



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANDRÉ RIBEIRO DA SILVA

**IMUNOENSAIO ic-ELISA PARA AFLATOXINA:  
DESENVOLVIMENTO, PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO  
VISANDO ANÁLISE EM AMENDOIM**

ANDRÉ RIBEIRO DA SILVA

**IMUNOENSAIO ic-ELISA PARA AFLATOXINA:  
DESENVOLVIMENTO, PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO  
VISANDO ANÁLISE EM AMENDOIM**

Dissertação apresentada ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Elisa Yoko Hirooka.

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Cássia Reika Takabayashi Yamasita.

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Silva, André Ribeiro da.

Imunoensaio ic-ELISA para aflatoxina : desenvolvimento, padronização e validação visando análise em amendoim / André Ribeiro da Silva. - Londrina, 2017.  
77 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Coorientador: Cássia Reika Takabayashi Yamashita.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. Aflatoxina - Tese. 2. Amendoim - Tese. 3. Imunoensaio - Tese. I. Hirooka, Elisa Yoko. II. Yamashita, Cássia Reika Takabayashi. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

ANDRÉ RIBEIRO DA SILVA

**IMUNOENSAIO ic-ELISA PARA AFLATOXINA:  
DESENVOLVIMENTO, PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO VISANDO  
ANÁLISE EM AMENDOIM**

Dissertação apresentada ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Elisabete Hiromi Hashimoto  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -  
UTFPR

---

Dra. Angélica Tieme Ishikawa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Thaís de Souza Rocha  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Douglas Fernandes Barbin  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Londrina, 03 de Fevereiro de 2017.

*Aos meus familiares, por sempre acreditar  
em mim e pelo incentivo.  
Ao meu pai, José Bispo da Silva  
(in memoriam), pelo exemplo de vida,  
dignidade, amor e dedicação.*

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka pela orientação, conhecimento transmitido, incentivo, paciência e apoio;

À Universidade Estadual de Londrina e aos professores do Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, por todo aprendizado e incentivo;

À Coordenação e Chefia do Curso de Pós-graduação, pela atenção e colaboração;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao Professor Dr. Osamu Kawamura de Kagawa University, Japão, pelo fornecimento de hibridomas e por todo conhecimento técnico repassado ao grupo de pesquisa;

À empresa Maritucs Alimentos, em especial ao gerente industrial, Sr. Marcos da Silva, pelo apoio e fornecimento de amostras de lotes de amendoim utilizados neste trabalho;

Às professoras Dra. Thaís de Souza Rocha e Dra. Elisabete Hiromi Hashimoto pela participação e sugestões no exame de qualificação;

À professora Dra. Marie Oshiwa, pela ajuda com a análise estatística;

À Pós-Doutoranda Cássia Takabayashi Yamashita, pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência e ajuda com a padronização do imunoensaio;

À Pós-Doutoranda Angélica Tieme Ishikawa e à Doutoranda Lívia Montanheiro Médice Zanin, pelo conhecimento transmitido e por cederem os anticorpos monoclonais;

Aos Doutorandos Thiago Bervelieri Madeira e Lycio Shinji Watanabe, pelo auxílio no desenvolvimentos dos métodos de espectrometria de massas;

Aos colegas de laboratório Felipe Pedote Fracalossi, Thaís Marques Amorim Umbelino, Gervásio Hitoshi, pela ajuda nas análises e pelos momentos de descontração;

Às estagiárias Fernanda Ramos, Geovana de Souza Cardozo, Nathália Tatakihara e

Mariana Ribeiro Befatti, pela ajuda nas análises e colaboração;

Aos funcionários e técnicos do Depto. De Ciência e Tecnologia de Alimentos, Patrícia Sambatti, Sandra Rezende, Alessandra, Rubens e Neuza pelo apoio;

Aos queridos amigos Thamires da Silva Peixoto, Mariana Assis de Queiroz Cancian e Felipe Pedote Fracalossi pelo companheirismo, momentos de descontração, e principalmente pela amizade, que tornaram os dias árduos mais suaves;

Aos colegas e companheiros do Programa de Mestrado e Doutorado, pelos momentos compartilhados e pela amizade;

Aos meus familiares, às minhas queridas irmãs Lucinéia e Andréa e aos meus irmãos Samuel, Jadiel e Paulo César, por toda compreensão e incentivo;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SILVA, ANDRÉ RIBEIRO. **Imunoensaio ic-ELISA para aflatoxina: desenvolvimento, padronização e validação visando análise em amendoim.** 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

O Estado de São Paulo se destaca pela maior produção de amendoim do Brasil, ocupando 92% da produção nacional. A cultura do amendoim é suscetível à contaminação por aflatoxinas. Estes metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, apresentam efeitos tóxicos e carcinogênicos ao homem e animais. O desenvolvimento de metodologias de triagem confiáveis, rápido e simples como o ensaio imunoenzimático pode ser alcançado empregando anticorpo monoclonal (AcM). O objetivo deste trabalho foi desenvolver, padronizar e validar imunoensaio enzimático indireto competitivo (ic-ELISA) para quantificação de aflatoxina B<sub>1</sub> em amendoim. Amendoins da região Alta Paulista, estado de São Paulo, foram avaliados, utilizando anticorpo monoclonal (AcM) anti-aflatoxina B<sub>1</sub> produzido *in vitro* por cultivo da linhagem de hibridoma AF4. Sessenta amostras de lotes de amendoim fornecidos por indústria de processamento localizada na região de Marília-SP (n = 42 amendoim não blanchado e n = 18 amendoim blanchado) foram analisados quanto à umidade, atividade de água e AFB<sub>1</sub>. Cada lote representou cinco toneladas de amendoim da cultivar IAC Runner 886, da safra 2014 / 15 e 2015 / 16. O plano de amostragem foi realizado segundo estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. A validação intra-laboratorial apresentou boa linearidade (R<sub>2</sub> = 0,9993), limite de detecção e quantificação de 1,13 ng/g e 3,59 ng/g, respectivamente, com taxas médias de recuperação de AFB<sub>1</sub> de 104,4; 101,7 e 107,0% para as concentrações de 4, 10 e 20 ng/g (CV de 4,9; 7,9 e 0,7%), respectivamente. O ic-ELISA mostrou boa precisão, expressa pela repetibilidade através da precisão intracorrída (CV= 1,87%) e precisão intermediária, através de precisão intercorrída (CV=6,75%). O teor de umidade variou de 4,03 a 7,89% (média de 6,09 % ± 0,18), sendo que nenhuma amostra ultrapassou o limite máximo permitido (8,0%). A atividade de água apresentou a variação de 0,48 a 0,69. Os resultados revelaram AFB<sub>1</sub> em concentração variando de 1,13 a 29,2 ng/g. No entanto, apenas duas amostras (3,3%) apresentaram níveis de contaminação acima de 20 ng/g, limite máximo estabelecido pela legislação Brasileira, sendo que 48,35% (n = 29) estavam abaixo do limite de quantificação. Em relação a legislação da Comunidade Européia, 76% das amostras (n = 46) apresentaram níveis em conformidade com o limite máximo permitido para amendoim (8 ng/g) a ser submetido a triagem ou outro tratamento físico antes do consumo humano, sendo que destas, 35% (n = 21) estavam de acordo se for considerar amendoim processado pronto para consumo humano (2 ng/g). Concluindo, este ic-ELISA desenvolvido pode consistir numa ferramenta de uso fácil para monitoramento rápido na cadeia produtiva de amendoim, contribuindo para a redução de perigo através da detecção e segregação de lotes contaminados.

**Palavras-chave:** Amendoim. Micotoxina. Aflatoxinas. Contaminação. Imunoensaio.

SILVA, ANDRÉ RIBEIRO. **Immunoassay ic-ELISA for aflatoxin: development, standardization and validation for Analysis in peanut**. 2017. 77 p. Dissertation (Masters in Food Science) – Department of Food Technology, State University of Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

The São Paulo State stands out for the greater production of peanuts in Brazil, occupying 92% of the national production. Peanut cultivation is susceptible to aflatoxin contamination. These toxic secondary metabolites produced by fungi of the genus *Aspergillus*, present toxic and carcinogenic effects to human and animals. The development of reliable, rapid and simple screening methodologies such as the enzyme-linked immunosorbent assay can be achieved using monoclonal antibody (mAb). The objective of this work was to develop, standardize and validate competitive indirect enzyme immunoassay (ic-ELISA) for the quantification of aflatoxin B<sub>1</sub> in peanuts. Peanuts from the Alta Paulista region, São Paulo State, were evaluated using anti-aflatoxin B<sub>1</sub> monoclonal antibody (MAb) produced in vitro by culture of the hybridoma AF.4 strain. Sixty samples of peanut batches provided by processing industry located in the Marília-SP region (n = 42 non-blanched peanut and n = 18 blanched peanut) were analyzed for moisture, water activity and AFB<sub>1</sub>. Each lot represented five tons of peanuts from cultivar IAC Runner 886, from the 2014/15 and 2015/16 crops. The sampling plan was carried out according to the National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA). Intra-laboratory validation showed good linearity ( $R_2 = 0.9999$ ), limit of detection and quantification of 1.13 ng / g and 3.59 ng / g, respectively, with mean AFB<sub>1</sub> recovery rates of 104.4; 101.7 and 107.0% for the concentrations of 4, 10 and 20 ng / g (CV of 4.9, 7.9 and 0.7%), respectively. The ic- ELISA showed good accuracy, expressed by the repeatability through the intra-assay precision (CV = 1.87%) and intermediate accuracy, through inter-assay precision (CV = 6.75%). The moisture content ranged from 4.03 to 7.89% (mean 6.09% ± 0.18), and there was no sample exceeding the maximum permitted limit (8.0%). Water activity varied from 0.48 to 0.69. The results revealed AFB<sub>1</sub> in concentration ranging from 1.13 to 29.2 ng / g. However, only two samples (3.3%) had contamination levels above 20 ng / g, the maximum limit established by Brazilian legislation, and 48.35% (n = 29) were below the limit of quantification. In relation to European Community legislation, 76% of the samples (n = 46) showed levels in accordance with the maximum limit allowed for peanuts (8 ng / g) to be subjected to screening or other physical treatment before human consumption. In total of samples, 35% of them were ready-to- eat peanut in according to European Community (2 ng / g). In conclusion, this ic-ELISA developed may consist of an easy tool for rapid monitoring in the peanut production chain, contributing to the reduction of danger through the detection and segregation of contaminated lots.

**Key words:** Peanut. Mycotoxin. Aflatoxins. Contamination. Immunoassay.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Fertilização da flor e desenvolvimento do fruto do amendoim. ....	16
<b>Figura 2.</b> Características da planta de amendoim. ....	17
<b>Figura 3.</b> Produção de amendoim no Brasil nas safras de 2005/06 a 2016/17. ....	19
<b>Figura 4.</b> Cultivar de porte ereto (A) e de porte rasteiro (B). ....	20
<b>Figura 5.</b> Estruturas químicas das principais aflatoxinas. ....	25
<b>Figura 6.</b> Principais reações e produtos da biotransformação da AFB <sub>1</sub> . ....	28
<b>Figura 7.</b> Amostragem do amendoim em sacas com calador. ....	34
<b>Figura 8.</b> Esquema de ELISA competitivo indireto (ic-ELISA). ....	38
<b>Figura 9.</b> Fluxograma geral do experimento. ....	42
<b>Figura 10.</b> Amostragem de amendoim. ....	43
<b>Figura 11.</b> Padronização de ic-ELISA: curva de calibração e interferência da matriz. ....	44
<b>Figura 12.</b> Extração de aflatoxinas do amendoim. ....	45
<b>Figura 13.</b> Validação intralaboratorial de ic-ELISA para análise de AFB <sub>1</sub> em amendoim. ....	46

## ARTIGO

<b>Figura 1.</b> Redução da interferência para determinação de AFB <sub>1</sub> por ic-ELISA em amendoim por diluição da matriz. ....	62
<b>Figura 2.</b> Análise de desvios entre curva padrão e matrizada para determinação de AFB <sub>1</sub> em amendoim. ....	62
<b>Figura 3.</b> Curva padrão para detecção de AFB <sub>1</sub> por ic-ELISA. ....	63
<b>Figura 4.</b> Ocorrência e faixa de contaminação de aflatoxina B <sub>1</sub> detectada em amostras de lotes de amendoim por ic-ELISA. ....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características de algumas cultivares de amendoim produzidas no Brasil. ....	21
<b>Tabela 2.</b> Características físico-químicas das principais aflatoxinas.....	26
<b>Tabela 3.</b> Limites máximos de aflatoxinas no leite, milho e amendoim. ....	31
<b>Tabela 4.</b> Limites máximos de aflatoxinas em outros alimentos.....	32
<b>Tabela 5.</b> Amostragem para análise de micotoxina em amendoim. ....	35

## ARTIGO

<b>Tabela 1.</b> Recuperação de AFB <sub>1</sub> em amostras de amendoim por ic-ELISA.....	63
<b>Tabela 2.</b> Análise de precisão na determinação de AFB <sub>1</sub> em amendoim por ic-ELISA.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
AcM	Anticorpo Monoclonal
AF	Aflatoxina
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFQ1	Aflatoxina Q1
AFM1	Aflatoxina M1
AFP1	Aflatoxina P1
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists International</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> – Albumina de soro bovino
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CV	Coefficiente de Variação
DAB	Diaminobenzidina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	Desvio Padrão
EC	<i>Europe Commission</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAO	<i>Food Agriculture and Organization of the United Nation</i>
GSH	Glutathiona
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
H-SFM	<i>Hybridoma-Serum free medium</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ic-ELISA	<i>Indirect Competitive Enzyme Linked Immuno Assay</i>
IgG	Imunoglobulina G
LMT	Limite Máximo Tolerado
MNNG	N-Methyl-N7-nitro-N-nitrosoguanidina
MS	Ministério da Saúde

NaCl	Cloreto de Sódio
OVA	Ovoalbumina
PBS	Tampão fosfato de sódio
PBST	Tampao fosfato de sódio-Tween
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SDS	Doddecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio-Gel de Poliacrilamida
SFB	Soro Fetal Bovino
TMB	3, 3, 5, 5',-tetrametilbenzidina

# SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	16
2.1.	AMENDOIM: ORIGEM E DIFUSÃO DA PLANTA	16
2.1.1.	CARACTERÍSTICAS BOTÂNICA	16
2.1.2.	CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS	17
2.2.	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	18
2.2.1.	PRODUÇÃO BRASILEIRA DE AMENDOIM	18
2.2.2.	PRODUÇÃO NO ESTADO DE SÃO PAULO	19
2.2.3.	VARIETADES DE AMENDOIM CULTIVADAS NO ESTADO DE SÃO PAULO	20
2.2.4.	CONSUMO PER CAPTA DE AMENDOIM	21
2.3.	PROCESSO DE BENEFICIAMENTO DO AMENDOIM	22
2.4.	MICOTOXINAS	23
2.5.	AFLATOXINAS	24
2.5.1.	FUNGOS PRODUTORES DE AFLATOXINA: <i>ASPERGILLUS</i> SECTION <i>FLAVI</i>	24
2.5.2.	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E DE TOXICIDADE	25
2.5.3.	BIOTRANSFORMAÇÃO DE AFLATOXINA B <sub>1</sub>	27
2.5.4.	OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM AMENDOIM E DERIVADOS	29
2.5.5.	LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	30
2.6.	IMPORTÂNCIA DE AMOSTRAGEM NA ANÁLISE DE MICOTOXINAS	32
2.6.1.	CRITÉRIOS NA AMOSTRAGEM DE AMENDOIM	33
2.7.	MÉTODOS DE ANÁLISE DE MICOXINAS	36
2.7.1.	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	36
2.7.2.	MÉTODOS IMUNOQUÍMICOS	37
2.7.2.1.	ANÁLISE DE AFLATOXINA EM AMENDOIM POR IC-ELISA	39
<b>3.</b>	<b>OBJETIVO</b>	41
3.1.	OBJETIVO GERAL	41
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	42
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	47

<b>ARTIGO</b> .....	48
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	51
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	52
2.1. AMOSTRAGEM .....	52
2.1.1. UMIDADE.....	53
2.1.2. ATIVIDADE DE ÁGUA.....	53
2.1.3. EXTRAÇÃO DE AFLATOXINA .....	53
2.2. PRODUÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-AFB <sub>1</sub> .....	53
2.3. ANÁLISE DE AFLATOXINAS POR IC-ELISA .....	54
<b>3. VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE IC-ELISA PARA QUANTIFICAÇÃO DE AFB<sub>1</sub></b> .....	55
3.1.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	56
4.1. VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE IC-ELISA .....	56
4.2. TEOR DE UMIDADE E ATIVIDADE DE ÁGUA (A <sub>w</sub> ).....	58
4.3. AFLATOXINA .....	60
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	61
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	65
<b>APÊNDICE</b> ..	74

## 1. INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é a quinta oleaginosa mais cultivada no mundo, com produção de 40,31 milhões de toneladas em 2015/2016 e projeção aproximada de 41,79 milhões para 2016/2017, tendo em principais produtores a China, Índia, Nigéria e Estados Unidos.

O Brasil com 406,1 mil toneladas na safra 2015/2016 é o terceiro maior produtor no continente americano atrás dos Estados Unidos e Argentina, sendo 385,1 mil toneladas (94,8%) produzidas apenas na região Sudeste. O Estado de São Paulo produz 93% (377,5 mil toneladas) em uma área de 110,2 mil hectares, com destaque à região da Alta Paulista - Oeste do Estado entre os municípios de Marília e Tupã, responsável também pelo beneficiamento e processamento industrial.

Aflatoxina constitui o primeiro grupo de micotoxinas, cujo impacto internacional drástico despertou importância de toxina natural de origem fúngica na toxicologia alimentar; com relevância apontada à cultura de amendoim, também compromete a qualidade e deprecia o valor comercial do produto. Este metabólito secundário produzido por *Aspergillus* section *Flavi*, representado principalmente *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus* apresenta ação imunossupressora, mutagênica, genotóxica, sendo classificada no grupo I - altamente carcinogênicas para humano pela *International Agency for Research on Cancer* – IARC.

Considerando o problema de aflatoxina à saúde pública, o controle através de monitoramento na pós-colheita, armazenagem e processamento de amendoim é de extrema importância. O ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - *ELISA*) destaca-se entre os métodos rápidos, sendo de uso fácil, capaz de detectar contaminação ao nível de nanograma, essencial para evitar matéria-prima contaminada no sistema de processamento alimentar.

O princípio de *ELISA* competitivo indireto (ic-*ELISA*) baseia-se na competição entre micotoxina presente na amostra com a toxina imobilizada na microplaca, perante o mesmo sítio específico do anticorpo (Ac). A concentração de toxina na amostra é indiretamente quantificada pela reação procedente de Ac específico anti-micotoxina absorvido a superfície sensibilizada, que atua como sítio de ligação ao anti-IgG (Anticorpo secundário) marcado com enzima, responsável pela reação colorimétrica.

O trabalho tem como objetivo desenvolver, padronizar, validar e implementar ic-*ELISA* para avaliar a ocorrência de aflatoxinas em lotes de amendoim provenientes de alguns

municípios do estado de São Paulo, região da Alta Paulista, empregando anticorpo monoclonal antiaflatoxina produzido em laboratório.

O presente trabalho justifica-se como inovação tecnológica com desenvolvimento de bioferramenta nacional, a fim de minimizar a dependência de importação de *kits*, do uso de solventes tóxicos, do tempo de análise, e conseqüentemente, o custo de análise de alimentos e matérias-primas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Amendoim: Origem e difusão da planta

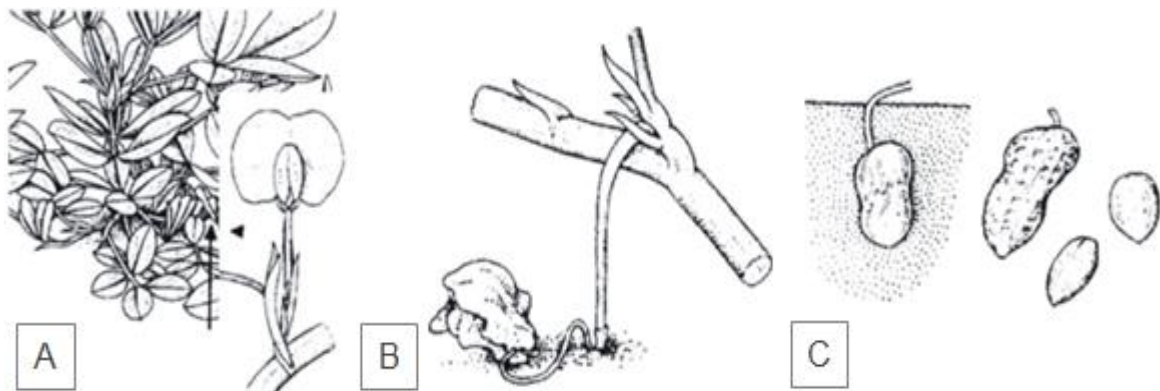
O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é originário da Região sul da Bolívia e do norte da Argentina, e acredita-se que praticamente todas as espécies do gênero *Arachis* (aproximadamente 69) sejam provenientes da América do Sul, há 5000 anos (KRISHNA, 2013; MARTINS, 2015).

A difusão do cultivo do amendoim nas regiões da América Latina, América Central e México, iniciada pelos indígenas, seguiu para a Europa no século XVIII; difundiu-se do Brasil para a África e do Peru para as Filipinas, China, Japão e Índia. Hoje a planta é amplamente distribuída e adaptou-se em diversos países (GILLIER; SILVESTRE, 1970; FAGUNDES, 2002; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2015).

#### 2.1.1. Características botânica

Pertencente à família *Fabaceae*, o amendoim é uma planta dicotiledônea com processo peculiar de frutificação e geotropismo positivo, embora as flores sejam aéreas (Figura 1 A). Após a fecundação o ginóforo, uma estrutura alongada e pontiaguda projeta e penetra no solo (Figura 1 B), cujo espessamento da extremidade resulta no desenvolvimento de fruto no subsolo (Figura 1 C) (CÂMARA, 1998; NOGUEIRA, TÁVORA; 2013; MARTINS, 2015).

**Figura 1.** Fertilização da flor e desenvolvimento do fruto do amendoim.



**Fonte:** Extraído e adaptado de Boote, 1982.

A parte aérea de amendoim é composta por ramificações, folhas e flores, com florescimento em 30 a 45 dias pós-plantio, atingindo o máximo em 6 a 7 semanas, para posterior decréscimo regular, mas pode florescer até próximo ao final do ciclo (ZORZETE, 2010).

As flores pequenas e amarelas agrupam em número variável ao longo do ramo principal ou ramos secundários (Figura 2 A); ao penetrar no solo, originam raiz aprumada repleta de vagens. As folhas trifoliadas formam abundante indumento na parte aérea (Figura 2 B) podendo atingir entre 30 - 50 cm de altura nas cultivares de porte ereto (Figura 2 C) (CÂMARA, 1998).

**Figura 2.** Características da planta de amendoim.



**Fonte:** Acervo pessoal do autor.

### 2.1.2. Características Nutricionais

O amendoim é um alimento de alto valor energético (596 kcal/100 g), composto por aproximadamente 25-30% de proteína, 20% de carboidratos, 5% de fibras, cinzas e 50% de óleo, sendo 90% de ácidos palmítico (16:0), oleico (18:1) e linoleico (18:2) (KNAUFT, WYNNE, 1995; FREIRE *et al.*, 2009).

