

OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM FEIJÕES COMERCIALIZADOS NO MERCADO VAREJISTA DE GOIÂNIA-GO¹

Juliana Lúcia da Silva², Albenones José de Mesquita³, Jaison Pereira de Oliveira², Jefferson Luís da Silva Costa⁴, Keyla de Oliveira Ribeiro², Edmar Soares Nicolau³ e Antônio Nonato de Oliveira³

ABSTRACT

OCCURRENCE OF AFLATOXINS IN BEANS IN THE RETAIL MARKET OF GOIÂNIA-GO

Thirty bean samples of different brands were chosen in the Goiânia retail market to be analyzed by thin-layer chromatography in order to detect the possible presence of aflatoxins. Only one sample showed a very low concentration of aflatoxins B1 and G1. The level of contaminants was inferior to 2.5 ppb (the standard). The process was repeated by boiling the sample at 116°C for 30 minutes under 0.7 kgf/cm² of pressure and then analyzed once again. The same level of contaminants was found proving the insufficiency of the thermal combustion method.

KEY WORDS: Micotoxin, food, Leguminosae.

RESUMO

Foram submetidas à pesquisa de aflatoxinas trinta amostras de feijões de diferentes marcas comerciais obtidas no mercado varejista da cidade de Goiânia, Goiás. Na detecção da toxina utilizou-se o método de cromatografia em camada delgada. Apenas uma amostra revelou-se contaminada com aflatoxinas B1 e G1, apresentando quantidades inferiores ao limite de detecção da técnica de 2,5 ppb. A amostra positiva foi submetida à cocção sob pressão de 0,7 kgf/cm² por 30 minutos, à temperatura de 116°C, e novamente analisada para detecção de aflatoxinas. Os mesmos níveis de toxinas foram detectados, o que demonstra a insuficiência desse tipo de tratamento térmico na sua inativação.

PALAVRAS-CHAVE: Micotoxina, alimento, Leguminosae.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são metabólitos fúngicos secundários produzidos por algumas linhagens das espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*. Pertencem à classe de compostos denominados furanocumarinas (Araújo 1995, Heathcote 1984). Foram identificadas pela primeira vez em 1961 em ração para animais, contaminada por *A. parasiticus* (Sargent *et al.* 1961). De um modo geral, admite-se que *Aspergillus flavus* produz aflatoxina B1 e B2 e *A. parasiticus* produz aflatoxina B1, B2, G1 e G2. Essas toxinas diferem entre si por pequenas variações em sua composição e estrutura molecular. As aflatoxinas M1 e M2 são metabólitos das aflatoxinas B1 e B2 (Toledo *et al.* 1997).

A aflatoxina B1 (AB1) é a mais tóxica, com atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica, quando em intoxicação crônica (World Health Organization 1979). A carcinogênese da AB1, segundo Fonseca (1984), deve-se provavelmente a sua interferência na síntese de ácidos nucléicos (DNA e RNA). O processo de intoxicação pode ocorrer de forma gradual, e os efeitos se manifestam a longo prazo (Silva 2001).

Verifica-se maior ocorrência de aflatoxinas em produto vegetal oriundo de debulha manual, ensacado e armazenado com uma umidade elevada e quando se reumedece o produto depois de seco. Essa toxina pode ser encontrada em muitos produtos, tais como, amendoim, milho, sementes oleaginosas, nozes, trigo, feijão etc. Estudos sobre a ocorrência de aflatoxinas em diversos produtos mostram que o amendoim, o

1. Trabalho recebido em mar./2002 e aceito para publicação em out./2002.

2. Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, C.P. 131, CEP 74001-970, Goiânia-GO.

3. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás. Cx. Postal 131, CEP 74001-970, Campus II, Goiânia-GO.

4. Embrapa Arroz e Feijão, Cx. Postal 179, CEP 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO.

milho e a semente de algodão são os mais suscetíveis à contaminação (Fonseca 1984, Jelinek 1988).

