



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**



**Centro de Ciências Agrárias
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos**

**AFLATOXINA NA CADEIA PRODUTIVA DE AMENDOIM NO ESTADO
DE SÃO PAULO, PRINCIPAL PRODUTOR NACIONAL**

André Ribeiro da Silva

Londrina/PR

2023

ANDRÉ RIBEIRO DA SILVA

**AFLATOXINA NA CADEIA PRODUTIVA DE AMENDOIM NO ESTADO
DE SÃO PAULO, PRINCIPAL PRODUTOR NACIONAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientador: Dra. Elisa Yoko Hirooka

Co orientador: Dr. Leonardo Fonseca Maciel

Londrina/PR

2023

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

da Silva, André Ribeiro.

AFLATOXINA NA CADEIA PRODUTIVA DE AMENDOIM NO ESTADO DE SÃO PAULO, PRINCIPAL PRODUTOR NACIONAL / André Ribeiro da Silva. - Londrina, 2023.
107 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Coorientador: Leonardo Maciel Fonseca.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2023.

Inclui bibliografia.

1. amendoim - Tese. 2. aflatoxinas - Tese. 3. qualidade microbiológica - Tese. 4. paçocas - Tese. I. Yoko Hirooka, Elisa . II. Maciel Fonseca, Leonardo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 641.1

ANDRÉ RIBEIRO DA SILVA

AFLATOXINA NA CADEIA PRODUTIVA DE AMENDOIM NO ESTADO DE SÃO PAULO, PRINCIPAL PRODUTOR NACIONAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

BANCA AVALIADORA

Orientador: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina – UEL/CCA/DCTA

Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono
Universidade Estadual de Londrina – UEL/CCE/BIOTEC&BIOQ.

Profa. Dra. Alice Yoshiko Tanaka
FATEC “Estudante Rafael Almeida Camarinha” – Fatec Marília

Profa. Dra. Elisabete Hiromi Hashimoto
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR *Campus* Ponta Grossa

Dra. Daiane Dias Lopes
United States Department of Agriculture - USDA
National Center for Agricultural Utilization Research - NCAUR

Suplentes

Dra. Lívia Montanheiro Médice Zanin
SL Alimentos.

Dra. Cássia Reika Takabayashi Yamashita
Universidade Federal do Paraná - UFPR *Campus* Jandaia do Sul

Londrina, 11 de setembro de 2023.

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, atenção e ensinamentos transmitidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Minha gratidão pelo incentivo no âmbito profissional e pessoal;

Ao Dr. Leonardo Maciel Fonseca, pela Co-orientação, sugestões e auxílio no desenvolvimento deste trabalho;

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado;

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

Aos integrantes da banca examinadora, que se disponibilizaram para participar e auxiliar na melhoria deste trabalho;

À empresa Maritucs Alimentos, em especial ao Gerente Industrial, Sr. Marcos da Silva, que prontamente disponibilizou o espaço fabril sempre que solicitado e pelo fornecimento das amostras de lotes de amendoim utilizados neste estudo;

Aos colegas de laboratório, Lívia Montanheiro Médici Zanin, Fernando de Godoi Silva, Tuany Marin Pomini, Cleverson Ferreira Shimizu, Gervásio Hitoshi Saito e Renata Pinheiro Sobottka; à doutoranda Tuany Marin Pomini, pelo auxílio no desenvolvimento dos métodos de análise;

À minha amiga de mestrado e doutorado, Mariana Assis de Queiroz Cancian, pelas conversas e apoio durante todo este período de pós-graduação; uma amizade construída para a vida toda;

Às amigas de mestrado, Thamires da Silva Peixoto e Luma Sarai de Oliveira, que mesmo longe sempre estiveram perto;

Aos meus familiares, às minhas irmãs Lucinéia e Andréa e aos meus irmãos, Samuel, Jadiel e Paulo César, pelo incentivo;

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

Muito obrigado!

SILVA, André Ribeiro da. **Aflatoxina na cadeia produtiva de amendoim no estado de São Paulo, principal produtor nacional**. 2023. 107 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR, 2023.

RESUMO

O Estado de São Paulo é o principal produtor de amendoim no Brasil, responsável por aproximadamente 90% da produção nacional, dos quais 80% são exportados para a Rússia, Holanda, Argélia e alguns países da comunidade europeia. O amendoim é suscetível à contaminação por fungos do gênero *Aspergillus* spp. e às Aflatoxinas (AFs). Estes metabólitos tóxicos são conhecidos por sua ação carcinogênica em seres humanos e animais. Devido aos riscos à saúde, é essencial que toda a cadeia produtiva do amendoim e de seus derivados sejam rigorosamente monitorados para garantia da segurança desses produtos. O objetivo deste trabalho foi realizar um monitoramento de AFs em um total de quatrocentos e sessenta lotes de amendoim *in natura*, ao longo de um período de três safras (2016/17 [$n=80$]; 2017/18 [$n=160$]; 2018/19 [$n=220$]). Além de detectar AFs e avaliar a qualidade microbiológica de cinquenta e duas amostras paçocas produzidas e comercializadas no Estado de São Paulo. A análise microbiológica incluiu a detecção de microrganismos indicadores, tais como coliformes termotolerantes, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, bolores e leveduras e contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios. A confiabilidade da análise rápida de AFs realizada em tempo real usando a coluna de imuno afinidade e fluorimetria (IAC-fluorimetria) foi avaliada comparando os resultados com um ensaio enzimático indireto competitivo validado (ic-ELISA) e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC-FLR). Os resultados mostraram que a correlação de Pearson (r) entre HPLC-FLD e IAC-fluorimetria foi de 0,86, enquanto a correlação entre IAC-fluorimetria e ic-ELISA foi de 0,90. Em relação à presença de AFs, 60% das amostras (277 lotes) apresentaram níveis totais de AFs abaixo do limite máximo estabelecido pela comunidade europeia ($\leq 4,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$). 70 lotes (15,2%) excederam os níveis máximos de aflatoxinas estabelecidos pela legislação brasileira ($20,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Foram analisadas 52 amostras de paçoca, sendo 37 produzidas pelo processo de prensagem a frio e 15 pelo processo cozido, de 27 municípios do estado de São Paulo. A pesquisa utilizou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS/MS) para a detecção AFs, com limites de quantificação (LOQ) estabelecidos em $0,29 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para AFB₁ e AFG₂, $0,36$ e $0,37 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para AFG₁ e AFB₂, respectivamente. As médias de recuperação para as AFs foram de 89,2, 83,5, 80,5 e 82,8% respectivamente para AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂. Os resultados revelaram que as aflatoxinas foram detectadas em 71% das amostras de paçoca, com níveis variando de $0,29$ a $38,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e uma média de $7,06 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Seis amostras (16%) excederam o limite tolerável de aflatoxina total (AFT, $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$) estabelecido pela legislação brasileiras. A AFB₁ foi a de maior incidência, presente em 75% das amostras de paçoca prensada e 60% das amostras de paçoca cozida. As paçocas cozidas apresentaram níveis superiores de umidade e atividade de água,

bem como contagens microbianas mais elevadas, incluindo bactérias aeróbias mesófilas e coliformes termotolerantes. Vinte e uma amostras (56%) apresentaram contaminação por fungos e leveduras variando de 1,0 a 4,25 log UFC.g⁻¹. A contagem total de bactérias mesófilas aeróbias na paçoca cozida (4,85 logs UFC.g⁻¹) foi maior do que na paçoca prensada (2,77 log UFC g⁻¹; p<0,05). Coliformes termotolerantes foram detectados em 7 amostras prensadas, que variaram de 3,6 a > 1100 NMP.g⁻¹; *E. coli* foi confirmada nas mesmas amostras na faixa de 3,0 a 160 NMP. g⁻¹. A detecção de *Salmonella* sp. em duas amostras de paçoca prensada indica a necessidade de melhorias na higiene e no processo de fabricação, bem como a importância de medidas de controle ao longo da cadeia de produção. Embora os níveis de contaminação por aflatoxinas em amendoim e seus derivados tenham apresentado redução, quando comparado às últimas duas décadas, este estudo ressalta a importância de um controle rigoroso no processo de produção de paçocas, para evitar a exposição do consumidor a aflatoxinas e microrganismos patogênicos.

Palavras-chave: amendoim, aflatoxinas, qualidade microbiológica, paçocas.

SILVA, André Ribeiro da. **Aflatoxin in the peanut production chain in the state of São Paulo, the main national producer.** 2023. 107 p. Doctoral Thesis (Doctorate in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR, 2023.

ABSTRACT

The State of São Paulo is the main producer of peanuts in Brazil, responsible for approximately 90% of national production, of which 80% are exported to Russia, the Netherlands, Algeria and some countries in the European community. The peanut crop is susceptible to contamination by fungi of the genus *Aspergillus spp.* and Aflatoxins (AFs), toxic metabolites produced by these fungi and known for their carcinogenic action in humans and animals. Due to these health risks, it is essential that the production, processing and marketing of peanuts and their products are strictly monitored to ensure that levels of AF are within the safety limits established by law. The objective of this work was to monitor the occurrence and incidence of AFs in a total of four hundred and sixty batches of fresh peanuts, over a period of three harvests (2016/17 [n=80]; 2017/18 [n =160]; 2018/19 [n=220]), identify the presence of AFs and evaluate the microbiological quality of fifty-two samples of "paçoca" peanut candy, which were produced and sold in the State of São Paulo. The microbiological analysis included the detection of indicator microorganisms, such as thermotolerant coliforms, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, molds, and yeasts, as well as the total count of aerobic mesophilic microorganisms. The reliability of rapid analysis of FAs performed in real time using the immunoaffinity and fluorimetry column (IAC-fluorimetry) was evaluated by comparing the results with a validated competitive indirect enzyme assay (ic-ELISA) and high-performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-FLR). The results showed that the Pearson's brightness (r) between HPLC-FLD and IAC-fluorimetry was 0.86, while the brightness between IAC-fluorimetry and ic-ELISA was 0.90. Regarding the presence of AFs, 60% of the samples (277 lots) had total levels of AFs below the maximum limit predicted by the European community ($\leq 4.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$). 70 batches (15.2%) exceeded the maximum levels of aflatoxins provided by Brazilian legislation ($20.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$). 52 samples of paçoca were tested, 37 produced by the cold pressing process and 15 by the cooked process, all manufactured and sold in 27 municipalities in the state. The research used High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) to detect AFs, with limits of quantification (LOQ) set at $0.29 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for AFB₁ and AFG₂, $0.36 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for AFG₁ and $0.37 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for AFB₂. The recovery averages for the AFs were 89.2% for AFB₁, 83.5% for AFB₂, 80.5% for AFG₁ and 82.8% for AFG₂. The results revealed that aflatoxins were detected in 71% of the paçoca samples, with levels ranging from 0.29 to $38.8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ and an average of $7.06 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Six samples (16%) exceeded the tolerable limit of total aflatoxin (AFT, $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$) stipulated by Brazilian guidelines. AFB₁ had the highest incidence, present in 75% of the pressed paçoca samples and 60% of the cooked paçoca samples. Cooked paçocas had higher levels of moisture

and water activity, as well as higher microbial counts, including mesophilic aerobic bacteria and thermotolerant coliforms. Twenty-one samples (56%) were contaminated by fungi and yeast ranging from 1.0 to 4.25 log CFU/g. The total count of aerobic mesophilic bacteria in cooked paçoca (4.85 logs CFU/g) was higher than in pressed paçoca (2.77 log CFU/g) ($p < 0.05$). Thermotolerant coliforms were detected in 7 pressed samples, which ranged from 3.6 to > 1100 MPN/g; *E. coli* was confirmed in the same samples in the range of 3.0 to 160 MPN/g. The detection of *Salmonella sp.* in two samples of pressed paçoca indicate the need for improvements in hygiene and in the manufacturing process, as well as the importance of control measures along the production chain. Although the levels of contamination by aflatoxins in peanuts and their derivatives show a reduction, when compared to the last two decades, this study emphasizes the importance of a specific control in the production process of paçocas, to avoid consumer exposure to aflatoxins and pathogenic microorganisms.

Keywords: peanut, aflatoxin, microbial quality, paçoca.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I – Introdução e Estrutura da Tese

Figura 1. Fluxograma geral da tese (Capítulos III e IV)..... 15

Capítulo II – Revisão Bibliográfica

Figura 2. Fases do processo de frutificação do amendoim. 19
Figura 3. Estruturas químicas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2..... 23
Figura 4. Erros envolvidos na quantificação de micotoxinas. 26
Figura 5. Esquema de ELISA competitivo indireto (ic-ELISA). 32
Figura 6. Tipos de paçocas de acordo com processo de fabricação 34
Figura 7. Fluxograma do processo de produção de paçoca prensada 35
Figura 8. Fluxograma do processo de produção de paçoca cozida..... 36

Capítulo III – Aflatoxins in the peanut production chain: Crop monitoring from 2016 to 2019 in the state of São Paulo, Brazil.

Fig 1. Correlation coefficient between IAC-fluorimetry with HPLC-FLD and ic ELISA for aflatoxin determination in naturally contaminated peanut samples.....62
Fig 2. Mean results of water activity (A-I, A-II, A-III) and moisture content (B-I, B-II, B-III) of peanut batches according to crop and type of peanut (*in-nature* and *Blanched* peanuts) 66

Capítulo IV – Aflatoxin and microbial safety in commercial confectionary peanut “paçoca” produced in São Paulo state – Brazil.

Fig 1. Geographic localization of Peanut producing regions and sampling counties, São Paulo state - Brazil.....78
Fig 2. Box plot of the content moisture (A) and water activity (B), in pressed (PP) and cooked ‘paçoca’ (CP) 87
Fig 3. Pearson correlation coefficients for AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, Total aflatoxins, moisture content and water activity in cooked (A) and pressed (B) ‘paçoca’.....88

LISTA DE TABELAS

Capítulo II – Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e derivados no Brasil24

Tabela 2. Amostragem para análise de micotoxina em amendoim.....27

Capítulo III – Aflatoxins in the peanut production chain: Crop monitoring from 2016 to 2019 in the state of São Paulo, Brazil.

Table 1. Aflatoxin analysis in peanut: performance of rapid commercial IAC Fluorimetry versus validated *in-home* ic-ELISA and HPLC-FLD..... 61

Table 2. Distribution of peanut batches based on different contamination thresholds and mean and median levels of total aflatoxins detected by IAC-fluorimetry..... 62

Table 3. Number of peanut batches, that exceeded the maximum limit allowed by Brazilian legislation.....64

Table 4. Mean and standard deviation of the results of moisture, water activity and total aflatoxins of the batches analyzed in the three crops 2016/17, 2017/18 and 2018/19, according to the type of peanut (*in natura* and blanched).....67

Capítulo IV – Aflatoxin and microbial safety in commercial confectionary peanut “paçoca” produced in São Paulo state – Brazil.