A semente é uma fonte de vitaminas -niacina (B3), ácido fólico (B9), tiamina (B1), riboflavina (B2), vitamina E e de, minerais - magnésio, fósforo, além de antioxidantes, fenólicos e outros fitoquímicos capazes de prevenir doenças cardiovasculares, controle de colesterol e triglicérides (HIGGS, 2003; FREIRE *et al.*, 2009; SHEM-TOV *et al.*, 2012; LIU, 2016).

## 2.2. Importância econômica

O amendoim é a quinta maior cultura oleaginosa cultivada em diversas regiões de clima tropical e temperada do mundo, estando atrás apenas da soja, algodão, colza e girassol. A produção anual aproximada de 40,31 milhões de toneladas tem como principais produtores a China, seguida de Índia e Estados Unidos (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2016).

A produção mundial estimada em 2016/17 é de 41,79 milhões de toneladas, com 17,0 e 5,5 milhões pela China e a Índia, respectivamente. Os Estados Unidos (2,83 milhões ton.) se destaca no continente americano, seguido da Argentina (1,16 milhões ton.) e Brasil (430,0 mil ton.) (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2016).

Argentina, Estados Unidos, Sudão, Senegal e Brasil respondem por 71% da exportação mundial de amendoim. Índia, Vietnã e países africanos participam no mercado internacional dependendo da qualidade de cultura e procura no mercado, enquanto União Europeia, Canadá e Japão correspondem a 78% de importação (CÁMARA ARGENTINA DEL MANÍ, 2013).

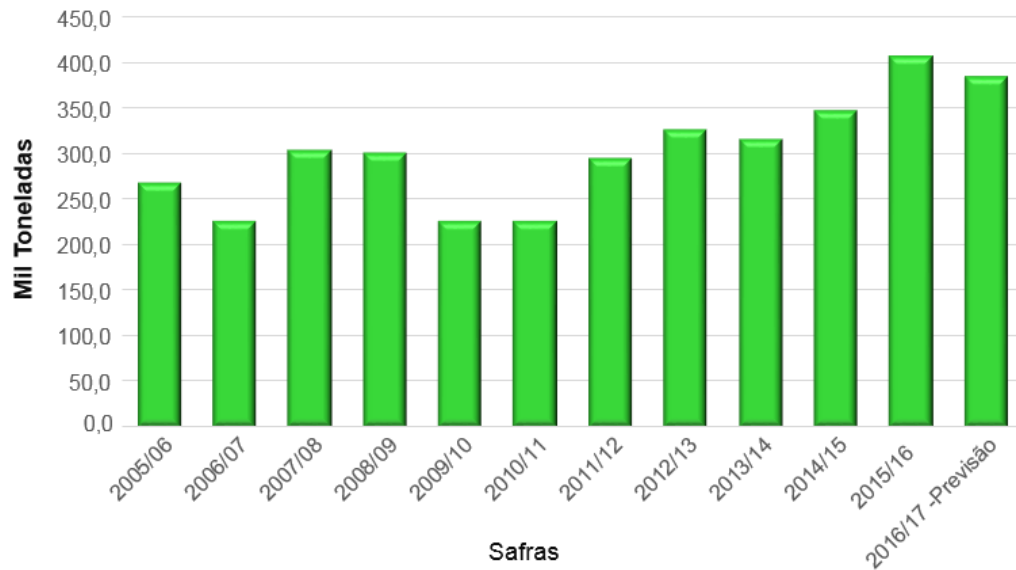
O amendoim é mundialmente importante seja pela propriedade organoléptica ou nutricional. A maior parte é convertida em produtos de valor agregado a exemplo de manteiga, confeitos e *snacks* (PERREN, ESCHER, 2013; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2015; SHI *et al*, 2017).

### 2.2.1. Produção Brasileira de Amendoim

A produção nacional de amendoim vem aumentando na última década, com 406,1 mil ton na safra 2015/2016 (Figura 3), sendo 99% (405,5 mil ton) produzida na Região Sudeste, tendo o Estado de São Paulo como maior produtor com 93% da produção nacional (377,5 mil ton), cultivado numa área aproximada de 110,3 mil hectares (CONAB, 2016).

Aproximadamente 80% do amendoim produzido no Estado de São Paulo destina-se à exportação, principalmente para União Europeia como Holanda, Reino Unido, Rússia, assim como África e Argélia (CONAB, 2015).

**Figura 3.** Produção de amendoim no Brasil nas safras de 2005/06 a 2016/17.



**Fonte:** Conab – Séries históricas (CONAB, 2016).

Outros produtores são os Estados de Tocantins, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná com 1,2; 7,6; 11,6 e 4,8 mil ton na safra 2015/2016, respectivamente. A produção de amendoim no Nordeste ocupa uma área de 3,4 mil hectares, com melhor produtividade em Sergipe (1.393 kg/hectare) (CONAB, 2016).

### 2.2.2. Produção no Estado de São Paulo

As principais regiões produtoras de amendoim são: Alta Mogiana, localizada no Norte do Estado de São Paulo, em municípios próximos a Ribeirão Preto e, a região Oeste em Alta Paulista, nas proximidades dos municípios de Herculândia, Iacri, Tupã e Marília, com destaque ao último pela instalação de diversas indústrias de processamento (SANCHES, 2003; MARTINS e PEREZ, 2006; IEA, 2012).

Sendo cultura de clima tropical, o amendoim pode ser cultivado em todo o Brasil, permitindo duas safras anuais. A primeira safra, conhecida como safra de primavera/verão, é responsável por volume anual superior a 80%; o período de plantio ideal situa-se entre setembro a outubro e colheita em janeiro a fevereiro, correspondente à época de chuva – anteriormente denominado de “safra das águas” (FREITAS *et al.*, 2005; AGUIAR *et al.*, 2014).

A segunda safra inicia-se entre fevereiro a março; é menos produtiva pela ausência de chuva na colheita (junho e julho) e, anteriormente denominada de “safra da seca”,

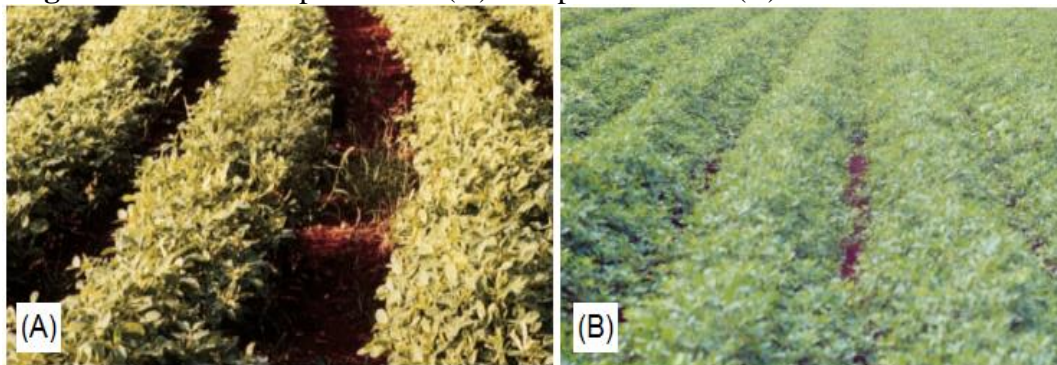
é indicada para cultivares precoces devido à estiagem no final do ciclo (FREITAS *et al.*, 2005; LOURENZANI, 2006).

### 2.2.3. Variedades de amendoim cultivadas no Estado de São Paulo

A classificação das variedades de amendoim baseia-se em característica hereditária e fenotípica como porte da planta, duração de ciclo vegetativo, tamanho de frutos, número de sementes e tipo de ramificação quanto à disposição de gemas reprodutivas e vegetativas (GILLIER; SILVESTRE, 1970).

*Arachis hypogaea* apresenta duas subespécies: *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* e *A. hypogaea* subsp. *fastigiata*. Este último apresenta porte ereto com ciclo curto, florescimento no eixo central (Figura 4 A) e, inclui os tipos Valência e Spanish. Trata-se de cultivar com ciclo entre 100 e 120 dias, adequado à safra de verão e safrinha, destinada a produtores sem mecanização (FREITAS *et al.*, 2005).

**Figura 4.** Cultivar de porte ereto (A) e de porte rasteiro (B).



**Fonte:** GODOY *et al.*, 2003.

*A. hypogaea* subsp. *hypogaea* apresenta porte rasteiro com ciclo tardio, sem flores no eixo central (Figura 4 B) e, inclui os tipos *Runners* e *Virginia* (SANTOS, 2009). A vantagem consiste na colheita totalmente mecanizada e, sendo de ciclo longo, evita período chuvoso durante a colheita (GODOY, 2009). As cultivares predominantes na região sudeste são desenvolvidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas, com destaque a cultivar de porte ereto IAC Tatu e, as de porte rasteiro *Runners* como, Runner IAC 886, IAC 503 e IAC 505 (SANTOS, GODOY, FÁVERO, 2005).

Os tipos principais de amendoim do Estado de São Paulo são as variedade Tatu ST, Tatu Vermelho, Caiapó e Runner IAC 886. A cultivar *Runner* IAC 886 apresenta alta

produtividade, crescimento rasteiro e ciclo de 130 dias na condição paulista, mas exige solo fértil e controle de doença, sendo recomendada para cultivo com alto nível tecnológico. As vagens contêm duas sementes com rendimento entre 70 e 80% no descascamento e massa entre 0,5 e 0,7 g/grão, película rosada e alto teor de óleo (SANTOS, GODOY, FÁVERO, 2005)

Os amendoins *Runners* adaptam à mecanização, sendo os preferidos pelo mercado importador; com produtividade média de 4000 kg/ha, corresponde à 30% superior a cultivares de porte ereto. A desvantagem é ciclo tardio entre 130 e 145 dias (FREITAS *et al.*, 2005; SUASSUNA *et al.*, 2006; PIGHINELLI, 2007). A cultivar Runner é a mais importante do Estado de São Paulo, que ganhou aceitação no mercado internacional porque é semelhante a cultivares de outras espécies de países como os Estados Unidos e a China (USDA, 2012; ZORZETE *et al.*, 2013). A Tabela 1 apresenta características de determinadas cultivares produzidas na região sudeste do Brasil e no Estado de São Paulo.

**Tabela 1.** Características de algumas cultivares de amendoim produzidas no Brasil.

Características	Cultivares			
	Runner IAC 886	IAC Caiapó	IAC 22	Tatu ST
Porte	Rasteiro	Rasteiro	Ereto	Ereto
Ciclo	Tardio	Curto	Curto	Curto
Cor da Semente	Rosada	Rosada	Rosada	Vermelha
Potencial Produtivo	6500 kg/ha	6500 kg/ha	5.000 kg/ha	4500 Kg/ha
Produtividade média	5525 kg/ha	3000 kg/ha	3383 kg/ha	2000 kg/ha
Mercado preferencial	Externo	Externo	Interno	Interno

Fonte: INSTITUTO AGRONOMICO DE CAMPINAS, 2006.

#### 2.2.4. Consumo per capita de amendoim

De acordo com dados da Associação Brasileira das Indústrias de Amendoim, Chocolate, Balas e derivados (ABICAB), o consumo per capita brasileiro de amendoim é de aproximadamente 0,8 kg/habitante em média, sendo o consumo maior nas regiões produtoras, tal como na região Sudeste (1,08 kg/hab) e menor nas regiões Centro-Oeste (0,72 kg/hab), e Nordeste (0,4 kg/hab) e Sul (0,49 kg/hab) (ABICAB, 2015). Este consumo é relativamente baixo quando comparado a países como Nigéria (16,8 kg/hab), China (12,1 kg/h), Estados Unidos (6,94 kg/hab), Índia (3,35 kg/hab), Canadá (2,48 kg/hab), Alemanha (1,50 kg/hab), Argentina (1,4 kg/hab) e Reino Unido (1,07 kg/hab) (INC, 2016).

### 2.3. Processo de beneficiamento do amendoim

A colheita de amendoim inicia-se com 70% de vagens atingindo maturação fisiológica completa, sendo o período variado conforme cultivar. Em cultivares de porte ereto, o período para que 70% atinja a maturidade varia de 85 e 90 dias pós-plantio, enquanto em cultivares de porte rasteiro ocorre após 120 e 150 dias (SOFIATTI *et al.*, 2009). O ponto de colheita é sempre um desafio aos produtores, já que uma mesma planta apresenta vagens em diferentes estágios de maturação. O período de colheita ideal é baseado no ciclo e através do monitoramento da cor de endoderma (superfície da casca abaixo da epiderme) (AGUIAR *et al.*, 2014).

Maior número de vagens imaturas na colheita afeta a qualidade do produto no armazenamento, enquanto o atraso causa a perda de vagens por desprendimento no solo, maior susceptibilidade ao ataque fúngico, pragas e ocorrência de grãos germinados (FAO, 2010; MARTINS, 2015). A fase final de maturação se demonstra pela vagem com textura fina e face interna com manchas marrom e a película de grão com coloração firme (BOLONHEZI, 2005; PIGHINELLI, 2007; AGUIAR *et al.*, 2014).

A retirada de planta (arranquio) pode ser manual ou mecânica para remover o excesso de terra da vagem pós-arranquio com chacoalhamento e, as plantas colocadas enfileiradas com a parte vegetal para baixo e as vagens para cima para o processo de cura, i.e., término de maturação (CÂMARA, 2014). A umidade inicial aproximada de 45% nos grãos se reduz até atingir 16 a 10% no campo, sendo esta uma pré-secagem natural de 2 a 6 dias conforme as condições de insolação, temperatura, ventilação e, sem chuva (CÂMARA, 2014; MARTINS, 2015). A seguir prossegue-se o despencamento (bateção), tendo o cuidado em retirar a quantidade máxima de vagens perfeitas, evitar dano mecânico e remover terra, resto de planta e outros materiais. Em processo de secagem artificial, o despencamento pode ocorrer com umidade do grão inferior a 20%; caso contrário, a etapa deve ser realizada ao atingir 8% de umidade (BRASIL, 2008).

Após o recolhimento de amendoim despencado, a pré-limpeza através de vibração, peneiramento e ventilação antecede a etapa de secagem para remover o solo, pedras, gravetos, e restos de cultura (CÂMARA, 2014). A secagem pode ser natural ou artificial, sendo que a secagem natural ocorre no campo até a atingir 8% de umidade, enquanto secagem artificial procede em secador do tipo conjunto de carretas ou silo estático a aproximadamente 35 °C e umidade relativa de 45% (BRASIL, 2008; SOFIATTI, QUEIROGA; 2009).

O amendoim seco é debulhado e, os grãos classificados por tamanho em peneiras de crivos circulares e mesas densimétricas, procedendo seleção eletrônica seguida de seleção manual e, acondicionado em saca (CÂMARA, 2014).

Dependendo da finalidade, os grãos podem passar pelo processo de blanchamento para remover a película. O amendoim é colocado em esteira que se move lentamente por fornos divididos em zonas de aquecimento com aumento gradual de temperatura, para provocar a expansão do grão. O fluxo de ar no forno flui alternadamente de cima para baixo. O amendoim é resfriado na última zona para contração do grão e, a película solta é retirada por abrasão (lixamento). O blanchamento altera a umidade e atividade enzimática de grãos, fatores importantes na qualidade de amendoim (ADELSBERG, SANDERS, 1997; SANDERS *et al.*, 1999; SCHIRACK *et al.*, 2006; MARTINS, 2015).

#### **2.4. Micotoxinas**

O termo micotoxina é proveniente do grego '*mykes*' que significa fungo e do Latim '*toxicum*' que significa veneno. As pesquisas de micotoxinas iniciaram na década de sessenta devido à perda de 400.000 perus na Inglaterra. A síndrome epidemiológica denominada de "*Turkey X Disease*" decorreu da ingestão de ração contaminada por toxina, sendo o alimento preparado com farelo de amendoim importado da África e Brasil (STEVENS *et al.*, 1960; ASPLIN, CARNAGHAN, 1961; SPENSLEY, 1963; BLOUNT, 1961; BULLERMAN, 1979).

A exposição humana às micotoxinas pelo consumo de alimentos é uma questão de saúde pública mundial, sendo a contaminação dependente de crescimento fúngico seja no campo, pós-colheita, transporte, processamento e ou armazenamento (SABINO, 1996). As micotoxinas produzidas em condições específicas persistem no armazenamento, assim como resistem ao processamento, constituindo em perigo natural de maior frequência na cadeia produtiva de alimentos (ANKLAM *et al.*, 2002; TAVČARKALCHER, *et al.*, 2007; MUSCARELLA *et al.*, 2007; GORYACHEVA *et al.*, 2007).

O crescimento de fungos toxigênicos pode estar diretamente relacionado à produção de micotoxinas; a produção de micotoxinas não ocorre sem o crescimento, mas a presença do fungo produtor não indica necessariamente a presença de micotoxina (GONÇALEZ; PINTO; FELICIO, 2001). A crescente preocupação dos países importadores

perante micotoxinas resultou na elaboração de legislações cada vez mais rígidas, no que concerne aos níveis máximos permitidos (CAST, 2003; FREIRE *et al.*, 2007).

## 2.5. Aflatoxinas

As aflatoxinas (AFs) pertencem ao grupo de micotoxinas resultantes do metabolismo secundário produzido principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*; destaca-se não somente pela maior toxicidade, mas também pelo perigo de produção desde o estágio de campo ao armazenamento (CARLSON *et al.*, 2000; JAIMEZ *et al.*, 2000; CHIAVARO *et al.*, 2001; CHO *et al.*, 2008; DORNER, 2008; LI *et al.*, 2009). A produção de aflatoxinas é afetada pela condição ambiental, com ênfase à temperatura (25-30 °C) e alta umidade, associada à injúria causada por inseto e/ou mecânica (CARLSON *et al.*, 2000.; JAIMEZ *et al.*, 2000.; CHIAVARO *et al.*, 2001.; CHO *et al.*, 2008.; DORNER, 2008).

### 2.5.1. Fungos produtores de aflatoxina: *Aspergillus* section *Flavi*

Pier Antônio Micheli (Micheli, 1729) descreveu o gênero *Aspergillus* em 1729, cuja similaridade da estrutura morfológica ao instrumento para aspergir água benta pelo clero, originou o nome ao fungo. *Aspergillus* section *Flavi* apresentam conídios verde amarelado ao marrom escuro, sendo capazes de produzir esclerócio (VARGA *et al.*, 2011). Os principais produtores de aflatoxinas são *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, embora outras espécies menos comum sejam capazes: *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. minisclerotigenes*, *A. parvisclerotigenes*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonomius*, *A. pseudotamarii*, *A. togoensis*, *A. mottae*, *A. sergii*, *A. transmontanensis* e *A. novoparasiticus* (PILDAIN *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2012; MASSI *et al.*, 2014).

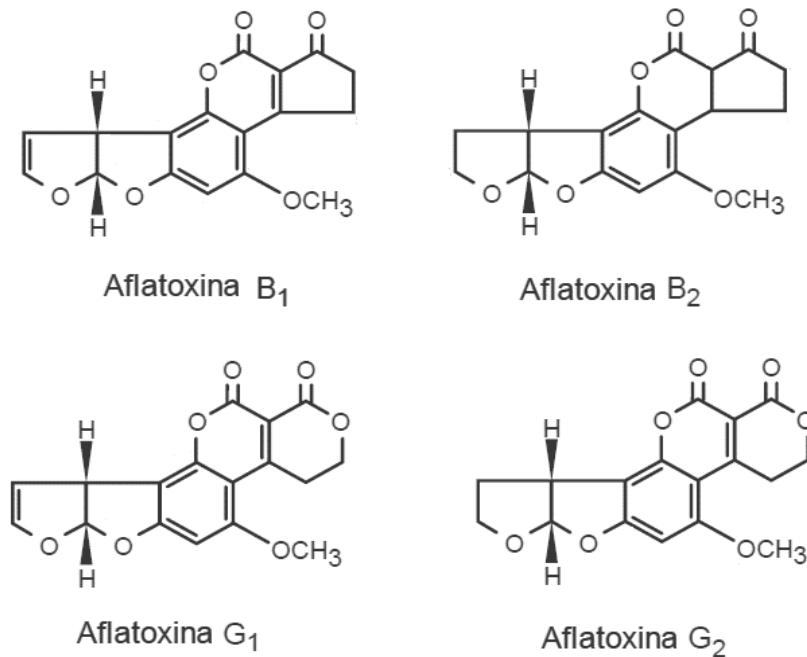
*Aspergillus flavus* caracteriza-se pelo crescimento rápido, colônias verde-amareladas de 65-70 mm de diâmetro após 7 dias de cultivo a 25 °C, contaminando praticamente todos os alimentos em países tropicais, produzem apenas aflatoxinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, sendo que 40% de suas cepas são aflatoxigênicas (FRISVAD *et al.*, 2007). O crescimento ocorre em atividade de água mínima de 0,78 e, temperatura ótima na faixa de 33 °C (mínima de 10-12 °C; máxima de 43-48 °C), sob variação da faixa de pH entre 3,4-10,0 (PITT & HOCKING, 2009).

*A. parasiticus* não ocorre em extensa variedade de alimentos por ser geograficamente restrito se comparado a *A. flavus*, mas destaca-se pela contaminação em amendoim (HORN *et al.*, 1994). A maioria das cepas de *A. parasiticus* produzem aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, podendo crescer entre 12-42 °C (ótima em 32 °C), A<sub>w</sub> mínima de 0,82 a 25 °C, 0,81 a 30 °C e 0,8 a 37 °C, faixa de pH de 2,4-10,0 e, apresentam baixa resistência ao tratamento térmico (FRISVAD *et al.*, 2007; PITT & HOCKING, 2009).

### 2.5.2. Características físico-químicas e de toxicidade

As aflatoxinas são bisfurano-cumarinas derivadas de decacetídeo sintetizada pela via de policetídeos e, constituem um grupo contendo mais de 20 análogos, sendo os principais denominados de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (Figura 5) (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Aflatoxina M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> derivam da metabolização e biotransformação de aflatoxina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, respectivamente e, excretadas principalmente no leite e urina de animais e seres humanos expostos à ingestão de alimento contaminado (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003).

**Figura 5.** Estruturas químicas das principais aflatoxinas.



**Fonte:** MOSS, 2002 modificado.

As bisfurano-cumarinas da série G diferem quimicamente da série B pela presença do anel 3-lactona, ao invés do anel ciclopentanona. Uma dupla ligação entre carbono 8 e 9 ocorre como vinil éter no terminal de anel furano em B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>, mas não em B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub>. Essa pequena diferença estrutural afeta drasticamente a atividade, aumentando a carcinogenicidade e toxidez de aflatoxina B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> em relação aos respectivos análogos B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> (JAIMEZ *et al.*, 2000).

A conjugação e rigidez estrutural de aflatoxina conferem característica natural de fluorescência, sendo que as denominações B e G decorrem de emissão em azul (*blue*, emissão cerca de 440 nm) e verde (*green*, a 460 nm), respectivamente, sob exposição à luz ultravioleta (360-365 nm). As pequenas variações estruturais têm influência drástica na propriedade fluorescente, permitindo a distinção visual das aflatoxinas, por exemplo, os análogos G<sub>2</sub> e B<sub>2</sub> fluorescem com maior intensidade do que homólogos insaturados B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> (JAIMEZ *et al.*, 2000; MARAGOS *et al.*, 2008).

