento de um padrão de contaminação. Entretanto, foi verificado na maioria das amostras que um grupo de *Aspergillus* predominou sobre outro, havendo raramente um equilíbrio entre *A. seção Flavi* e *A. seção Nigri*.

5.3 Incidência e potencial toxigênico das espécies de *Aspergillus* seção *Flavi* e *Aspergillus* seção *Nigri*

Nas safras 2006/2007 e 2007/2008, na região de Augusto Pestana foram isoladas 163 colônias de *A. seção Flavi*, sendo 68,7% identificadas como *A. flavus* e 31,3% como *A. parasiticus*. Dos isolados de *A. flavus* 89,3% se mostraram produtores de aflatoxina B1 (Figura 13) e dos isolados de *A. parasiticus*, 39,2% produziram aflatoxina B1 nas condições testadas. Foram isoladas ainda 270 colônias de *A. seção Nigri*, sendo 71,1% identificadas como *A. niger var niger*, 22,2% *A. niger var awamori* e 6,7% de outras espécies de

aspergillus negros. Nenhum dos isolados de *A. seção Nigri* se mostraram produtores de ocratoxina A nas condições testadas.

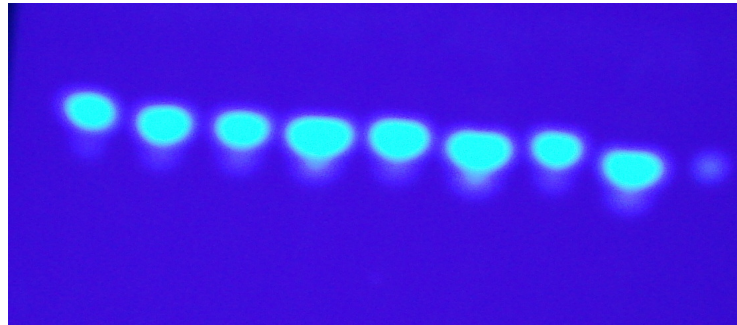


FIGURA 13. Manchas fluorescentes de aflatoxina B1 em placa cromatográfica produzidas por *Aspergillus flavus*.

Nas safras 2006/2007 e 2007/2008, na região de Ivorá foram isoladas 368 colônias de *A. seção Flavi*, sendo 93,2% identificadas como *A. flavus* e 6,8% como *A. parasiticus*. Dos isolados de *A. flavus* 70,3% se mostraram produtores de aflatoxina B1 e dos isolados de *A. parasiticus*, 32% produziram aflatoxina B1 nas condições testadas. Das 410 colônias de *A. seção Nigri* isoladas, 74,2% foram identificadas como *A. niger var niger*, 15,6% como *A. niger var awamori* e 10,2% de outras espécies de aspergillus negros. Nenhum dos isolados de *A. seção Nigri* se mostraram produtores de ocratoxina A nas condições testadas.

Em relação ao número de colônias isoladas de cada espécie, considerando-se a região e o cultivar, foi observado que em Augusto Pestana para o cultivar Tatu (Figura 14), *A. flavus* foi isolado em todos os períodos analisados tendo a maior incidência ocorrido no período da colheita, em ambas as safras. *A. parasiticus* foi isolado somente nos períodos da colheita e pós-

colheita. *A. niger* var *niger* também foi isolado em todos os períodos pesquisados.