Os fungos produtores dessas toxinas estão presentes no solo possibilitando a invasão durante a fase de pré-colheita dos grãos. Para o seu desenvolvimento, a umidade relativa deve estar acima de 14% e a temperatura superior a 20°C. As toxinas podem ser produzidas no campo, durante o arma-zenamento e no processamento. São altamente resistentes ao calor, e sua inativação varia de 237°C a 285°C. São instáveis na presença de agentes oxidantes e em condições extremas de pH (Araújo 1995).

De acordo com a Resolução N° 34/1976, da CNNPA (Ministério da Saúde 1977), admite-se, no máximo, 30 ppb de AB1+AB2 em alimentos. Para o Ministério da Agricultura (1996), segundo sua Portaria MAARA N°183, o limite máximo para o somatória de contaminação por aflatoxina B1+B2+G1+G2 é de 20 ppb.

Em produtos como o feijão e o amendoim, as aflatoxinas prejudicam a divisão celular, o que compromete o crescimento, e bloqueiam a síntese de clorofila, tornando-se letal para a planta (Silva 2001). Contudo, há poucos estudos referentes à presença de aflatoxinas em feijões. Tseng *et al.* (1995) fizeram comparação da ocorrência de aflatoxinas em vinte lotes de feijão e soja. A microbiota foi mais diversa em feijões, sendo o *Aspergillus* o gênero de fungo mais freqüente. Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foram detectadas nas amostras infectadas. Na soja infectada não se detectou a toxina. Elkady *et al.* (1991) estudaram cem variedades de feijão inoculadas com *Aspergillus flavus* (CMI 102135) para determinar a resistência à produção de aflatoxina. O estudo revelou que onze variedades foram altamente resistentes à produção da toxina e nove apresentaram resistência parcial. As amostras restantes foram suscetíveis à colonização pelo *A. flavus* e à produção de aflatoxina.

De um total de doze produtos analisados, Adachi *et al.* (1991) detectaram AB1 pelo método ELISA em sete amostras, incluindo o feijão. Quando utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), encontraram quatro amostras positivas. Em todas elas, o teor de AB1 foi inferior a 10 ng/g.

O Brasil é o segundo produtor mundial de feijão. A importância dessa produção deve-se ao fato de o produto ser um dos alimentos básicos da população brasileira, constituindo-se num dos principais fornecedores de proteína na dieta alimentar dos estratos sociais economicamente menos favorecidos. O Estado de Goiás ocupa a quinta posição na classificação nacional da produção de

feijão, e essa leguminosa é um importante produto da agricultura do Estado (IBGE 2002).

Considerando a relevância do tema e a importância do feijão, um dos alimentos mais apreciados mundialmente, este trabalho objetivou verificar a ocorrência de aflatoxinas em feijões de diferentes marcas do comércio varejista da cidade de Goiânia, bem como avaliar a termorresistência da toxina nas amostras positivas.

MATERIAL E MÉTODOS

Trinta amostras de diferentes marcas comerciais de feijão (Tabela 1), obtidas na cidade de Goiânia-GO, foram analisadas no período compreendido entre os meses de abril e maio de 2001. Foram coletadas ao acaso amostras de 1,0 kg no mercado varejista da cidade de Goiânia-GO. As amostras foram levadas à estufa por aproximadamente 48 horas a 65°C a fim de retirar a umidade dos grãos, facilitando assim a moagem. Após a moagem e homogeneização, uma fração foi retirada para estudo. Para a realização da análise, foram feitas duas repetições em cada amostra, sendo que amostras positivas devem ser analisadas novamente para a confirmação da presença de aflatoxina.

Para a detecção de aflatoxina, empregou-se o método de cromatografia em camada delgada, conforme descrito em Prado *et al.* (1993):

Extração: Em béquer de 250 ml foram pesados 50 g da amostra. A seguir foram adicionados, lentamente, 30 ml de solução de cloreto de sódio 4% e 270 ml de metanol, agitando-se por cinco minutos em liquidificador, à velocidade intermediária. Essa solução foi filtrada em papel-filtro qualitativo e foram coletados 150 ml em béquer de 600 ml.