Estas moléculas de baixa massa molecular, incolores e inodoras, não alteram o sabor do alimento e, são extremamente estáveis em altas temperaturas, com ponto de fusão, superando 200 °C. Embora apresentem baixa solubilidade em água, são solúveis em solventes orgânicos como clorofórmio, benzeno, metanol e etanol (WHO, 1979; BIHEL; BUCK, 1987).

A Tabela 2 descreve algumas características físico-químicas das principais aflatoxinas.

**Tabela 2.** Características físico-químicas das principais aflatoxinas.

Aflatoxinas	Fórmula Molecular	Massa Molecular	Temperatura de Fusão (°C)	Emissão de fluorescência comprimento de onda (nm) e cor*
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	269	425 – azul
B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289	425 – azul
G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244-246	450 – verde
G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	237-240	450 – verde

\* sob luz ultravioleta

**Fonte:** OPAS (1983).

A aflatoxina B<sub>1</sub> é a mais tóxica do grupo e classificada no Grupo 1 - carcinógeno ao homem pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2002). A toxicidade manifesta-se pela mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade, dependendo da dose e tempo de exposição. Efeitos agudos causam danos estruturais e funcionais no fígado devido

à necrose celular, hemorragia, lesões, fibrose e cirrose. Além disso, desencadeiam imunossupressão, infecção no trato respiratório inferior, hemorragia gastrointestinal, indisposição e febre. Exposição crônica pode resultar em câncer hepático, bem como carcinoma em rins, pulmão, colon e sistema nervoso (COULOMBE, 1993; CARLSON *et al.*, 2000; JAIMEZ *et al.*, 2000; CHIAVARO *et al.*, 2001; EDINBORO & KARNES, 2005; BINDER *et al.*, 2007; ROMERO, 2007).

### 2.5.3. Biotransformação de Aflatoxina B<sub>1</sub>

A característica lipofílica facilita a absorção de aflatoxina inclusive pela epiderme. A toxina ingerida é distribuída pela circulação sanguínea, concentrando-se no fígado devido à alta permeabilidade membranar do hepatócito e, em menor quantidade no rim (EATON, GROOPMAN, 1994).

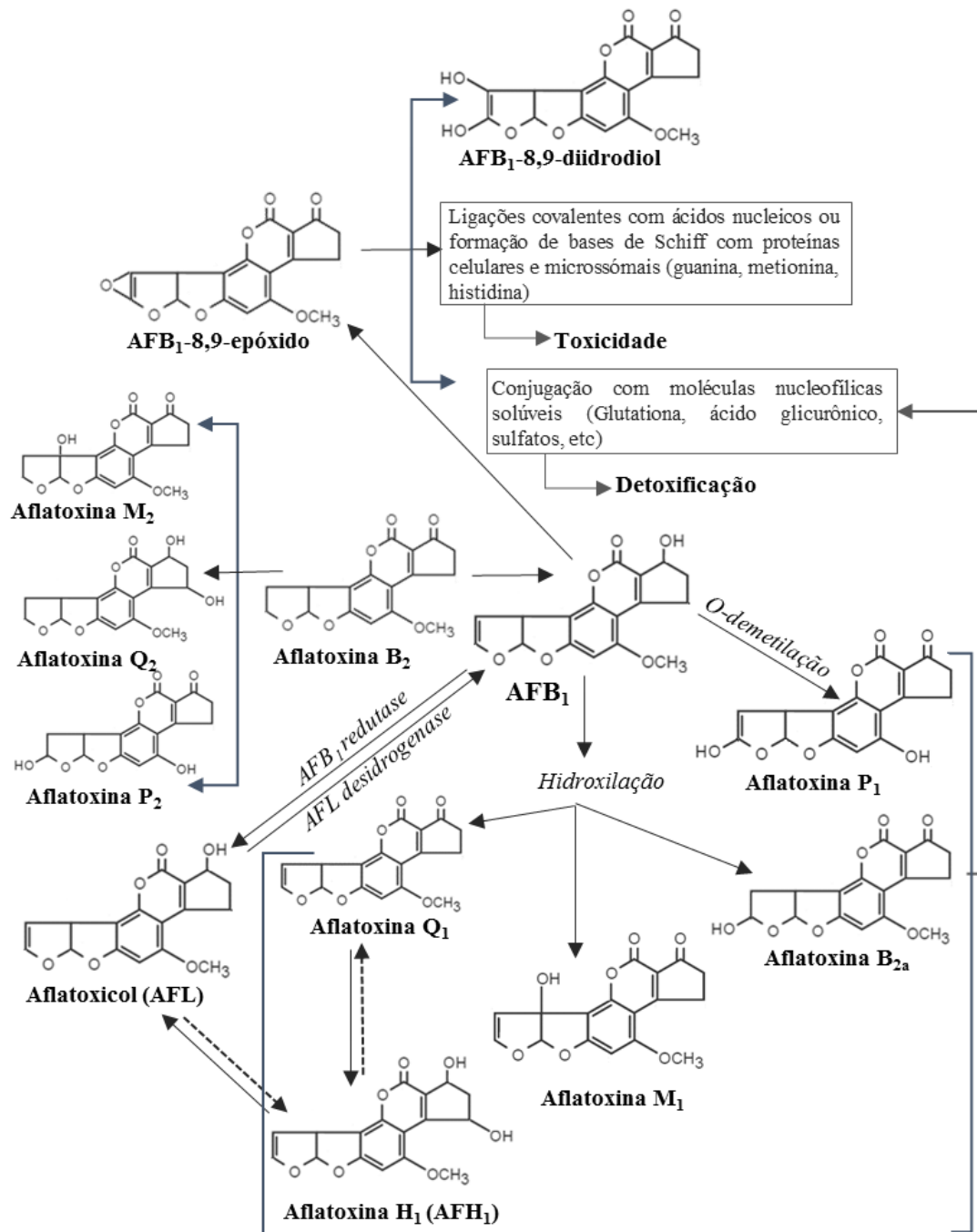
A biotransformação de aflatoxina B<sub>1</sub> tem sido amplamente estudada devido à estreita relação entre mecanismo de toxidez, seja para ativação resultando em aductos tóxicos e carcinogênicos, como na inativação e eliminação (WU *et al.*, 2009), considerando que a aflatoxina B<sub>1</sub> é um pró-carcinogênico, portanto requer ativação metabólica para manifestar efeito tóxico (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; OGIDO, 2003).

A biotransformação da aflatoxina B<sub>1</sub> é mediada principalmente pelo citocromo P450 microsomal intra e extra-hepática, embora haja outras conversões. Aflatoxina é metabolizada por hidroxilação – formação de AFM<sub>1</sub> e AFQ<sub>1</sub>, ou epoxidação – AFB<sub>1</sub>-8,9 epóxido (Figura 6).

A detoxicação hepática consiste na formação de metabólitos hidroxilados como aflatoxina M<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>, B<sub>2a</sub>, com potencial mutagênico inferior à B<sub>1</sub>; em contraste, a ativação de aflatoxina B<sub>1</sub> gera aflatoxina B<sub>1</sub>-8,9-epóxido altamente instável e reativo (EATON *et al.*, 1994).

A biotransformação de AFB<sub>1</sub> em AFP<sub>1</sub>, AFQ<sub>1</sub> ou AFM<sub>1</sub> permite conjugação com ácido glicurônico e, subsequente excreção. A  $\sigma$ -demetilação produz AFP<sub>1</sub>, consideravelmente menos tóxica do que AFB<sub>1</sub>, mas a epoxidação pode reconvertê-la em composto reativo. AFB<sub>2a</sub> origina-se da hidratação de dupla ligação do anel furano terminal de AFB<sub>1</sub> (EATON *et al.*, 1994). O aflatoxicol (AFL) atua como reservatório, ocorrendo reconverção em AFB<sub>1</sub> (COULOMBE, 1993; ORSI *et al.*, 2007).

**Figura 6.** Principais reações e produtos da biotransformação da AFB<sub>1</sub>.



**Fonte:** WU *et al.*, 2009.

A atividade carcinogênica e mutagênica de aflatoxina B<sub>1</sub> decorre de alta afinidade nucleofílica e reatividade de AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido a qualquer componente celular com ênfase ao DNA, especificamente o ataque nucleofílico ao átomo N7 de guanina (GROOPMAN *et al.*, 1984; COULOMBE, 1993). As pesquisas indicam que aflatoxina B<sub>1</sub> seja indutora de

mutação no códon 249 em gene p53 supressor de tumor e ocorre nas maioria dos hepatocarcinomas (LEE *et al.*, 2004).

A inativação enzimática de aflatoxina B<sub>1</sub>-8,9-epóxido por glutathione (GSH) consiste em importante via de detoxicação em várias espécies animais, sendo que via de conjugação com sulfato e ácido glicurônico também participam no processo, sendo excretado através de urina (COULOMBE, 1993).

A aflatoxina M<sub>1</sub> resultante da hidroxilação da aflatoxina B<sub>1</sub> em fígado animal corresponde a aproximadamente 1 a 3 % de aflatoxina B<sub>1</sub> ingerida; conhecida como “toxina do leite” por ser a principal via de excreção, a detecção da AFM<sub>1</sub> no leite pode ocorrer de 12 a 24 horas após primeira ingestão de AFB<sub>1</sub> (ARAÚJO, 1990; WEIGEL, 2007). Aflatoxina M<sub>1</sub> é menos carcinogênica e mutagênica que B<sub>1</sub>, mas com a toxicidade aguda similar a outras aflatoxinas.

Embora a susceptibilidade humana à aflatoxinas não esteja totalmente esclarecida, a alta incidência de carcinoma hepatocelular no sul da África, sudeste da Ásia, Coreia do Sul, Taiwan e China tem sido relacionado à dieta com elevado teor de aflatoxinas, combinada à infecção por vírus da hepatite B (SYLLA *et al.*, 1999; ANKLAM *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2004; POLYCHRONAKI, *et al.*, 2008). Entre patologias associando ingestão de alimento contaminado com aflatoxinas citam-se a “cirrose infantil indiana”, parcialmente decorrente de intoxicação por aflatoxinas e “Síndrome de Reye”, resultando em encefalopatia e degeneração lipídica de vísceras em criança (JAIMEZ *et al.*, 2000).

#### **2.5.4. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e derivados**

A característica de um fruto subterrâneo expõe as vagens de amendoim em contato direto com o solo e conseqüentemente à contaminação por fungos aflatoxigênicos, considerando que o solo seja reservatório primário de *A. flavus* e *A. parasiticus* (HORN, PITT; 1997; HORN, MOORE, CARBONE, 2009; ZORZETE, 2013).

As condições meteorológicas durante o período de enchimento dos grãos podem afetar significativamente tanto o rendimento da cultura como a qualidade do amendoim, devido à contaminação por aflatoxinas. Em condições de chuva ou irrigação adequada, a contaminação pela toxina normalmente não ocorre. No entanto, nas principais áreas de cultivo da cultura de amendoim pelo mundo, as condições de produção não são ideais (PITT, TANIWAKI, COLE; 2013; TORRES, *et al.*, 2014).

Embora se saiba que muitos fatores influenciam a produção de aflatoxinas no campo, o estresse hídrico durante o crescimento da planta é o mais importante. Em geral, o déficit prolongado de umidade durante o período de enchimento dos grãos aliado à temperaturas elevadas do solo (>22 °C) aumentam a produção de aflatoxinas (COLE *et al.*, 1982; DORNER, BLANKENSHIP, 1989; NAGESWARA *et al.*, 2002; HORN, 2005).

O estresse hídrico também pode influenciar a produção de aflatoxinas, pois o mesmo age reduzindo as defesas naturais da planta contra a infecção; por reduzir a atividade da água no solo, o que reduz o crescimento e atividade de bactérias, amebas e fungos concorrentes, promovendo o crescimento de *A. flavus* e *A. parasiticus*, que são xerofílicos (PITT *et al.*, 2013).

Cole *et al.* (1985), sugeriram que mesmo após o grão ser infectado por fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*, a produção de aflatoxinas não ocorre no grão até que os mecanismos de defesa natural da planta sejam rompidos em consequência do estresse ambiental (déficit hídrico e temperatura elevada), e que a manutenção da alta atividade de água do grão até o momento da colheita preserva o mecanismo de defesa natural do amendoim contra fungos aflatoxigênicos, devido a produção de fitoalexinas.

A cultura pode ser contaminada com aflatoxinas ainda no campo, no estágio de pré-colheita, geralmente associada ao estresse hídrico e ataque de insetos. O amendoim em desenvolvimento pode ser infectado por diferentes vias, incluindo sistemicamente através das flores, mas a infecção principal e direta ocorre à partir do solo ao redor das vagens (PITT *et al.*, 2003; ZORZETE, 2010; TORRES, *et al.*, 2014).

As recomendações visando redução de aflatoxinas em amendoim e derivados podem ser divididas na adoção de duas técnicas: (i) Boas Práticas Agrícolas (BPA) e Boas Práticas de Fabricação (BPF); (ii) aliado a um sistema de gestão de complementar baseada em Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (KABAK, DOBSON, VAR; 2006). Estudos tem demonstrado a ocorrência de aflatoxinas em amendoim e derivados, demonstrando a constante necessidade de monitoramento dos níveis destes contaminantes em alimentos (SABINO *et al.*, 2000; GLORIA *et al.*, 2006; CALDAS *et al.*, 2002; JAGER *et al.*, 2013).

#### **2.5.5. Legislação Brasileira**

Agências governamentais, principalmente de países importadores, têm estabelecido rigoroso programa regulamentar perante limite de tolerância de aflatoxina baseado em *Codex Alimentarius*, sendo que o nível varia conforme país importador ou exportador,

blocos comerciais, bem como matriz alimentar ou ração animal (AKIYAMA *et al.*, 2001; ANKLAM *et al.*, 2002; XIULAN *et al.*, 2006; VAN EGMOND *et al.*, 2007).

A regulamentação do nível máximo de aflatoxina permitido no Brasil ocorreu através da Resolução nº 34 pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), estabelecendo o limite em  $30 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , calculada pela soma de AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> e, publicada no Diário Oficial da União em 19/01/1977 (SILVA, 2010). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde - Brasil revogou a Resolução nº 34 de 1976 através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº274 de 15/10/2002 e, regulamentou o limite máximo de aflatoxina total (B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>) em  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$  para milho, amendoim e derivados (BRASIL, 2002). A mesma resolução estabeleceu o limite máximo de  $0,5 \mu\text{g}/\text{L}$  para aflatoxina M<sub>1</sub> em leite fluído e  $5,0 \mu\text{g}/\text{L}$  para leite em pó (Tabela 3).

**Tabela 3.** Limite máximo de aflatoxina no leite, milho e amendoim.

Alimento	Aflatoxinas	Limite
Leite fluído ou Leite em pó	M <sub>1</sub>	$0,5 \mu\text{g}/\text{L}$ e $5,0 \mu\text{g}/\text{kg}$
Milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído); farinhas ou sêmolos de milho	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>	$20,0 \mu\text{g}/\text{kg}$
Amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado); Pasta ou manteiga de amendoim	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>	$20,0 \mu\text{g}/\text{kg}$

**Fonte:** RDC nº274 de 15/10/2002 (ANVISA, 2002).

A RDC nº7 de 18/03/ 2011 (BRASIL, 2011), revogou a RDC nº274 e incluiu outras categorias de alimento anteriormente não regulamentadas no monitoramento de aflatoxina (Tabela 4). A Resolução nº 7 manteve o mesmo Limite Máximo Tolerado (LMT) de aflatoxina total para amendoim e derivados em  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ . A referida legislação, além de incluir novas categorias de alimento para o monitoramento de aflatoxina, estabeleceu limite máximo tolerável para outras micotoxinas - ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FUM), patulina (PAT) e zearalenona (ZEA) ( ANVISA, 2011).

**Tabela 4.** Limite máximo de aflatoxina em outros alimentos.

Micotoxinas	Alimento	Limite ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )
Aflatoxina M <sub>1</sub>	Leite fluído / Leite em pó / Queijos	0,5 / 5 / 2,5
	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados	5
	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Frutas desidratadas e secas	10
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância;	1
Aflatoxinas (B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub> )	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Especiarias tais como: <i>Capsicum spp.</i> (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão doce); <i>Piper spp.</i> (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta), <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada), <i>Zingiber officinale</i> (gengibre), <i>Curcuma longa</i> (curcuma) e misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias citadas.	20
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolas de milho)	20

**Fonte:** RDC nº 07 de março/2011 (ANVISA, 2011).

## 2.6. Importância de amostragem na análise de micotoxinas

A análise de micotoxinas segue as etapas de amostragem, homogeneização, extração e limpeza-concentração de extrato, sendo a amostragem adequada crucial na obtenção de resultado quantitativo correto de contaminantes residuais (BERTHILLER *et al.*, 2007). Salienta-se a distribuição heterogênea de contaminantes no mesmo lote, onde normalmente ocorre baixa unidade de grãos contaminados, mas com níveis extremamente elevados (FONSECA, 2002; VAN EGMOND *et al.*, 2007; DORNER, 2008; KRŠKA *et al.*, 2008).

Whitaker, Slate e Johanson (2005) demonstraram a contaminação desuniforme de micotoxina num mesmo lote de produtos agrícolas. Portanto, a amostra deve ser constituída de pequenas porções tomadas de diferentes pontos do lote, capaz de gerar amostragem representativa do total de lote. Simulando o procedimento, o resultado analítico de uma amostra é afetado pelo tamanho de amostragem, concentração de aflatoxina e percentual de grãos

contaminados no lote, sendo a relação expressa como tabela de probabilidade de Whitaker *et al.* (1974).

Considerando a variabilidade na distribuição de aflatoxina, é sempre conveniente realizar a amostragem em lotes em movimento. I.e., a probabilidade de obter teor real de aflatoxina num lote dependeria de amostras representativas tomadas durante a construção ou desmantelamento de pilha, carregando ou descarregando caminhão, vagão, ou navio (FAO, 1993; FONSECA, 2002). Se não for possível proceder a movimentação do lote, devem retirar incrementos distribuídos sistematicamente no lote estático. O lote deve ser previamente organizado de maneira a permitir que o amostrador circunde toda a pilha de sacas, ou acessar todas as faces (BRASIL, 2013).

### **2.6.1. Critérios na amostragem de amendoim**

O critério de amostragem visando determinação de aflatoxina em amendoim deve seguir o plano de amostragem oficial. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa para o Regulamento Técnico de Boas Práticas Agrícolas através da Portaria N° 65 de 10/09/2004 para controle de aflatoxina na cadeia produtiva (BRASIL, 2004).

O plano de amostragem proposto pela Portaria N° 65 tem como base o projeto de referência e plano de amostragem para aflatoxina em amendoim elaborado por *Codex Alimentarius* em 1999 e, revisto em 2001 (CODEX ALIMENTARIUS, 1999). No plano, o tamanho de amostra total (amostra global) é de 20 kg para amendoim descascado (lote com até 25 toneladas), devendo ser coletada conforme a massa total do lote. A amostra global de 20 kg deve ser integralmente triturada, homogeneizada, quarteada até obter sub-amostra de 5 kg de amendoim em casca. Portanto, trata-se de amostragem mais rigorosa do que a proposta pela Resolução RDC n° 274 de ANVISA (BRASIL, 2002).

No procedimento usual de amostragem do amendoim em saca, anteriormente à amostragem procede-se a verificação física (exame visual) do lote, ou partida no local de armazenamento, ou no estabelecimento para avaliar a condição geral do ambiente e produto, devendo estar isento de pragas (BRASIL, 2002).

Outro item importante no lote a ser amostrado é a identificação devida para permitir adequada relação com a Amostra de Trabalho. No sistema de amostragem de

amendoim emprega-se determinadas nomenclaturas para descrever as variações de tamanho de amostra coletada: sub-lote, incremento, amostra global e amostra de trabalho (BRASIL, 2002).

O sub-lote é a parte designada de um lote, fisicamente separado, quantificado e identificado, devendo apresentar as mesmas características de lote original; Incrementos são as pequenas porções tomadas para compor uma amostra global; A amostra global é a porção de produto composta pela reunião de todos os incrementos extraídos de lote ou sub-lote representativo; A amostra de trabalho é resultante do quarteamento de amostra global para envio ao laboratório de análise e classificação, sendo a homogeneização obrigatória para garantir a representatividade (BRASIL, 2002).

A coleta de incrementos em lote em sacaria ou a granel procede-se com calador manual, sonda ou similares com comprimento e diâmetro compatíveis com o tipo de embalagem a ser amostrada e com a massa do incremento (Figura 7).

**Figura 7.** Amostragem do amendoim em sacas com calador



**Fonte:** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2013.

A RDC nº 274 de 2002 estabelece Planos de amostragem para análise de Aflatoxina em Milho, e Amendoim baseado em recomendação de *Food and Agriculture Organization* (FAO, 1993). O tamanho de lote e subseqüente sub-lotes, bem como tamanho de amostras coletadas para análise de aflatoxina e classificação de grãos devem estar em conformidade com a Tabela 5 (BRASIL, 2002).

**Tabela 5.** Amostragem para análise de micotoxina em amendoim.

Tamanho do Lote (Toneladas)	Massa dos Sub-lotes ou nº de sub-lotes	<sup>(a)</sup> Número de Incrementos	<sup>(b)</sup> Massa de Incrementos (g)	<sup>(c)</sup> Massa da Amostra global (kg)	Massa da amostra De Trabalho	
					Amostra para Micotoxinas (kg)	Amostra de Classificação
> 500 t	100 t					
> 100 e ≤ 500 t	5 sub-lotes	100		20		
> 25 e ≤ 100 t	25 t					
> 15 e ≤ 25 t	1 sub-lote		200		5	2
> 10 e ≤ 15 t	----	80				
> 5 e ≤ 10 t	----	60		12		
> 1 e ≤ 5 t	----	40		8		

<sup>(a)</sup> Números de pontos aleatórios à serem amostrados em todo o lote; <sup>(b)</sup> Massa de cada ponto amostrado; <sup>(c)</sup> Porção de produto formada pela reunião de todos os incrementos extraídos do lote.

**Fonte:** Adaptado de BRASIL, 2002.

Conforme plano acima, a amostra de trabalho de amendoim a ser encaminhada para o laboratório é de 5 kg, devendo a totalidade ser transformada em pasta homogênea ou moída em malha 14, para posterior divisão em três partes, sendo uma tomada para análise de rotina, podendo ser tomada mais uma quarta amostra para análise de rotina (BRASIL, 2002).

Além do tamanho de lote, sub-lote, número de incrementos, massa da amostra global e amostra de trabalho, a legislação estabelece a frequência (F) de amostragem. I.e., baseado no tamanho de lote (toneladas), é possível estabelecer a frequência de incrementos coletados em saca para compor a massa de amostra global, conforme equação 1.

**Equação 1.** Fórmula para determinar a frequência de amostragem (F).

$$(F) = \frac{\text{Massa do lote (kg)} \times \text{Massa do incremento (kg)}}{\text{Massa da amostra global (kg)} \times \text{Massa de uma embalagem individual (kg)}}$$

A equação permite obter um valor numérico capaz de representar a frequência de amostragem (F) a ser adotada em cada caso, sendo necessário o arredondamento de casas para um número inteiro mais próximo (BRASIL, 2002).

## 2.7. Métodos de análise de Micoxinas

A extensa diversidade estrutural dificulta a utilização de método padrão único capaz de analisar todas as micotoxinas, já que técnica satisfatória para determinada molécula pode ser inadequado para outras com propriedades similares, ou mesma molécula em matrizes diferentes (TURNER, SUBRAHMANYAM, PILETSKY; 2009).