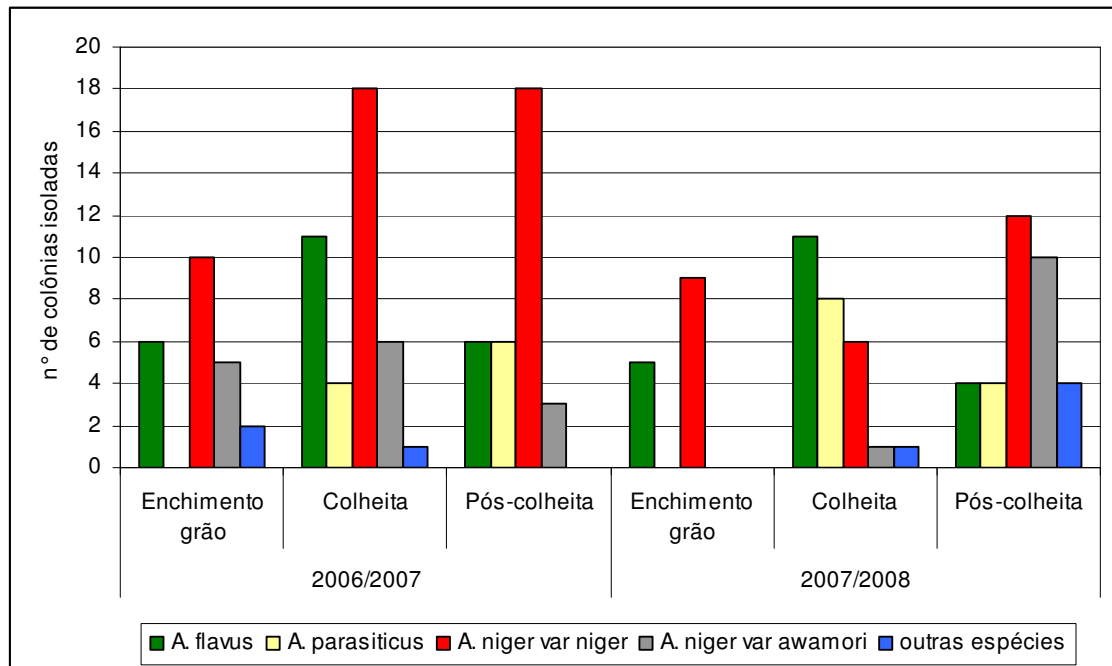


FIGURA 14. Comparação entre o número de colônias isoladas das espécies de *A. seção Flavi* e *A. seção Nigri* nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Tatu na região de Augusto Pestana, RS.

Para o cultivar Paraguai (Figura 15), *A. flavus* e *A. niger* var *niger* foram isolados de todos os períodos analisados, tendo a maior incidência ocorrido no período de enchimento dos grãos, em ambas as safras. *A. parasiticus* foi isolado somente nos períodos da colheita e pós-colheita.

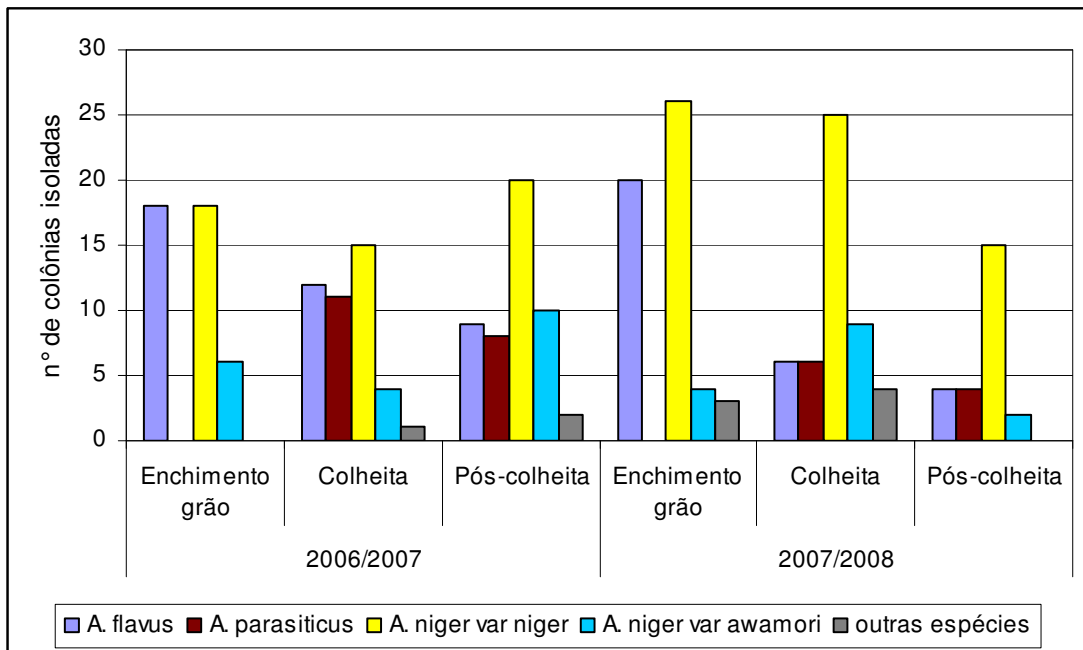


FIGURA 15. Comparação entre o número de colônias isoladas das espécies de *A. seção Flavi* e *A. seção Nigri* nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Paraguaio na região de Augusto Pestana, RS.

Na região de Ivorá, para o cultivar Tatu (Figura 16), *A. niger var niger* foi a espécie predominante em ambas as safras. *A. flavus* predominou no período de enchimento dos grãos e *A. parasiticus* foi isolado somente dos períodos de colheita e pós-colheita. No cultivar Paraguaio (Figura 17), a safra 2006/2007 apresentou maior incidência de *A. flavus*, enquanto que na safra 2007/2008 a incidência dessa espécie aumento ao longo dos períodos analisados. A presença de *A. niger var niger* foi maior na safra 2007/2008.