Table 1. Intra-laboratory validation of aflatoxin analysis in ‘Paçocas’ by UPLC-MS/MS.....83

Table 2. Occurrence of aflatoxin ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) in total ‘paçocas’ (n=52) sampled in 27 counties of the São Paulo state, Brazil.....84

Table 3. Occurrence of aflatoxin in pressed and cooked ‘paçoca’ produced with peanut of the São Paulo state, Brazil.....85

Table 4. Occurrence and count of Molds and yeasts and Aerobic mesophilic bacteria in pressed ‘paçoca’ (n=37) and cooked (n=15) 89

Table 5. Occurrence and most probable number per gram of Thermotolerant coliforms, *E. coli* and *Salmonella* in pressed (n=37) and cooked (n=15)..... 91

LISTA DE ABREVIATURAS

AFB₁: Aflatoxina B₁

AFB₂: Aflatoxina B₂

AFG₁: Aflatoxina G₁

AFG₂: Aflatoxina G₂

AFs: Aflatoxinas

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists International*

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

DP: Desvio Padrão

EC: *Europe Commission*

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FAO: *Food Agriculture and Organization of the United Nation*

HPLC-FLD: *High Performance Liquid Chromatography with Detector of Fluorescence*

ic-ELISA: *Indirect Competitive Enzyme Linked Immuno Assay*

LMT: Limite Máximo Tolerado

LOD: Limite de Detecção

LOQ: Limite de Quantificação

NMP: Número Mais provável

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
CAPÍTULO I – Introdução e Estrutura da Tese	11
1. <i>Introdução</i>	11
2. <i>Estrutura da tese</i>	14
<i>Referências</i>	16
CAPÍTULO II – Revisão Bibliográfica.....	19
1. <i>Amendoim: Origem, características botânicas e nutricionais</i>	19
1.1. <i>Importância econômica: Produção mundial e Brasileira</i>	20
1.2. <i>Aflatoxinas: Características físico-químicas e toxicidade</i>	21
1.3. <i>Aflatoxinas em amendoim: Ocorrência no Brasil e Legislação</i>	23
1.4. <i>Amostragem do amendoim para análise de aflatoxinas</i>	25
1.5. <i>Métodos de detecção de micotoxinas</i>	28
1.5.1. <i>Métodos cromatográficos</i>	28
1.5.2. <i>Métodos Imunológicos</i>	31
2. <i>Processamento de derivados de amendoim: Paçocas</i>	33
3. <i>Microrganismos Indicadores</i>	37
3.1. <i>Microrganismos aeróbios mesófilos</i>	38
3.2. <i>Bolores e Leveduras</i>	39
3.3. <i>Coliformes Termotolerantes e Escherichia coli</i>	40
3.4. <i>Salmonella</i>	42
<i>Referências</i>	45
CAPÍTULO III: Aflatoxins in the peanut production chain: Crop monitoring from 2016 to 2019 in the state of São Paulo, Brazil.....	53
1. <i>Introdução</i>	55
2. <i>Material and Methods</i>	56
2.1. <i>Reagents</i>	56

2.2. Samples.....	57
2.3. Moisture Content, Activity Water and Determination of Aflatoxins	57
2.4. Analysis by Immunoaffinity chromatography Column-fluorimetry	58
2.5. Ic-ELISA-Indirect Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay	58
2.6. Liquid Chromatography – Fluorescence detector (HPLC-FLD)	59
2.7. Statistical analysis	60
3. Results and Discussion.....	60
3.1. Quality Assurance.....	60
4. Conclusion	68
Referências.	69

CAPÍTULO IV: Aflatoxin and microbial safety in commercial confectionary peanut “paçoca” produced in São Paulo State - Brazil 73

1. Introduction	75
2. Experimental section.....	77
2.1. Materials and Reagents.....	77
2.2. Samples	77
2.3. Determination of water activity and moisture content	79
2.4. Microbiological analysis.....	79
2.5. Aflatoxin analysis.....	80
2.5.1. Extraction and purification	80
2.5.2. Chromatographic conditions.....	80
2.5.2.1. Intra-laboratory validation.....	81
2.6. Data analysis.....	82
3. Results and Discussion	82
3.1. Intra-laboratory validation	82
3.2. Occurrence of aflatoxins in “paçoca”	84
3.3. Water activity and moisture content.....	86
3.4. Microbiological Quality.....	89
3.4.1. Molds and yeasts and Total Count Bacteria	89
3.4.2. Thermotolerant Coliforms, E. coli and Salmonella.....	91
4. Conclusion.....	94
References	95

CAPÍTULO V: Conclusões e Sugestão para Pesquisas 100

1. Conclusões Gerais	100
----------------------------	-----

CAPÍTULO I – Introdução e Estrutura da Tese

1. Introdução

A produção brasileira de amendoim na safra de 2022/23 é estimada em 892,7 mil toneladas, apresentando um aumento de 16,0% em relação a safra anterior. O Estado de São Paulo, o maior produtor, é responsável por mais de 90% da produção nacional (CONAB, 2023; USDA, 2023).

Aproximadamente 70% da produção nacional é exportada; em 2022 as exportações tiveram como destino mais de 90 países, os principais destinos foram: Rússia, Argélia, Holanda, Reino Unido, Espanha, Polônia, Colômbia, Turquia, Ucrânia, África do Sul, Austrália e Emirados Árabes Unidos (IEA, 2023; CONAB; 2023).

O restante da produção abastece o mercado nacional, incluindo várias indústrias alimentícias localizadas no Estado de São Paulo, nas regiões da Alta-Paulista e Alta-Mogiana. A matéria-prima é destinada à fabricação de doces e derivados de amendoim, tais como: amendoins confeitados, drageados, *paçocas*, *pé-de-moleque*, pasta de amendoim, entre outros (CONAB, 2023).

A qualidade do amendoim deve ser monitorada ao longo de toda cadeia produtiva, devido a susceptibilidade de contaminação por aflatoxinas (AFs), um dos principais fatores que causam a depreciação dos grãos. AFs são micotoxinas produzidas pelo metabolismo secundário de fungos do gênero *Aspergillus*, especialmente por *A. flavus*, *A. parasiticus* (TENGEY et al., 2022).

As aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) são as toxinas mais tóxicas entre as naturalmente encontradas em alimentos. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer classificou o AFB₁ no Grupo I, indicando sua natureza carcinogênica para humanos (IARC, 2002). Devido as propriedades mutagênica, imunossupressora, teratogênica e carcinogênica, a contaminação por AFs em produtos alimentícios é estritamente regulamentada e controlada em diversos países, com Limite Máximo Tolerado (LMT) estabelecido em amendoim e em outros alimentos (WU, STACY, KENSLER; 2013).

As diferenças químicas estruturais das AFs estão associadas a sua atividade e toxicidade, sendo a AFB₁ a mais tóxica, seguida da AFG₁, AFB₂ e AFG₂

(JAIMEZ et al., 2000). Neste sentido, alguns países adotam limites distintos: um para AFB₁ e outro para as AFs totais. A União Europeia estabelece o LMT de 15 µg.kg⁻¹ para AFs totais (B₁ + B₂ + G₁ + G₂) e 8 µg/kg para AFB₁ em amendoim destinado à triagem, ou tratamento físico anterior ao consumo humano; enquanto que para outros alimentos, o LMT é de 2 µg.kg⁻¹ de AFB₁ e 4 µg.kg⁻¹ para AFs totais (EUROPEAN UNION, 2006). No Brasil, apenas o LMT de AFs totais é regulamentado, sendo limitado à 20 µg/kg para AFT (B₁ + B₂ + G₁ + G₂) em amendoim e outros alimentos destinados ao consumo humano (BRASIL, 2011).

Desde 2001, as principais indústrias brasileiras de amendoim lançaram o selo “*Pró-amendoim*”, um programa de autorregulação focado na prevenção e monitoramento de AFs na cadeia produtiva do amendoim. O intuito do programa é produção de amendoim e derivados de acordo com os padrões de qualidade nacionais e internacionais (KUJIBDA et al., 2019). O Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), também implantou legislação específica para Estabelecimentos Industrializadores de Amendoins e Derivados contendo diretrizes e a lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação para indústria de amendoins processados e derivados (BRASIL, 2003).

Em 2011, o mesmo órgão ampliou o monitoramento de outras micotoxinas em diversas categorias de alimentos (Resolução RDC n.7 de 18 de fevereiro de 2011, BRASIL, 2011), permanecendo o limite de AFT em 20 µg.kg⁻¹ em amendoim e produtos à base de amendoim. Os esforços para melhorar a qualidade da cadeia produtiva brasileira do amendoim têm refletido positivamente no aumento das exportações para países da União Europeia, cujo o LMT das aflatoxinas são mais rigorosos que no Brasil (CONAB, 2023).

Embora consolidado como país exportador, a contaminação por aflatoxinas em amendoim e derivados no Brasil continua um problema recorrente (CALDAS, SILVA, OLIVEIRA., 2002; GLÓRIA et al., 2006; IHA et al., 2016; LEMOS JÚNIOR et al., 2016) e são escassas as pesquisas sobre a qualidade do amendoim que abastece o mercado nacional, especificamente, ao utilizado como matéria-prima nas indústrias alimentícias.

A paçoca é um exemplo destes derivados, doce típico brasileiro de origem indígena preparado a partir da mistura de amendoim torrado moído, açúcar e sal (LEMOS JÚNIOR et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2018). Algumas formulações

incluem adição de farinha de milho, fécula de mandioca e xarope de glicose. A produção envolve a mistura de amendoim torrado moído e outros ingredientes; prensada em vários formatos, mais comumente quadrado ou de rolha (IHA et al., 2016).

Em termos de processamento tecnológico, a desintegração dos grãos de amendoim através da moagem para fabricação de *paçocas*, promove a maior uniformidade e distribuição das partículas, tornando a contaminação por aflatoxinas mais homogênea e portanto, com maior uniformidade entre as embalagens individuais do produto final. Em contrapartida nos amendoins cobertos, onde a integridade do grãos é mantida, havendo apenas a adição de cobertura aos grãos, tornando a distribuição de contaminação heterogênea (GLORIA et al, 2006).

Mesmo em *paçocas*, onde a possibilidade de distribuição da contaminação é homogênea, caso haja a possibilidade de contaminação do produto após o processamento, durante a estocagem ou a comercialização, a contaminação pode apresentar-se novamente no mercado em embalagens individualizadas; caso haja condições propícias de umidade, atividade de água, pH e temperatura que favoreça o desenvolvimento de fungos aflatoxigênicos (GLORIA et al, 2006).

Além do perigo químico das aflatoxinas, o amendoim e seus derivados podem ser contaminados ao longo de toda a cadeia produtiva com perigos biológicos, incluindo bactérias patogênicas, tais como, *Salmonella*, *Escherichia coli*, bolores e leveduras e outros microrganismos indicadores (CARMINATI et al., 2016). Os microrganismos indicadores podem ser usados para verificar as condições higiênicas na produção de alimentos. A presença de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, bolores e leveduras, contagem total de mesófilos aeróbios em números acima de certos limites é um indicador de má higiene ou possível ocorrência de patógenos (ICMS, 2011).

A Comissão de Especificações Microbiológicas de Alimentos (ICMS, 2011), considera essencial a verificação de *Salmonella* em matérias-primas, ambientes de processamento e produtos finais. Outras enterobactérias também devem ser verificadas (coliformes e *E. coli*) como indicativos de desvios no controle de higiene (ICMSF 2011; CARMINATI et al., 2016). A Anvisa estabelece a obrigatoriedade do monitoramento de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. em produtos derivados de amendoim prontos para consumo, sendo tolerado o máximo de 10

Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama (UFC/g) para *E. coli* e ausência de *Salmonella* sp. em 25 gramas (BRASIL, 2019). A presença e a capacidade de sobrevivência de *Salmonella* sp. em produtos com baixa atividade de água, incluindo confeitos de amendoim e seus derivados têm sido relatada na literatura (NUMMER, SHRESTHA, SMITH., 2012; KATAOKA, ENACHE, BLACK., Black., 2014; NASCIMENTO et al., 2018), bem como a associação desta em surtos (CDC, 2009, 2007).

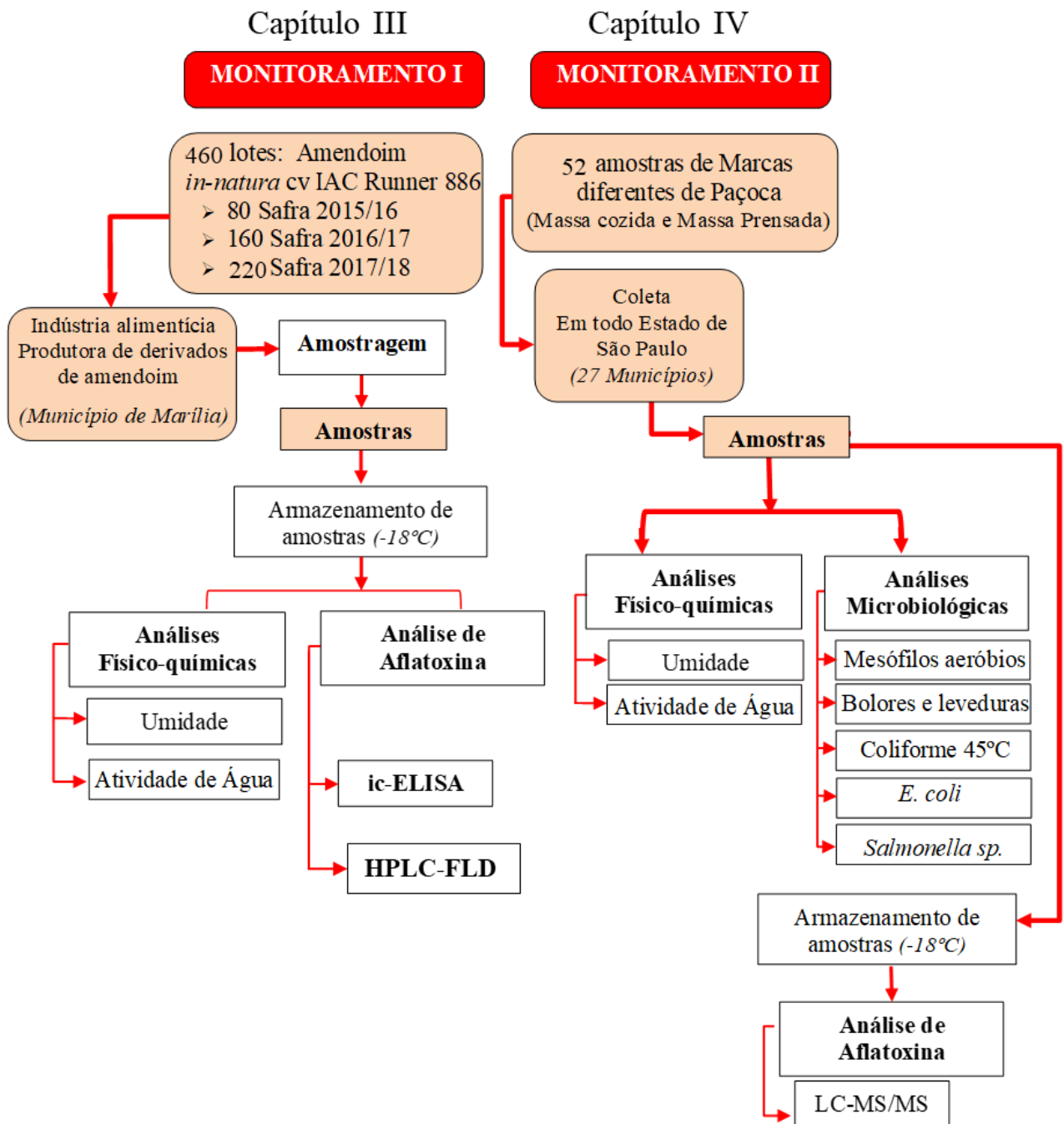
Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi monitorar a ocorrência e incidência de aflatoxinas em quatrocentos e oitenta lotes de amendoim *in-natura* de um triênio de safra (2016/17 [n=80]; 2017/18 [n=160]; 2018/19 [n=220]) utilizados por uma indústria de processamento de doces e confeitos de amendoim localizada na região da Alta Paulista; Identificar a presença de aflatoxinas e avaliar a qualidade microbiológica em relação a presença de microrganismos indicadores (Coliformes termotolerantes, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, bolores e leveduras, contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios) em cinquenta e duas (n=52) amostras de doce de amendoim do tipo *paçoca*, produzidas entre Julho de 2018 a Agosto de 2019 e comercializados no Estado de São Paulo.

2. Estrutura da tese

A tese foi estruturada de forma que os capítulos possam ser lidos independentemente uns dos outros, embora alguns conceitos fundamentais estejam interconectados e referenciados. O conteúdo desta tese está organizado em cinco capítulos. O capítulo I tem caráter introdutório acerca do conteúdo estudado e apresenta os objetivos e a estrutura da tese. O capítulo II apresenta uma revisão bibliográfica, contextualizando o tema e a cadeia produtiva do amendoim e sobre microrganismos indicadores.