Métodos analíticos tradicionais para a detecção de aflatoxina empregam na etapa de limpeza, a coluna cromatográfica, partição líquido-líquido, ou adsorção química para remover componentes interferentes. A quantificação é geralmente realizada após separação por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), seguida de detecção fluorimétrica, CLAE acoplado à Espectrometria de Massas LC/MS (BRADBURN *et al.*, 1995, XIULAN *et al.*, 2006).

A separação de analitos de interesse é comumente obtida por técnica baseado em princípio cromatográfico, seguida de detecção por método físico-químico e imunoquímico. A cromatografia tem como vantagem separar inúmeros analitos, enquanto que o método imunoquímico utiliza anticorpo (Ac) altamente específico (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989; BERTHILLER *et al.*, 2007).

### 2.7.1. Métodos Cromatográficos

A análise cromatográfica iniciou-se com a camada delgada devido à simplicidade e praticidade. Usada para fins quantitativos e semiquantitativos, a técnica tem baixo custo de operação e facilidade na detecção de compostos na faixa de ultravioleta-visível (UV-visível). O método é realizado em placas cromatográficas, sendo as aflatoxinas quantificadas procedendo comparação simultânea perante rf do *spot* de amostra com padrão de toxinas sob luz UV (análise semi-quantitativo), ou densitometria. As desvantagens consistem na necessidade de pré-tratamento de amostra, elevada quantidade de solventes, protocolos validados utilizando solventes clorados como diclorometano e clorofórmio nocivos ao meio ambiente, além da falta de automatização, com precisão e confiança analítica dependente da habilidade e experiência do técnico, principalmente na análise visual das placas (STROKA & ANKLAM, 2000, 2002; TURNER, SUBRAHMANYAM, PILETSKY, 2009).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é o método padrão de escolha na micotoxicologia atual, estando acoplado a diversas estratégias de detecção (EDINBORO & KARNES, 2005). Diferentes colunas cromatográficas são empregadas conforme característica físico-química de moléculas, sendo que pode empregar sistema CLAE de fase normal ou reversa na separação de aflatoxinas. A fase reversa é mais frequente pela facilidade de manipulação, assim como menor toxicidade de fase móvel aquosa (JAIMEZ *et al.*, 2000; CALLERI *et al.*, 2007). Os detectores comuns são de UV ou fluorescência, já que determinadas micotoxinas como ocratoxina, aflatoxina e citrinina contém cromóforo fluorescente natural na estrutura molecular. A vantagem consiste na detecção direta de toxinas fluorescentes, enquanto fumonisina, sem cromóforo natural, a análise por fluorescência requer derivatização da molécula (TURNER, SUBRAHMANYAM, PILETSKY, 2009).

A análise de aflatoxina por CLAE exige uma sequência de operações incluindo amostragem e preparo de amostra, extração, purificação e concentração do extrato, sendo etapas de fundamental importância para garantir a correta separação, quantificação e confirmação. Devido à diversidade de matrizes passíveis de contaminação por aflatoxina, não existe um método único adequado de extração, devendo-se considerar as propriedades físicoquímicas de cada matriz. As aflatoxinas são ligeiramente solúveis em solventes polares e insolúveis em solventes totalmente apolares, sendo normalmente extraídas com metanol, acetona e clorofórmio. A etapa de purificação/limpeza de amostra procede-se por partição líquido – líquido, colunas de extração em fase sólida (sílica, C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, entre outros), e colunas de imunoafinidade preparada com anticorpo específico (JAIMEZ *et al.*, 2000).

A CLAE é um método robusto e sensível; o acoplamento à espectrometria de massas permitiu análise de compostos em menor limite de detecção, reduziu a necessidade de derivatização, gera informações estruturais de analitos aliado à enorme variedade de compostos. Outrossim, trata-se de técnica de alto custo e sofisticado, requer reagentes de alta pureza e operadores treinados, impossibilitando emprego na rotina laboratorial *in loco* (BERTHILLER *et al.*, 2007; ONO *et al.*, 2007; TABARI *et al.*, 2011).

### **2.7.2. Métodos Imunoquímicos**

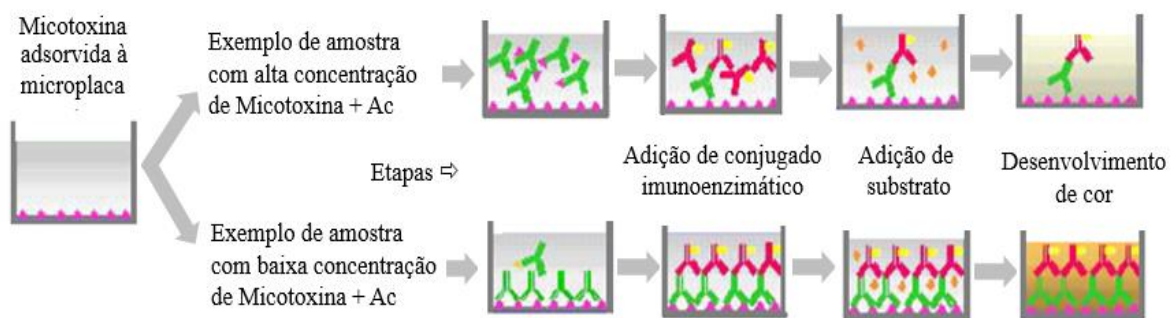
Métodos baseados em sistema biológico tem ocupado espaço na detecção de micotoxinas devido ao menor custo, sensibilidade, especificidade e rapidez. A geração de anticorpo monoclonal e policlonal de alta especificidade e sensibilidade permitiu o desenvolvimento da coluna de imunoafinidade na limpeza de amostra, obtendo extrato com

baixo nível de interferentes de matriz, assim como ELISA (*Enzyme-Linked immunosorbent Assay*) na triagem rápida perante contaminação de micotoxinas, facilitando e reduzindo o uso de sistemas cromatográficos (ANKLAM; STROKA; BOENKE, 2002).

Entre os métodos imunoquímicos, o ELISA se destaca entre os pioneiros na detecção rápida visando análise rotineira de micotoxinas (ANKLAM *et al.*, 2002; CALLERI *et al.*, 2007; XIULAN *et al.*, 2006). Diversos kits comerciais de ELISA têm sido disponibilizados para uma variedade de micotoxinas, incluindo detecção de aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, zearalenona, deoxinivalenol, citrinina e toxina T-2 (OLIVEIRA; PRADO; JUNQUEIRA, 2000; PITTET, 2005; KRŠKA *et al.*, 2008; SANTOS, 2009).

Uma das modalidades de ELISA é o método competitivo indireto (ic-ELISA) (Figura 8), o mais indicado na detecção de micotoxinas de baixa imunogenicidade. O princípio baseia-se na competição entre a toxina contaminante da amostra e toxina imobilizada na microplaca pelo sítio de ligação específico de anticorpo monoclonal. Quanto maior a concentração de toxina na amostra ocorrerá menor ligação de anticorpo com a toxina imobilizada na placa. I.e., a reação colorimétrica enzimática do anticorpo marcado (anticorpo secundário) será indiretamente proporcional à concentração de toxina (FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004; LI; ZHANG; ZHANG, 2009), ou seja, a concentração de micotoxina na amostra é inversamente proporcional à intensidade de cor desenvolvida (HEFLE, 1995; ONO *et al.*, 2004).

**Figura 8.** Esquema de ELISA competitivo indireto (ic-ELISA).



**Fonte:** Adaptado de Ono *et al.* (2004).

O ensaio ELISA apresenta rapidez, alta especificidade, limite de detecção comparável a métodos cromatográficos (ng a pg), requer pouca limpeza e concentração do analito e, pode ser portátil. A desvantagem consiste em possíveis resultados falso positivos devido a reação cruzada entre anticorpo com matriz alimentar, assim como falso negativos,

portanto a validação é essencial perante confiabilidade dos resultados. Além disso, o *kit* deve ser descartado após cada análise (ANKLAM; STROKA; BOENKE, 2002; FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

O componente central dos imunoenaios é o anticorpo, imunoglobulina secretada pelos linfócitos B em virtude da presença de substância estranha no organismo (antígeno), a molécula consiste de glicoproteína com massa molecular de aproximadamente 150 kDa, na forma de um tetrâmetro com duas cadeias leves de 25 kDa e duas cadeias pesadas de 50 kDa idênticas (HARLOW & LANE, 1988).

Antigamente, a produção de anticorpo ocorria pela inoculação do antígeno de interesse em ratos e camundongos, que através do sistema imunológico produziam anticorpos contra o antígeno, posteriormente os anticorpos eram retirados do animal pela cavidade ascítica, porém esse método de produção é limitado pela própria capacidade de produção do animal, além disso, a busca por técnicas de produção *in vitro* foi conduzida pela preocupação ética com os animais e pela maior eficiência na produção (HEILMANN *et al.*, 2005).

Köhler e Milstein (1975) desenvolveram a técnica de produção por hibridomas, e permitiu a produção ilimitada de anticorpo monoclonal (AcM) com alta especificidade, uniformidade e afinidade por um único epítipo (ROITT, BROSTOFF, MALE; 1999). Células de hibridomas são fusões de células de mieloma e células de baço de camundongos imunizados, assim as primeiras garantem a viabilidade aos hibridomas por tempo indeterminado e as células de baço são produtoras dos anticorpos monoclonais de interesse (HEILMANN *et al.*, 2005; LI, ZHANG, ZHANG; 2009).

### **2.7.2.1. Análise de aflatoxina em amendoim por ic-ELISA**

Devido a susceptibilidade e elevada ocorrência de aflatoxinas na cultura de amendoim, são necessários métodos analíticos rápidos e rentáveis capazes de identificar o produto contaminado, antes que este seja industrializado e seja colocado no mercado (BIOMIN, 2014). Os testes ELISA para as aplicações comerciais devem ser de fácil uso, com o mínimo de passos possível e método de extração simples (LI *et al.*, 2009).

Li *et al.* (2009), desenvolveram três anticorpos monoclonais para rastreamento de aflatoxina total em amendoim; os autores selecionaram o anticorpo 10C9 por apresentar elevada reatividade cruzada (65%) à aflatoxina G<sub>2</sub> e por apresentar maior sensibilidade para cinco aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> e AFM<sub>1</sub>) cujos valores estavam na faixa de 2,1-3,2

ng/mL. Os resultados de recuperação encontrados pelos autores (87,5% a 102,0% em amostras contaminadas artificialmente com níveis de 0,1 a 0,2 ng/mL de AFB<sub>1</sub>, e 0,2 a 0,4 ng/mL de AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>) indicaram que o ELISA desenvolvido poderia ser empregado para determinação de aflatoxinas totais em amostras de amendoim após procedimento de extração simples e rápido.

Oplatowska-Stachowiak *et al.* (2016), desenvolveram e validaram dois protótipos de *kit* ELISA competitivo, sendo um para a detecção de aflatoxina B<sub>1</sub> e outro para aflatoxina total em amendoim. Após a produção de sete anticorpos monoclonais, dois foram selecionados por apresentar elevada sensibilidade e bom perfil de reatividade cruzada. Os autores validaram os testes, demonstrando a aplicabilidade do método de detecção de AFB<sub>1</sub> (LD = 0,43 ng/g) e soma de aflatoxinas (LD = 0,38 ng/g) abaixo dos teores máximos fixados pelo Regulamento (CE) N°1881/2006 (2 e 4 ng/g, respectivamente).

A disponibilidade de anticorpos monoclonais adequados e de baixo custo contra aflatoxinas é de extrema importância para ampla adoção de procedimentos analíticos imunoquímicos, especialmente nos países tropicais em desenvolvimento, onde a contaminação por aflatoxina é frequente (GATHUMBI, USLEBER, MaERLBAUER, 2001).

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Padronizar e validar imunoenensaio ic-ELISA para aflatoxina B<sub>1</sub> em amendoim.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

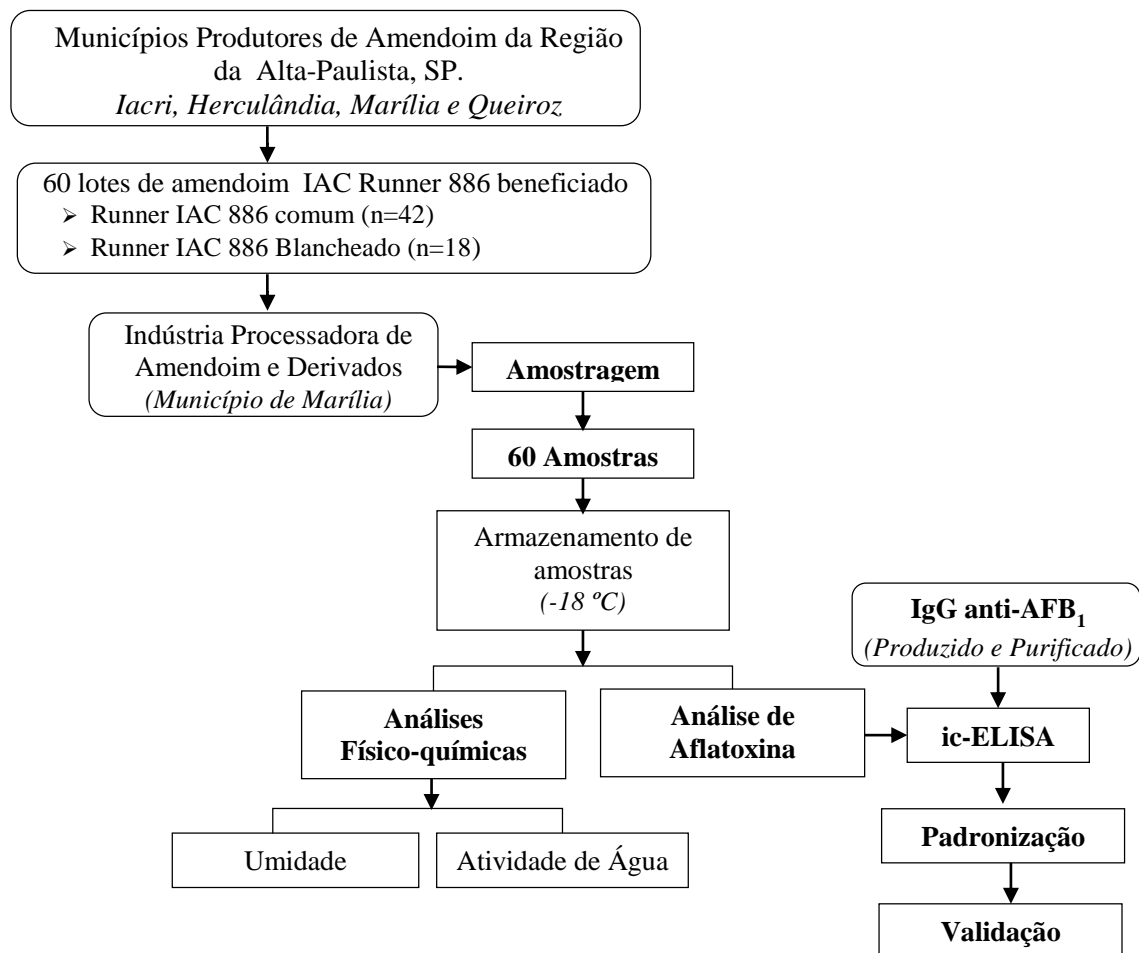
- Aplicar ic-ELISA para análise de lotes de amendoim provenientes da região Alta Paulista, Estado de São Paulo.
- Determinar a umidade e a atividade de água das amostras e correlacioná-las com a contaminação de aflatoxina.
- Empregar análise estatística para comparar possíveis diferenças nos resultados de análise de umidade, atividade de água e aflatoxina entre os lotes de amendoim blanchado e não blanchado.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### Fluxograma Experimental

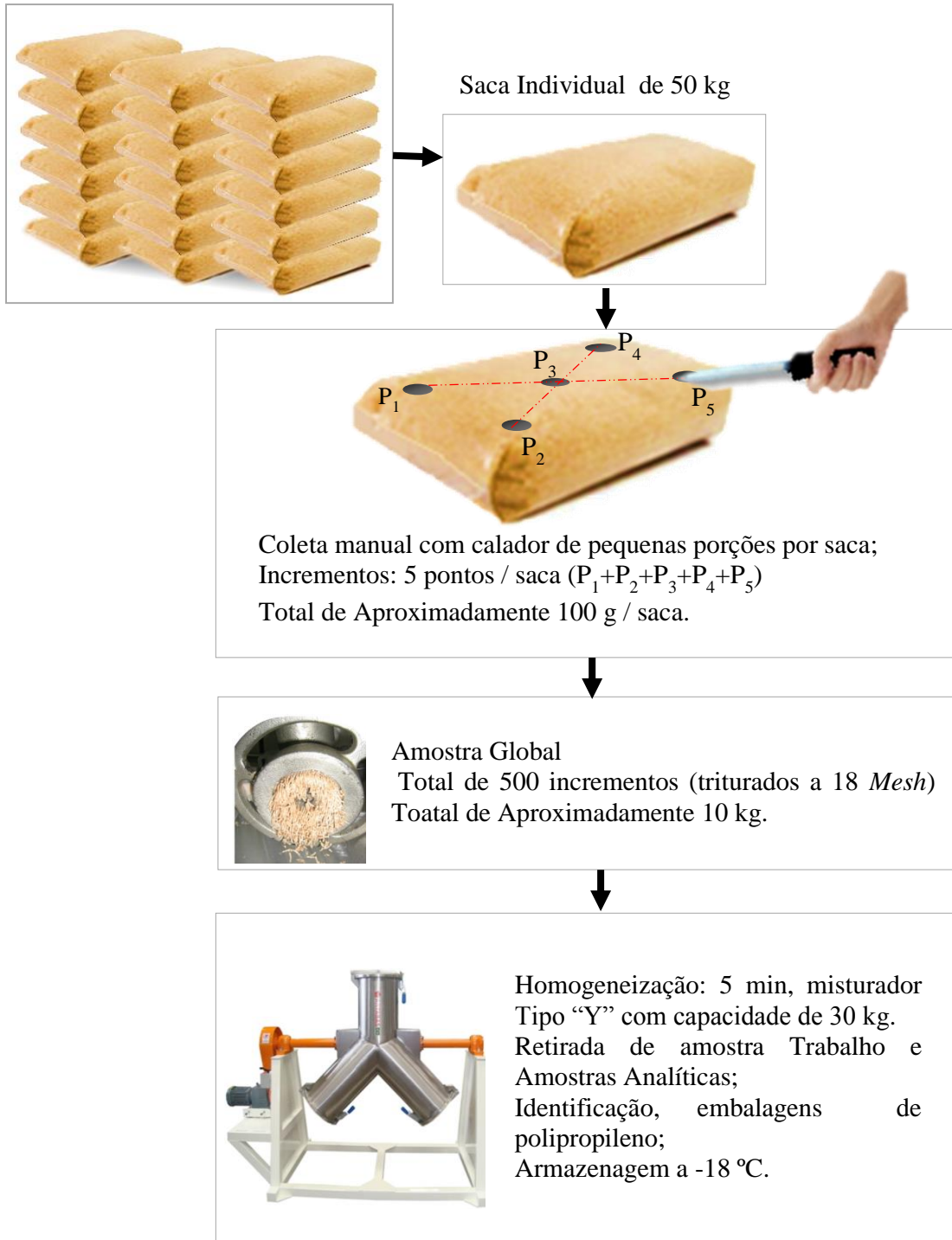
Os fluxogramas abaixo apresentados compilam as metodologias utilizadas no decorrer da pesquisa, sendo a descrição técnica detalhada de etapas redigida no formato de artigo.

**Figura 9.** Fluxograma geral do experimento.



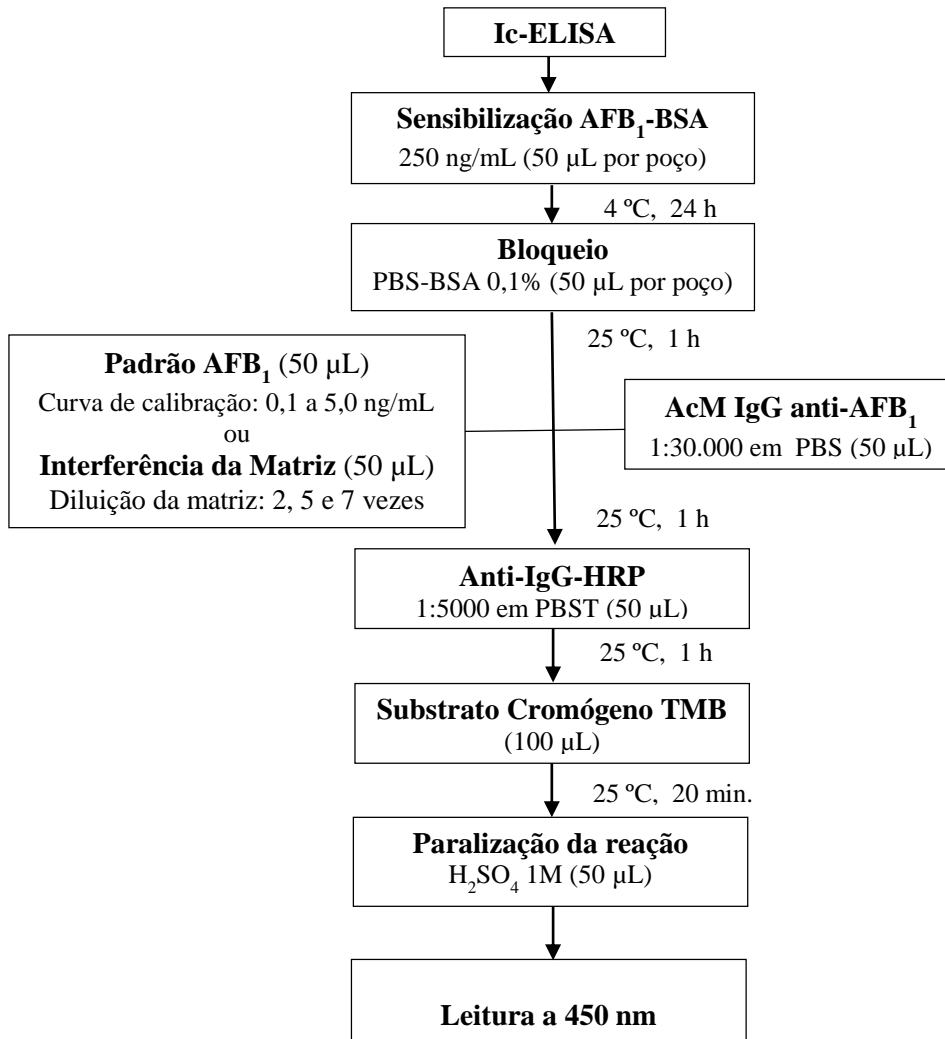
**Figura 10.** Amostragem de amendoim.