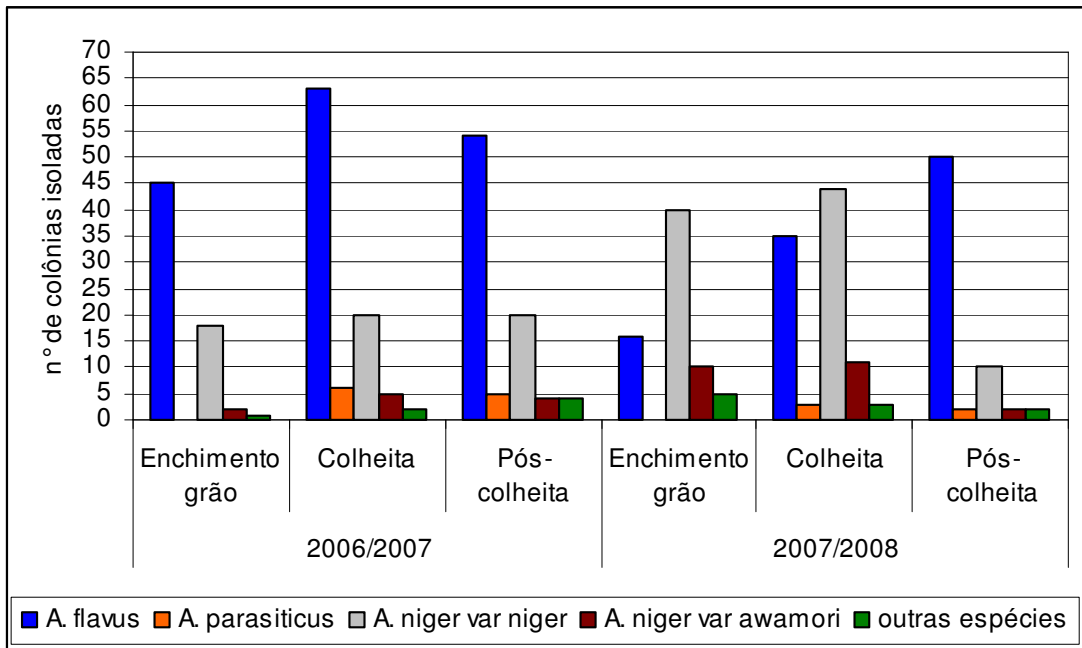


FIGURA 16. Comparação entre o número de colônias isoladas das espécies de *A. seção Flavi* e *A. seção Nigri* nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Tatu na região de Ivorá, RS.