Os capítulos III e IV, representam os artigos desenvolvidos na tese. O capítulo III, apresenta o artigo de monitoramento de aflatoxinas em um triênio de safra de amendoim *in-natura*; O Capítulo IV, apresenta o artigo do monitoramento de aflatoxinas e qualidade microbiológica de amostras de paçocas, conforme demonstra a figura 1 abaixo, que ilustra fluxograma experimental de ambos artigos. O capítulo V apresenta as conclusões gerais, bem como sugestões para trabalhos futuros.

Figura 1. Fluxograma geral da tese (Capítulos III e IV).



Referências

BRASIL. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, 22 fev. 2011. Seção 1, p.72-73.

BRASIL. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1.

BRASIL. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Instrução Normativa Nº60 de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, 26 dez. 2019. Seção 1.

BRASIL. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário oficial**. Seção 1. Nº 46. 2011

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health. **Rev. Saúde Pública**. v. 36, n. 3, 2002.

CARMINATI, J. A.; AMORIM NETO, D. P.; MORISHITA, K. N.; TAKANO, L. V.; BERNARDI, A. O.; COPETTI, M. V.; NASCIMENTO, M. E. Microbiological contamination in peanut confectionery processing plants. **J. Appl. Microbiol.** v. 121, p.1071–1078, 2016.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2007). **Multistate outbreak of *Salmonella* serotype Tennessee infections associated with peanut butter – United States, 2006–2007**. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report, 56, 521–524.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2009). **Multistate outbreak of *Salmonella* infections associated with peanut butter and peanut butter-containing products – United States, 2008–2009**. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report, 58, 85–90.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento Acompanhamento da safra brasileira de Grãos: Safra 2022/23, n. 9 – **Nono levantamento**, p. 1-16, junho 2023. (2023). Disponível em:< <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 08 jul. 2023.

EUROPEAN UNION. Commission Regulation (EC) nº 401/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L 364, Mar. 9 2006b. 23p.

GLÓRIA, E. M.; ROMERO, A. C.; CARVALHO, A. P. P.; DOMINGUES, M. A. C.; GONÇALVES, P. V. M. Afloxin contamination profile among packages of peanut candies. **Food Sci. Technol.** v. 26, n. 3, 2006.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Aflatoxins. Chemical agents and Related Occupations. **A review of Human Carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, p. 225–248, 2002.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Food. **Microorganisms in foods 8 – Use of data for assessing process control and product acceptance**. New York: Springer, 2011.

IHA, M. H.; OKADA, I. A.; BRIGANTI, R. C.; MINI, C. A.; TRUCKSESS, M. W. Aflatoxins in Brazilian Peanut Confection, **Journal of AOAC international**. v. 99, n. 3, p. 830–834, 2016.

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.

KATAOKA, A. I.; ENACHE, E.; BLACK, D. G. Survival of *Salmonella* Tennessee, *Salmonella* Typhimurium DT104, and Enterococcus faecium in peanut paste formulations at two different levels of water activity and fat. **J Food Prot.** v. 77, p. 1252–1259, 2014.

KUJIBIDA, P.; MAIA, P. P.; ARAÚJO, A. N.; MENDES, L. D.; OLIVEIRA, M. L.; SILVA-ROCHA, W. P.; BRITO, G. Q.; CHAVES, G. M.; Martins, I. Risk assessment of the occurrence of aflatoxin and fungi in peanuts and cashew nuts. **Braz. J. Pharm. Sci.**, p. 1–10, 2019.

LEMOS JÚNIRO, W. J. F.; TROMBETE, F. M.; REIS, L. P. A.; DIREITO, G. M.; RANDOW, A. V.; SALDANHA, T. Aflatoxins intake from peanut candy marketed in Rio de Janeiro city, Brazil. **Int. Food Res. Journal**. v. 23, n. 2, p. 733-738, 2016.

NASCIMENTO, M. S.; CARMINATI, J. A.; MORISHITA, K. N.; AMORIM NETO, D. P.; PINHEIRO, H. P.; MAIA, R. P. Long-term kinetics of *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 survival on peanuts and peanut confectionery products. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, 2018.

NUMMER, B. A.; SHRESTHA, S.; SMITH, J. V. Survival of *Salmonella* in a high sugar, low water- activity, peanut butter flavored candy fondant. **Food Control**, v. 27, p. 184–187, 2012.

TENGEY, T. K.; KANKAM, F.; NDELA, D. N.; FREMPONG, D.; APPAW, W. O.22). Growth and Toxicogenicity of *A. flavus* on Resistant and Susceptible Peanut Genotypes. **Toxins**. v.14, n. 8, 2022.

USDA. United States Department of Agriculture. World agricultural production. 2023. (USDA. Foreign agricultural service. **Circular series, WAP 6-23**, June2023). Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 07 jul. de 2023.

WU, F.; STACY, S. L.; KENSLER, T. W. Global Risk Assessment of Aflatoxins in Maize, and Peanuts: Are Regulatory Standards Adequately Protective? **Toxicological sciences**, v. 135, n. 1, p. 251–259, 2013.

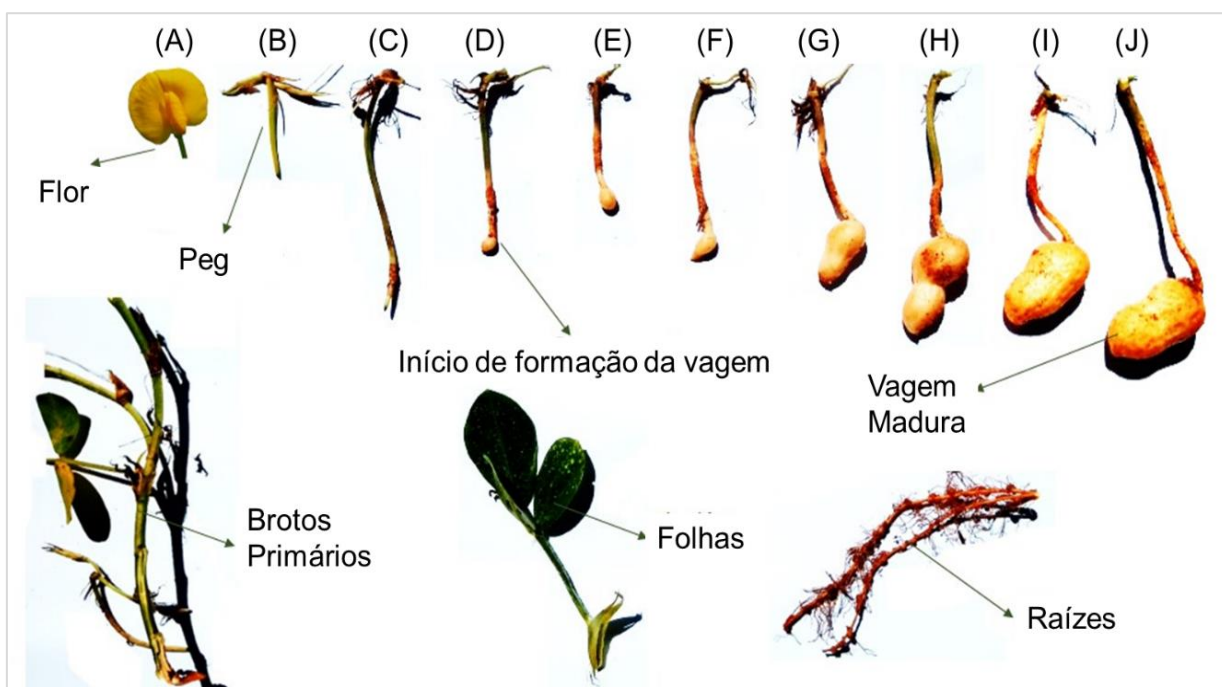
CAPÍTULO II – Revisão Bibliográfica

1. Amendoim: Origem, características botânicas e nutricionais

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma leguminosa oleaginosa pertencente à família *Fabaceae*, originária da América do Sul, nas regiões entre o sul da Bolívia - norte da Argentina (KRISHNA, 2013; MARTINS, 2015). A difusão da cultura ocorreu inicialmente através de povos indígenas na América Latina e México, seguiu para a Europa no século XVIII, difundindo-se do Brasil para África, sendo hoje cultivado em diversos países em todo mundo (USDA, 2020).

A planta possui uma parte aérea arbustiva, composta por ramificações, raiz aprumada, folhas trifoliadas e pequenas flores amarelas (Figura 2) com processo peculiar de frutificação denominado de geotropismo positivo, processo no qual as flores aéreas (A) após fecundação dos ginóforos, formam uma estrutura alongada e pontiaguda denominada *peg* (B, C) que se projeta e penetra no solo, cujo espessamento da extremidade (D, E, F, G, H, I) resulta no desenvolvimento de fruto subterrâneo sob a forma de vagens (J) (NOGUEIRA, TÁVORA; 2013; TORRES et al., 2014).

Figura 2. Fases do processo de frutificação do amendoim.



Fonte: Autor (2023).

Nutricionalmente, o amendoim apresenta alto valor energético, fornecendo aproximadamente 596 calorias a cada 100 gramas, composto por aproximadamente 25-30% de proteína, 20% de carboidratos, 5% de fibras, cinzas e 50% de lipídeos. Aproximadamente de 80 a 90% do óleo de amendoim é composto de gordura saturadas, monoinsaturadas e polinsaturadas, na forma de três ácidos graxos primários; palmítico, oleico e linoleico, respectivamente. A composição do óleo tende a variar, sendo de 30 a 60% de oleico (ômega 9); 2 a 43% de linoleico (ômega 6), dependendo do genótipo, maturidade das sementes e condições ambientais como época do ano de plantio, variação sazonal e condições do solo (MARTINS, 2015).

A semente é uma fonte de vitaminas do complexo B, tais como, tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido fólico (B9), vitamina E, minerais incluindo magnésio, potássio, fósforo, além de compostos bioativos, tais como polifenóis e ácidos fenólicos (caféico, ferúlico, *p*-cumárico, cumárico), estilbenos (*trans*-resveratrol), flavonóides (quercetina, biochanina A, daidzeína, genisteína), entre outros. Estes compostos fitoquímicos possuem propriedades anti-inflamatórias e capacidade antioxidante capazes de prevenir doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade (LIN et al., 2016; CAMARGO et al, 2017; GUO et al., 2020).

O amendoim destaca-se por seu valor nutricional, facilidade de processamento e sabor agradável aceito por grande parte dos consumidores. Sendo a maior parte da produção convertida em produtos de valor agregado a exemplo de manteiga de amendoim, doces, confeitos drageados e vários *snacks*, gerando empregos diretos e indiretos ao longo de toda a cadeia produtiva (SHI et al, 2017). O consumo per capita de amendoim no Brasil é da ordem de 1,1 quilo por ano, bem inferior ao da China (12,8), ao dos EUA (6,7) e à média mundial (6,0) (MIRANDA, 2021).

1.1. Importância econômica: Produção mundial e Brasileira

O amendoim é a terceira maior cultura oleaginosa cultivada em diversas regiões de clima tropical e temperada do mundo, estando atrás apenas da soja e girassol (USDA, 2023). A produção anual mundial na safra 2022/23 está estimada em

50,78 milhões de toneladas, sendo os principais produtores a China (18,6 milhões ton.), seguido da Índia (6,60 milhões ton.), Nigéria (4,30 milhões ton.), Estados Unidos (2,82 milhões ton.) e Sudão (2,50 milhões ton.) (USDA, 2023).

O Brasil é o terceiro maior produtor de amendoim do continente americano, atrás dos Estados Unidos e Argentina (USDA, 2023). O país colhe duas grandes safras por ano, a primeira é responsável por 80% da produção nacional, a segunda é menos produtiva pela ausência de chuva na época da colheita (junho e julho), anteriormente denominada de “safra da seca” (CONAB, 2020). A produção da safra de 2021/22 foi de 746,7 mil toneladas. A estimativa da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), é que a safra de 2022/23 apresente um aumento de 16% em relação à safra anterior. O Estado de São Paulo é o maior produtor, responsável sozinho por 90% da produção nacional (CONAB, 2023, USDA, 2023).

Grande parte da produção é destinada à exportação e cerca de 30% da produção é consumido internamente pelas indústrias de doces e confeitos, na região da Alta Paulista e Alta Mogiana, no estado de São Paulo (CONAB, 2023). Entretanto, a cultura de amendoim é altamente suscetível a contaminação por fungos produtores de micotoxinas. As aflatoxinas podem contaminar as vagens e sementes nas fases iniciais de desenvolvimento, ainda no campo, devido o contato com fungos e esporos fúngicos presentes no solo. E ainda, no decorrer das fases de beneficiamento (pós-colheita, debulha, secagem, armazenamento), sendo este o maior problema na cadeia produtiva de amendoim, responsável pela perda de qualidade e depreciação comercial do grão (PITT e HOCKING, 2009; HERTWIG et al., 2020).

1.2. Aflatoxinas: Características físico-químicas e toxicidade

As aflatoxinas (AFs) são metabólitos tóxicos secundários produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* spp., especificamente *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*; Considerada uma das classes de micotoxinas mais regulamentada e estudada, esteve associada com a síndrome epidemiológica denominada de “*Turkey X Disease*” na década de 60, devido a mortandade de 400.000 perus na Inglaterra,

provocada pelo consumo de ração de farelo de amendoim contaminados com aflatoxinas importados da África e Brasil (STEVENS *et al.*, 1960; SPENSLEY, 1963; BLOUNT, 1961; BULLERMAN, 1979).

A. parasiticus produz aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) e aflatoxina G₂ (AFG₂), enquanto *A. flavus* produz principalmente AFB₁ e AFB₂. No entanto, também foram identificados isolados de *A. flavus* que produzem AFG₁ e AFG₂ (MOORE *et al.*, 2018). Quando concentrações totais de aflatoxinas são mensuradas, refere-se à soma dessas quatro aflatoxinas, sendo AFB₁ a mais frequentemente encontrada em amostras contaminadas (FAO/OMS, 2018).

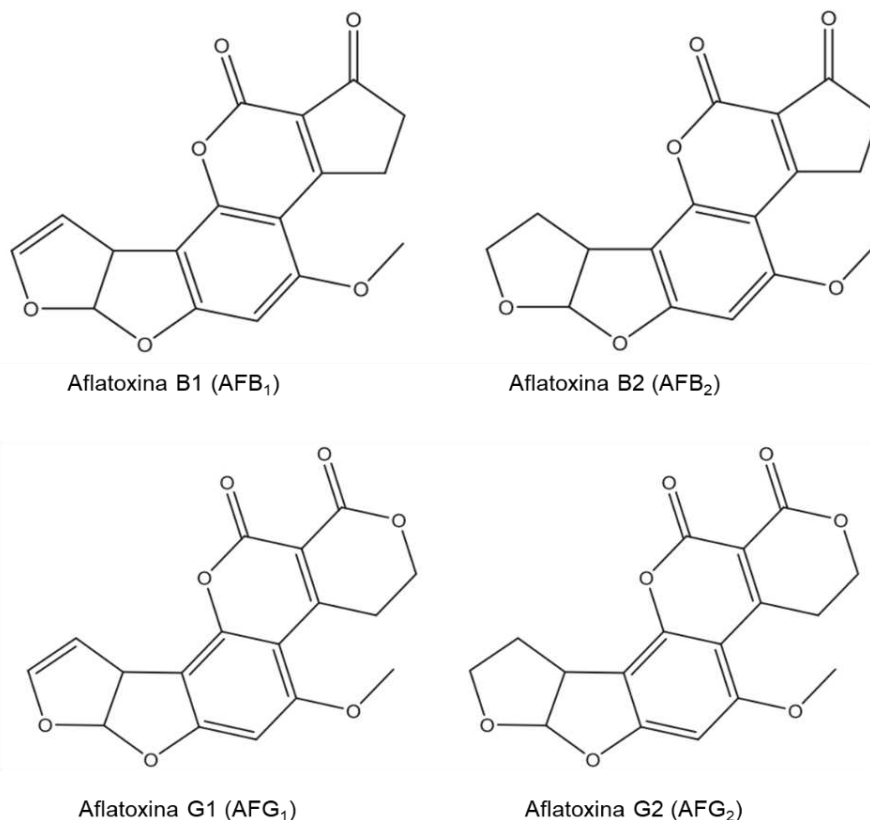
Quimicamente são definidas como bisfurano-cumarinas derivadas de decacetídeo sintetizadas pela via das policetidas, que fluorescem sob luz ultravioleta, dependendo da cor que fluorescem são divididas em AFs B₁ e B₂ (fluorescência em azul) e G₁ e G₂ (fluorescência em verde) (Figura 3), sendo estas os principais análogos encontrados em amendoim e derivados (RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010; PITT e HOCKING, 2009).