Purificação: No extrato filtrado, foram adicionados lentamente 20 ml da solução de acetato de chumbo 20%, sob agitação, deixando-se em repouso por cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 180 ml da solução de sulfato de amônio 30%, sob agitação. Após dez minutos de repouso, foram-lhe acrescentados 50 ml de celite, sob agitação, e novamente esse foi deixado em repouso por mais cinco minutos. A amostra foi filtrada em papel-filtro, retirando-se os primeiros 150 ml para funil de separação.

Desengorduramento: Foram adicionados ao extrato 50 ml de hexano e, após agitação por um minuto e repouso para separação das fases, foi coletada a fase inferior. Repetiu-se novamente essa etapa.

Tabela 1. Identificação das amostras de feijão conforme a marca comercial, denominação e estabelecimento de origem (Goiânia-GO, 2001)

N°	Marcas Comerciais ¹	Nome Popular	Origem	N°	Marcas Comerciais	Nome Popular	Origem
1	A	Preto	I	16	E	Preto	III
2	A	Carioca	I	17	E	Mulatinho	III
3	B	Preto	II	18	E	Manteiga	III
4	B	Branco	III	19	E	Branco	III
5	B	Carioca	III	20	F	Jalo	II
6	B	Jalo	II	21	F	Carioca	II
7	B	Emgopa	IV	22	G	Branco	III
8	B	Vermelho	II	23	H	Carioca	II
9	B	Rajado	II	24	I	Branco	III
10	C	Carioca	III	25	J	Preto	II
11	C	Preto	III	26	L	Carioca	IV
12	D	Carioca	I	27	M	Carioca	II
13	D	Preto	I	28	N	Preto	III
14	E	Roxo	I	29	N	Carioca	III
15	E	Carioca	III	30	O	Carioca	III

¹- As marcas comerciais foram omitidas por se tratar de uma pesquisa sem interesse de inspeção e pelo fato de a amostragem ter sido restrita a um único lote.

Partição líquido-líquido: Na fração coletada em funil de separação, foram adicionados 10 ml de clorofórmio, e ela foi agitada vigorosamente por dois minutos. Após a separação, a fase inferior (clorofórmica) foi coletada. Essa etapa foi novamente repetida. O frasco com a amostra, devidamente identificado, foi levado para estufa a 60°C para evaporação do clorofórmio.

Leitura: Inicialmente foi efetuada a saturação da cuba de cromatofolha empregando-se solução de clorofórmio e acetona (9:1) por um tempo mínimo de trinta minutos, para completar a saturação. A cromatofolha foi preparada para injeção das trinta amostras e da amostra-padrão (2,5 ppb). Antes da injeção foram adicionados 100 µl do reagente benzeno acetonitrila (98:2), a cada frasco contendo as amostras, para suspensão do extrato. Os frascos foram agitados e retiraram-se 3 µl com uma microseringa para a injeção. Após a injeção das amostras e da padrão, a cromatofolha foi levada à cuba de saturação e, posteriormente, submetida à luz ultravioleta.

Deteção de aflatoxina: As bandas de aflatoxina do padrão, sob exposição à luz ultravioleta (360 nm), apresentam coloração azul fluorescente, ou, pela adição do ácido sulfúrico 20%, passam para amarelo-esverdeado fluorescente. Esse último

procedimento permite confirmar a presença ou ausência de aflatoxina. Para fazer a quantificação de aflatoxina por cromatografia em camada delgada, compara-se a coloração das bandas correspondentes à molécula de aflatoxina no padrão e na amostra.

Para avaliar a termorresistência da toxina, amostras positivas foram submetidas à cocção em autoclave a 116°C por trinta minutos, sob pressão de 0,7 kgf/cm².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das amostras de feijão revelou a presença de bandas azuis fluorescentes, um pouco acima da banda B2 da amostra-padrão. Após a adição de ácido sulfúrico 20%, as bandas permaneceram com a mesma coloração, indicando, portanto, não se tratar de aflatoxina. Algumas marcas de feijões apresentaram bandas de maior intensidade.