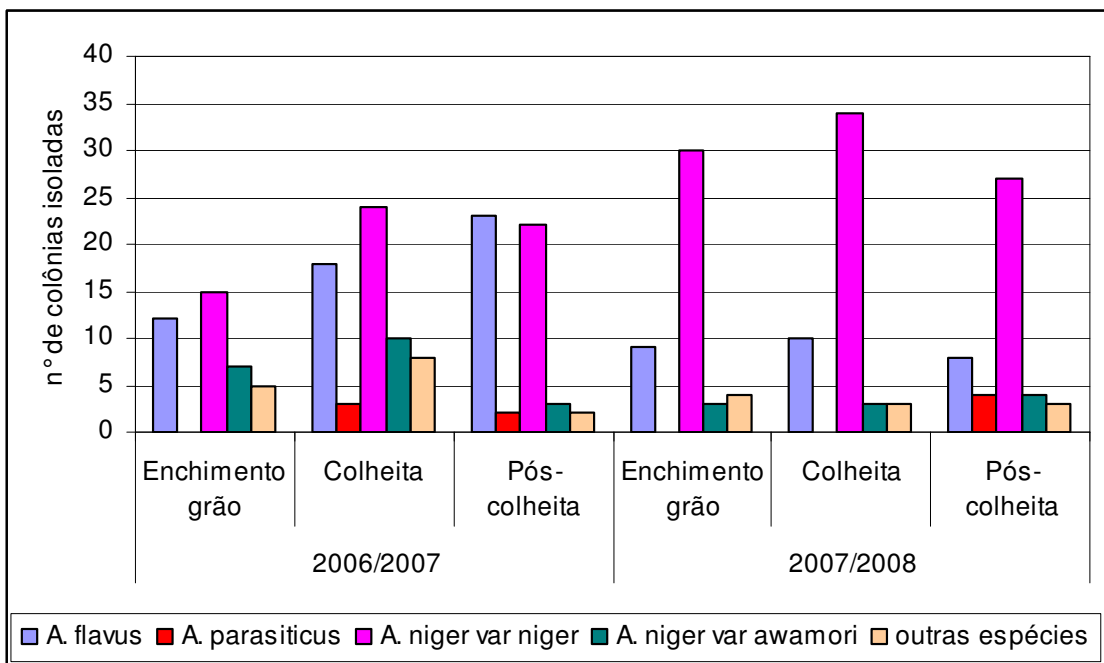


FIGURA 17. Comparação entre o número de colônias isoladas das espécies de *A. seção Flavi* e *A. seção Nigri* nos diferentes períodos da cultura do amendoim do cultivar Paraguaio na região de Ivorá, RS.

5.4 Micotoxinas nas amostras de amendoim

Aflatoxina B1 foi detectada em 50% das amostras, com níveis entre 16 µg/Kg e 115 µg/Kg. Ocratoxina A foi detectada em 25% das amostras, com níveis entre 12,16 µg/Kg e 76,9 µg/Kg. Foi observada a ocorrência simultânea das duas micotoxinas em amostras do período pós-colheita. Em nenhuma das amostras foram detectadas micotoxinas no período de enchimento dos grãos.

Na região de Augusto Pestana, a maior contaminação por micotoxinas foi observada no cultivar Tatu (Tabela 7). Na safra 2006/2007, foi observada a presença de ocratoxina A no período da colheita, fato que não se repetiu na safra posterior; na safra 2007/2008 ocorreu o inverso quanto à presença de aflatoxina B1. As duas micotoxinas ocorreram simultaneamente no período pós-colheita, com níveis significativamente maiores na safra 2006/2007.

TABELA 7. Níveis de aflatoxina B1 e ocratoxina A encontrados nas amostras do cultivar Tatu, região de Augusto Pestana, nos diferentes períodos da cultura do amendoim nas safras 2006/2007 e 2007/2008.

Períodos	2006/2007		2007/2008	
	Aflatoxina B1	Ocratoxina A	Aflatoxina B1	Ocratoxina A
Enchimento dos grãos	ND*	ND*	ND*	ND*
Colheita	ND*	12,16µg/Kg	63,7 µg/Kg	ND*
Pós-colheita	115 µg/Kg	76,9 µg/Kg	92,4 µg/Kg	21 µg/Kg

*ND = não detectado

No cultivar Paraguaio (Tabela 8), as duas micotoxinas ocorreram simultaneamente, apenas na safra 2006/2007, também no período pós-colheita. Individualmente, ocratoxina A foi detectada na safra 2006/2007 no período da colheita e aflatoxina B1, no período pós-colheita da safra 2007/2008.

TABELA 8. Níveis de aflatoxina B1 e ocratoxina A encontrados nas amostras do cultivar Paraguaio, região de Augusto Pestana, nos diferentes períodos da cultura do amendoim nas safras 2006/2007 e 2007/2008.

Períodos	2006/2007		2007/2008	
	Aflatoxina B1	Ocratoxina A	Aflatoxina B1	Ocratoxina A
Enchimento dos grãos	ND*	ND*	ND*	ND*
Colheita	ND*	17,8 µg/Kg	ND*	ND*
Pós-colheita	23 µg/Kg	19,4 µg/Kg	43,2 µg/Kg	ND*

*ND = não detectado

Na região de Ivorá, no cultivar Tatu (Tabela 9), aflatoxina B1 foi detectada nos períodos da colheita e pós-colheita, em ambas as safras, com níveis maiores na safra 2006/2007. No cultivar Paraguaio (Tabela 10), na safra 2006/2007 foi detectada aflatoxina B1 nos períodos da colheita e pós-colheita, enquanto que na safra 2007/2008, foi detectada a ocorrência simultânea de aflatoxina B1 e ocratoxina A no período da pós-colheita.

TABELA 9. Níveis de aflatoxina B1 e ocratoxina A encontrados nas amostras do cultivar Tatu, região de Ivorá, nos diferentes períodos da cultura do amendoim nas safras 2006/2007 e 2007/2008.