As aflatoxinas M₁ e M₂ são metabólitos hidroxilados derivados do metabolismo da biotransformação da AFB₁ e AFB₂, respectivamente, que são excretadas principalmente no leite e urina de mamíferos expostos a ingestão de alimento contaminado; outros metabólitos da AFB₁ são aflatoxicol e aflatoxina Q₁ (CAST, 2003). As AFs apresentam elevada toxicidade, com propriedades mutagênica, imunossupressora, teratogênica e carcinogênica para humanos (IARC, 2002). São moléculas de baixa massa molecular, não imunogênicas, incolores e inodoras, não alteram o sabor dos alimentos e são extremamente estáveis em altas temperaturas, com ponto de fusão, superando 200 °C (IARC, 2002).

As diferenças químicas estruturais das aflatoxinas estão associadas a sua atividade e toxicidade, sendo a AFB₁ a mais tóxica, classificada no Grupo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa para o Câncer (IARC), como carcinógeno ao homem, seguida da G₁, B₂ e G₂ (IARC, 2002). A toxicidade depende 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, cólon e sistema nervoso (BINDER *et al.*, 2007; ROMERO, 2007).

Figura 3. Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.



Fonte: EFSA (2017).

1.3. Aflatoxinas em amendoim: Ocorrência no Brasil e Legislação

O processo característico de frutificação do amendoim expõe as vagens ao contato com esporos e fungos aflatoxigênicos, uma que vez que, o solo é o reservatório primário de *A. flavus* e *A. parasiticus*, tornando-se a principal via de infecção direta ainda no campo (KORANI *et al.*, 2017). Desta forma, o desenvolvimento dos fungos aflatoxigênicos e a consequente produção de aflatoxinas pode ocorrer em várias etapas da cadeia produtiva do amendoim (colheita, secagem,

armazenamento, transporte), tornando necessárias adoção de medidas preventivas para a redução da probabilidade de ocorrência de aflatoxinas (TENGEY et al., 2022).

Vários estudos têm reportado a ocorrência de aflatoxinas em amendoim e seus derivados no Brasil desde a década de oitenta, indicando a constante necessidade de monitoramento dos níveis destes contaminantes, conforme demonstra a Tabela 1.

Tabela 1.

Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e derivados no Brasil.

Tipo de amostra	Quantidade de amostras	Ocorrência (%)	Faixa de contaminação ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Referências
Amendoim	241	128 (53,1 %)	n.d. - 1282	Scussel e Amaya., 1985
Paçocas	316	205 (64,95 %)	4,0 - 195	Freitas e Badaloto, 1992
Amendoim	35	11 (27,0 %)		
Derivados	45	30 (67,0%)	43 - 1789	Freitas e Brigido., 1998
Amendoim	60	20 (33,3 %)	7,0 – 45,5	Nakai et al., 2008.
Derivados	240	106 (44,2 %)	0,5 – 103,8	Oliveira et al. 2009.
Paçoca	100	71 (71,0 %)	0,3 – 41,8	Iha et al., 2016.

Devido a necessidade de constante monitoramento de aflatoxinas, Anvisa incluiu a obrigatoriedade de monitoramento de outras categorias de alimentos passíveis de apresentar contaminação por aflatoxina, além do monitoramento de outras micotoxinas. A Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº7 de 18/03/ 2011, revogou a RDC nº274 de 15 de Outubro de 2002, que estabelecia o limite máximo tolerado de aflatoxinas totais em milho, amendoim e derivados, incluiu na legislação outras categorias de alimento anteriormente não regulamentados, tais como, alimentos para lactentes e fórmulas infantis, frutas desidratadas, cacau e chocolate, especiarias, dentre outros. A RDC nº 7 manteve o mesmo Limite Máximo Tolerado (LMT) de aflatoxina total para amendoim e derivados em 20 $\mu\text{g/kg}$ (BRASIL, 2011).

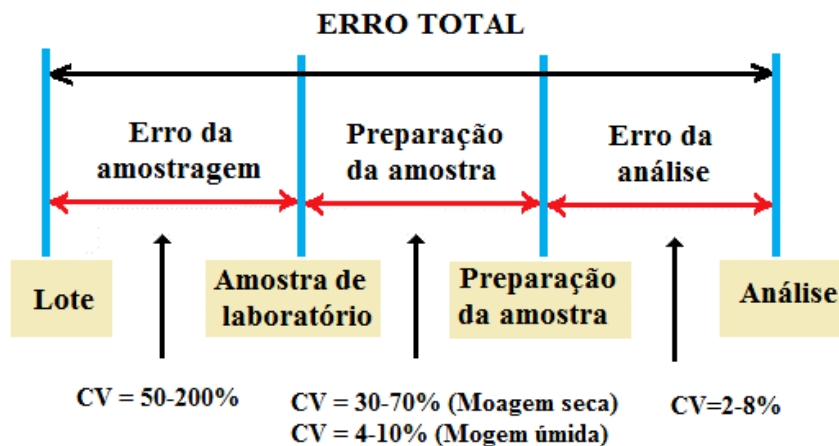
1.4. Amostragem do amendoim para análise de aflatoxinas

A Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº274 de 2002 da Anvisa (BRASIL, 2002), estabelece Planos de amostragem para a análise de aflatoxinas em Milho, Amendoim e derivados baseados em diretrizes da *Food and Agriculture Organization* (FAO, 1993), *Codex Alimentarius* (CODEX, 1999) e o Regulamento da Comunidade Europeia EC nº 401/2006 (EC, 2006). A contaminação por aflatoxinas apresenta distribuição heterogênea e enorme variabilidade dentro de um lote de amendoim, onde normalmente há uma pequena porcentagem de grãos do lote contaminados, porém, contaminados com níveis extremamente elevados de toxina, sendo o processo de amostragem crucial para a obtenção de resultados quantitativos fidedignos a respeito do lote (FONSECA, 2002; DORNER, 2008).

Segundo Whitaker (2011), o procedimento de amostragem é constituído de três fases: a própria amostragem, a preparação da amostra e finalmente a fase de análise. A amostragem consiste em selecionar uma amostra com determinado volume, de acordo com o tamanho do lote. A fase de preparação da amostra é dividida em dois pontos: moagem da amostra e sub-amostragem. A fase de análise é o emprego de metodologias analíticas, onde será determinada a concentração de micotoxinas da amostra representativa do lote.

Cada fase do procedimento de quantificação está associada a um nível específico de erro, e conseqüentemente, não é possível estabelecer o valor verdadeiro de micotoxina em um lote (Figura 4). A indicação da eficiência de um procedimento de análise pode ser medida pela variação em cada uma de suas fases. A variação total que constitui o erro é o resultado da soma da variância da amostragem, da variância da preparação da amostra e da variância da análise. O erro na fase da amostragem é grande porque geralmente as aflatoxinas são encontradas somente em porcentagens inferiores a 0,1% dos grãos do lote, porém, nesta porção a concentração poderá ser extremamente alta (JOHANSON et al., 2000).

Figura 4. Erros envolvidos na quantificação de micotoxinas.



Fonte: Extraído de Turner et al., 2015.

Considerando a amostragem como a maior causa de variação dos erros dos resultados analíticos e que o resultado analítico é afetado pelo tamanho da amostra, a amostra de trabalho deverá ser constituída de pequenas porções de amostras (incrementos) coletados de diferentes pontos do lote, para gerar uma amostra representativa do lote (WHITAKER, SLATE E JOHANSON, 2005).

Devido a variabilidade na distribuição de aflatoxina, é sempre conveniente realizar a amostragem dos lotes em movimento, durante a construção ou desmantelamento dos lotes (pilha de sacas), no carregamento ou descarregando de caminhões, vagões, ou navios (FAO, 1993; FONSECA, 2002). Se não for possível proceder a movimentação do lote, os incrementos devem ser retirados de forma distribuída 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). A Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 274 de 2002 estabelece Planos de amostragem para análise de Aflatoxina em Milho, e Amendoim de acordo com o tamanho de lote (toneladas); O número de incrementos, pequenas amostras coletadas em todo o lote, aumenta conforme o tamanho do lote, sendo necessária a criação de sub-lotes menores e mais análises para representar o lote, conforme demonstra a Tabela 2 (BRASIL, 2002).

Tabela 2. Amostragem para análise de micotoxina em amendoim.

Tamanho do Lote (Toneladas)	Massa dos Sub-lotes ou nº de sub-lotes	^(a) Número de Incrementos	^(b) Massa de Incrementos (g)	^(c) 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	16	5	2
> 10 e ≤ 15 t	----	80				
> 5 e ≤ 10 t	----	60		12		
> 1 e ≤ 5 t	----	40		8		

^(a) Números de pontos aleatórios a serem amostrados em todo o lote;

^(b) Massa de cada ponto amostrado;

^(c) Porção de produto formada pela reunião de todos os incrementos extraídos do lote.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2002.

De acordo com o plano descrito acima, a amostra de trabalho de amendoim a ser encaminhada para o laboratório é de 5 kg, devendo esta ser transformada em pasta homogênea (moagem úmida) ou moída (moagem seca) em malha 14, em sua totalidade, para posteriormente ser dividida em três partes, sendo uma tomada para análise de rotina, podendo ser tomada uma quarta amostra para análise de rotina (BRASIL, 2002).

O Regulamento da Comunidade Europeia EC nº 401/2006 (EC, 2006), considera a característica física do amendoim ou seu derivado, para estabelecer o plano de amostragem, sendo este critério importante para análise de produtos no varejo, e produtos que foram processados a partir de lotes de amendoim *in natura*. Quando ocorre a desintegração do grão através da moagem na produção do alimento, assume-se que a contaminação se torna homogênea, como por exemplo no processamento de farinha de amendoim e pasta de amendoim, sendo neste caso a amostra global menor que a de amendoim *in natura* (EC, 2006).

Quando não corre modificação do grão, como por exemplo no processamento de amendoins fritos, drageados doces ou salgados, a amostra global

deverá atender os mesmos requisitos de amendoim *in natura*, por considerar-se como amostra de contaminação heterogênea. No caso da amostragem de produtos prontos destinados ao consumo, em que não for possível coletar uma amostra global suficientemente representativa conforme o tamanho do lote, no mínimo 1 kg de produto deverá ser coletado para compor a amostra global (EC, 2006).

1.5. Métodos de detecção de micotoxinas

1.5.1. Métodos cromatográficos

A análise de micotoxinas é complexa devido à falta de uma única técnica adequada para todas elas, levando ao desenvolvimento de vários métodos em todo o mundo. Isso ocorre devido à importância das micotoxinas devido à sua toxicidade e aos limites regulatórios em alimentos. A busca por métodos simples, econômicos e eficazes é uma prioridade devido à sua significativa relevância em segurança alimentar (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é usada para triagem qualitativa e semiquantitativa de micotoxinas em grandes amostras de forma econômica e simples. Ela envolve a detecção dos compostos de interesse na faixa do UV-visível, com comparação com substâncias padrão. No entanto, a CCD tem desvantagens, como a necessidade de pré-tratamento da amostra, o uso de quantidades elevadas de solvente (alguns dos quais são considerados prejudiciais ao meio ambiente), e a falta de automação, dependendo da habilidade do técnico para resultados precisos (STROKA; OTTERDIJK; ANKLAM, 2000).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o método padrão para a análise de micotoxinas em indústrias. Diferentes adsorventes são usados com base nas propriedades físicas e químicas das moléculas. As colunas de fase normal ou fase reversa são utilizadas para separar e purificar as toxinas, dependendo de sua polaridade. Os métodos de detecção mais comuns envolvem detectores por UV ou fluorescência. Algumas micotoxinas, como ocratoxina, aflatoxina e citrinina, possuem cromóforos fluorescentes naturais em suas moléculas e podem ser detectadas diretamente, enquanto outras, como a fumonisina, não possuem cromóforos naturais

e requerem derivatização da molécula para detecção por fluorescência (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

A análise de micotoxinas por CLAE é precedida pelo preparo das amostras, extração, limpeza e concentração do extrato obtido, itens necessários para garantir a correta separação, quantificação e confirmação do analito no equipamento. Devido à diversidade de matrizes que podem conter as toxinas, a técnica deve levar em consideração as propriedades físico químicas de cada matriz, as AFs são ligeiramente solúveis em solvente polares e insolúveis em solventes totalmente apolares, sendo normalmente extraídas com metanol, acetona e clorofórmio. A etapa de extração e limpeza pode ser realizada por partição líquido - líquido, colunas de extração em fase sólida, constituídas por sílica, C₁₈, C₈, entre outros, e colunas de imunoafinidade (JAIMEZ *et al.*, 2000).

Técnicas de análise por imunoensaio e cromatografia líquida permitem a detecção de somente um tipo ou grupo de toxina por ensaio ou corrida, por exemplo a detecção de AFB₁ isoladamente ou do grupo de aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e AFM₁). O acoplamento da cromatografia líquida ao espectrômetro de massa (LC-MS) permite a detecção simultânea de micotoxinas e seus metabólitos, na ordem de mais de 20 micotoxinas detectadas na mesma corrida, isso é possível devido ao detector não ser tão dependente da característica química da molécula como o detector por UV ou fluorescência (BERTHILLER *et al.*, 2007).

A detecção é feita através da relação massa/carga (m/z) do íon precursor da toxina, após a ionização da molécula, e dos íons gerados após a colisão do íon precursor com gás argônio, esses íons são definidos como íons de quantificação e confirmação, e são específicos para cada análogo da toxina. A alta especificidade e possibilidade de método multitoxinas despontou o LC-MS em analítica emergente relevante na micotoxicologia (BERTHILLER *et al.*, 2007).

A análise por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa sequencial, composto por dois quadropolos de transmissão montados em série (LC-MS/MS), permite melhor detecção de compostos polares sem a necessidade de derivatização, outras vantagens incluem baixo limite de detecção, habilidade de gerar

informação estrutural do analito e possibilidade de detectar vasta gama de analitos com diferentes polaridades (BERTHILLER *et al.*, 2007).

Como exemplo de LC-MS/MS, pode-se citar o triplo-quadropolo (TQD) que possui como adicional um terceiro quadrupolo com voltagem rf (rádio frequência) exclusivo, que funciona como célula de colisão. Após passagem do íon pelo TQD, responsável por separar as massas previamente selecionadas, os dados podem ser adquiridos, entre outras formas, pelo modo de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (MRM). No modo MRM os dados são adquiridos pelo monitoramento da reação selecionada para múltiplos íons produto provenientes de um ou mais íons precursores, a partir do qual é possível identificar quais os íons de quantificação e confirmação para cada toxina (VESSECCHI *et al.*, 2011).