Das trinta amostras analisadas, somente em uma amostra (n° 28) de feijão-preto foi detectada a presença de aflatoxina. Na Figura 1 pode-se evidenciar a presença de bandas compatíveis com AG1, mais intensa, e AB1, menos intensa. Por comparação com as bandas-padrão, foi possível quantificar em 2,5 ppb e 2,0 ppb a concentração de aflatoxina G1 e B1, respectivamente. Essas concentrações estão aquém do

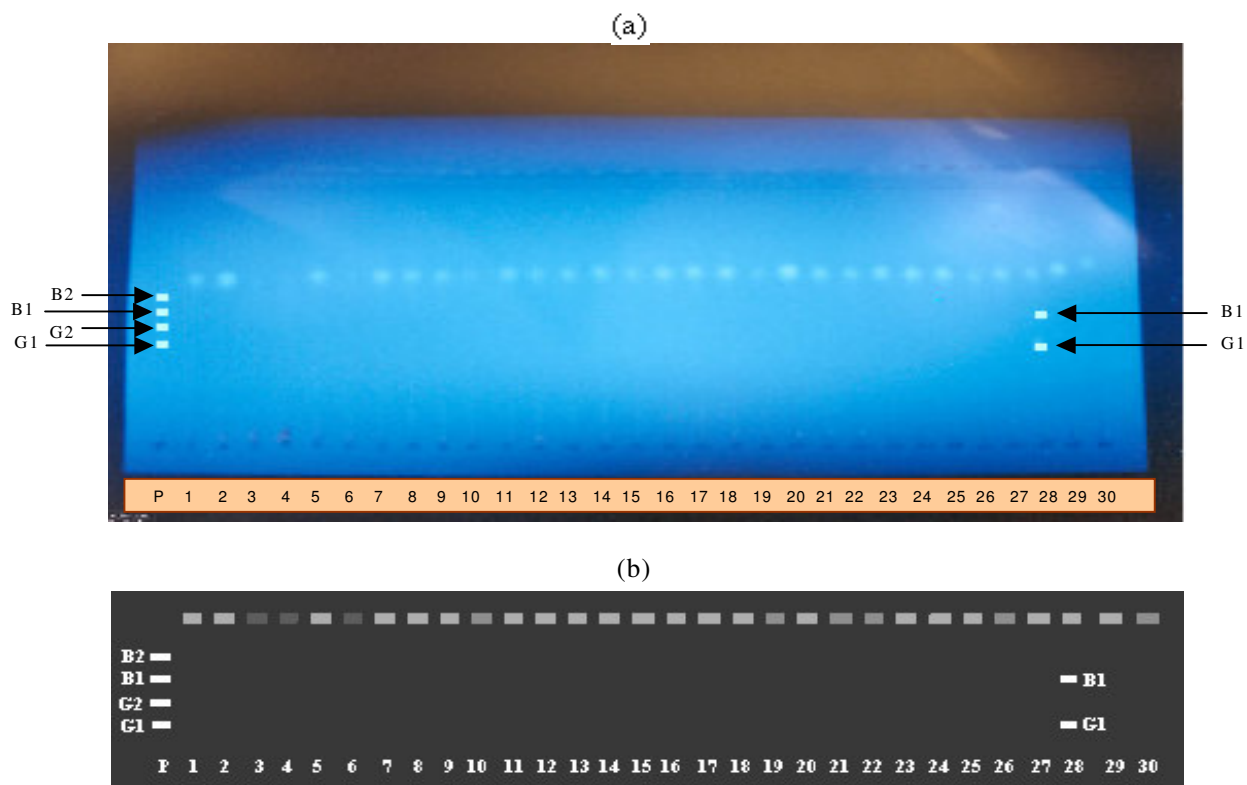


Figura 1. Corrida em cromatofolha (a) e desenho esquemático (b) das amostras experimental e padrão (bandas à esquerda correspondem ao padrão de aflatoxinas G1, G2, B1 e B2, em ordem ascendente, e bandas à direita correspondem à amostra)

limite máximo de aflatoxina admitido pelo Ministério da Agricultura, que é de 20 ppb.