Períodos	2006/2007		2007/2008	
	Aflatoxina B1	Ocratoxina A	Aflatoxina B1	Ocratoxina A
Enchimento dos grãos	ND*	ND*	ND*	ND*
Colheita	72,5 µg/Kg	ND*	16 µg/Kg	ND*
Pós-colheita	97,3 µg/Kg	ND*	43 µg/Kg	ND*

*ND = não detectado

TABELA 10. Níveis de aflatoxina B1 e ocratoxina A encontrados nas amostras do cultivar Paraguaio, região de Ivorá, nos diferentes períodos da cultura do amendoim nas safras 2006/2007 e 2007/2008.

Períodos	2006/2007		2007/2008	
	Aflatoxina B1	Ocratoxina A	Aflatoxina B1	Ocratoxina A
Enchimento dos grãos	ND*	ND*	ND*	ND*
Colheita	51,8 µg/Kg	ND*	ND*	ND*
Pós-colheita	63 µg/Kg	ND*	31,7 µg/Kg	61,5 µg/Kg

*ND = não detectado

Cabe salientar que os níveis de contaminação encontrados no período da colheita aumentaram no período da pós-colheita. Esse incremento

foi de cerca de 26,7 µg/Kg para aflatoxina B1 e de cerca de 33,6 µg/Kg para ocratoxina A.

5.5 Desempenho do método para a quantificação de aflatoxina B1 e ocratoxina A nas amostras de amendoim

O desempenho da cromatografia em camada delgada com detector de carga acoplada (CCD-DCA) como método analítico foi avaliado tendo por base os seguintes parâmetros: linearidade, porcentagem de recuperação, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

Para aflatoxina B1, o LD foi de 0,4 ng por mancha e o LQ foi de 1,2 µg/kg. O coeficiente de regressão linear obtido da análise de curvas-padrão com concentrações de 0,8, 1,6, 2,4, 3,2 e 4,8 ng por mancha ($y = 40255x - 1894.8$) foi de 0,998. Os percentuais de recuperação obtidos através da contaminação de amostras com 16, 20 e 32 µg/kg, em triplicata, foram de 94, 97 e 102%, respectivamente, e o desvio-padrão relativo para as repetições foi 4,2, 4,0 e 5,6, respectivamente.

Para ocratoxina A, o LD foi de 0,32 ng por mancha e o LQ foi de 2,4 µg/kg. O coeficiente de regressão linear obtido da análise de curvas-padrão com concentrações de 0,8, 1,6, 2,4, 3,2 e 4,8 ng por mancha ($y = 5.067x + 1.6786$) foi de 0,996.

Os percentuais de recuperação obtidos através da contaminação de amostras com 16, 20 e 32 µg/kg, em triplicata, foram de 87, 90 e 91%, respectivamente, e o desvio-padrão relativo para as repetições foi 7,8, 6,4 e 9,2, respectivamente.

6 CONCLUSÕES

As espécies que predominaram nas amostras de solo antes e após o plantio do amendoim foram *A. niger* seção *niger* e *A. flavus*. A alta incidência dessas duas espécies também foi verificada nos períodos de enchimento dos grãos, na colheita e após a secagem, fato que ocorreu nas duas regiões analisadas e em ambas as safras. Foi observado um grande percentual de produtores de aflatoxina B1, sendo isolados de todas as amostras.

Aflatoxina B1 foi detectada em 50% das amostras, com níveis entre 16 µg/Kg e 115 µg/Kg, sendo sua ocorrência registrada nos períodos da colheita e após a secagem dos grãos. A presença de aflatoxina B1 em manejos pré- e pós-colheita já era esperada, uma vez que as espécies produtoras desse metabólito estão disseminadas no ar e solo, encontrando no amendoim condições propícias para o seu desenvolvimento.

Ocratoxina A foi detectada em 25% das amostras, com níveis entre 12,16 µg/Kg e 76,9 µg/Kg. A detecção dessa micotoxina foi um fato novo, ainda não documentado em amendoim brasileiro e que merece atenção, pois os efeitos tóxicos sinérgicos pela ocorrência simultânea com aflatoxina B1, como observada nesse estudo, ainda não estão completamente elucidados.

O método desenvolvido para a quantificação de aflatoxina B1, baseado na técnica de cromatografia em camada delgada com detector de carga acoplada se mostrou sensível e eficiente, detectando com precisão níveis suficientemente baixos, exigidos pela legislação internacional. Além disso, com a parceria do Instituto de Física desta universidade, foi possível o desenvolvimento de um fotômetro adequado as análises (em processo de patente).