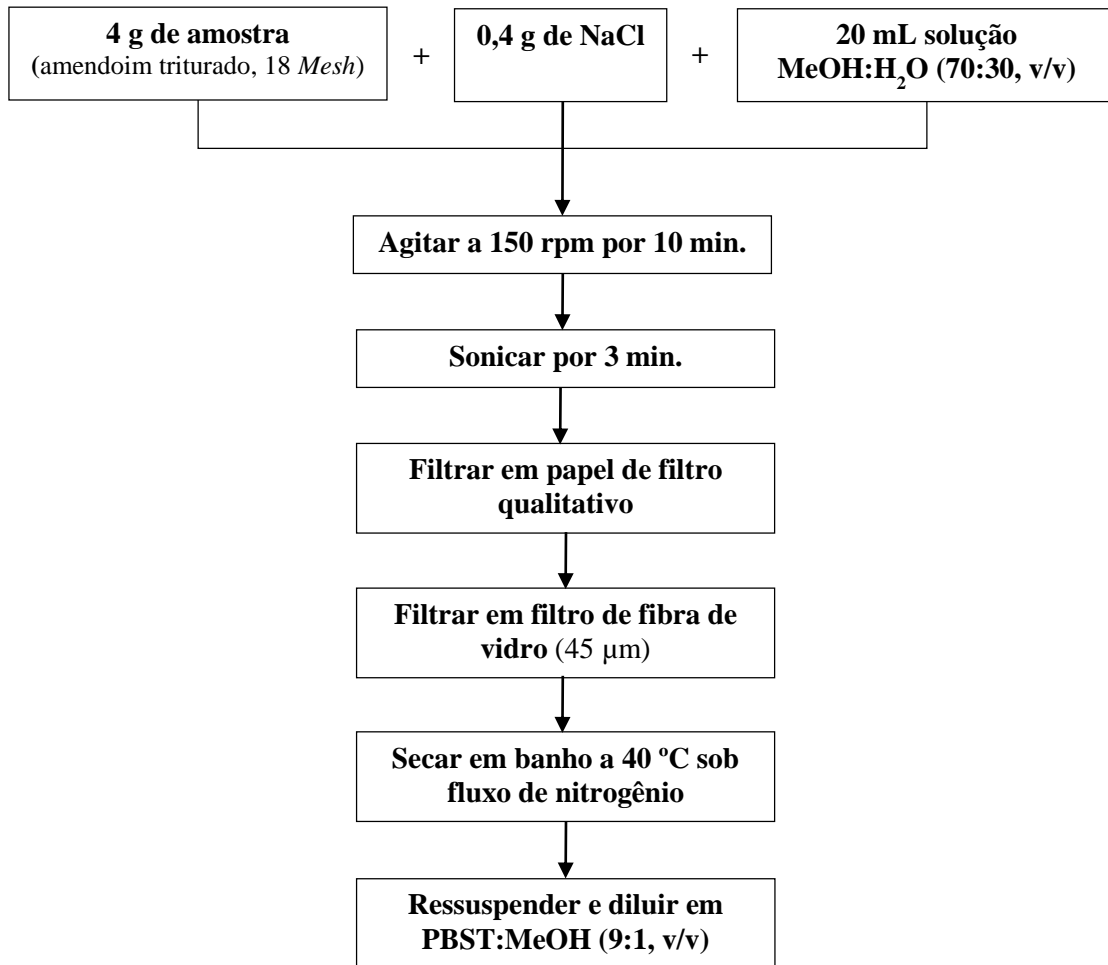
Tamanho de cada lote: 5 Ton (5.000 kg)  
100 sacas de 50 kg de Amendoim Runner IAC 886



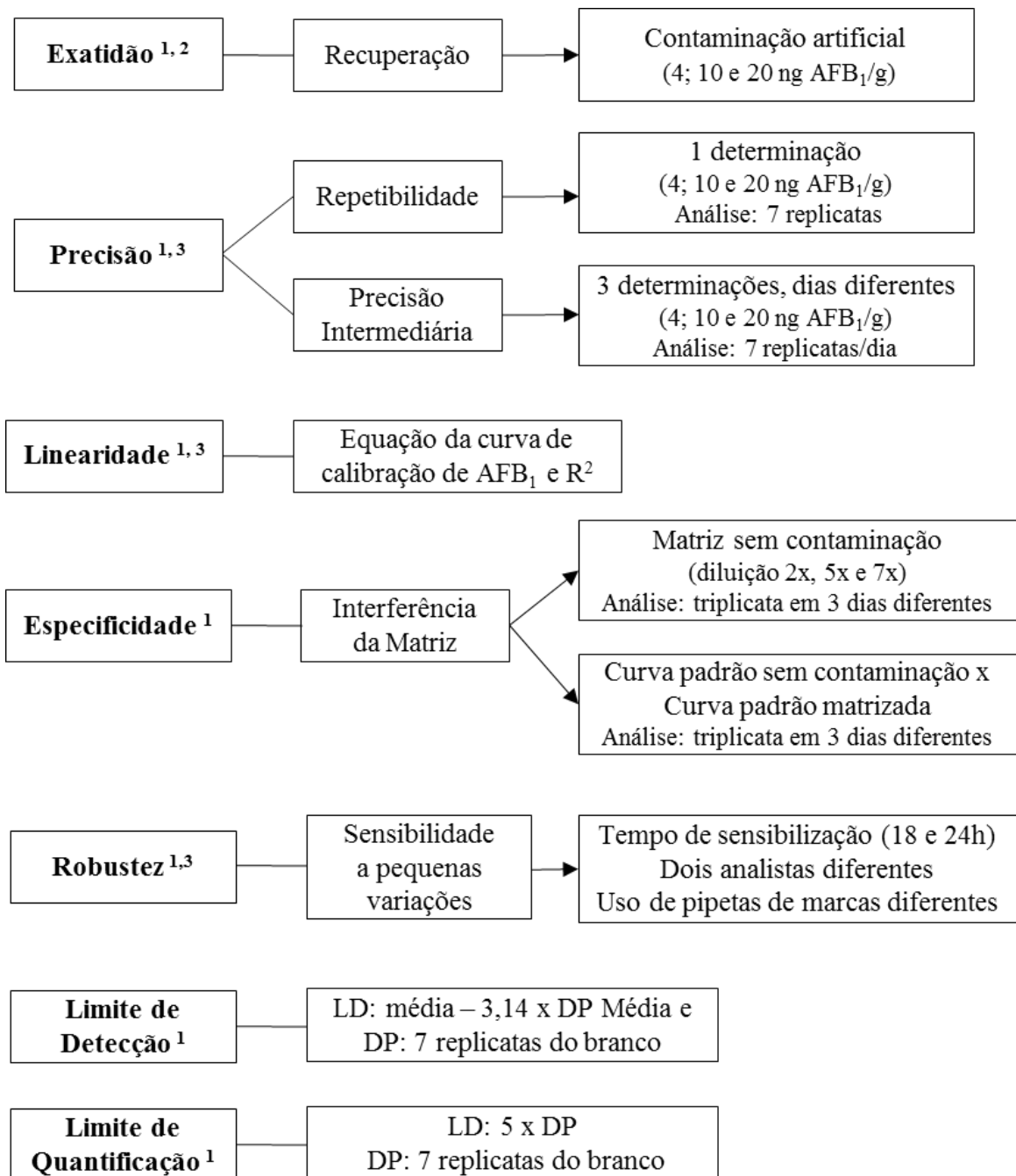
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Figura 11.** Padronização de ic-ELISA: curva de calibração e interferência da matriz.



**Figura 12.** Extração de aflatoxinas do amendoim.

**Figura 13.** Validação intralaboratorial de ic-ELISA para análise de AFB<sub>1</sub> em amendoim. (<sup>1</sup>INMETRO, 2007.; <sup>2</sup>CE n° 401/206 e <sup>3</sup>ANVISA, 2003).



## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão, redigidos em formato de artigo, assim como apêndice, consta conforme listado abaixo:

### **ARTIGO:**

Desenvolvimento de Imunoensaio ic-ELISA para Aflatoxina: aplicação em amendoim da Região Alta Paulista - Estado de São Paulo, Brasil

**ARTIGO**

**Desenvolvimento de Imunoensaio ic-ELISA para Aflatoxina: aplicação em amendoim da  
Região Alta Paulista - Estado de São Paulo, Brasil**

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar amendoim da região Alta-Paulista, São Paulo, quanto à contaminação por aflatoxina B<sub>1</sub>. Imunoensaio enzimático indireto competitivo (ic-ELISA), foi padronizado e validado intralaboratorialmente, utilizando anticorpo monoclonal (AcM) anti-aflatoxina B<sub>1</sub> de hibridoma AF4. Em seguida aplicou-se o ic-ELISA para analisar 60 amostras de lotes de amendoim (42 amostras de amendoim não blanchado e 18 de amendoim blanchado). Cada lote representou cinco toneladas de amendoim da cultivar IAC Runner 886, da safra 2014/15 e 2015/16. As amostras foram analisadas também quanto ao teor de umidade e atividade de água. Os parâmetros de desempenho analítico avaliados para validação de ic-ELISA foram: Extensão, repetibilidade, precisão intermediária, linearidade, especificidade, robustez, limite de detecção e de quantificação. A validação intra-laboratorial apresentou boa linearidade ( $R^2=0,9993$ ), limite de detecção e quantificação de 1,13 ng/g e 3,59 ng/g, respectivamente, com taxas médias de recuperação de AFB<sub>1</sub> de 104,4; 101,7 e 107,0% para as concentrações de 4, 10 e 20 ng/g (CV de 4,9; 7,9 e 0,7%), respectivamente. O ic-ELISA mostrou boa precisão, expressa pela repetibilidade através da precisão intracorrída (CV= 1,87%) e precisão intermediária, através da precisão intercorrída (CV=6,75%). O teor de umidade das amostras variou de 4,03 a 7,89% (média de 6,09 %), sendo que nenhuma amostra ultrapassou o limite máximo permitido (8,0%). A atividade de água apresentou a variação de 0,48 a 0,69. Os resultados revelaram AFB<sub>1</sub> em concentração variando de 1,13 a 29,2 ng/g. No entanto, apenas duas amostras (3,3%) apresentaram níveis de contaminação acima de 20 ng/g, limite máximo estabelecido pela legislação Brasileira, sendo que 48,35% (n= 29) estavam abaixo do limite de quantificação (< 3,59 ng/g). Em relação a legislação da Comunidade Européia, 76% das amostras (n=46) apresentaram nível de contaminação de acordo com o máximo permitido para amendoim a ser submetido a triagem ou outro tratamento físico antes do consumo humano (8 ng/g), sendo que destas, apenas 35 % (n=21) estavam de acordo com os limites para amendoim pronto para consumo humano (2 ng/g). Em suma, este ic-ELISA desenvolvido mostrou ser uma ferramenta de uso fácil para monitoramento rápido na cadeia produtiva de amendoim. Podendo contribuir para a redução de perigo através da detecção e segregação de lotes contaminados.

**Palavras-chave:** amendoim, micotoxina, aflatoxinas, contaminação, imunoensaio.

## ABSTRACT

The objective of this work was to analyze the peanut of the Alta-Paulista region, São Paulo, regarding aflatoxin B<sub>1</sub> contamination. Competitive indirect enzyme immunoassay (ic-ELISA) was standardized and validated in-house using monoclonal antibody (MAb) anti-aflatoxin B<sub>1</sub> from hybridoma AF.4. The ic-ELISA was then applied to analyze 60 samples of peanut batches (42 samples of non-blanched peanut and 18 samples of blanched peanut). Each batch represents five tons of peanut from the cultivar Runner IAC 886, from the 2014/15 and 2015/16 crops. As samples were also analyzed for moisture content and water activity. The analytical performance parameters for ELISA validation were: accuracy, repeatability, intermediate precision, linearity, specificity, robustness, limit of detection and quantification. An intra-laboratory validation showed good linearity ( $R^2 = 0.9999$ ), limit of detection and quantification of 1.13 ng / g and 3.59 ng / g, respectively, with mean AFB<sub>1</sub> recovery of 104.4; 101.7 and 107.0% for the concentrations of 4, 10 and 20 ng / g (CV of 4.9, 7.9 and 0.7%), respectively. The ic-ELISA showed good precision, expressed by the repetition for the intra-assay precision (CV = 1.87%) and intermediate precision, through the inter-assay precision (CV = 6.75%). The moisture content of the samples ranged from 4.03 to 7.89% (mean 6.09%), and it was lower than 8.0% of moisture. Water activity varied from 0.48 to 0.69. The results revealed AFB<sub>1</sub> in concentration ranging from 1.13 to 29.2 ng / g. However, only two samples (3.3%) presented contamination levels above 20 ng / g, the maximum limit established by Brazilian legislation, with 48.35% (n = 29), 59 ng / g). In according to European Community legislation, 76% of the samples (n = 46) presented contamination level within the maximum allowed to be submitted to physical treatment before human consumption (8 ng / g). Only 35% (n = 21) were within maximum limits for human consumption (2 ng / g). In conclusion, this developed ic-ELISA proved to be an easy-to-use tool for rapid monitoring in the peanut production chain. It can contribute to a reduction of danger through the detection and segregation of contaminated lots.

**Key words:** peanut, micotoxin, aflatoxins, contamination, Immunoassay.

## 1. INTRODUÇÃO

A Região Sudeste do Brasil é a maior produtora de amendoim, sendo responsável por 94,8% da produção nacional, cuja safra 2015/16 atingiu o total de 406,1 mil toneladas. O Estado de São Paulo é o maior produtor, responsável por 93% do produção brasileira (USDA, 2016; CONAB, 2016). Salienta-se a região da Alta Paulista no Oeste do Estado entre os municípios de Marília e Tupã, pois a região também é responsável pelo beneficiamento e processamento industrial por varias indústrias alimentícias (SANCHES, 2003; MARTINS e PEREZ, 2006; IEA, 2012).

A aflatoxina constitui um dos maiores problemas associada à cultura de amendoim, capaz de comprometer a qualidade e depreciar o valor comercial. Este metabólito secundário é produzido pelo gênero *Aspergillus* com ênfase a *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, sendo AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, os principais análogos em amendoim (PITT & HPCKING, 2009). A *Agência Internacional de Pesquisa em Câncer* classificou a aflatoxina B<sub>1</sub> no Grupo 1, i. e., carcinogênico a humano (IARC, 2002).

A contaminação por aflatoxinas é rigorosamente controlada no mundo, com limite máximo estabelecido em diferentes *commodities*. O Regulamento (CE) N° 1881 da Comunidade Europeia estabelece o limite máximo de 15 ng/g para aflatoxina total (AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>) e 8 ng/g AFB<sub>1</sub> em amendoim a ser submetido a triagem, ou outro tratamento físico anterior ao consumo humano (EC, 2006). No Brasil, a RDC N° 07 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde estabelece desde mar/2011, o limite máximo de aflatoxinas total em 20 ng/g (BRASIL, 2011).

Método de rastreio rápido, sensível, específico e simples é essencial para controlar aflatoxina de ocorrência comum e de maior repercussão em amendoim. A imunológica se destaca entre os métodos rápidos com sensibilidade atingindo faixa de nanograma (ng) a picograma (pg). A produção de anticorpo monoclonal (AcM) anti-aflatoxina específico permite o desenvolvimento irrestrito de ensaios quantitativos ou semi-quantitativos destinados ao monitoramento, a exemplo de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). A imunológica não requer instrumentação dispendiosa, é capaz de análise simultânea de inúmeras amostras sem exigir extensiva limpeza, tornando-se em método de escolha para aplicação na rotina de diagnóstico rápido (ANKLAN; STROKA; BOENKE, 2002; CALLERI *et al.*, 2007; KRŠKA *et al.*, 2008; LI, ZHANG & ZHANG, 2009; ZHANG, WANG & FANG, 2011; ROSSI *et al.*, 2012).

O ensaio ELISA apresenta alta especificidade, com limite de detecção comparável ou inclusive inferior a métodos cromatográficos (KOLOSOVA *et al.*, 2006). Pesquisas relatam o desenvolvimento de ELISA baseado em anticorpo monoclonal para detecção de aflatoxina em diversas matrizes alimentícias (KOLOSOVA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2009; ROSSI *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; OPLATOWSKA-STACHOWIAK *et al.*, 2016).

Considerando a ocorrência de aflatoxinas em amendoim, o perigo associado e a necessidade de contante monitoramento destas substâncias na cadeia produtiva de forma rápida e eficaz, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, padronizar e validar ensaio ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) baseado em anticorpo monoclonal anti-AFB<sub>1</sub> e aplicá-lo para análise de aflatoxina B<sub>1</sub> em lotes de amendoim provenientes da região da Alta-Paulista, no Oeste do Estado de São Paulo.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Amostragem**

As amostras foram provenientes de 60 lotes de amendoim da variedade Runner IAC 886 (n=42 amendoim Runner comum e n=18 amendoim Runner blanchado) cultivados e beneficiados na safra 2014/15 e 2015/16 e, cedidos por uma indústria processadora de amendoim e derivados do município de Marília-SP. Os lotes foram produzidos em cinco municípios da Região da Alta-Paulista no Estado de São Paulo, Brasil (Iacri, Herculândia, Tupã, Marília e Queiroz). A amostragem foi baseada na Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 274 de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2002). Este plano de amostragem estabelecido para análise de aflatoxina em amendoim foi adaptado, i.e. foi inserido aumento no número de incrementos e frequência de amostragem.

Cada lote com 5 toneladas de amendoim, foi composto por 100 sacas de 50 kg. A coleta de amostra global foi realizada manualmente em todas as 100 sacas com auxílio de calador, durante o descarregamento de lote na indústria processadora. Em cada saca coletou-se cinco incrementos de amendoim em pontos diferentes, através da perfuração nas extremidades e centro das sacas, totalizando aproximadamente 100 g amendoim por saca. A soma dos 500 incrementos constuiu-se em amostra global de 10 kg, sendo esta totalmente triturada em moinho para granulometria de 18 *mesh*, e homogeneizada por 5 min (misturador do tipo “Y” de fabricação própria com capacidade para 30 kg). Após a homogeneização, a amostra de

trabalho de aproximadamente 200 g foi coletada, identificada (lote, origem e data de recepção) acondicionada em embalagem de polipropileno e armazenada à -18 °C até a análise.

### **2.1.1. Umidade**

O teor de umidade das amostras de amendoim foi determinado em triplicata em estufa a 105 °C (MOD NV 1.5, Nevoni<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) até peso constante. O percentual de umidade foi calculado como a diferença entre o peso final e peso original dividido pelo peso original da amostra, e multiplicado por 100 (IAL, 2008).

### **2.1.2. Atividade de Água**

A atividade de água ( $A_w$ ) foi determinada em triplicata com equipamento Aqualab (MOD 4TE, Decagon Devices<sup>®</sup>, Pullman, USA), seguindo especificações descritas pelo fabricante.

### **2.1.3. Extração de aflatoxina**

Uma alíquota de 4 g de amostra de amendoim moído (18 *mesh*) foi adicionada de 0,4 g de NaCl e 20 mL de solução metanol grau HPLC:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v) e agitada a 150 rpm por 10 min. Em seguida foi sonicada por 3 min, posteriormente foi filtrada qualitativamente, e em membrana de vidro de 0.45 µm (Macherey-Nagel, Alemanha). Alíquotas de 500 µL do filtrado foram secas em banho a 40 °C sob fluxo de nitrogênio. No momento da análise os extratos foram ressuspensos em 500 µL de Tampão Fosfato de Sódio-Tween (PBS + 0.05% Tween 20) PBST: Metanol (9:1, v/v) e diluídas no mesmo solvente.

## **2.2. Produção do Anticorpo Monoclonal Anti-AFB<sub>1</sub>**

O hibridoma linhagem AF4 secretor de AcM específico para AFB<sub>1</sub> (isotipo IgG<sub>1</sub> lambda), derivado de mieloma linhagem SP2/0-AG14 e célula esplênica de camundongo BALB/c, foi desenvolvido por Kawamura *et al.* (1988) em *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo* e, mantidas em *Department of Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Japão* e no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Estadual de Londrina. A linhagem celular do hibridoma AF4

foi cultivada em meio RPMI (Gibco Co., USA) com 10 % de Soro Fetal Bovino (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>) foram adaptados em meio *Hybridoma*-SFM (*serum free medium* H-SFM, Gibco Co., USA), adicionado gradualmente 25, 50, 75 e 100% de H-SFM suplementado com 2 mM de glutamina, 5000 U/mL de penicilina e 5000 µg/mL de estreptomicina (HEUSSNER, 2007; TAKABAYASHI YAMASHITA, 2013; KAWAMURA, informação pessoal, *Kagawa University*).

O sobrenadante filtrado contendo AcM anti-AFB<sub>1</sub> foi precipitado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (243g/L) sob agitação lenta até concentração final de 50 % de saturação para precipitação e purificação parcial de IgG. O sobrenadante foi mantido a 4 °C por 16 h sob agitação, posteriormente foi filtrado e o precipitado proteico transferido para tubo limpo e mantido a -80 °C (Kawamura, informação pessoal, *Kagawa University*). Antes da utilização, o concentrado proteico precipitado foi dissolvido em tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,3 (adicionou-se 1-2 mL de PBS para o precipitado oriundo de 500 mL de sobrenadante) e depois dialisado (cut-off de 12000-16000 MM, tamanho 25 mm x 16 mm) empregando-se PBS (4 x 1 L) a 4 °C por 16 h. O AcM anti-AFB<sub>1</sub> foi utilizado para determinação de aflatoxinas por ic-ELISA. Este AcM IgG anti-AFB<sub>1</sub> é caracterizado pela reatividade cruzada com AFB<sub>1</sub> (100%), AFB<sub>2</sub> (2,3%), AFG<sub>1</sub> (3,4 %) e AFG<sub>2</sub> (2,4%), mostrou baixa reatividade cruzada contra AFL<sub>1</sub>, AFL<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>, AFQ<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> e AFB<sub>2a</sub> (KAWAMURA *et al.*, 1988).

### 2.3 Análise de aflatoxinas por ic-ELISA

Aflatoxinas foram determinadas por Ic-ELISA seguindo o protocolo descrito por Kawamura *et al.* (1988) com adaptação. As microplacas de poliestireno (Corning, New York, NY) foram sensibilizadas com 50 µL de AFB<sub>1</sub>-BSA (albumina de soro bovino) (250 ng/mL, em Tampão PBS 0,015 M pH 7,3) e incubadas a 4°C por 18 h. Após 3 lavagens com PBST (PBS + 0,05 % Tween 20), as placas foram bloqueadas com 150 µL de solução de Albumina de Soro Bovino (BSA) Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA) 0,1% em PBS para minimizar ligação não específica e incubadas por 1h a 25 °C. Após 3 lavagens com PBST, adicionou-se 50 µL de padrões de AFB<sub>1</sub> (0,1 – 5,0 ng/mL) ou matriz de amendoim, seguida de 50 µL AcM anti-AFB<sub>1</sub> produzido em H-SFM 1:30000 em PBS (concentração 4,9 x 10<sup>-8</sup>), procedendo reação em triplicata, sendo incubado a 25 °C por 1 h. A placa foi lavada 3 vezes com PBST, adicionada de 50 µL de conjugado anti-IgG de camundongo marcado com *horseradish peroxidase* (HRP) (1: 5.000 em PBST) e incubada a 25 °C por 1 h. Após 6 lavagens com PBST 100 µL da solução de substrato cromógeno TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi adicionado. Após 20

min a 25 °C a reação enzimática foi interrompida com a adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a absorbância lida a 450 nm em leitora de microplaca ELISA (Bio-Tek Instruments ELX800, USA).