Em estudos realizados por outros pesquisadores, amostras de feijão também apresentaram baixos níveis de aflatoxina. Haydar *et al.* (1990) encontraram níveis de aflatoxinas B1 e B2 nas concentrações de 0,19 ppb a 11,0 ppb. Cvetnic (1994) detectou aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, em feijões, também nas quantidades inferiores ao limite de 20 ppb. Mahmoud & Abdalla (1995) analisaram amostras de feijão e detectaram aflatoxinas B1 e B2 em concentrações inferiores a 30 ppb. Taguchi *et al.* (1995) não encontraram aflatoxinas em amostras de feijões. Vale observar que os experimentos citados não foram desenvolvidos com base em um mesmo espaço amostral.

Nesses estudos observa-se heterogeneidade de resultados em relação à presença e quantificação de aflatoxinas em feijão. Isso provavelmente pode ser atribuído às diferentes épocas de cultivo da leguminosa (diferentes procedências) e às condições de armazenamento determinadas pelo comerciante aos diferentes lotes.

A amostra positiva apresentou os mesmos níveis de aflatoxina, antes e depois de submetidas à

cozção, o que confirma a termorresistência da toxina. Ainda que o nível de aflatoxina B1 e G1 detectado nessa amostra tenha sido baixo, isto é, insuficiente para tornar o produto impróprio para consumo humano, deve-se considerar que se um produto nessas condições for ingerido frequentemente pela população pode causar malefícios que apenas serão evidenciados a longo prazo, em decorrência do caráter acumulativo da toxina.

Os métodos de processamento, assim como as práticas agrônomicas, não eliminam ou previnem completamente as aflatoxinas em alimentos. Deste modo, a prevenção constitui a maneira mais eficiente para controlar a contaminação. O controle fundamenta-se em cuidados a serem tomados durante as operações de colheita, na limpeza e secagem dos grãos e na sanificação dos graneleiros, silos e equipamentos mecânicos. Realizar a colheita tão logo seja atingido o teor de umidade ideal também ajuda a impedir o desenvolvimento de fungos e a conseqüente produção de toxinas.

Evitar a exposição do homem à aflatoxina torna-se praticamente impossível. No entanto, produtos destinados à alimentação humana devem ser monitorados frequentemente, ao longo de toda a cadeia

produtiva, para se evitar esse tipo de contaminação. É sabido que a contaminação de alimentos por aflatoxinas tem sido mais freqüente em regiões tropicais. Por isso, o controle nessas regiões deve ser muito criterioso por parte dos órgãos de fiscalização e regulamentação.

Por outro lado, o consumidor também deve ser instruído cada vez mais a observar o prazo de validade dos produtos e outras informações relativas a sua estocagem. Ademais, sabe-se que alimentos embalados em polietileno de baixa densidade (PEBD) apresentam maior estabilidade quanto à estocagem. O PEBD possui baixa permeabilidade ao vapor de água, garantindo um bom equilíbrio entre a resistência à tração, ao impacto e ao rasgamento. Por estas características, este é o material de embalagem mais utilizado para grãos, seguido das embalagens laminadas, metalizadas e cartonadas, que também são eficazes nesse sentido.

As pesquisas referentes à contaminação de alimentos por aflatoxinas freqüentemente avaliam produtos como amendoim, milho e subprodutos. O resultado positivo de aflatoxinas na referida amostra reforça a importância de se estender esse tipo de pesquisa a outros alimentos consumidos em grande escala pela população, como é o caso de trigo, soja, leite e feijão. Tal medida visaria, sobretudo, orientar os diversos segmentos da cadeia produtiva a adotarem medidas higiênico-sanitárias para prevenir contaminações desse tipo.

CONCLUSÕES

1. A ocorrência de aflatoxinas em amostras de feijões do mercado varejista de Goiânia, atualmente, pode ser considerada baixa (contaminação inferior a 5%).
2. O tratamento térmico por meio da cocção sob pressão em autoclave não foi suficiente para inativar as aflatoxinas.
3. Os níveis de aflatoxinas encontrados em amostra positiva de feijão foram relativamente baixos (inferiores a 2,5 ppb).