Não foi possível o estabelecimento de um padrão para a contaminação fúngica ao comparar as regiões, os cultivares e os períodos analisados, o mesmo ocorrendo para a ocorrência de aflatoxina B1 e ocratoxina. Isso traz a necessidade de mais pesquisas em relação à qualidade micotoxicológica do amendoim produzido no Rio Grande do Sul em colaboração com o pequeno agricultor e com instituições dedicadas ao agronegócio no Estado, como a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER/RS-ASCAR). Através do levantamento de dados sobre essa contaminação e sua ocorrência podem-se estabelecer medidas de controle, como base nas boas práticas agrícolas, tais como a rotação de culturas, o controle biológico e o plantio de variedades mais resistentes.

7 REFERÊNCIAS

AMÉZQUETA, S.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A. L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 326-333, 2009.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br.htm>> Acesso em: 12 de jan. 2006.

ASTORECA, A.; BARBERIS, C.; MAGNOLI, C.; COMBINA, M.; DALCERO, A. Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains on irradiated peanut seeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, p. 131-135, 2009.

ATLAS SÓCIO-ECONÔMICO DO RIO GRANDE DO SUL. Amendoim, cana-de-açúcar e erva-mate. Disponível em: <<http://www.scp.rs.gov.br/atlas/atlas.asp?menu=269>> Acesso em: 26 mai. 2009.

BALASAHEB, W.P.; SINHA, N.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A.K. Teratogenic effects of ochratoxin A and aflatoxin B1 alone and in combination on post-implantation rat embryos in culture. **Journal of the Turkish German Gynecology Association Ártemis**, Turkish, v. 8, n. 4, p. 357-364, 2007.

BARROS, G. et al. Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strain isolated from peanut-cropped soils in Argentina. **Soil Biology & Biochemistry**, Netherlands, v. 38, p. 145-152, 2006.

BARROS, G.; TORRES, A.; PALACIO, G.; CHULZE, S. *Aspergillus* species from section *Flavi* isolated from soil at planting and harvest time in peanut-growing regions of Argentina. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, United Kingdom, p. 1303-1307, 2003.

BRAICU, C.; PUIA, C.; BODOKI, E.; SOCACIU, C. Scening and quantification of aflatoxins and ochratoxin A in different cereals cultivated in Romania using thin-layer chromatography-densitometry. **Journal of Food Quality**, Trumbull, v. 31, p. 108–120, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº183, de 21 de março de 1996. Adota Regulamento Técnico MERCOSUL sobre seus limites máximos admissíveis no leite, amendoim e milho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 mar. 1996. Seção Suplemento, p. 42.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 274, de 15 de outubro de 2002. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 out. 2002. Seção 1, p. 45-46.

BROWN, A.L.; ODELL, E.W.; MANTLE, P.G. DNA ploidy distribution in renal tumours induced in male rats by dietary ochratoxin. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Germany, v. 59, n. 2, p. 85-95, 2007.

BURDASPAL, P.; LEGARDA, T. Occurrence of ochratoxin A in sweet wines produced in Spain and other countries. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 24, n. 9, p. 976-986, 2007.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e risco para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

COLE, R.J. et al. Mean geocarposphere temperature that induce pre-harvest aflatoxin contamination of peanuts under drought-stressed. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 91, n. 3, p. 41-46, 1985.

COLVARA, M. E. C. **Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados, no estado do Rio Grande do Sul, no período de 2001 a 2004**. 2005. 47 f. Monografia (Especialização) – Curso de Especialização em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Série histórica de produção de amendoim**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 10 maio 2009.

CRAUFURD, P. Q. et al. Drought, pod yield, pre-harvest *Aspergillus* infection and aflatoxin contamination on peanut in Niger. **Field Crops Research**, Netherlands, v.98, n 1, p.20-29, 2006.

DALL'ASTA, C.; J. DE DEA LINDNER, G.; GALAVERNA, A.; DOSSENA, E. ; R. MARCHELLI. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese, **Food Chemistry**, London, v. 2, p. 729-734, 2008.

DHINGRA, O.D.; COELHO NETO, R.A. Micotoxinas em grãos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, n. 1, p. 49-101, 1998.

DORNER, J. W.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; BLANKENSHIP, P. D. Interrelationship of kernel water activity, soil temperature, maturity, and phytoalexin production in preharvest aflatoxin contamination of drought-stressed peanuts. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 105, p. 117-128, 1989.

DORNER, J. W. et al. Evaluation of biological control formulations to reduce aflatoxina contamination in peanuts. **Biological Control**, Orlando, v. 26, p. 318-324, 2003.

DORNER, J. W. Management and prevention of mycotoxins in peanuts. **Food Additives & Contaminants: Part A**, London, v. 25, n. 2, p. 203-208, 2005.