A média de absorbância foi calculada a partir de valores individuais obtidos e os resultados expressos em porcentagem de ligação:

$$\% \text{ ligação} = (A^+/A^-) \times 100$$

Onde A<sup>+</sup> corresponde à média de absorbância na presença de amostra ou padrão, enquanto que A<sup>-</sup>, a média da absorbância na ausência de toxina (controle negativo). A concentração de AFB<sub>1</sub> foi determinada pela curva padrão (0,1 a 5 ng/mL de AFB<sub>1</sub>), plotando a porcentagem de ligação contra log da concentração de AFB<sub>1</sub>.

### 3. Validação intralaboratorial de ic-ELISA para quantificação de AFB<sub>1</sub>

A validação intra-laboratorial do método foi baseado nos seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão, especificidade e robustez. A exatidão foi avaliada através da metodologia de recuperação, utilizando três concentrações na faixa linear (4,0; 10,0 e 20,0 ng/g de AFB<sub>1</sub>) para contaminar artificialmente um *pool* de amostras de amendoim, procedendo extração (item 2.1.3) e determinação de aflatoxina (item 2.3) em três repetições em triplicata (INMETRO, 2007; Regulamento (CE) n° 401/2006, 2006). A precisão foi avaliada por repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade, realizada pela precisão intracorrída, foi avaliada através de três concentrações analisada (4,0; 10,0 e 20,0 ng/g de AFB<sub>1</sub>), em sete replicatas no mesmo dia.

A precisão intermediária, realizada pela precisão inter-corrída, avaliada através de três concentrações analisadas (4,0; 10,0 e 20,0 ng/g de AFB<sub>1</sub>), em sete replicatas em três dias diferentes (INMETRO, 2007; ANVISA, 2003). A Linearidade, avaliada pela equação de regressão linear e coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) utilizando cinco pontos da curva de calibração (0,1; 0,2; 0,5; 1,5 e 5,0 ng/mL de AFB<sub>1</sub>) (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). Especificidade, pelo estudo da interferência da matriz sem contaminação, em que foi comparado a % de ligação da matriz (50 µL matriz diluída + 50 µL do AcM 1:30000) em relação a % de ligação do AcM (50µL metanol:PBST (1:9, v/v) + 50µL do AcM 1:30000). As soluções do extrato da matriz foram diluídas 2x, 5x e 7x em metanol:PBST (1:9, v/v). Posteriormente, comparou-se a curva padrão obtida na presença da matriz (0,1; 0,2; 0,5; 1,5 e 5,0 ng/mL de AFB<sub>1</sub>), em que os pontos da curva foram solubilizados no extrato da matriz diluído pelo fator pré-definido, com a curva padrão na ausência da matriz, em que os pontos da

curva foram solubilizados em metanol:PBST (1:9, v/v). Dois métodos comparativos foram usados, de acordo com o INMETRO (2007, sendo a análise de médias pelo teste t (*Student*) e a análise dos desvios entre a curva de referência e a curva matrizada - % de interferência (INMETRO, 2007).

A robustez foi avaliada pela execução de curvas padrão por dois analistas diferentes, variação no tempo de sensibilização da placa (18 e 24h), e uso de pipetas calibradas de marcas diferentes para preparação das soluções de AcM anti-AFB1 e anti-IgG-HRP (INMETRO, 2007; ANVISA, 2003). O Limite de Detecção do método (LD) foi determinado pelo cálculo de 3,143 vezes o desvio padrão do branco da amostra em 7 replicatas (INMETRO, 2007) e o Limite de Quantificação (LQ) foi definido, calculando a média e 5 x desvio padrão dos valores de absorbância do branco padrão, obtidos em 7 replicatas (INMETRO, 2007).

### **3.1.1. Análise Estatística**

Os dados paramétricos gerados na validação do ic-ELISA foram testados quanto à normalidade e avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido do Teste de Tukey, considerando-se o nível de 5% de significância, utilizando o software Statistica v.10 (StatSoft®, USA).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Validação intralaboratorial de ic-ELISA**

A especificidade foi avaliada pela interferência da matriz sem contaminação (Figura 1). A diluição 5 e 7x causaram menor interferência de matriz, com valor médio de 11,6 %  $\pm$  3,50 (CV= 3,32%) e 11,2 %  $\pm$  2,85 (CV= 3,92), respectivamente ( $p > 0,05$ ). Todas as diluições testadas apresentaram coeficiente de variação inferior ao recomendado pela ANVISA (CV=15%, 2003).

A diluição 2x permitiria obter limites de detecção e quantificação inferiores ao obtido, mas comprometeria o resultado pela maior interferência (23,2%  $\pm$  4,76; CV=4,88) e elevado valor de recuperação, com média de 128,3% para amendoim contaminado com 10,0 ng AFB<sub>1</sub>/g; o valor aceitável situa-se entre 70 e 110% (EC 401, 2006). O fato confirma que a interferência de matriz em icELISA pode ser minimizada procedendo diluição do extrato, ou incluindo limpeza adequada anteriormente ao ensaio (ONO *et al.*, 2000; FUJII, 2002). A

diluição 5x consistiu em melhor escolha por ser a menor diluição, e por apresentar boa recuperação (valor médio de 101,7 %) para amostra contaminada com 10,0 ng AFB<sub>1</sub>.

A interferência de matriz é um fator essencial na análise de contaminantes residuais, sendo causada pela composição alimentar bastante complexa. Conseqüentemente, o efeito de interferentes de matriz alimentar tem sido principal causa de reações falso positivas em imunoenensaio, pela possibilidade de interação entre determinados componentes do alimento com o anticorpo. Por exemplo, procedendo ic-ELISA em vinho, a influência de matriz na reação falso positiva poderia ser explicada pela análise de componentes principais, com provável interação de bioativos inatos ao anticorpo específico afetando a resposta. Em contraste, taninos condensados podem inibir a atividade ligante do anticorpo em ensaio ELISA (ISHIKAWA, 2012.; HIROOKA *et al.*, 2015).

A reação falso-positiva em ic-ELISA é notada através de uma visível diminuição na resposta cromógena, sugerindo ligação de interferentes da matriz alimentar, prejudicando ligação adequada entre analito (antígeno) e anticorpo (LEE *et al.*, 2004).

Definida a diluição 5x para minimizar a interferência, desenvolveu-se a curva padrão sem e com amendoim - matrizada (Figura 2). O método de comparação pela análise de desvio entre a curva padrão sem matriz e a curva matrizada - % interferência (INMETRO, 2007) indicou a sobreposição de desvios na maioria de pontos (0,1 ng/mL a 5,0 ng/mL). A similaridade, demonstrada pela análise de médias por teste t (*Student*), comprovou que não houve diferença significativa em nenhum dos pontos da curva ( $p > 0,05$ ).

A linearidade do método foi avaliada pela curva de calibração com padrão de AFB<sub>1</sub> (Figura 3). Elaborando curva de calibração com cinco pontos (0,1 ng/mL a 5,0 ng/mL), obteve equação de regressão linear  $y = -13,24\ln(x) + 52,008$  e  $R^2 = 0,9993$ , confirmando a linearidade com valor superior ao mínimo aceitável pelo INMETRO ( $R^2=0,99$ , 2007) .

O limite de detecção obtido de 0,045 ng/mL (1,13 ng/g) atendeu a legislação brasileira (20 ng/g de AF total para amendoim) (BRASIL, 2011), assim como a legislação da Comunidade Européia (máximo de 2 ng/g de AFB<sub>1</sub> em amendoim processado pronto para consumo e 8 ng/g em amendoim submetido a triagem para tratamento físico anterior ao consumo humano) (EC 401, 2006).

A partir do teste de recuperação de AFB<sub>1</sub> avaliou-se a exatidão do método (Tabela 1). A taxa de recuperação em amendoim artificialmente contaminado com 4,0 ng/g apresentou valor médio de 4,1 ng/g  $\pm$  0,20, com recuperação variando de 97,5 a 108,7% (média de 104,4%); o amendoim contaminado com 10,0 ng/g apresentou valor médio de 10,1 ng/g  $\pm$  0,81 e recuperação de 93,5% a 109 % (média de 101%); com 20,0 ng/g obteve valor médio de

21,5 ng/g  $\pm$  0,16 e recuperação de 106,5% a 108% (média de 107,7%). A três concentrações avaliadas apresentaram taxa de recuperação dentro de valores recomendados pela CE nº 401/2006, sendo entre 70 a 110% (1 e 10  $\mu$ g/kg) e, 80 a 110% (> 10  $\mu$ g/kg).

Li *et al.* (2009) obtiveram a taxa de recuperação de 97,0 a 102,0% sob contaminação artificial com 0,1 a 0,2 ng/g de AFB<sub>1</sub>, ao analisar pasta de amendoim por imunoenensaio, empregando anticorpo monoclonal com reatividade cruzada para AFB<sub>1</sub> (100%), AFB<sub>2</sub> (93,6%), AFG<sub>1</sub> (95,4%) e AFG<sub>2</sub> (65,2%).

A análise de precisão foi conduzida avaliando repetibilidade e precisão intermediária (Tabela 2). A repetibilidade (precisão intracorrída – análise no mesmo dia) apresentou coeficiente de variação <15% preconizado pela ANVISA (2003) para todas as concentrações testadas, sendo 1,22%, 1,91% e 2,50% para 4,0 ng/g, 10,0 ng/g e 20,0 ng/g, respectivamente. Coeficiente variação baixo indicaria pouca variação entre resultados numa mesma corrida, com boa repetibilidade. O mesmo ocorreu com a precisão intermediária (precisão intercorrída - análise em diferentes dias) com valores de 4,38%, 10,58% e 5,28 %.

A avaliação de robustez baseou-se na mudança de operador perante obtenção de curva padrão (CV obtido com cinco concentrações de 0,1 e 5,0 ng/mL em triplicata, sete dias diferentes). O CV de 4% a 13% demonstrou baixa variação perante troca de analista.

O tempo de sensibilização de microplaca com AFB<sub>1</sub>-BSA (18 e 24h) e uso de pipetas de marcas diferentes no preparo de anti-AFB<sub>1</sub> e anti-IgG-HRP obtiveram baixo CV, demonstrados através da repetibilidade, portanto o método apresentou robustez para as três variáveis testadas.

#### **4.2. Teor de Umidade e Atividade de Água (A<sub>w</sub>)**

O teor de umidade é um fator importante a ser monitorado na cadeia produtiva do amendoim, por ser considerado um ponto crítico através da correlação com a produção de aflatoxinas. Os resultados dos teores de umidade das amostras analisadas variaram de 5,30 a 7,89% (média de 6,31%  $\pm$  0,17) em amendoim Runner comum, e entre 4,0 e 7,28% (média de 5,54%  $\pm$  0,82) para as amostras de amendoim Runner Blanqueado. Todas as amostras atenderam ao limite máximo de umidade permitido para amendoim beneficiado sem casca (máx. 8,0%) estabelecido na Resolução RDC n. 274 da ANVISA (BRASIL, 2002).

Outros estudos relataram que o teor máximo de umidade para armazenamento do amendoim sem casca é de 7,0%, se a umidade relativa ambiente for mantida a 70%, com

temperatura entre 25-27 °C, sendo o armazenamento considerado seguro nestas condições pelo período de aproximadamente um ano (ODOGOLA, 1994; WALIYAR *et al.*, 2007; WALIYAR *et al.*, 2008).

Os lotes de amendoim blanchado apresentaram teor médio de umidade de 5,54 %, valor inferior ao teor médio encontrado nos lotes de amendoim comum (6,31%), sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , teste t de *Student*). Os valores médios de umidade inferiores dos lotes blanchados se comparados aos de amendoim comum, podem ser explicados pela temperatura empregada no processo de blanchamento.

O processo de blanchamento consiste na remoção da película do amendoim, através de tratamento térmico. Neste processo o amendoim é colocado em esteiras que se movem lentamente por fornos divididos em zonas de aquecimento, com aumento de temperatura de uma zona para outra. O fluxo de ar sobre esses fornos flui de forma alternada de cima para baixo e a temperatura aumenta gradualmente a cada 30 °C até atingir a faixa de 85-90 °C. O tempo total do tratamento térmico é de aproximadamente 30-45 min.; Após aquecimento o amendoim é resfriado provocando a contração da semente, desta forma a película solta-se, sendo removida mecanicamente (ADELSBERG, SANDERS; 1997; SANDERS, ADELSBERG, HENDRIX, McMICHAEL, 1999; SCHIRACK, DRAKE, SANDERS, SANDEEP, 2006).

Adelsberg e Sanders (1997) analisaram nove protocolos de blanchamento com tempos de aquecimento de 5,0; 7,5 e 10,0 minutos por zona de aquecimento, para um total de seis zonas e tempo total de aquecimento de 30, 45 ou 60 minutos em temperaturas que subiam progressivamente de 32,2 a 98,9 °C, relatando o decréscimo nos teores de umidade do amendoim; Amostras com valores iniciais de umidade de 5,5% em média, variaram entre 4,81 e 2,94% ao final do processo.

Neste estudo os resultados de atividade de água ( $A_w$ ) variou de 0,4848 a 0,6939 (amendoim blanchado) e entre 0,5013 a 0,6998 para amendoim comum, com média de  $0,5855 \pm 0,004$  e  $0,6049 \pm 0,005$ , respectivamente. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o valor médio de  $A_w$  dos lotes de amendoim comum e blanchado.

Zorzete *et al.* (2013) relataram valores de  $A_w$  entre 0,45 a 0,62, ao estudar mensalmente, por um período de seis meses, 35 amostras de amendoim da cultivar Runner 886 e 35 de IAC Caiapó. Os valores médios de  $A_w$  encontrados neste trabalho são superiores aos relatados por Nakai *et al.* (2008), que encontrou valores de  $A_w$  entre 0,44 e 0,65 ao estudar a microflora e a ocorrência de aflatoxinas em 60 amostras de amendoim Runner 886 estocados por um ano, na região de Tupã, estado de São Paulo. Os resultados de  $A_w$  encontrados neste

trabalho (amendoim Runner 886 comum e blanchado), estão dentro da faixa de segurança, quanto à  $A_w$  mínima requerida para o controle do crescimento de fungos *A. flavus* e consequente produção de aflatoxina (0,78 e 0,80-0,82) (LACEY *et al.*, 1991; PITT & HOCKING, 2009).

### 4.3. Aflatoxina

A Figura 4 apresenta a ocorrência de AFB<sub>1</sub> nos lotes de amendoim da safra 2014/15 – 2015/16. Os valores detectados apresentaram variação de 1,13 a 29,2 ng/g (média de 5,77 ng/g). Do total de amostras analisadas (n=60), apenas duas amostras (3,3%) apresentaram contaminação acima do limite de 20 ng/g estabelecido pela legislação Brasileira (BRASIL, 2011). Em relação a legislação da Comunidade Européia, 76% das amostras (n=46) apresentaram nível de contaminação de acordo com o limite máximo permitido para amendoim a ser submetido a triagem ou outro tratamento físico antes do consumo humano (8 ng/g) (EC, 2006).

O nível médio de aflatoxina detectado em amostras de amendoim blanchado (3,31 ng/g) foi inferior ao detectado em amendoim comum (6,83 ng/g), variando na faixa de 1,13 - 12,2 ng/g e 1,13-29,2 ng/g, respectivamente. A média de contaminação entre os dois tipos de amendoim apresentou diferença ( $p < 0,05$ ). A diferença de contaminação por AFB<sub>1</sub> entre amendoim runner blanchado e comum, pode estar associada aos menores teores médios de umidade (5,54%) e de atividade de água (0,5855) detectados nas amostras que passaram pelo processo de blanchamento; indicando que o processo pode ser uma ferramenta útil para prevenir a contaminação de aflatoxinas durante a cadeia produtiva de amendoim.

Os resultados de contaminação por aflatoxina obtidos no trabalho apresentaram-se inferiores aos descritos por Nakai *et al.* (2008); ao analisar 60 amostras de amendoim Runner 886 provenientes região de Tupã por HPLC, os autores observaram contaminação com AFB<sub>1</sub> em 33,3% (20 amostras, 7,0-116 ng/g) e 28,3% com AFB<sub>2</sub> (17 amostras, 3,3 – 45,5 ng/g), sendo que 17 (70,8%) amostras ultrapassaram o limite máximo de 20 µg/kg.

Zorzete *et al.* (2013) relataram valores de contaminação inferiores ao obtido neste estudo ao analisar 20 amostras de amendoim variedade Runner 886 e 20 da variedade Caiapó por HPLC; na variedade Caiapó a AFB<sub>1</sub> foi detectada em 10% das amostras, com níveis médios variando de 0,2 a 0,6 ng/g; na variedade Runner 886 a AFB<sub>1</sub> foi detectada em 20% das amostras com com níveis médios variando de 0,2 a 1,0 ng/g.

Perre *et al.* (2015) relataram a necessidade da adoção da gestão de segurança alimentar aliado ao plano de amostragem por empresas de beneficiamento, além da conscientização de produtores implementando boas práticas agrícolas e manufatura e, conseqüente redução no impacto de exposição e os níveis de contaminação por micotoxinas.

Os resultados quanto à contaminação por aflatoxina encontrado neste trabalho, pode demonstrar a melhora da qualidade do amendoim brasileiro com o passar dos anos, quando comparado ao relatado por Nakai *et al.* (2008) e Zorzete *et al.* (2013).

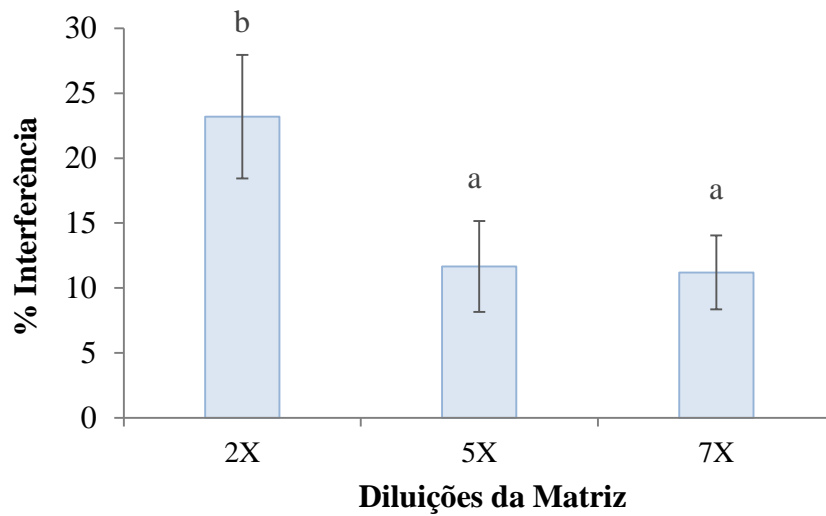
Segundo Gorayeb (2015), no Brasil, as empresas têm investido muito para a melhoria da qualidade do amendoim produzido, além de se comprometerem a adotar o comportamento ético industrial implantando Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), a fim de atender a legislação em vigor, em especial a Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RDC Nº 275/02, de 21.10.2002 e Resolução ANVISA RDC Nº 274/02, de 16.10.2002 (produtos finais) (BRASIL, 2002), em que são determinados os limites máximos permitidos de aflatoxinas, para oferecer alimentos seguros ao consumidor.

Embora apenas duas amostras (3,3 %) ultrapassem o limite de AFB<sub>1</sub> permitido pela legislação brasileira, ressalta-se a necessidade do contínuo monitoramento da cadeia produtiva de amendoim pelo potencial perigo à saúde da população. Além disso, países fornecedores de *commodities* podem perder a oportunidade de exportação, devido a regulamentação rigorosa de micotoxinas em países desenvolvidos importadores, tais como a União Europeia (DOHLMAN, 2003).

## 5. CONCLUSÃO

O ic-ELISA desenvolvido consistiu em método imunoquímico rápido promissor, com diferencial em uso nacional de baixo custo para triagem de AFB<sub>1</sub> em amendoim. A sensibilidade, especificidade, limite de detecção e quantificação são condizentes para aplicação e avaliação de lotes, seja destinados ao mercado interno como externo. A vantagem também consiste no uso de menos solvente orgânico em relação a analítica química, além de análise simultânea de 15 a 24 amostras em triplicata por microplaca.

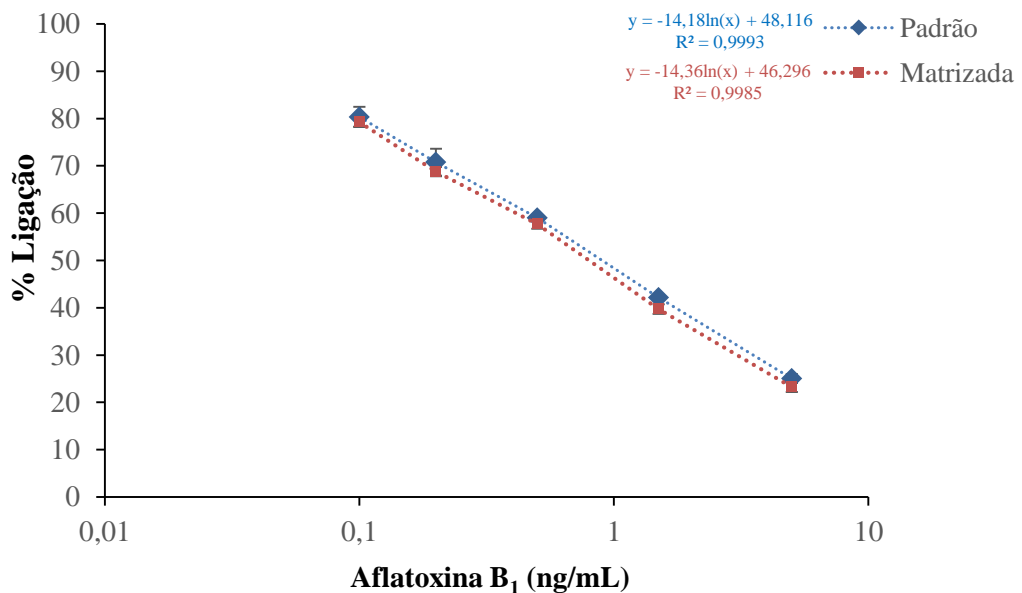
**Figura 1.** Redução da interferência para determinação de AFB<sub>1</sub> por ic-ELISA em amendoim a partir da diluição da matriz.



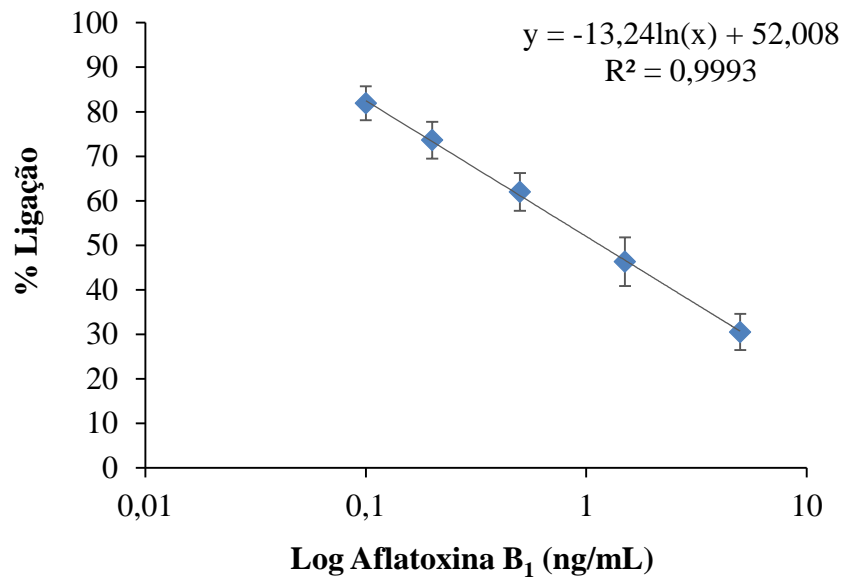
Resultados expressos em média de % de interferência, n=7

<sup>a-b</sup> Diferença significativa (  $p < 0.05$ , one-way-ANOVA).