Spanjer, Rensen e Scholten (2008), validaram método multitoxina por LC-MS/MS, com ionização por eletro spray e aquisição por MRM no modo positivo. O total de 33 micotoxinas foi validado para análise em amendoim, pistache, trigo, milho, cornflakes, uva passa e figo. O LOQ para aflatoxinas e OTA foi $1,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e para deoxinivalenol foi $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$, para as demais micotoxinas o LOQ variou de 10 a $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

A quantificação de micotoxinas por CLAE é um método robusto e sensível, a possibilidade do acoplamento com espectrômetro de massa permitiu análise de compostos em menor limite de detecção, reduziu a necessidade de derivatização, gera informações estruturais dos analitos e possibilita análise de grande variedade de compostos, porém exige etapas de pré-preparo, como as citadas anteriormente, equipamento de alto custo, uso de reagentes de alta pureza e técnicos treinados para operação do equipamento, sendo a grande desvantagem o custo da análise (ONO *et al.*, 2007). Portanto, a aplicação de métodos secundários, como o imunoensaio, na triagem de micotoxinas em alimentos, seguida da análise por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa para confirmação das amostras positivas no imunoensaio, é uma alternativa vantajosa a fim de reduzir o custo da análise e garantir a confiabilidade do resultado.

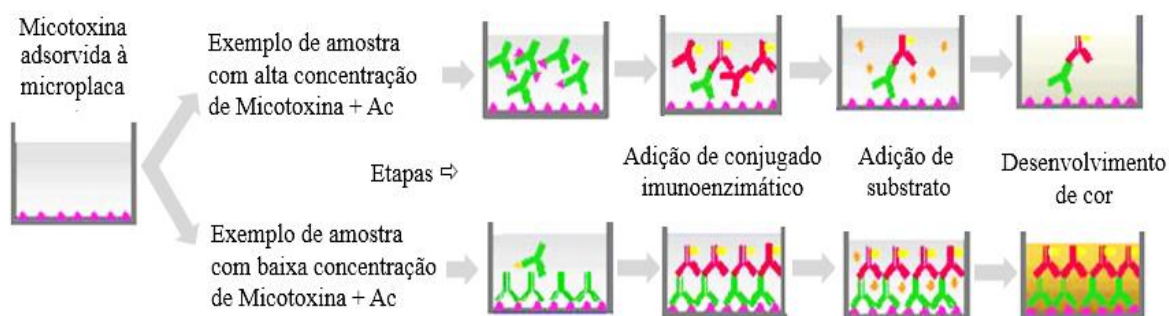
1.5.2. Métodos Imunológicos

Métodos baseados em sistemas biológicos têm ganhado espaço na detecção de micotoxinas por apresentarem menor custo, sensibilidade, especificidade e rapidez. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais e policlonais com alta especificidade e sensibilidade à micotoxinas permitiu o desenvolvimento de métodos imunológicos bastante úteis na limpeza das amostras, como as colunas de imunoafinidade, que impulsionaram a obtenção de extratos com baixos interferentes de matriz; e o ensaio ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), aplicado na triagem de amostras quanto à presença de micotoxinas, facilitando e reduzindo a utilização de sistemas cromatográficos (ANKLAM; STROKA; BOENKE, 2002).

O ensaio ELISA tornou-se popular devido ao seu baixo custo e facilidade de aplicação na detecção de micotoxinas. Os kits comerciais de ELISA para essa finalidade baseiam-se em um sistema competitivo direto ou indireto. No sistema competitivo direto, um anticorpo é imobilizado na placa e se liga especificamente aos sítios do antígeno caso estejam presentes na amostra. São adicionados marcadores colorimétricos, que geralmente consistem em anticorpos marcados com enzimas responsáveis por reações que geram cor. Esses anticorpos marcados se ligam a outro sítio específico do antígeno imobilizado. Nesse caso, a intensidade da coloração gerada é diretamente proporcional à concentração dos antígenos (micotoxinas) na amostra (LI; ZHANG; ZHANG, 2009).

O ELISA competitivo indireto (Figura 5) é o mais indicado na detecção de micotoxinas, devido à baixa imunogenicidade desses compostos, nesse caso a toxina é imobilizada na placa ao invés do anticorpo, o princípio baseia-se na competição entre a toxina presente na amostra e a toxina imobilizada, pelo sítio de ligação específico do anticorpo monoclonal, assim quanto maior a concentração de toxina na amostra, menor vai ser a ligação do anticorpo com a toxina imobilizada na placa, e a reação de coloração será indiretamente proporcional à concentração de toxina presente (FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004; LI; ZHANG; ZHANG, 2009).

Figura 5. Esquema de ELISA competitivo indireto (ic-ELISA).



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

O ensaio ELISA oferece várias vantagens, como portabilidade, rapidez e alta especificidade na detecção de micotoxinas. Ele possui limites de detecção comparáveis aos métodos cromatográficos, capazes de identificar quantidades muito pequenas dessas substâncias. Além disso, requer pouca ou nenhuma preparação ou concentração do analito. No entanto, o ELISA possui desvantagens, incluindo o potencial de resultados falso positivos devido a reações cruzadas com outros componentes e o risco de resultados falso negativos. Portanto, a validação rigorosa é fundamental para garantir a confiabilidade dos resultados. Além disso, o uso de kits descartáveis pode aumentar os custos, especialmente em situações que envolvem a triagem de várias amostras (ANKLAM; STROKA; BOENKE, 2002; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

Lee *et al.* (2004), validaram ELISA competitivo indireto para análise de AFB₁ em amendoim, milho, pistache e soja, o limite de detecção do método foi de 4,2 µg.kg⁻¹, os valores médios de recuperação foram de 78, 67, 87 e 100% para amendoim, milho, pistache e soja, respectivamente, sendo as amostras contaminadas em níveis de 5, 15 e 50 µg.kg⁻¹.

A principal limitação na aplicação do ic-ELISA para análise de micotoxinas em alimentos é a possibilidade aumentada de reações falso-positivas devido à complexidade da matriz, composta de macro e micronutrientes que variam entre cada alimento. Nas reações falso-positivas há uma diminuição do desenvolvimento da cor na análise por ic-ELISA, que pode sugerir a presença do

analito, isso ocorre quando a atividade enzimática é inibida pela presença de interferentes da amostra; quando a matriz prejudica a ligação adequada entre o analito (antígeno) e o anticorpo, ou ambos os fenômenos acontecendo simultaneamente (LEE *et al.*, 2004 e CAMPBELL *et al.*, 1990).

A fim de prever e eliminar esse efeito da matriz no imunoensaio, é necessário avaliar o parâmetro de especificidade durante a validação do método, pois através dele é verificado o quanto a matriz pode interferir no resultado da análise. Normalmente a diluição da amostra ao final da extração é suficiente para minimização do efeito da matriz, porém este parâmetro deve ser avaliado para cada alimento individualmente, já que diferentes matrizes podem levar a níveis diferentes de interferência, a depender de sua complexidade (LEE *et al.*, 2004).

2. Processamento de derivados de amendoim: Paçocas

A cadeia produtiva do amendoim abrange três grandes etapas: produção agrícola, beneficiamento e industrialização. Os processos de colheita e pós-colheita compreendem as operações de arranquio, enleiramento, secagem, despencamento das vagens, pré-limpeza e ensacamento, etapas realizadas manualmente ou mecanicamente. De acordo com a legislação brasileira, ao chegar na indústria beneficiadora o limite de umidade do amendoim cru descascado deve ser $\leq 8\%$, enquanto em amendoim cru com casca este índice seria $\leq 11\%$ (BRASIL, 2003).

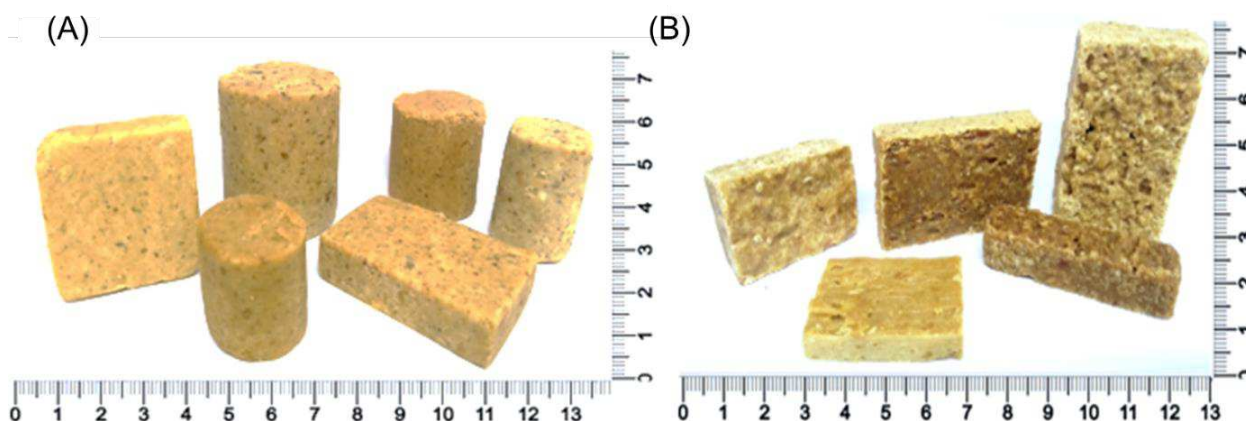
Para a comercialização dos grãos são realizadas as operações de descascamento, seleção/classificação, torração, blanchamento, nova seleção e embalagem. O amendoim descascado pode ser comercializado cru, torrado e/ou blanchado, sendo destinado ao comércio varejista, à extração de óleo ou à indústria processadora. O blanchamento, etapa de retirada da película que recobre o grão, consiste na expansão do grão em temperatura a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ para remoção da película. Posteriormente, os grãos são resfriados para voltar a forma original. Esta etapa pode ser realizada em associação a torrefação ou em etapa posterior por processo a seco (utilizando jatos de ar ou rotação em tambor) (EPA, 1995; CARMINATTI, 2016).

O processo de torrefação confere as características sensoriais desejáveis no amendoim (cor, sabor, crocância), geralmente é realizado a seco em fornos ou torradores empregando temperatura ao redor de 160 °C por 25 a 60 minutos (WOODROOF, 1983; CARMINATTI, 2016).

Atualmente no mercado brasileiro há diversos produtos industrializados a base de amendoim, dentre eles: manteiga, pasta, doces (doce de amendoim, paçoca, pé-de-moleque, torrone), e amendoins drageados doces e salgados (CARMINATTI, 2017). A *paçoca* é um doce típico brasileiro, produzida através da prensagem de amendoim torrado, moído com açúcar, farinha de mandioca, podendo ser adicionado de pequena quantidade de cloreto de sódio (IHA *et al.*, 2016). Atualmente são comercializados dois tipos de paçocas, que possuem diferenças quanto aos processos de produção, ingredientes, formato e características sensoriais. Estes tipos de doce de amendoim podem ser classificados quanto ao processamento em “paçoca prensada” (A) e “paçoca cozida” (B), conforme demonstra a Figura 6.

Figura 6. Tipos de paçocas de acordo com processo de fabricação.

(A) Paçocas prensadas (B) Paçocas cozidas.

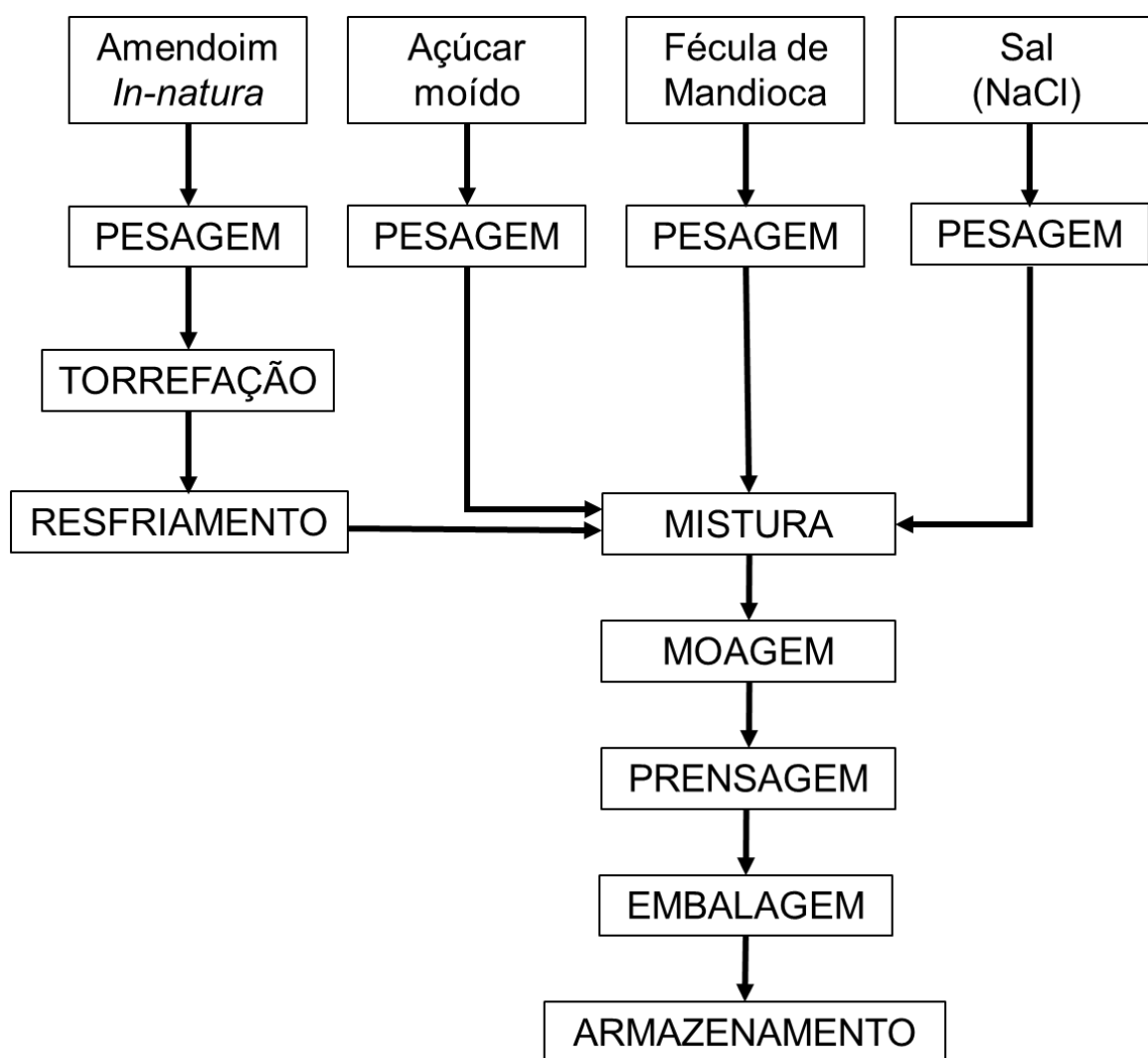


Fonte: Acervo pessoal (2023).

Para obtenção de paçoca do tipo prensada, o amendoim torrado (após resfriamento) é misturado ao açúcar moído (impalpável), fécula de mandioca e sal. Estes ingredientes são triturados em moinhos industriais, até a obtenção de uma “farofa” umedecida com a própria gordura do amendoim, expelida durante o processo de moagem, conforme demonstra o fluxograma do processo de produção (Figura 7). O produto resultante da moagem é prensado em equipamento que formata o produto

individualmente, geralmente em formato de “rolha”, quadrados ou retângulos (Figura 6 A). Após a prensagem e formatação o produto é imediatamente embalado em embalagens individuais primárias do tipo *Flow-pack* com três soldas. Posteriormente o produto é acondicionado em potes plásticos de polietileno ou em caixas de papel cartonado (embalagens secundárias). O produto também é comercializado sem as embalagens primárias do tipo flow-pack individualizadas. Neste caso, após a prensagem, os produtos são acondicionados manualmente em potes de polietileno.

Figura 7. Fluxograma do processo de produção de paçoca prensada.