DORNER, J. W. Management and prevention of mycotoxins in peanuts. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 25, n. 2, p. 134-145, 2008.

EIZENDEHER, L. B. Incidência de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em doces de amendoim e amendoim *in natura* comercializados no estado do Paraná. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 129, p. 101-104, 2005.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission regulation (EC) no. 472/2002 of March 2002, amending regulation no. 466/2002 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L 75, 18-20, 2002.

FAGUNDES, M. H. Outubro de 2002. **Sementes de amendoim: alguns comentários**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br.htm>>. Acesso em 20 jan. 2006.

FEDERAÇÃO DAS ASSOCIAÇÕES DE MUNICÍPIOS DO RIO GRANDE DO SUL (FAMURS). **Informações municipais**. Disponível em: <<http://www.famurs.com.br/>>. Acesso em: 25 mai 2009.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. **Food and Nutrition Papers**, v. 81, p. 180, 2004.

FREITAS, V. P. S.; BRIGIDO, B. M. Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in peanuts and their products marketed in the region of Campinas, Brazil in 1995 and 1996. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 15, n. 7, p. 807-811, 1998.

FRISVAD, J. C.; SCOUBOE, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers. **Systematic Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, p. 442-453, 2005.

FU, Z.; HUANG, X., MIN, S. Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. **Journal of Chromatography A**, v. 1209, p. 271-274, 2008.

FURLONG, E. B. Ocorrência de micotoxinas em alimentos: situação na região sul do Brasil, no período de 1990 a 1997. **Ciência de Alimentos**, São Paulo, v. 2, p. 99-103, 2001.

GILBERT, J.; ANKLAM, E.; Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 21, p. 468-486, 2002.

GONÇALEZ, E.; NOGUEIRA, J. H. C.; FONSECA, H.; FELÍCIO, J. D.; PINO, F. A.; CORRÊA, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanut kernels from sowing to harvest. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 123, p. 184-190, 2008.

HUSSEIN, S. H.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Limerick, v.167, p.101–134, 2001.

IARC – International Agency for Research on Cancer. **Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins**. Lyon: OMS, 1993. Monografia 56.

IARC – International Agency of Research on Cancer - **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon: OMS, v. 82, 2002.

INSTITUTO CAMPINEIRO DE ENSINO AGRÍCOLA. **Cultura de amendoim**. Campinas, 1987.

JUAN, C., ZINEDINE, A., MOLTÓ, J. C., IDRISSE, L.; MAÑES, J. Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Salé area, Morocco. **Food Control**, Guildford, v.19, p. 849-853, 2008.

KAWASHIMA, L. M.; VIEIRA, A. P.; SOARES, L. M. V. Fumonisin B1 and ochratoxin A in beers made in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, no. 2, p. 317-323, 2007.

KLICH, M. A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 8, p. 713-722, 2007.

LASRAM, S. et al. Evolution of ochratoxin A content during red and rose vinification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, n. 10, p. 1696-1703, 2008.

LEONG, S. L. et al. Fate of ochratoxin A during vinification of Semillon and Shiraz grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 6460–6464, 2006.

LIANG, Y.; BAKER, M. E.; YEAGER, T.; DENTON, M. B.; Quantitative Analysis of Aflatoxins by High-Performance Thin-Layer Chromatography Utilizing a Scientifically Operated Charge-Coupled Device Detector. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, p. 3885-3891, 1996.

MAGNOLI, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, M. L.; FERNÁNDEZ-JURI, M. G.; BARBERIS, C.; DALCERO, A. M. Ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in peanut seeds at different months of storage in Córdoba, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.119, p. 213-218, 2007.

MAGNOLI, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L.; CHIACCHIERA, S.; DALCERO, A. Ochratoxin A and ochratoxin A producing fungi in stored peanut seeds from Córdoba Province, Argentina. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, p. 2369-2373, 2006.

MALLMANN, C. A., KAWALSKI, C. H., ALMEIDA, C. A., MÜRMAN, L. AND SILVEIRA, V. G. 2003. **Prevalência de aflatoxinas em amendoim e seus derivados, destinados ao consumo humano, no estado do Rio Grande do Sul**. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/artigos.html>> Acesso em: 05 mar. 2008.

MARIN-KUAN, M.; CAVIN, C.; DELATOUR, T.; SCHILTER, B. Ochratoxin A carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanisms. **Toxicol**, Elmisford, v. 52, p. 195–202, 2008.

NAKAI, V. K. et al. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. **Food Chemistry**, London, v. 106, p. 285-290, 2008.