**Figura 2.** Análise de desvios entre curva padrão e matrizada para determinação de AFB<sub>1</sub> em amendoim.



Quadrados e losangos representam a média de % de ligação de três curvas padrão realizadas em triplicata em dias diferentes. Barras representam o desvio padrão.

**Figura 3.** Curva padrão para detecção de AFB1 por ic-ELISA.

Losangos representam a média de % de ligação de sete curvas padrão realizadas em dias diferentes. Barras representam o desvio padrão.

**Tabela 1.** Recuperação de AFB<sub>1</sub> em amostras de amendoim por ic-ELISA.

AFB <sub>1</sub> adicionada (ng/g)	Média ± DP* (ng/g)	CV (%)	Recuperação (%)	Valores de Referência** (%)
4,0	4,1 ± 0,20	4,9	104,4	70 a 110%
10,0	10,1 ± 0,81	7,9	101,7	
20,0	21,5 ± 0,16	0,7	107,7	80 a 110%

\* Resultados expressos em média ± DP de três repetições analisadas em sete replicatas.

\*\* Segundo Regulamento (CE) n° 401/2006, 2006.

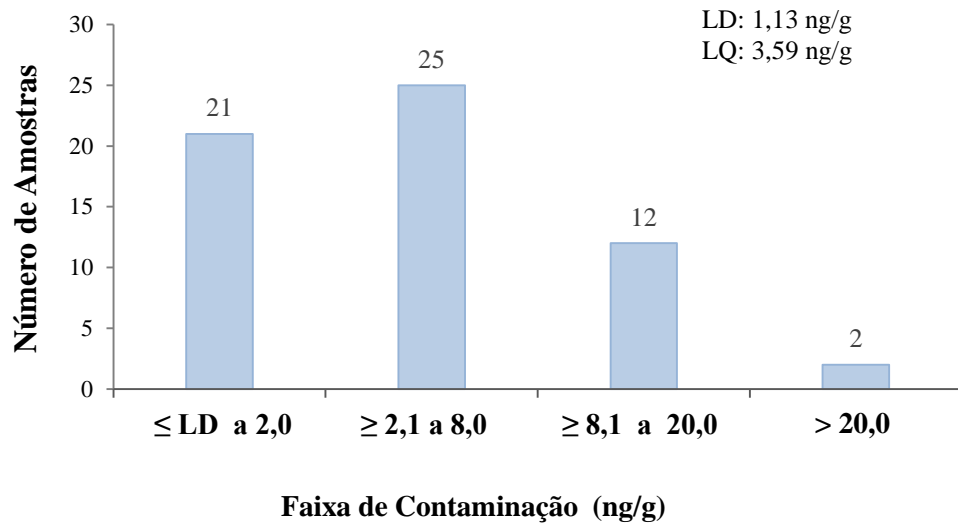
**Tabela 2.** Análise de precisão na determinação de AFB<sub>1</sub> em amendoim por ic-ELISA.

AFB <sub>1</sub> (ng/g)	Repetibilidade <sup>a</sup>		Precisão Intermediária <sup>b</sup>		Valor de referência <sup>c</sup>
	CV (%)	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)
4,0	1,22		4,38		
10,0	1,91	1,87	10,58	6,75	15
20,0	2,50		5,28		

<sup>a</sup> Resultados expressos em coeficiente de variação (CV) de uma repetição analisada em sete replicatas para cada concentração.

<sup>b</sup> Resultados expressos em coeficiente de variação (CV) de três repetições analisadas em sete replicatas para cada concentração em dias diferentes.

<sup>c</sup> Segundo ANVISA, 2003.

**Figura 4.** Ocorrência e faixa de contaminação de aflatoxina B<sub>1</sub> detectada em amostras de lotes de amendoim por ic-ELISA.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELSBERG, G. D.; SANDERS, T. H. Effect of peanut Blanching protocols on bed and seed temperatures, seed moisture, and blanchability. *Peanut Science*, v. 24, p. 46-46, 1997.
- AGUIAR, A. T. E.; GONÇALVES, C.; PATERNIATI, M. E. A. G. Z.; TUCCI, M. L. S.; CASTRO, C. E. F. **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. 7ª ed. Campinas: Instituto Agrônômico. Boletim IAC, nº 200., 452 p. 2014.
- AKIYAMA, H.; GODA, Y.; TANAKA, T.; TOYODA, M. Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using multifunctional column clean-up. **Journal of Chromatography A**, v.932, p.153-157, 2001.
- ANKLAM, E.; STROKA, J.; BOENKE, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v.13, p. 173-183, 2002.
- ASPLIN, F. D.; CARNAGHAN, R. B. A. The toxicity groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. **Veterinary Record**. v. 73, n. 46, p. 1215-1219, 1961.
- BERTHILLER, F.; SULYOK, M.; KRŠKA R.; SCHUHMACHER, R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. No prélogo. **International Journal of Food Microbiology**, 2007.
- BINDER, E. M.; TAN, L. M.; CHIN, L. J.; HANDL, J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.265–282, 2007.
- BLOUNT, W. P. Turkey “X” disease. **Turkeys**, v. 9, n. 2, p. 52-67, 1961.
- BOLONHEZI, D. Colheita e pós-colheita do amendoim. In: SANTOS, R. C. (Ed). **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 247 -251, 2005.
- BOOTE, K. J. Growth stages of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Peanut Science**, n. 9, p. 35–40, 1982.
- BRADBURN, N.; COKER, R. D.; BLUNDEN, G. A comparative study of solvent extraction efficiency and the performance of immunoaffinity and solid phase columns on the determination of aflatoxin B<sub>1</sub>. **Food Chemistry**, v.52, p.179-185, 1995.
- BRASIL. Resolução n.34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 jan.1977. Seção I, pt.I, p.710.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa No 26, 12 de junho de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 de julho de 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002 da ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. **Diário Oficial da União – D.O.U.**, de 16 de outubro de 2002.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 65, 10 de setembro de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de setembro de 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 da ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos Tolerados para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União – D.O.U.**, de 22 de fevereiro de 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de coleta de amostras do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem vegetal / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS,37 p. 2013.

- BULLERMAN, L.B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **Journal Food Protection**, v. 42, n. 1, p. 65-86, 1979.
- CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.
- CALLERI, E.; MARRUBINI, G.; BRUSOTTI, G.; MASSOLINI, G.; CACCIALANZA, G. Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the online solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in aqueous solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 2, p. 396 – 403, 2007.
- CÂMARA, G. M. S. **Introdução à cultura do amendoim**. Piracicaba: Departamento de Agricultura, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 21 p. 1998.
- CÂMARA, G. M. S. Introdução ao agronegócio amendoim. 2014. Disponível em: <<http://www.1pv.esalq.usp.br/1pv506/LPV%20506%20A01%20-%20Amendoim%20Apostila%20Agronegocio.pdf>> Acesso em: 15 de setembro de 2015.
- CARLSON, M. A.; BARGERON, C. B.; BENSON, R. C.; FRASER, A. B.; PHILLIPS, T. E.; VELKY, J. T.; GROOPMAN, J. D.; STRICKLAND, P. T.; KO, H. W. An automated, handheld biosensor for aflatoxin. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 14, p. 841–848, 2000.
- CHIAVARO, E.; DALL’ASTA, C.; GALAVERNA, G.; BIANCARDI, A.; GAMBARELLI, E.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. New reversed-phase liquid chromatography method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. **Journal of Chromatography A**, v.937, p.31-40, 2001.
- CHO, S.-H.; LEE, C.-H.; JANG, M.-R.; SON, Y.-W.; LEE, S.-M.; CHOI, I.-S.; KIM, S.-H.; KIM, D.-B. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. **Food Chemistry**, v.107 p. 1283–1288, 2008.
- CODEX ALIMENTARIUS. Nivel máximo y planes de muestreo para el contenido total de aflatoxinas en el maní (cacahuete) destinado a ulterior elaboración. Codex stan 209, **Codex Alimentarius**, 1999, Rev. 1, 2001, 1-6p.
- COLE, R. J.; HILL, R. A.; BLANKENSHIP, P. D.; SANDERS, T. H.; GARREN, K. H. Influence of irrigation and drought stress on invasion by *Aspergillus flavus* of corn kernels and peanut pods. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 23, p. 229–236, 1982.
- COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; HILL, R. A.; BLANKENSHIP, P. D. Mean geocarpospheretemperatures that induce preharvest aflatoxin contamination of peanuts under drought stress. **Mycopathologia**, v. 91, p. 41–46, 1985.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Série histórica de produção de amendoim**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 17 set. 2015.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Produção total Brasileira de amendoim na safra 2014/2015**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 17 nov. 2015.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). 2016. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. v. 3. Safra 2015/16, n. 5. Quinto levantamento, fevereiro 2016, Brasília, p. 1-182. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 18 de fevereiro de 2016.
- COULOMBE, R.A.JR. Biological Action of Mycotoxins. **Journal of Dairy Science**, v. 76, no. 3, p. 880-891, 1993.
- COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). **Mycotoxins: risk’s in plant, animal and human systems**. Washington, p. 199, 2003.
- DOHLMAN, E. Mycotoxin hazards and regulations: impacts on food and animal feed crop trade. International Trade and Food Safety, Agricultural Economic Report. 828, 2003.

- DORNER, J. W. Management and prevention of in peanuts. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n.2, p.203-208, 2008.
- EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. The toxicology of Aflatoxins; human health, veterinary and agricultural significance. **Academic Press**. 1994.
- EDINBORO, L. E.; KARNES, H. T. Determination of aflatoxins B<sub>1</sub> in sidestream cigarette smoke by immunoaffinity column extration coupled with liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1083, p.127-132, 2005.
- FAGUNDES, M. H. **Sementes de amendoim**: alguns comentários. Outubro de 2002. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 17 set. 2015.
- FAO - Food and Agriculture Organization. **Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn**. FAO Food and Nutrition Paper 55. FAO, Rome, 1993.
- FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **World Regulations for mycotoxins**: a compendium. FAO Food and Nutrition, Rome, v. 64, 1995.
- FONSECA, H. Sampling plan for the analysis of aflatoxin in peanuts and corn: na update. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p.97-105, 2002.
- FREIRE, F. C. O., VIEIRA, I. G. P., GUEDES, M. I. F., MENDES, F. N. P. Micotoxinas: Importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Embrapa Agroindústria**, Fortaleza, out. 2007.
- FREIRE, R. M. M.; DOS SANTOS, R. C.; SILVA, A. C.; LIMA, L. M. P. Propriedades nutricionais e processamento. In: DOS SANTOS, R. C.; FREIRE, R. M. M.; SUASSUNA, T. M. F (Eds). **Amendoim: o produtor pergunta, a Embrapa responde/Brasília, DF; Embrapa Informação Tecnológica**. 2009.
- FREITAS, S. M.; MARTINS, S. S.; NOMI, A. K.; CAMPOS, A. F. Evolução do Mercado brasileiro de amendoim. In: SANTOS, R. C. (Ed). **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, p. 17-44, 2005.
- FRISVAD, J. C.; THRANE, U.; SAMSON, R. A. Mycotoxin producers. In; Food mycology – a multifaceted approach to fungi and food. New York (NY): **CRC Press**. 2007.
- FUJII, S.; GARCIA, L. B.; HIROOKA, E. Y. Metodologia analítica com ênfase na detecção de micotoxinas – ficotoxinas no sistema agroalimentar. Alimentos e Nutrição, **Brazilian Journal of Food and nutrition**, v. 15, n.3, p. 273-284, 2004.
- GATHUMBI, J. K.; USLEBER, E.; MAERTLBAUER, E. Production of ultrasensitive antibodies against aflatoxin B1. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 349–351, 2001.
- GILLIER, P.; SILVESTRE, P. El cacahute o mani. Barcelona: Editorial Blume, 1970. 281 p.
- GLORIA, E. M.; ROMERO, A. C.; CARVALHO, A. P. P.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; GONÇALVES, P. V. M. Perfil da contaminação com aflatoxinas entre embalagens de produtos de amendoim. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 660-665, 2006.
- GODOY, I.J.; MORAES, S.A.; ZANOTTO, M.; SANTOS, R.C. Melhoramento do Amendoim. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 1 ed., Viçosa: U.F.V., vol.1, p. 51-94, 1999.
- GODOY, I. J.; MORAES, S. A.; KASAI, F. S.; MARTINS, A. L. M.; PEREIRA, J. C. V. N. A.; MORAES, A. R. A.; TEIXEIRA, J. P. F. Cultivares IAC de Amendoim. **O agrônomo**, Campinas, n.55, v. 1, p. 26-29, 2003.
- GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **O Biológico**, v. 63, n. 1/2, p. 15-19, 2001.
- GONÇALVES, S. S.; STCHIGEL, A. M.; CANO, J. P.; GODOY-MARTINEZ, P. C.; COLOMBO, A. L.; GUARRO, J. *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section Flavi. **Medical Mycology**, v. 50, p.152-160, 2012.
- GORAYEB, T. C. C. **Aplicação de biofungicidas no controle do fungo *Aspergillus flavus* em amendoim (*Arachis hypogaea*)**. 2015. 200 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de

- Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.
- GORYACHEVA, I. U., SAEGER, S., DELMULLE, B., LOBEAU, M., A. EREMIN, S.A., BARNAVETRÓ, I., VAN PETEGHEM, C. Simultaneous non-instrumental detection of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A using a clean-up tandem immunoassay column. **Analytica Chimica Acta**, v. 590, p. 118–124, 2007.
- GROOPMAN, J.D.; TRUDEL, L.J.; DONAHUE, P.R.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A.; WOGAN, G.N. High-affinity monoclonal antibodies for aflatoxin and their application to solid-phase immunoassays. **Biochemistry**, v.81, p.7728-7731, 1984.
- HEILMANN, K.; GROTH, T. H.; BEHSING, O.; ALBRECHT, W.; SCHOSSIG, M.; LENDLEN, A.; MICHEL, B. The influence of the chemical composition of cell culture material on the growth and antibody production of hybridomas cells. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 291-301, 2005.
- HEFLE, S. L. Immunoassay fundamentals, **Food Technology** v. 49, n. 2, p. 102-107, 1995.
- HIGGS, J. The beneficial role of peanuts in the diet-part 2. **Nutr. Food Science**. v. 33, p. 56-64, 2003.
- HIROOKA, E.Y.; ONO, E.Y.S.; TAKABAYASHI-YAMASHITA, C.R.; ISHIKAWA, A.T.; BARBIN, D.F.; BORDINI, J.G.; HIROZAWA, M.T.; RISSO, W.E.; FELÍCIO, A.L.S.M.; BAGATIN, A.K.; MIGUEL, T.A.; SOUZA, T.M.; TABUCHI, Y.; ROSA, J.L.; MACIEL, L.F.; SILVA, D.L.D.; SOBOTTKA, R.P.; PRANDO, A.M.; GARCIA, S.; ZUCARELI, C.; KURODA, E.K.; HASHIMOTO, E.H.; ANDRADE, D.S.; MIRANDA, M.Z.; MIRANDA, M.S.; BISPO, E.S.; SOARES, A.L.; SHIMOKOMAKI, M.; SABINO, M.; ITANO, E.N.; TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; SUGIURA, Y.; HARADA, K-I.; KAWAMURA, O. In: **Food Production and Industry**, Ed. Eissa, A.A. (Ed.). Safety and quality in agricultural product chain in Brazil. p. 137-165, 2015.
- 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, p. 179-191, 1994.
- HORN, B. W.; PITT, J. I. Yellow mold and aflatoxin. In N. Kokalis-Burelle, D.M. Porter, R. Rodriguez-Kabana, D. H. Smith, & Subrahmanyam (Eds.), Compendium of peanut diseases (p. 44–49). St. Paul. MN, USA: Am. **Phytopathol. Soc.** 1997.
- HORN, B. W.; GREENE, R. L.; SORENSEN, R. B.; BLANKENSHIO, P. D.; DORNER, J. W. Conidial movement of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in peanut fields following application to soil. **Mycopathology**, v. 151, p. 81-92, 2000.
- HORN, B. W. Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section Flavi. **Mycologia**, v. 97, p. 202–217, 2005.
- HORN, B. W.; MOORE, G. G.; CARBONE, I. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. **Mycologia**, v. 101, p. 423–429, 2009.
- HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Review: toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.
- IAL – INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Micotoxinas. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. Ed. São Paulo, 2008, p. 759.
- IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. WHO. World Health Organization. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 56, p. 19-23, 1993.
- IARC, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Stryrene. **International Agency for Research on Cancer** v. 82, p. 171-300, 2002.

- INC – INTERNATIONAL NUT AND DRIED FRUIT COUNCIL FOUNDATION. **Global Statical Review 2015/2016**. Estimated World Peanut Consumption. Spain, 2016. Disponível em : <<http://www.nutfruit.org/wp-continguts/uploads/2016/05/Global-Statistical-Review-2015-2016.pdf>>. Acesso em: 03/03/2017.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE-008 – Orientação sobre validação de métodos e ensaios químicos**. Revisão 02, 2007.
- INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS (IAC). Centro de Grãos e Fibras. **Cultivares-Amendoim**. Disponível em:<<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/graos/amendoim.php>> Acesso em: 15 de fevereiro de 2016.
- INSTITUTO CAMPINEIRO DE ENSINO AGRÍCOLA. **Cultura de amendoim**. Campinas, 1987.
- ISHIKAWA, A. T. Hibridoma OTA.1: **Anticorpo anti-OTA no desenvolvimento da coluna de imunoafinidade e aplicação associada à qualidade e segurança de vinho**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2012.
- JAGER, A. V.; TEDESCO, M. P.; SOUTO, P. C. M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 33, p. 87-92, 2013.
- JAIMEZ, J.; FENTE, C. A.; VAZQUEZ, B. I.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P. Review: Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 1-10, 2000.
- JOÃO, I. S.; LOURENZANI, W. L. **Análise Swot do sistema agroindustrial do amendoim na região de Tupã e Marília-SP**. Organizações Rurais & Agroindustriais, Lavras, v. 13, n. 2, p. 243-256, 2011.
- KABAK, B.; DOBSON, A. D. W.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 593–619, 2006.
- KAWAMURA, O.; NAGAYAMA, S.; SATO, S.; OHTANI, K.; UENO, I.; UENO, Y. A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B<sub>1</sub> in peanut products. **Mycotoxin Research**, v.4, p.75-87, 1988.
- KNAUFT, D. A.; WYNNE, J. C. Peanut breeding and genetics. **Advances in agronomy**, n. 55, p. 393-445, 1995.
- KRISHNA, K. R. Agroecosystems: Soils, climate, crops, nutriente dynamics and Productivity. **CRC Press**. 2013.
- KRSKA, R.; SCHUBERT-ULLRICH, P.; MOLINELLI, A.; SULYOK, M.; MACDONALD, S.; CREWS, C. Mycotoxin analysis: An update. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n.2, p.152-163, 2008.
- LEE, N.A.; WANG, S.; ALLAN, R.D.; KENNEDY, I.R. A rapid aflatoxin B<sub>1</sub> ELISA: Development and Validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.2746-2755, 2004.
- LI, P.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; ZHANG, J.; CHEN, X.; JIANG, J.; XIE, L.; ZHANG, D. Development of a class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut. **Food Chemistry**, v. 115, p. 313-317, 2009.
- LI, P.; ZHANG, Q.; ZHANG, W. Immunoassays for aflatoxins. **Trend in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1115-1126, 2009.
- LIU, B. The effect of yellow–brown and black soil on the germination of the peanut. **Acta Ecologica Sinica**. v. 36, p.200-204, 2016.
- LIU, B.; HSU, Y.; LU, C.; YU, F. Detecting aflatoxin B<sub>1</sub> in foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip. **Food Control**, v. 30, p. 184-189, 2013.

- MARAGOS, C. M.; APPELL, M.; LIPPOLIS, V.; VISCONTI, A.; CATUCCI, L.; PASCALE, M. Use of cyclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n.2, p.164-171, 2008.
- MARTINS, R. Amendoim: produção, exportação e a safra de 2011/2012. Análise e indicadores do Agronegócio, v. 6. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=12242>> Acesso em: 10 de setembro de 2015.
- MARTINS, L. M. **Ocorrência de fungos e aflatoxinas, cinética de degradação de aflatoxinas durante a torração e modelagem probabilística do risco de exposição pelo consumo de amendoim.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas-SP, 2015.
- MARTINS, R.; PEREZ, L. H. **Amendoim: inovação tecnológica e substituição de importações.** Informações Econômicas, São Paulo, v. 36, n. 12, p. 7-19, 2006.
- MASSI, F. P.; VIEIRA, M. L. C.; SARTORI, D.; PENHA, R. E. S.; MUNHOZ, C. F.; FERREIRA, J. M.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; FRISVAD, J. C.; FUNGARO, M. H. P. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonominus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 14-21, 2014.
- McELHINNEY, C.; O'KIELY, P.; ELLIOTT, C.; DANAHER, M. Development and validation of an UHPLC-MS/MS method for the determination of mycotoxins in grass silages. *Food Addit Contam Part A*. **Chem Anal Control Expo Risk**, v. 32, n. 12, p. 2101-2112, 2015.
- MICHEL, P. A. Nova plantarvm genera ivxta Tovernfortii methodvm disposita. Florence, 1729.
- MUSCARELLA, M.; LO MAGRO, S.; PALERMO, C.; CENTONZE, D. Validation according to European Commission Decision 2002/657/EC of a confirmatory method for aflatoxin M1 in milk based on immunoaffinity columns and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 594, p. 257-264, 2007.
- NAGESWARA, R. R. C.; WRIGHT, G. C.; KROSCHE, S. Management practices to minimise pre-harvest aflatoxin contamination in Australia peanuts. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 42, p. 595-605, 2002.
- NAKAI, V. K.; ROCHA, L. O.; GONÇALEZ, E.; FONSECA, H.; ORTEGA, E. M. M.; CORRÊA, B. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. **Food Chemistry**, v. 106, p.285-290, 2008.
- NOGUEIRA, R. J. M. C.; TÁVORA, F. J. A. F. Ecofisiologia do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In: *O agronegócio do Amendoim*. 2ª ed. Embrapa, cap. 3, 2013.
- OGIDO, R. **Efeitos da exposição prolongada de aflatoxina B<sub>1</sub> e fumonisina B<sub>1</sub> em codornas: avaliação de parâmetros de desempenho e qualidade dos ovos.** Pirassununga, 2003. 109 f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2008.
- OLIVEIRA, C. A. F, GERMANO P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista Saúde Pública**, v.31, n.4, p.417-424, 1997.
- OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; JUNQUEIRA, R. G. Comparação das técnicas de cromatografia em camada delgada e ELISA na quantificação de aflatoxinas em amostras de milho. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20 n.3, 2000.
- ONO, E. Y. S.; MENDES, A. M.; MEIRELLES, P. G.; HIROOKA, E. Y.; ONO, M. A. Micotoxinas em alimentos: Progressos na imunodectecção. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.32, p.69-80, 2004.
- ORSI, R.B.; OLIVEIRA, C.A.F; DILKIN, P.; XAVIER, J.G.; DIREITO, G.M; CORRÊA, B. Effects of oral administration of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Chemico-Biological Interactions**, v.170, n. 3, p. 201-208, 2007.