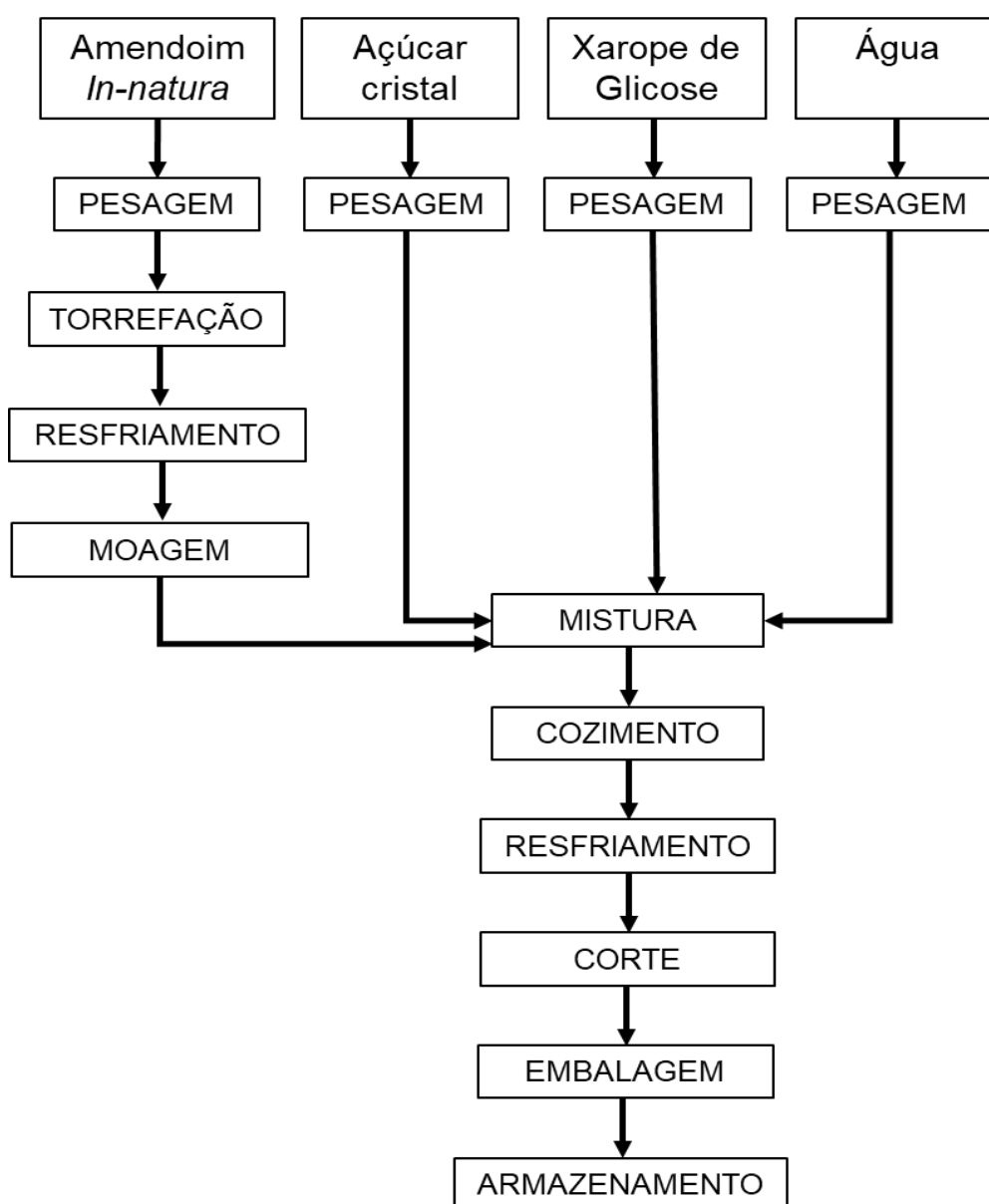


Fonte: Extraído e adaptado de Carminatti (2017).

Para obtenção de paçoca do tipo cozida, o amendoim torrado (após resfriamento) é triturado, misturado ao açúcar, xarope de glicose e água. Esta mistura

é cozida em tachos abertos até a prévia cristalização da sacarose. A massa obtida é imediatamente colocada sobre mesas, nivelada com auxílio de rolos/cilindros para atingir a espessura desejada. Após esta etapa, inicia-se o processo de resfriamento (geralmente em temperatura ambiente) e cristalização completa da sacarose. A cristalização da sacarose produz paçocas com a textura menos quebradiças, quando comparadas as paçocas prensadas (Figura 6 B). A Figura 8, demonstra o fluxograma do processo de produção de paçocas cozidas.

Figura 8. Fluxograma do processo de produção de paçoca cozida.



Fonte: Extraído e adaptado de Carminatti (2017).

Após a solidificação, o produto é cortado manualmente com cilindros cortadores. A embalagem primária é realizada de forma semi-automática em embaladoras do tipo *Flow-pack*. Geralmente a máquina de embalar é “alimentada” com os produtos de forma manual. Os produtos são comercializados em embalagens primárias individuais ou em potes plásticos de polietileno (embalagens secundárias), com ou sem embalagem primária.

3. Microrganismos Indicadores

Microrganismos indicadores são utilizados como critério microbiológico para determinar a qualidade de produtos alimentícios, bem como avaliar indiretamente a sua vida de prateleira (CARMINATI, 2016). Normalmente é realizada a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios totais, no entanto, por considerar apenas células viáveis este método não é o suficiente para fornecer dados sobre a qualidade de matérias-primas utilizadas no processamento (DOYLE e BEUCHAT, 2007).

Desta forma, a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF 2011) considera essencial para assegurar a qualidade microbiológica e segurança de produtos derivados de amendoim, o monitoramento da presença de *Salmonella*, assim como de outras *Enterobacteriaceae*, por exemplo *Escherichia coli* ou outros micro-organismos indicadores na matéria-prima, no ambiente de processo e no produto final para predizer desvios nas medidas de controle de higiene durante o processamento (ICMSF, 2011; SWANSON, 2011; CARMINATI, 2017).

No Brasil, a Instrução Normativa Nº 60 de 23 de dezembro de 2019, preconiza que para nozes, amêndoas, castanhas, amendoim, sementes leguminosas e sementes comestíveis, adicionadas ou não de outros ingredientes a tolerância de *E. coli* para amostra indicativa é de 10 UFC/g, e *Salmonella* deve estar ausente em 25 g de produto (BRASIL, 2019).

Durante a produção primária da cadeia produtiva do amendoim, as condições ambientais (temperatura, chuva, umidade), solo, água de irrigação contaminada, higiene de equipamentos e utensílios, presença de animais e danos

mecânicos causados por insetos podem influenciar na carga e tipo de contaminação microbiológica (ICMSF, 2011).

Na produção secundária, onde ocorre a manufatura de derivados de amendoim, o ambiente de fabricação é um dos pontos críticos mais prováveis para a introdução de contaminação microbiana (CARMINATI *et al.*, 2016). Falhas de higiene de equipamentos e utensílios, do ambiente de produção e dos manipuladores, são a principal causa de contaminação cruzada em produtos derivados de amendoim, podendo veicular *Salmonella* sp., *E. coli* e outras *Enterobacteriaceae* (CARMINATI *et al.*, 2016). A possibilidade de contaminação cruzada resultante de falhas em programas de controle de qualidade, pode veicular microrganismos pelo ar, poeira, água, equipamentos e trânsito de pessoal (BEUCHAT *et al.*, 2013; CHANG *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2009).

3.1. Microrganismos aeróbios mesófilos

A contagem total de Aeróbios Mesófilos em placas (*Aerobic Plate Count*), também denominada Contagem Padrão em Placas, é o método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas em alimentos. Não diferencia tipos de bactérias, sendo utilizada para se obter informações gerais sobre a qualidade de produtos, práticas de manufatura, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira (SILVA *et al.*, 2017).

Esta contagem não é um indicador de segurança, pois não está diretamente relacionado à presença de patógenos ou toxinas. Dependendo da situação, pode ser útil na avaliação da qualidade, porque populações altas de bactérias podem indicar deficiência nas operações de sanitização ou falha no controle de processo ou dos ingredientes (SILVA *et al.*, 2017). O método clássico de contagem total de aeróbios mesófilos em alimentos é realizado por meio de contagem padrão em placas, por plaqueamento em profundidade (*pour plate*), superfície (*spread plate*) ou filtração por membrana. O meio de cultivo recomendado para a maioria dos produtos é o Ágar Padrão para a Contagem (PCA) incubado a 35 ± 1 °C/ por 48 ± 2

horas (APHA, 2015; SALFINGER, SALFINGER, TORTORELLO; 2015; SILVA et al., 2017).

A utilização da contagem total de aeróbios mesófilos como indicador de qualidade deve ser criteriosa, considerando os ingredientes, diluições, tratamentos térmicos e o efeito no produto. Ryser e Schuman (2015), relataram contagens típicas de aeróbios mesófilos em grão de cereais não processados ($1,0 \times 10^4$ a $1,0 \times 10^5$ UFC/g), chocolates e marshmallows ($1,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^4$ UFC/g), nozes, sementes e pastas de legumes ($1,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^4$ UFC/g).

Uçkun e Var (2018), avaliaram a qualidade microbiológica de amendoins recém-colhidos (n=12), sem casca (n=12) e durante armazenamento (n=12) e amendoins torrados (n=92) comercializados em lanchonetes na Turquia. As amostras foram avaliadas quanto a presença de microrganismos mesófilos aeróbios, coliformes termotolerantes, *E. coli*, *E-coli* O157:h7, *Salmonella*, *Listeria* e Bolores e Leveduras. A contagem total de mesófilos variou de 3,0 a 8,7 log UFC/g para amendoins recém-colhidos, 3,4 a 5,6 log UFC/g e Não Detectável a 7,4 log UFC/g, para amendoim descascado e durante o armazenamento, respectivamente. Em amostras de amendoins torrados a contagem variou entre não detectável a 5,0 log UFC/g. Os autores relataram redução da carga microbiana de mesófilos aeróbios e de patógenos nas amostras de amendoim torrado, devido a redução da atividade de água e ao tratamento térmico empregando calor.

No Brasil, a Instrução Normativa Nº 60 de 23 de dezembro de 2019, em vigor atualmente, não preconiza a utilização do critério de contagem total de mesófilos aeróbios em amendoins e seus derivados. No entanto, a contagem pode fornecer informações relacionadas ao processamento, manipulação e vida de prateleira do alimento (BRASIL, 2019; SILVA et al., 2017).

3.2. Bolores e Leveduras

Os bolores e leveduras constituem um grande grupo de microrganismos, a maioria originários do solo ou ar. Os bolores são extremamente versáteis, a maioria das espécies são capazes de assimilar qualquer fonte de carbono derivada de

alimentos. A maioria também é indiferente com relação às fontes de nitrogênio, podendo utilizar o nitrato, os íons de amônia e o nitrogênio orgânico (SILVA et al., 2017). São bastante resistentes às condições adversas, como pH ácido e atividade de água baixa. Com relação ao pH, os fungos são muito pouco afetados pela variação na faixa de 3,0 a 8,0; entretanto, quando o pH se afasta do ótimo (geralmente próximo de 5,0) a velocidade de crescimento diminui, principalmente quando há outros fatores de inibição (atividade de água, temperatura) (SILVA et al., 2017).

Os bolores deteriorantes de alimentos, como quase todos os outros fungos filamentosos, exigem oxigênio para crescimento, podendo ser considerados aeróbios estritos. Ao contrário dos bolores, muitas espécies de leveduras são capazes de crescer na completa ausência de O₂ e em diferentes concentrações de CO₂, isso as torna os deteriorantes mais comuns de alimentos líquidos engarrafados (SILVA et al., 2017). Em alimentos processados que passaram por tratamento térmico e que são estáveis a temperatura ambiente, a contagem elevada de bolores e leveduras pode indicar falha no tratamento térmico, falha nas condições higiênico sanitárias ou contaminação durante o processamento (RYSER, SCHUMAN; 2015; UÇKUN, VAR; 2018).

3.3. Coliformes Termotolerantes e *Escherichia coli*

O grupo dos coliformes termotolerantes, é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose a 44,5 - 45,5 °C com produção de gás, em meios contendo sais biliares ou outros agentes tensoativos com propriedades inibidoras semelhantes (SILVA et al., 2017). *Escherichia coli* está incluída tanto no grupo dos coliformes totais quanto no dos coliformes termotolerantes. Seu habitat natural é o trato intestinal de animais de sangue quente, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais. É tradicionalmente distinguida dos demais coliformes termotolerantes pelas características de crescimento no Ágar L-BEM (Levine Eosina Azul de Metileno) e pelo perfil dos testes de indol, vermelho de metila, Voges Proskauer e citrato. Os métodos mais modernos diferenciam *E. coli* através da verificação da atividade da enzima β-glicuronidase, produzida por 96% das cepas, incluindo as anaerogênicas (FENG, HATMAN; 1982).

Um dos substratos para verificar a atividade β -glicuronidase é o MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo), que é quando é degradado pela β -glicuronidase, resulta em 4-metilumbeliferona, fluorescente sob luz UV. Outro é o BCIG (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glicuronídeo), também chamado de X- β -D-Glicuronídeo, que quando é degradado pela enzima, forma um produto de reação azul (SILVA et al., 2017).

Atualmente, a premissa de que altos números de *E. coli*, coliformes termotolerantes ou enterobactérias em alimentos estão relacionadas com contaminação fecal já não é válida; principalmente porque, estes microrganismos não são habitantes obrigatórios do trato intestinal de animais de sangue quente, podendo ser encontrados em reservatórios ambientais (SILVA et al., 2017). Além disso, estes microrganismos são comuns em ambientes de manufatura de alimentos, podendo se tornar parte da microbiota residente, principalmente quando as condições de limpeza e sanitização são inadequadas (SALFINGER, TORTORELLO; 2015; SILVA et al., 2017).

Como base nestes fatores, a Food and Agriculture Organization (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) concluíram que não é possível avaliar a inocuidade de alimentos em função dos níveis de *E. coli*, coliformes termotolerantes. No entanto, um alto índice desses microrganismos pode estar, em certas circunstâncias, relacionado com uma maior probabilidade de presença de patógenos entéricos, porém, frequentemente não está. Da mesma forma, sua ausência nem sempre significa que os produtos estejam livres de bactérias entéricas patogênicas (SILVA et al., 2017).

Entretanto, enterobactérias e coliformes, são utilizados como indicadores das condições de higiene dos processo de fabricação, porque são facilmente inativados pelos sanitizantes e são capazes de colonizar vários nichos das plantas de processamento, quando a sanitização é falha; Os coliformes indicam falha de processo ou de contaminação pós processo em alimentos pasteurizados, porque são facilmente destruídos pelo calor e não devem sobreviver ao tratamento térmico; A presença de *E. coli* em alimentos é um indicador de contaminação fecal em alimentos *in-natura*, mas não em alimentos processados (SILVA et al., 2017).

No Brasil, até o ano de 2019, apenas coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. eram utilizados como padrões microbiológicos para indicar as condições higiênico-sanitárias de alimentos processados derivados de amendoim (BRASIL, 2001). A atual legislação brasileira eliminou a exigência de monitoramento de coliformes termotolerantes e passou a adotar o padrão microbiológico de *E. coli* e *Salmonella* sp., preservando o limite máximo tolerado de 10 MPN/g ou 10 UFC/g para *E. coli* e a ausência de *Salmonella* sp. em 25 gramas (BRASIL, 2019).

3.4. Salmonella

Salmonella é o principal agente global de doenças de origem alimentar, com dezenas de milhões de casos por ano em todo mundo (WHO, 2013). É uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, que apresenta forma de bastonetes curtos, Gram negativos, não esporogênicos, apresentando metabolismo anaeróbico facultativo. As principais características bioquímicas são catalase positiva e oxidase e uréase negativas, capacidade de metabolizar nutrientes por vias respiratórias e fermentativas, com exceção da sacarose, descarboxilação da lisina e produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) (DOYLE e BEUCHAT, 2007).

A classificação de *Salmonella* mais usual é a nomenclatura por sorotipo que segue o sistema de Kauffmann-White baseado nas diferenças encontradas nas estruturas antigênicas de parede celular (antígeno somático), flagelar e capsular (LE MINOR, 1988; BRENNER, 1984). Atualmente existem mais de 2500 sorotipos de *Salmonella* (CARMINATI, 2017).