NEAL, G. E. et al. Differences detected in vivo between samples of aflatoxina-contaminated peanut meal, following decontamination by two ammonia-based processes. **Foods Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 2, p. 137-149, 2001.

NGUYEN, M.T. et al. Occurrence of aflatoxin B₁, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. **Food Chemistry**, London, v. 105, p. 42-47, 2007.

PALMA, N.; CINELLI, S.; SAPORA, O.; WILSON, S.H.; DOGLIOTTI, E. Ochratoxin A-induced mutagenesis in mammalian cells is consistent with the production of oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 20, n. 7, p. 1031-1037, 2007.

PAPP, E.; H-OTTA, K; ZA'RAY, G.; MINCISOVICS, E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. **Microchemical Journal**, New York, v. 73, p. 39–46, 2002.

PEÑA, E. G. et al. Comparison between capillary electrophoresis and HPLC-FL for ochratoxin A quantification in wine. **Food Chemistry**, London, v. 97, p. 349-354, 2006.

PILDAIN, M. B. et al. Analysis of population of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 93, p. 31-40, 2004.

PRADO, G. Ocorrência de micotoxinas em alimentos: situação em Minas Gerais. **Ciência de Alimentos**, São Paulo, v. 2, p. 97-98, 2001.

PRADO, G. et al. Resistência de quatro genótipos de amendoim à produção de aflatoxina B1 após inoculação com *Aspergillus flavus* link. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 1, p. 84-87, 1999.

PREFEITURA DE AUGUSTO PESTANA. **Dados do município**. Disponível em: <<http://www.pmaugustopestana.com.br>>. Acesso em: 10 mai. 2009.

PRÓ-AMENDOIM – PROJETO ABICAB. Disponível em: <<http://www.proamendoim.com.br>>. Acesso em: 20 mai. 2009.

RIBA, A.; MOKRANE, S.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A; SABAOU, N. Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122 , p. 85-92, 2008.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – an overview. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, p. 3-20, 2007.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 1-11, 2002.

ROMERO, S. M.; CORNERIO, R. M.; LARUMBE, G.; RITIENI, A.; VAAMONDE, G.; FERNANDEZ-PINTO, V. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 104, p. 43-49, 2005.

ROSA, R.C.A. et al. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, p. 408-414, 2002.

ROSSIELLO, M.R. et al. Ochratoxin A inhibits the production of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 by human blood mononuclear cells: Another potential mechanism of immune-suppression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 229, p. 227-231, 2008.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, London, v. 59, p. 57-67, 1999.

SABINO, M. et al. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the state of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, p. 85-88, 1999.

SABINO, M. Micotoxinas: limites máximos tolerados e os efeitos na economia nacional e internacional. **Ciência de Alimentos**, São Paulo, v. 2, p. 91-93, 2001.

SAVA, V.; REUNOVA, O.; VELASQUEZ, A.; HARBISON, R.; SÁNCHEZ-RAMOS, J. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. **NeuroToxicology**, Little Rock, n. 27, v. 1, p. 82-92, 2006.

SOARES, L. M. V. Ocorrência de micotoxinas em alimentos: situação em São Paulo. **Ciência de Alimentos**, São Paulo, v. 2, p. 94-96, 2001.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multitoxin thin layer chromatographic method. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 72, p. 22-26, 1989.

STROKA, J.; ANKLAM, E. New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 21, no. 2, p. 90-95, 2002.

SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M.; SANTOS, R. C.; SUASSUNA, T. M. F. **Cultivo do Amendoim**. Embrapa Algodão, (Campina Grande, 2006).
Disponível em: < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br.html>>. Acesso em: 10 mai. 2009.

TANIWAKI, M. H. Fungos toxigênicos em alimentos. **Ciência de Alimentos**, São Paulo, v. 2, p. 106-107, 2001.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, Neusely Silva. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia/ITAL, 2001. 82p.

TOZLOVANU, M.; FAUCET-MARQUIS, V.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R.A. Genotoxicity of the hydroquinone metabolite of ochratoxin A: Structure-activity relationships for covalent DNA adduction. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 19, n. 9, p. 1241-1240, 2006.

VAN EGMOND, H. P. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. **FAO Food and Nutrition Papers**, v. 81, p. 180, 2004.

ZHANG, L.; LIN, X. Quantitative evaluation of thin-layer chromatography with image background estimation based on charge-coupled device imaging. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1109, p. 273-278, 2006.

ZINEDINE, A.; JUAN, C.; IDRISSE, L.; MAÑES, J. Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco. **Microchemical Journal**, New York, v. 87, p. 154-158, 2007.