- PERRE, E. V.; JACXSENS, A.; LACHAT, C.; TAHAN, F. E.; MEULENAER, B.; Impact of maximum levels in European legislation on exposure of mycotoxins in dried products: Case of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A in nuts and dried fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 75, p. 112–117, 2015.
- PERREN, R.; ESCHER, F. E. **Impact of roasting on nut quality**. In L. J. Harris (Ed.), Improving the safety and quality of nuts. Philadelphia, PA, USA: Woodhead Publishing, P. 173-197, 2013.
- PIGHINELLI, A. L. M. T. **Extração mecânica de óleos de amendoim e de girassol para produção de biodiesel via catálise básica**. 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2007.
- PILDAIN, M.; FRISVAD, J. C.; VAAMONDE, G.; CABRAL, D.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58, p. 725-735, 2008.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3 ed. New York. Springer. 2009.
- PITT, J. I. Biocontrol of aflatoxins in peanuts. *In: Meeting the mycotoxins menace*. Barug et al. Wageningen Acad. Publ. **The Netherlands**. 1ª Edição, 2004. pg 144.
- PITT, J. I.; TANIWAKI, M. H.; COLE, M. B. Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. **Food Control**, v. 32, p. 205–215, 2013.
- PITTET, A. Modern methods and trends in mycotoxin analysis. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v.96, p. 424-444, 2005.
- POLYCHRONAKI, N.; WILD, C. P.; MYKKÄNEN, H.; AMRA, H.; ABDEL-WAHHAB, M.; SYLLA, A.; DIALLO, M.; EL-NEZAMI, H.; TURNER, P.C. Urinary biomarkers of aflatoxin exposure in young children from Egypt and Guinea. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p.519–526, 2008.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Técnicas analíticas para micotoxinas**. In: IV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, 4-8 outubro, 1988, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 1989. p. 245-247.
- ROMERO, A. C. **Mensuração de Biomarcador de Exposição às Aflatoxinas em fluidos biológicos**. Piracicaba, São Paulo, 2007, 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2007.
- SABINO, M. Micotoxinas em Alimentos. In: OGA, S. (ed.) **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, p. 461-472, 1996.
- SABINO, M.; LAMARDO, L.C.A.; MILANES, T.V.; INOMATA, E.I.; ZORZETTO, M.A.P.; NAVAS, S.A.; GALVÃO, M.S. Twenty years of Aflatoxin contamination in groundnuts and groundnut products in São Paulo State, Brazil. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá. **Resumos...** Guarujá: s.n., p. 151, 2000.
- SANCHES, M. A. R. **Cooperação e competição na indústria de alimentos de amendoim de Marília, SP**. 2003. 325 f. Tese (Doutorado em Administração de Empresas) - Fundação Getúlio Vargas, São Paulo, 2003.
- SANDERS, T. H.; ADELSBERG, G. D.; HENDRIX, K. W.; McMICHAEL, R. W. J. Effect of blanching on peanut shelf-life. **Peanut Science**, v. 26, p. 8–13, 1999.
- SANTOS, J. S. **Aplicação biotecnológica: anticorpo monoclonal anti-desoxinivalenol para monitoramento e avaliação da exposição pelo consumo de trigo (*Triticum aestivum* L.)**. 134 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.
- SHEM-TOV, Y. O. A. V.; BADANI, H.; SEGEV, A.; HEDVAT, I.; GALILI, S.; HOVAV, R. Determination of total polyphenol, flavonoid and anthocyanin contents and antioxidant capacities of seed coats from peanut (*Arachis hypogaea*) lines with different seed coat colors, **J.Food Biochem.** v. 36, p. 301-308, 2012.

- SHI, X.; DAVIS, J. P.; XIA, Z, SANDEEP, K. P.; SANDERS, T. H.; DEAN, L. O. Characterization of peanuts after dry roasting, oil roasting, and blister frying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 520-528, 2017.
- SILVA, A. R. **Avaliação do risco de exposição a aflatoxinas por meio de biomarcadores**. 2011. 44f. Monografia de Especialização em Bioquímica Aplicada – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.
- SOARES, C.; RODRIGUES, P.; PETERSON, S. W.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. *Mycologia*, v. 104, n. 3, p.682-697, 2012.
- SOFIATTI, V.; QUEIROGA, V. P. Colheita e pós colheita. In: SANTOS, R. C.; FREIRE, R. M. M.; SUASSUNA, T. M. F. (Eds). *Amendoim: o produtor pergunta, a Embrapa responde/ Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica*. 2009.
- STEVENS, A. J.; SAUNDERS, C. N.; SPENCE, J. B.; NEWHAM, A. C. Investigation into “disease” of turkey poults. **Veterinary Record**. v. 72, n. 31, p. 627-628, 1960.
- STEYN, P. S. Mycotoxins, excluding aflatoxins, zearalenone and trichotecenes. In: RODRICKS, J.V. et al. **Mycotoxins in human and animal health**. Illinois: Pathotox Publishers, p. 419-467, 1977.
- STROKA, J.; ANKLAM, E. New strategies for the screening and determination of aflatoxin-producing moulds in food and feed. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 90-95, 2002.
- STROKA, J.; ANKLAM, E. Development of a simplified densitometer for the determination of aflatoxins by thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.904, p.263-268, 2000.
- STROKA, J.; VAN OTTERDIJK, R.; ANKLAM, E. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. **Journal of Chromatography A**, v.904, p.251-256, 2000.
- TABARI, M.; KARIM, G.; GHAVAMI, M.; CHAMANI, M. Validation for aflatoxin M<sub>1</sub> determination in yoghurt using immunoaffinity column clean-up prior to high-performance liquid chromatography. **Toxicol Ind Health**, v. 27, n. 7, p.629-635, 2011.
- TAKABAYASHI YAMASHITA, C. R. **Geração de hibridoma e imunoenensaio empregando anticorpos monoclonais para detecção de toxinas naturais**. 2013. 138 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.
- TAVČAR-KALCHER, G.; VRTAČ, K.; PESTEVŠEK, U.; VENGUŠT, A. Validation of the procedure for the determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in animal liver using immunoaffinity columns and liquid chromatography with postcolumn derivatisation and fluorescence detection. **Food Control**, v. 18, p. 333-337, 2007.
- TORRES, A. M.; BARROS, G. G.; PALACIOS, S. A.; CHULZE, S. N.; BATTILANI, P. Review on pre- and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. **Food Research International**, v. 62, p. 11-19, 2014.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Foreign agricultural service: Table 13 peanut area, yield, and production. (2013). Disponível em:<<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx>> Acesso em:28 set 2015.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). 2015. Foreign agricultural service: Production, supply and Distribution online. Disponível em:<<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>> Acesso em:28 set 2015.
- VAN EGMOND, H.P.; SCHOTHORST, R.C.; JONKER, M.A. Review Regulations relating to mycotoxins in food Perspectives in a global and European context. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 1, p. 147-157, 2007.

- VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in mycology**, v .69, p. 57-58, 2011.
- WEIGEL, M. **Avaliação da contaminação por Aflatoxina M<sub>1</sub> em leite cru e leite UHT**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- WHITAKER, T. B; SLATE, A. B; JOHANSON, A. S; Sampling feeds for mycotoxin analysis In: DIAZ, D.E. **The mycotoxin blue book**, Nottingham: Nottingham University Press, 2005. p. 1-21.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) International Programme on Chemical Safety (IPCS) – **Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Geneva, 1993.
- WU, Q.; JEZKOVA, A.; YUAN, Z.; PAVLIKOVA, L.; DOHNAL, V.; KUCA, K. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, v. 41, p. 1-7, 2009.
- XIULAN, S.; XIAOLIAN, Z.; JIAN, T.; XIAOHONG, G.; JUN, Z.; CHU, F. S. Development of na immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in foods. **Food Control**, v. 17, p. 256-262, 2006.
- ZORZETE, P. **Fungos, micotoxinas e fitoalexina em variedades de amendoim do plantio ao armazenamento**. 2010. 188 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- ZORZETE, P.; BAQUIÃO, A. C.; ATAYDE, D. D.; REISA, T. A.; GONÇALVES, E.; CORRÊA, B. Mycobiota, aflatoxins and cyclopiazonic acid in stored peanuts cultivars. **Food Research International**, v. 52, p. 380-386, 2013.
- ZORZETE, P.; REIS, T. A.; FELÍCIO., BAQUIÃO, A. C.; MAKIMOTO, P. Fungi, mycotoxins and phytoalexin in peanuts varieties, during plant growth in the field. **Food Chemistry**, v. 129, p. 957-964, 2013.

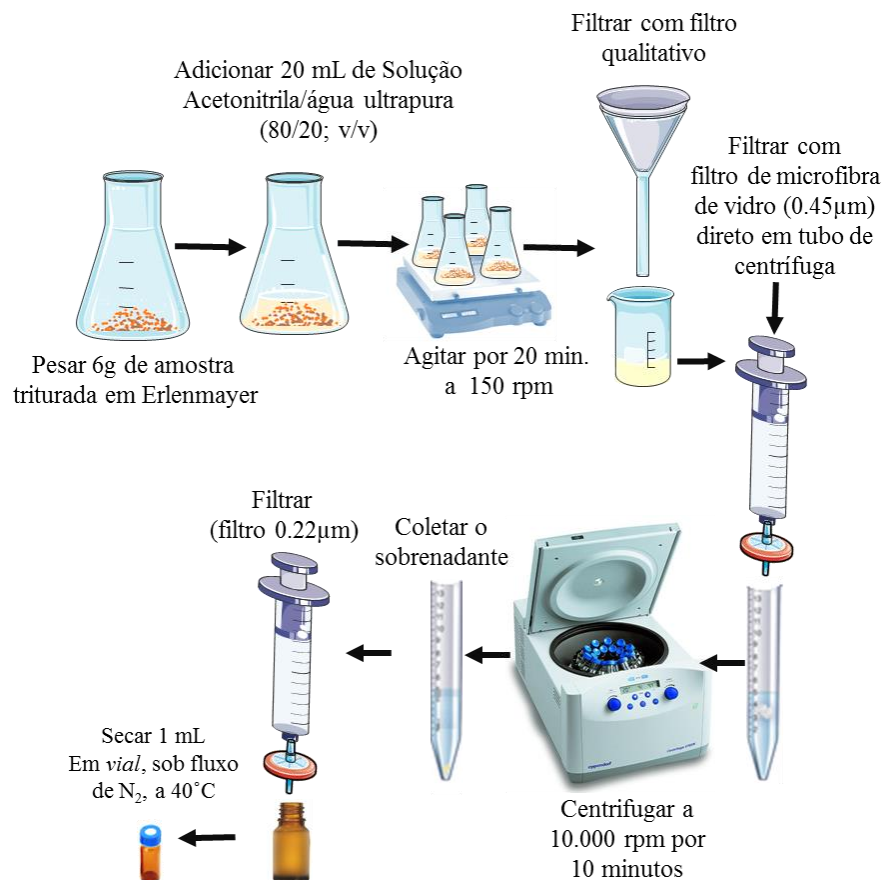
## APÊNDICE

Um sistema Waters ACQUITY UPLC® acoplado a um espectrômetro de massas (Water ACQUIT TQ detector) foi utilizado para a confirmação dos níveis de aflatoxinas em determinadas amostras analisadas por ic-ELISA, com resultado preliminar positivo e negativo. A micotoxina foi determinada conforme metodologia preconizada por Waters (*Application Note*, reportado por KOK et al., 2007). O método de extração foi baseado conforme descrito por Huang *et al.* (2010) e adaptado às condições do nosso Laboratório (Figura 1).

A coluna utilizada foi ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ). A fase móvel consistiu de de água + 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila + 0,1% ácido fórmico (B) sob eluição isocrática, com tempo de corrida de 10 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por *electrospray* positivo empregando os parâmetros a seguir: tensão capilar 4,0 kV, temperatura da fonte a 120 °C, gás de solvatação Nitrogênio, 800L/h, Temperatura a 450 °C.

Os dados obtidos foram processados e analisados empregando software MassLynx™TargetLynx. A figura 2. mostra MRM (Monitoramento de reações múltiplas) e tempo de retenção das 4 aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>).

**Figura 1.** Procedimento de extração das amostras de amendoim para UPLC-MS/MS.



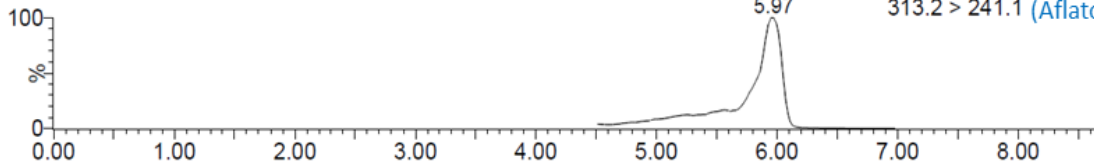
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Fonte de imagens do Banco de dados SERVIER Medical Arts© 2014.

**Figura 2.** Tempo de retenção e separação através de MRM para aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>). (Infusão de soluções padrão na concentração de 10 µg/kg).

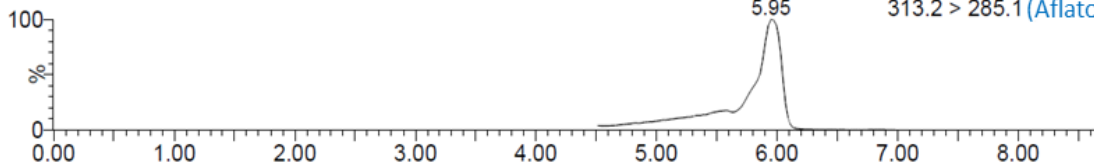
**10ppb**

Pool\_10ppb\_211216 Sm (Mn, 1x3)



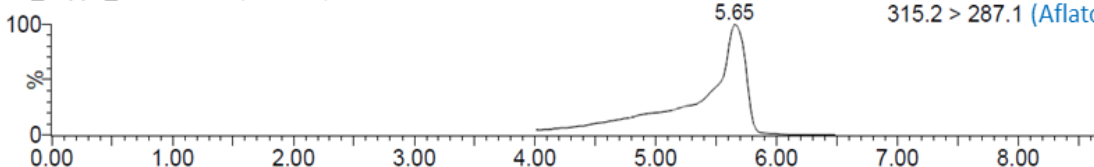
5: MRM of 2 Channels ES+  
313.2 > 241.1 (Aflatoxin B1)  
5.75e4

Pool\_10ppb\_211216 Sm (Mn, 1x3)



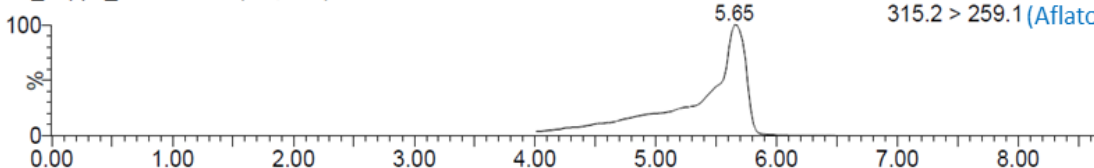
5: MRM of 2 Channels ES+  
313.2 > 285.1 (Aflatoxin B1)  
6.35e4

Pool\_10ppb\_211216 Sm (Mn, 1x3)



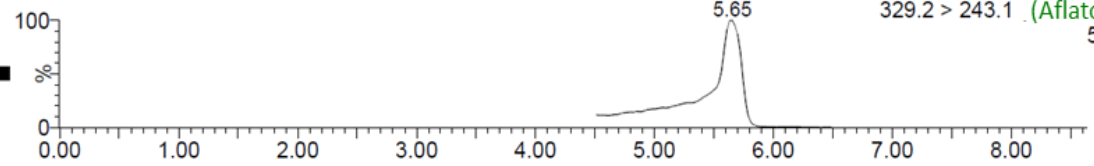
3: MRM of 2 Channels ES+  
315.2 > 287.1 (Aflatoxin B2)  
1.55e5

Pool\_10ppb\_211216 Sm (Mn, 1x3)



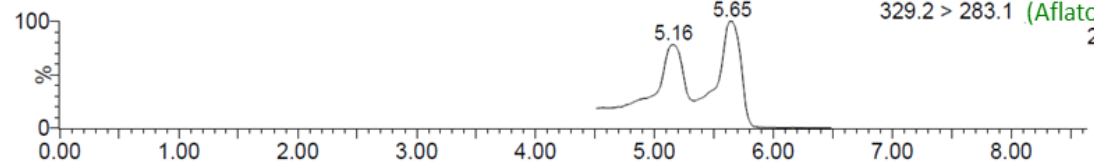
3: MRM of 2 Channels ES+  
315.2 > 259.1 (Aflatoxin B2)  
1.38e5

Pool\_10ppb\_211216 Sm (Mn, 1x3)



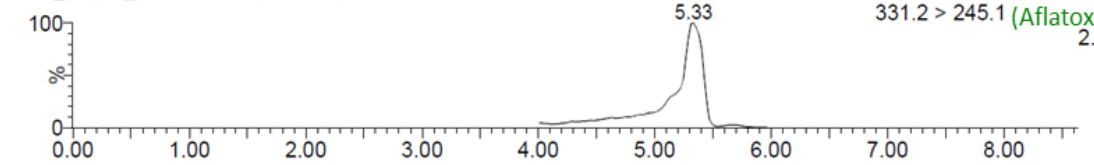
4: MRM of 2 Channels ES+  
329.2 > 243.1 (Aflatoxin G1)  
5.62e4

Pool\_10ppb\_211216 Sm (Mn, 1x3)



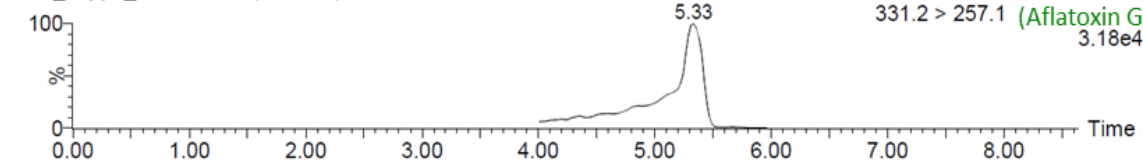
4: MRM of 2 Channels ES+  
329.2 > 283.1 (Aflatoxin G1)  
2.30e4

Pool\_10ppb\_211216 Sm (Mn, 1x3)



2: MRM of 2 Channels ES+  
331.2 > 245.1 (Aflatoxin G2)  
2.08e4

Pool\_10ppb\_211216 Sm (Mn, 1x3)

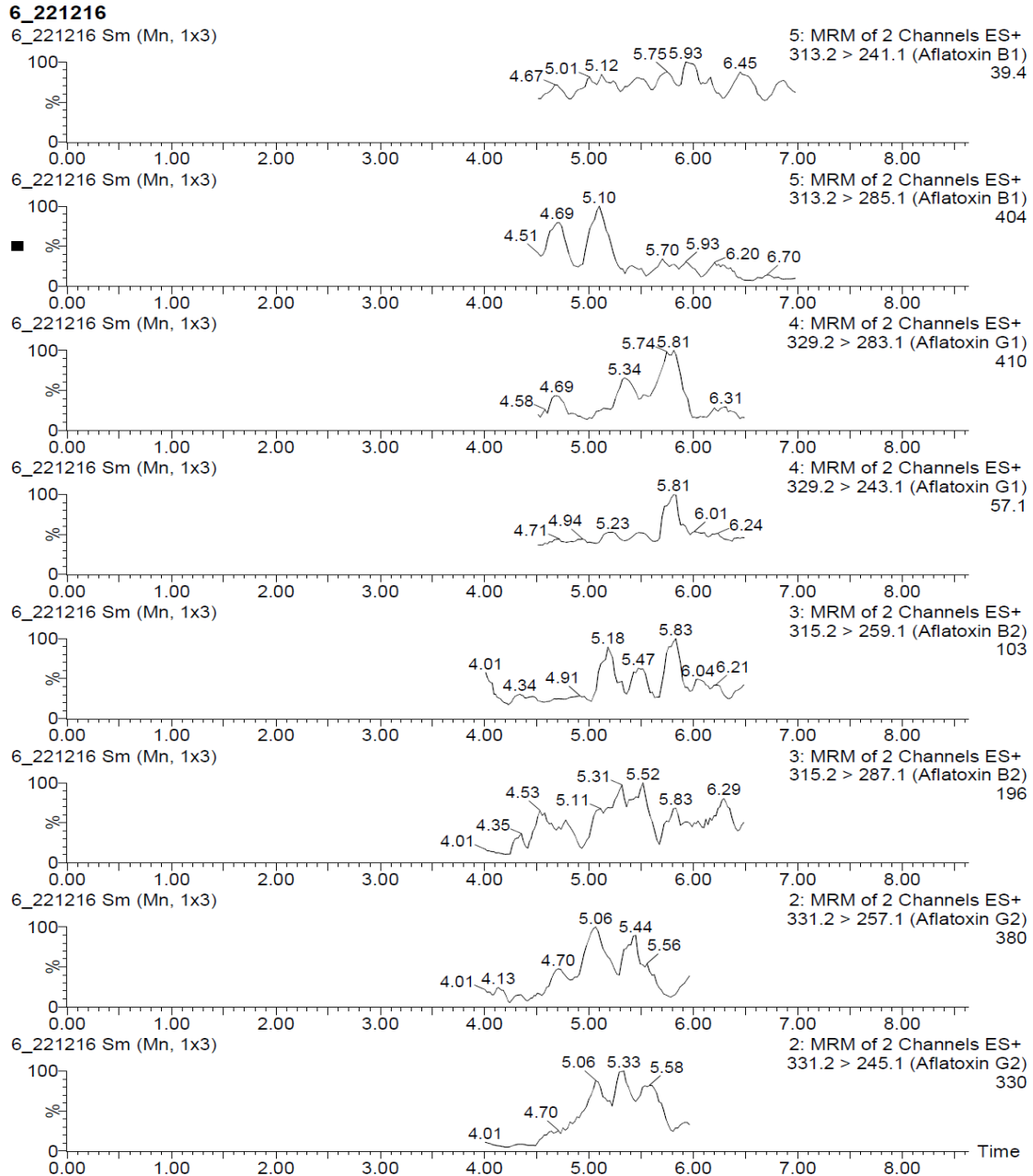


2: MRM of 2 Channels ES+  
331.2 > 257.1 (Aflatoxin G2)  
3.18e4

Time

Um total de 15 amostras previamente analisadas por imunoensaio ic-ELISA foram analisadas por UPLC-MS/MS, conforme a seguir: 02 consideradas ND pelo imunoensaio (<LD ic-ELISA); 13 amostras com contaminação na faixa de 1,13 a 29,2 ng de AFB<sub>1</sub>. A Figura 3 mostra o cromatograma de uma amostra com contaminação abaixo de 1,13 ng/g pelo ic-ELISA e também mostrou-se ausente para as 4 aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) em UPLC-MS/MS. A Figura 4 mostra os cromatogramas de uma amostra com teor médio de 7,22 ng/g por ic-ELISA, sendo a presença de AFB<sub>1</sub> confirmada por UPLC-MS/MS

**Figura 3.** Cromatograma de uma amostra de amendoim considerada como ND para aflatoxinas.



**Figura 4.** Cromatograma de uma amostra de amendoim considerada positiva em ic-ELISA (7,22 µg/g) e confirmada para aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>,G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>) em UPLC-MS/MS.