REFERÊNCIAS

- Adachi, Y., M. Hara, K. Kumazawa, I. Ueno & K. Egawa. 1991. Detection of aflatoxin B1 in imported food products into Japan by enzyme-linked immunosorbent assay and highperformance liquid chromatography. *Journal of Veterinary Medical Science, Japão*, 53 (1): 49-52.
- Araújo, J. M. A. 1995. *Química de Alimentos, teoria e prática*. UFV, Viçosa. 335 p.
- Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/agropecuário.htm>>. Acessado em 17 jun. 2002.
- Brasil. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução No. 34/76 publicada no Diário Oficial da União em 19 de Janeiro de 1977. Seção I, p. 710. *Compêndio da legislação de alimentos*. São Paulo.
- Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria MAARA No. 183 de 21 de março de 1996. Diário Oficial da União, Brasília, 25 mar. 1996, Seção I, p. 4929.
- Cvetnic, Z. 1994. Cyclopiazonic acid and aflatoxin production by cultures of *Aspergillus flavus* isolated from dried beans and maize. *Nahrung, Zagreb*, 38 (1): 21-25.
- Elkady, I., S. Elmarachi & A. Zohri. 1991. Mycotoxins production on different cultivars and lines of broad bean (*Vicia-Faba L*) seeds in Egypt. *Mycopathologia, Assiut*, 113 (3): 165-169.
- Fonseca, H. 1984. Envenenamento Alimentar-Micotoxinas e Micotoxicoses, p. 51-57. In R. Camargo, H. Fonseca, M. Graner, L. G. F. Prado, J. G. B. Caruso, M. O. Andrade, J. N. Nogueira, P. R. Cantarelli, U. A. Lima, A. J. Oliveira & L. S. Moreira. *Tecnologia dos produtos agropecuários - Alimentos*. Nobel, São Paulo.
- Haydar, M., L. Benelli & C. Brera. 1990. Occurrence of aflatoxins in Syrian foods and foodstuffs: a preliminary study. *Food Chemistry, Lattakia*, 37 (4): 261-268.
- Heathcote, J. G. 1984. Aflatoxins and related toxins, p. 89-130. In BETINA. *Mycotoxins: production, isolation, separation and purification*. 5 ed. Elsevier, Amsterdam.
- Jelinek, C. F. 1988. Distribution of mycotoxins na analysis of world wide commodities data, including data from FAO/WHO/UNEP food contamination monitoring programme. *International Conference on Mycotoxins, Bangkok*. 49 p.
- Mahmoud, A. & M. Abdalla. 1995. Natural occurrence of mycotoxins in broad bean (*Vicia-Faba L*) seeds and their effect on rhizobium-legumes symbiosis. *Soil Biology & Biochemistry, Assiut*, 26 (8): 1081-1085.
- Prado, E., M. P. M. B. Leite & M. A. S. Nicassio. 1993. Estudo comparativo de métodos analíticos para a quantificação de aflatoxinas em ração animal. In *Bol. Soc. Bras. Ciên. Tecnol. Alim.* v. 27. p. 9-13.
- Sargent, K., A. Sheridan & J. Okelly. 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature, London*, 192 (480): 1096.
- Silva, L. C. 2001. *Fungos e micotoxinas em grãos armazenados*. Universidade Estadual do Oeste do

- Paraná. Disponível em: <<http://www.unioeste.br/agais/fungos.html>>. Acessado em 12 set. 2001.
- Taguchi, S., S. Fukushima, T. Sumimoto, S. Yoshida & T. Nishimune. 1995. Aflatoxins in foods collected in Osaka, Japan, from 1988 to 1992. *Journal of AOAC International*, Japão, 78 (2): 325-327.
- Toledo, M. E. P., H. Fonseca & M. Oetterer. 1997. Contaminação e distribuição de aflatoxinas nos produtos e subprodutos do processamento via seca e via úmida do milho. *SBCTA*, 31 (1): 77-86.
- Tseng, T., J. Tu & L. Soo. 1995. Comparison of the profiles of seedborne fungi and the occurrence of aflatoxins in mould-damaged beans and soybeans. *Microbios*, Taipei, 84 (339): 105-116.
- World Health Organization. 1979. *Mycotoxins*. UNEP/WHO, Geneva.