Salmonella é uma bactéria mesófila, com temperatura mínima de multiplicação de 5,2 °C e ótima de 35 a 43 °C. A faixa de pH para multiplicação varia de 3,8 a 9,5, sendo o ideal próximo a 7,0. A atividade de água mínima para sua multiplicação é de 0,94 e a concentração de cloreto de sódio (NaCl), deve ser inferior a 9 % (ICMSF, 1996). De acordo com o sorotipo, a *Salmonella* pode provocar três tipos de doenças, sendo a gastroenterite (*Salmonelose*) a mais disseminada e conhecida. A *Salmonelose* é provocada pela maioria dos sorotipos, sendo caracterizada por curto tempo de incubação, em torno de 6 a 72 horas. Os sintomas da *Salmonelose* são náuseas, vômitos e/ou diarreia, dores abdominais, febre e dor de

cabeça e podem durar de 4 a 7 dias. No entanto, sorotipos específicos como a *S. Typhi* provoca a febre tifoide. As manifestações dos sintomas ocorrem entre 7 a 28 dias, em média 14 dias, os principais sintomas são mal-estar, dor de cabeça, febre alta persistente, dores abdominais e corporais, sentidos entorpecidos e os pacientes podem apresentar delírios (ICMSF 1996).

De acordo com Li et al. (2013), *Salmonella* é incapaz de se multiplicar em aW abaixo de 0,94, no entanto, estudos recentes têm relatado a sobrevivência de *Salmonella* em produtos de baixa atividade de água, mesmo quando estocados por longos períodos, incluindo produtos derivados de amendoim (NUMMER, SHRESTHA, SMITH; 2012; KATAOKA, ENACHE, BLACK; 2014; NASCIMENTO et al., 2018). O alto teor de gordura e a baixa atividade de água no amendoim resultam num aumento na resistência ao calor de *Salmonella* (ICMSF, 2011). O estresse osmótico induzido pela baixa aw resulta na ativação de mecanismos de defesa dentro da célula microbiana, resultando na produção de solutos como prolina, trealose e glutamina. O aumento da concentração intracelular destes compostos resulta numa maior resistência térmica e osmótica (CÁNOVAS et al., 2001).

Nascimento et al. (2018), realizaram uma avaliação da sobrevivência de *Salmonella* Typhimurium ATCC14028 em diversos produtos de amendoim que foram armazenados a 28 °C por 420 dias, incluindo amostras de paçocas. Os resultados indicaram que *Salmonella* sobreviveu além do prazo de validade em produtos de amendoim (>420 dias), principalmente em produtos com aW em torno de 0,4. Foi demonstrado que a viabilidade da população de *Salmonella* em paçocas excedeu o limite de detecção (1 UFC/g) durante todo o período de estudo (420 dias). Amostras de paçocas inoculadas com *Salmonella* nas concentrações de 3,0 e 6,0 log UFC/g apresentaram pequena taxa de declínio, com contagens de 1,1 e 3,1 log UFC/g após 14 e 420 dias.

Nascimento et al., (2018) avaliaram a incidência de contaminação por *Salmonella*, *E. coli* e *Enterobacteriaceae* na cadeia produtiva do amendoim no Brasil. Os autores examinaram 129 amostras de amendoim após a colheita, 185 em processamento secundário e 100 no varejo, incluindo 26 amostras de paçocas e outros produtos (amendoim torrado, amendoim cozido, amendoim revestido, pasta de

amendoim, pé-de-moleque e pé-de-de moça). As amostras de confeitos de amendoim (amendoim revestido, pé-de-moleque e pé-de-moça) que passaram por tratamento térmico adicional, típico do processo produtivo, não estavam contaminadas com *Enterobacteriaceae*, *E. coli* ou *Salmonella*. Entretanto, os autores relataram altas contagens de *Enterobacteriaceae* em amostras de amendoim pós-colheita e ao final do processamento secundário, onde 16% das amostras ainda estavam contaminadas com esse grupo de microrganismos. *Salmonella* foi detectada em 9 amostras (2,2%), 6 pós-colheita, 2 etapas de processamento secundário e 1 varejo (amostra de manteiga de amendoim) que também testaram positivo para *E. coli*.

Carminati et al., 2016, estudaram a presença de *Enterobacteriaceae*, coliformes, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. em três empresas processadoras de derivados de amendoim. O estudo envolveu a análise do amendoim utilizado como ingrediente, ambiente (equipamentos, utensílios e instalações), superfície das mãos dos manipuladores de alimentos e produtos prontos para consumo. *Enterobacteriaceae* e coliformes foram identificadas nas mãos dos manipuladores de alimentos, enquanto *Salmonella* sp. foi detectada em uma das plantas de processamento. Os autores isolaram *Salmonella* sp. do piso próximo ao equipamento misturador de paçoca, o que representa um risco potencial de contaminação do produto final, principalmente porque a paçoca prensada não é submetida a nenhum tipo de tratamento térmico após a prensagem. O ambiente fabril, incluindo os manipuladores de alimentos, foi considerado a principal fonte de contaminação dos produtos de amendoim (CARMINATI et al., 2017).

Referências

ANDRADE, P. D.; HOMEM DE MELO, M.; FRANÇA, J. A.; CALDAS, E. D. Aflatoxins in food products consumed in Brazil: a preliminar dietary risk assessment. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 1, p. 127-136, 2013.

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.

BERTHILLER, F.; SULYOK, M.; KRŠKA R.; SCHUHMACHER, R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. **International Journal of Food Microbiology**, n. 119, p. 33 – 37, 2007.

BEUCHAT, L. R.; KOMITOPOULOU, E.; BECKERS, H.; BETTS, R. P.; BOURDICHON, F.; FANNING, S.; JOOSTEN, H. M.; TER KUILE, B. H. Low-water activity foods: increased concern as vehicles of foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 150-172, 2013

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.

BRASIL. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1.

BRASIL. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Instrução Normativa Nº60 de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, 26 dez. 2019. Seção 1.

BRASIL. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário oficial**. Seção 1. Nº 46. 2011.

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 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.

BRENNER, D. J. Facultatively anaerobic Gram- negative rods, In: Krieg, N. R. e Holt, J. C. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p. 408-516.

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. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CÁNOVAS, D.; FLETCHER, S. A.; HAYASHI, M.; CSONKA, L. N. Role of trehalose in growth at high temperature of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **J. Bacteriol.** v. 183, n. 11, p. 3365–3371, 2001.

CAMARGO, A. C. C.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; RASERA, G. B.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; PRADO-SILVA, L.; ALVARENGA, V. O.; SANT'ANA, A. S.; SHAHIDI, F. Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. **Food Chemistry**, v. 237, p. 538-544, 2017.

CAMPBELL, T.C.; CHEN, J.; LIU, C.; LI, J.; PARPIA, B. Nonassociation of aflatoxin with primary liver cancer in a cross-sectional ecological survey in the Peoples Republic of China. **Cancer Res**, **50**: 6882-93, 1990.

CARMINATI, J. A. **Ocorrência e sobrevivência de *Salmonella* em amendoim e produtos derivados de amendoim**. Campinas, São Paulo, 2017. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2017.

CAST. COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). **Mycotoxins: risk's in plant, animal and human systems**. Washington, p. 199, 2003.

CHANG, A.S.; SREEDHARAN, A.; SCNEIDER, K.R. Peanut and peanut products: a food safety perspective. **Food Control**, v. 32, p. 296-303, 2013.

CHEN, Y.; SCOTT, V. N.; FREIER, T. A. Control of *Salmonella* in low-moisture foods. III: process validation and environmental monitoring. **Food Protection Trends**, v. 29, p. 493-508, 2009.

CODEX ALIMENTARIUS. **Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment**. CAC/GL-30. Rome: Codex Alimentarius, 1999. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/357/CXG_030e.pdf>. Acesso 08 de jul. de 2023.

CONAB. ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE GRÃOS: safra 2019/20: **segundo levantamento**, v. 7, n. 2, nov. 2019. 41p. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/gaos/boletim-da-safra-de-gaos>> Acesso em: 08 jun. 2023.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento Acompanhamento da safra brasileira de Grãos: Safra 2022/23, n. 9 – **Nono levantamento**, p. 1⁻¹ 16, junho 2023. (2023). Disponível em:< <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 08 jul. 2023.

DORNER, J. W. Management and prevention of in peanuts. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n.2, p.203-208, 2008.

DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 3 ed. Washington: American Society for Microbiology. **Press**. 2007.

EFSA. Contam Panel. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain.SCHRENK, D.; BIGNAMI, M.; BODIN, L.; CHIPMAN, J. K.; DEL MAZO, J.; GRASL-KRAUPP, B.; HOGSTRAND, C.; HOOGENBOOM, L. R.; LEBLANC, J-C.; NEBBIA, C. S.; NIELSEN, E.; NTZANI, E.; PETERSEN, A.; SAND, S.; SCHWERDTLE, T.; VLEMINCKX, C.; MARKO, D.; OSWALD, I. P.; PIERSMA, A.; ROUTLEDGE, M.; SCHLATTER, J.; BAERT, K.; GERGLOVA, P.; WALLAC, H.2020. Scientific opinion – Risk assessment of aflatoxins in food. **EFSA Journal**, v. 18, n. 3, 6040, 112 p, 2020.

EPA - United State Environmental Protection Agency. Food and Agricultural Industries. In: **Confectionary products: peanut processing**. 5. Ed, v. 1. 1995.

FAO - Food and Agriculture Organization. **Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn**. FAO Food and Nutrition Paper 55. FAO, Rome, 1993.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization), Aflatoxins. Safety evaluation of certain contaminants in food: prepared by the eighty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series, No 74; 2-280, 2018.

FENG. P. C. S.; HARTMAN. P. A. Fluorogenic assay for immediate confirmation of Escherichia coli. **Applied an Environmental Microbiology**, v. 43, p. 1320⁻¹ 329, 1982.

FONSECA, H. Sampling plan for the analysis of aflatoxin in peanuts and corn: an update. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p.97⁻¹ 05, 2002.

FREITAS, V. P. S.; BADOLATO, M. L C. **Incidência de aflatoxinas em paçocas de amendoim consumidas na cidade de Campinas**, Estado De São Paulo. Ver. Int. Adolfo Lutz, v. 52, p. 83-87, 1992.

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

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.

GUO, C.; XIE, Y. J.; ZHU, M.T.; XIONG, Q.; CHEN, Y.; YU, Q.; XIE, J. H. Influence of different cooking methods on the nutritional and potentially harmful components of peanuts. **Food Chem.** 316, 2020.

HERTWING, A. M. V.; IAMANAKA, B. T.; AMORIM NETO, D. P.; REZENDE, J. B.; MARTINS, L. M.; TANIWAKI, M. H. NASCIMENTO, M. S. Interaction of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* with *Salmonella* spp. isolated from peanuts. **Int. J. Food Microbiol.** V. 328, n. 1, 2020.

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.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Cocoa, Chocolate and Confectionery. In: **Microorganisms in Foods 8: Use of Data for Assessing Process Control and Product Acceptance.** Springer, New York, p. 241–246. 2011.

IHA, M. H.; OKADA, I. A.; BRIGANTI, R. C.; MINI, C. A.; TRUCKSESS, M. W. Aflatoxins in Brazilian Peanut Confection, **Journal of AOAC international.** v. 99, n. 3, p. 830–834, 2016.

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.

JOHANSSON, A. S.; WHITAKER, T. B.; GIESBRECHT, F. G.; HAGLER, W. M.; YOUNG, J. H. Testing shelled corn for aflatoxin, part II: modeling the distribution of aflatoxin test results. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 83, n.5, p. 1270-1278, Sep./Oct. 2000.

KATAOKA, A. I.; ENACHE, E.; BLACK, D. G. Survival of *Salmonella Tennessee*, *Salmonella Typhimurium* DT104, and *Enterococcus faecium* in peanut paste formulations at two different levels of water activity and fat. **J Food Prot**, v. 77, p. 1252-1259. 2014.

KORANI, W. A.; CHU, Y.; HOLBROOK, C.; CLEVINGER, J.; OZIAS-AKINS, P. Genotypic regulation of aflatoxin accumulation but not *Aspergillus* fungal growth upon post-Harvest infection of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. **Toxins**, v. 9, 2017.

KRISHNA, K. R. Agroecosystems: Soils, climate, crops, nutrient dynamics and Productivity. **CRC Press.** 2013.

LE MINOR, L. Typing *Salmonella* species. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 214-218. 1988.

LEE, N.A.; WANG, S.; ALLAN, R.D.; KENNEDY, I.R. A rapid aflatoxin B₁ 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. Immunoassays for aflatoxins. **Trend in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1115-1126, 2009.

LI, H.; WANG, H.; D'AOUST, J. Y.; MAURER, J. *Salmonella* species. In M. P. Doyle, & R. L. Buchanan (Eds.). Food microbiology: Fundamentals and frontiers. 225–262. (fourth ed.). Washington DC: **ASM Press**. 2013.

LIN, S.-T.; TU, S.-H.; YANG, P.-S.; HSU, S.-P.; LEE, W.-H.; HO, C.-T.; et al. Apple polyphenol phloretin inhibits colorectal cancer cell growth via inhibition of the type 2 glucose transporter and activation of p53-mediated signaling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 64, p. 6826-6837, 2016.

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.

MIDIO, A. F.; CAMPOS, R. R.; SABINO, M. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in cooked food components of whole meals marketed in fast food outlets of the city of São Paulo, SP, Brazil, **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 5, p. 445-448, 2001.

MOORE, M. M.; SCHOENY, R. S.; BECKER, R. A.; WHITE, K.; POTTENGER, L. H. Development of an adverse outcome pathway for chemically induced hepatocellular carcinoma: case study of AFB₁, a human carcinogen with a mutagenic mode of action. **Critical Reviews in Toxicology**, 48, 312–337, 2018.

NASCIMENTO, M. S.; CARMINATI, J. A.; MORISHITA, K. N.; AMORIM NETO, D. P.; PINHEIRO, H. P.; MAIA, R. P. Long-term kinetics of *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 survival on peanuts and peanut confectionery products. **PLoS ONE**. v. 13, n. 2, 2018.

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**. 2^a ed. Embrapa, cap. 3, 2013.

NUMMER, B. A.; SHRESTHA, S.; SMITH, J. V. Survival of *Salmonella* in a high sugar, low water- activity, peanut butter flavored candy fondant. **Food Control**, v. 27, p. 184–187. 2012.

OLIVEIRA, C. A. F.; GONÇALVES, N. B.; ROSIM, R. E.; FERNANDES, A. M. Determination of Aflatoxins in Peanut Products in the Northeast Region of São Paulo, Brazil. **Int. J. Mol. Sci.** v. 10, p. 174–183, 2009.

ONO, E.Y.S., BERND, L.P., FUJII, S., RIBEIRO, R.M.R., HASHIMOTO, E. H., HIROOKA, E.Y. Princípios Básicos para Análise de Micotoxinas. **Editora da Universidade Estadual de Londrina**, Londrina- Pr, 2007.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3 ed. New York. Springer. 2009.

RAWAL, S., KIM, J.E., COULOMBE, R.A.J. Aflatoxin B₁ in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.325-331, 2010.

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.

RYSER, E. T.; SCHUMAN, J. D. Mesophilic Aerobic Plate Count in: SALFINGER Y. & TORTORELLO ML. (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 5th ed. American Public Health Association. Washington, D.C., Chapter 8, p.95-101. 2015.

SABINO, M.; INOMATA, E. L.; LAMARDO, L. C. A. - Variação dos níveis de aflatoxinas B₁ em pasta de amendoim e paçoca consumidas no Estado de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 42, p. 39 - 44, 1982.

SAMPAIO, R. M. Amendoim: alta de 46% nas exportações em 2020. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 16, p. 1– 5. 2021.

SALFINGER, Y. & TORTORELLO, M. L. (eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 5th Ed. American Public Health Association (APHA), 2015.

SCUSSEL, V. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados em Campinas em 1980-82. **Boletim da SBCTA**, 19: 109-119, 1985.

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, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A.; OKAZAKI, M. M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 5ª Ed. São Paulo: Bluncher, 2017. 560 p.

SILVA, A. R.; ZANIN, L. M. M.; ISHIKAWA, A. T.; TAKABAYASHI, C. R.; FRACALOSI, F. P.; AMORIM, T. M.; ITANO, E. N.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.

Y. Development of ic-Elisa for the screening of aflatoxin contamination in the peanut production chain. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.53, n.3, p.361-370, 2018.

SPANGER, M.C., RENSEN, P.M., SCHOLTEN, J.M. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n.4, p. 472-489, 2008.

SPENSLEY, P. C. Aflatoxin, the active principle in turkey «X» disease. **Endeavour**, v. 22, p. 75-79, 1963.

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.

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.

SWANSON, K. M. J. Nuts, oilseeds, dried legumes and coffee. In: ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Food. Microorganisms in Food 8. New York: Springer, p. 227 – 237. 2011.

TENGEY, T. K.; KANKAM, F.; NDELA, D. N.; FREMPONG, D.; APPAW, W. O.22). Growth and Toxigenicity of *A. flavus* on Resistant and Susceptible Peanut Genotypes. **Toxins**. v.14, n. 8, 2022.

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**. 62,11⁻¹ 9, 2014.

TURNER, N.W., SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v.632 n. 2, p. 168⁻¹ 80, 2009.

UÇKUN, O.; VAR, I. Microbiological Quality of Peanuts: From Field to Consumption. **Sustainable Food Production**, v. 4, p 31-39,2018.

USDA. United States Department of Agriculture. World agricultural production. 2023. (USDA. Foreign agricultural service. **Circular series, WAP 6-23**, June2023).

Disponível em: <

https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?startrow=11&cropid=2221000&sel_year=2023&rankby=Production >. Acesso em: 07 Jul. de 2023.

VESSECCHI, R., LOPES, N.P., GOZZO, F.C., DORR, F.A., MURGU, M., LEBRE, D.T., ABREU, R., BUSTILLOS, O.V., RIVEROS, J.M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n.10, p. 1875 – 1887, 2011.

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, p. 1-21, 2005.

WHITAKER, T.B. et al. **Sampling procedures to detect mycotoxins in agricultural commodities**. New York: Springer, 2011. 58 p.

WOODROOF, J. G. **Peanut: production, processing, products**, 3 ed, Westport, CN: The Avi Publishing Company. 1983.

**CAPÍTULO III: Aflatoxins in the peanut production chain: Crop monitoring from
2016 to 2019 in the state of São Paulo, Brazil**

ARTIGO I

Artigo redigido para ser submetido à revista Food Control

Abstract

The State of São Paulo produces 90% of Brazilian peanuts, of which 80% are exported to Russia, the Netherlands, Algeria and some countries in the European community. This oilseed is highly susceptible to contamination by fungi of the genus *Aspergillus* spp., and the consequent presence of Aflatoxins (AFs), secondary toxic metabolites with carcinogenic effect for humans and animals. Therefore, the peanut production chain requires constant monitoring of the levels of this chemical hazard. The aim of this study was to monitor AFs in peanut lots in a food industry located in the Alta-Paulista region, state of São Paulo, Brazil. 460 batches (5 tons each; 396 raw and 64 shelled peanuts) from three sequential harvests (2016 to 2019; 2016/17, N=80; 2017/18, N=160; 2018/19, N=220) were analyzed for moisture, water activity and FAs using rapid column analysis of immunoaffinity and fluorimetry (IAC-fluorimetry). The reliability of the rapid analysis of FAs performed in real time using an immunoaffinity and fluorimetry column (IAC-fluorimetry) was verified by combining the data with a validated competitive indirect enzyme immunoassay (ic-Elisa) and high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector (HPLC-FLD). The Pearson correlation (r) of HPLC-FLD and IAC-fluorimetry was 0.86, while IAC-fluorimetry and ic-ELISA was 0.90. In 60% of the samples (277 batches), the total AFs were below the maximum limit established by the European community ($\leq 4.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$). There was a statistically significant difference between moisture content, a_w and AF when comparing fresh and blanched peanuts ($p < 0.05$). However, 70 lots (15.2%) exceeded the maximum levels of AFs established by Brazilian legislation ($20.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Proper monitoring of aflatoxin levels is essential to ensure consumer safety.

Keywords: *Aspergillus*; aflatoxin B₁; mycotoxins; peanut; HPLC-FLD

1. Introdução

Brazil is ranked as the third peanut producer in the American continent, with considerable increase in productivity (11.7%) occurring in the last 2021 - 2022 crops, and 750.0 thousand tons are estimated for 2022/23 crop (Conab, 2023; USDA, 2023). São Paulo state account for 90% of Brazilian production (USDA, 2023), currently, 80% are exported to Russia, the Netherlands, Algeria and some countries in the European community. The remaining are processed by local food industries in the production of sweets and derived products (Conab, 2021; USDA, 2023).

Aflatoxins (AFs) are mycotoxins frequently associated with the peanut chain worldwide, which causes damage to human and animal health, with additional phytosanitary problems that affect the grain quality, reducing commercial value (Jallow et al., 2021). AFs are polyketide-derived furanocoumarins produced by the secondary metabolism of fungi of the genera *Aspergillus*, especially by *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*, with strong carcinogenicity that is associated with both acute and chronic toxicity for animals and humans. The International Agency for Research on Cancer classified the AFB₁ in Group I, indicating its carcinogenic nature to humans (IARC, 2002).

Peanut (*Arachis hypogaea* L.), being a subterranean legume, is highly susceptible to AFs contamination due to its direct interaction with soil, which plays a role as a primary inoculum reservoir of aflatoxigenic fungal populations (Tengey et al., 2022). Aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) can be produced from pre-harvest, drying, and transport to the storage stage, depending on the farm's management practices and environmental factors (temperature, humidity, rainfall) or whenever there is a failure in the control of the grain temperature, humidity and storage conditions, which are the critical factors involving entire peanut chain (Waliyar et al., 2015). The European Commission Regulation (EC) n°. 1881/2006 (European Union, 2006b) established the maximum limit of 4 µg.kg⁻¹ for total AFs, and 2 µg.kg⁻¹ for AFB₁ in peanut-derived and processed products intended for direct human consumption or as an ingredient used. The National Health Surveillance Agency (ANVISA) of the Brazilian Ministry of Health set the maximum tolerable limit at 20 µg.kg⁻¹ for total AFs in peanuts and derived products (Anvisa, 2011).

Several Brazilian peanut studies concerning microbiota and AF occurrence have reported the importance of continuous monitoring in the production chain (Gorayeb et al., 2009; Iha et al., 2016; Martins et al., 2017; Santos et al., 2018). A continuous real-time tracking system applying a reliable and sensitive (ng-level) quantitative method should be the routine in the Brazilian agroindustry, as the maximally tolerated limits for AFs (Anvisa, 2011) are higher than the guideline established in many European Community countries (European Union, 2006b).

In the current agribusiness trend, 80% of Brazilian peanuts are exported to countries with a maximum permitted AFs limits lower than the guideline practiced in Brazil. Therefore, the internal supply market should be carefully monitored to ensure public health (Conab, 2021; Anvisa, 2011). A study was carried out in real-time concerning the AF monitoring and controlling targeted on beneficiated peanut batches at the reception stage of an agroindustry, which involved acceptance/rejection decisions based on program Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP). The reliability of rapid fluorimetry coupled with immunoaffinity clean-up (IAC fluorimetry) applied in this stage was evaluated by comparing with validated High-Performance Liquid Chromatography with a fluorescence detector (HPLC-FLR), as well as in-home Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ic-ELISA).

2. Material and Methods

2.1. Reagents

The reagents and chemicals used were: sodium chloride (NaCl) P.A. grade. (Dinâmica, Brazil); anhydrous magnesium sulfate (MgSO₄) P.A. grade (Merck, USA); methanol and acetonitrile HPLC grade (Sigma-Aldrich, USA); Acetic acid HPLC grade (Macron, Itália); trifluoroacetic acid (J.T. Baker, USA); Hexane (Synth, Brasil); standard Aflatoxin B1 (Sigma-Aldrich, USA); AflaTest-P® immunoaffinity column and developer stock solution (0.03% bromine) (Vicom Inc, Watertown, USA); qualitative filter paper N°1, 24 cm (Vicom, USA); microfiber filter 1.5 µm, 11 cm (Vicom, USA); ultrapure water from the Mili-Q purification system (Elga LabWater, UK).

2.2. Samples

A total of 460 peanut samples (5 tons, each batch) of the cultivar Runner IAC 886 were collected in three sequential harvesting seasons – 2016/17 (n=80), 2017/18 (n=160), and 2018/19 (n=220) in a peanut sweets & derivatives agroindustry in the county of Marília, São Paulo state, Brazil. Peanut batches were delivered to the agroindustry by grain processors of five counties (Iacri, Herculândia, Tupã, Marília and Queiroz) in Alta Paulista, one of the peanut zones in São Paulo State.

Peanut sampling was carried out according to RDC n°274/2002 of the Brazilian National Health Surveillance Agency, the Ministry of Health (Anvisa, 2022) Each sample belonged to corresponding batch (5 tons), which was consisted with 100 bags of 50 kg. The pool of a global sample was collected manually from all 100 bags with a collector. Five increments of peanuts were collected at different points of each bag by perforation at the ends and center of bags, totaling approx. 100 g per bag. The sum of 500 increments generated 01 (one) global sample of 10 kg, which was ground entirely in a mill (18 mesh particle size) and homogenized for 5 min in a "Y"- type mixer with 30 kg capacity. Then 200g of working sample was identified according to the batch, origin, and date of receipt. The samples were stored in polypropylene packages at -18 °C until analysis. The batches had already been analyzed on the producing farms for the presence of aflatoxins but were analyzed again on the spot in the food industry. The same samples were taken to the Center for Training & Research in Food & Water Safety, the State University of Londrina, where moisture and water activity analyses were carried out in triplicate for a collaborative study.

2.3. Moisture Content, Activity Water and Determination of Aflatoxins

The moisture content was determined by drying at 105°C in triplicate until reaching constant weight (MOD NV 1.5 chamber, Nevoni, SP-Brazil) (Anvisa, 2002); the water activity (Aw) was analyzed in triplicate according to the manufacturer's instructions (MOD 4TE water activity meter, Aqualab Decagon Devices®, Pullman, USA). Peanut batches - approved in grain classification, and moisture content $\leq 8\%$ (Anvisa, 2002) were analyzed for total AF according to AOAC, USA, 991.31 (AOAC,

1991) (Aflatest-P® IAC column prepared with specific monoclonal antibody AFB1, AFB2, AFG1, and AFG2, Vicam, MA, USA). The reliability of such analysis in the reception phase (batch acceptance/rejection) was evaluated by comparing some results with the methodology of intra-laboratory validated HPLC-FLD, as well as ic-ELISA developed at the Center for Training & Research in Food and Water Safety, State University of Londrina. The ic-ELISA was validated in a laboratory, where 80 samples of peanuts for the years 2016 and 2017 were analyzed (Silva et al., 2018). Validation was performed on a matrix mixing raw and bleached peanuts (15 samples, 7.0g each showing total AF level < LOD by ic-ELISA). The HPLC-FLD was also validated intra-laboratory, where 38 samples of bleached peanuts belonging to the 2016/2017 to 2018/2019 harvests were selected, and the analysis was performed in 2022.

2.4. Analysis by Immunoaffinity chromatography Column-fluorimetry

Twenty-five grams of ground peanut (18-mesh particle size) added with 5 g of NaCl were blended with 125 mL of methanol/water (70:30, v/v) for 2 min, according to the manufacturer (Aflatest-P® Vicam, MA, USA). A volume of 15 mL of extract (corresponding to 1 g of sample) was diluted with 30 mL of water, and it was filtered through 24 cm qualitative filter paper N°1 (Vicam, USA), followed by second filtration in 1.5 µm Whatman glass microfiber filter (934-AH, Maidstone, UK). The clean-up was carried out by transferring 15 mL of filtrate into Aflatest-P® IAC, then the column was washed with 20 mL of deionized water, and AF were eluted with 1.0 mL of methanol grade HPLC (1-2 drops s⁻¹). The eluate was collected in a glass cuvette, and 1.0 mL of day-prepared 0.03% Bromine developer solution was added and homogenized. The reading was carried out in a fluorimeter (Vicam® Serie-4, USA) (AOAC, 1991).

2.5. Ic-ELISA-Indirect Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay

The Indirect Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ic-ELISA) was performed with mAb produced in vitro by hybridoma AF4 cell line derived from

myeloma SP2/0-AG14 strain and BALB/c mouse splenic cell, developed at Kagawa University, Japan. This isotype IgG1 lambda mAb was highly specific to AFB₁ (100%) with very low cross-reactivity with analogs: 2.3% AFB₂, 3.4% AFG₁, and 2.4% AFG₂ (Kawamura et al., 1988). The developed ic-ELISA was in-home validated and applied in AF analysis in the peanut chain (Silva et al., 2018). The ic-ELISA was performed as described by Silva et al. 2018. Intralaboratorial validation was based on: linearity, the limit of detection (LOD), the limit of quantification (LOQ), specificity, accuracy, precision, and robustness following recommendations of AOAC (Inmetro, 2020). The AFB₁ standard curve at a range of 0.1 to 5 ng mL⁻¹ with five points was prepared in PBST: methanol (9:1, v/v) and in peanut extract.

2.6. Liquid Chromatography – Fluorescence detector (HPLC-FLD)

The analyses of AF by Liquid Chromatography – Fluorescence detector (HPLC-FLD) and the extraction was performed with the method QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe) proposed by Desmarchelier et al., 2010 with some modifications. A 5.0 (±0.03) g sample was mixed with 10 ml of water, followed by addition of 10 mL of 0.5% acetic acid in acetonitrile, and centrifuged at 300 rpm for 10 min (orbital shaker, Quimis, Brazil). Then 5.0 (±0.2) g of salt mixture (MgSO₄/NaCl, 4:1 v/v) was added, immediately hand-shacked, and centrifuged at 450 g for 15 min (5810R, Eppendorf, Germany). The extract was cleaned in hexane (1:1 v/v), and 1 mL of supernatant was dried at 40°C under a nitrogen stream. The residue was reconstituted in 100 µL of acetonitrile, vortexed (30 s), ultrasonic agitated (5 min), and 100 µL of water was added and vortexed (30 s). The volume of ± 200 µL was transferred microtube, centrifuged at 20,817 g for 15 min, and 120 µL of supernatant was diluted with 280 µL of water, again centrifuged at 20,817 g for 15 min, and filtered in 0.22 µm polyvinylidene fluoride - PVDF syringe filters, 13 mm diameter (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The filtrate was stored at 3°C until the derivatization step with trifluoroacetic acid (TFA) (Trombete et al., 2014). The derivatization was carried out by diluting 200 µL of filtered extract in 400 µL of derivatizer (water, TFA and acetic acid, 70:20:10 v/v) and incubated at 65°C for 10 min in the dark (Novus, N1040,

Marconi, Brazil). Then 20 µL in duplicate was analyzed by reversed-phase isocratic HPLC system (LC⁻¹ 0AD pump and RF-535 fluorescence detector; Shimadzu, Kyoto, Japan), managed by CBM-20A interface, manual injection valve (Rheodyne, Boston, USA). Luna C18 reverse phase Phenomenex column (250 x 4,6 mm, 5 µm, Scharlau, Barcelona, Spain) was maintained at 40°C (CTO-20AC column oven), and excitation and emission wavelength was 365 nm and 450 nm, respectively. Mobile phase was methanol, acetonitrile, and water (20:10:70 v/v), and the flow rate was 1 mL min⁻¹.

2.7. *Statistical analysis*

The data obtained were evaluated by variance analysis (ANOVA), followed by Tukey's test at 5% probability using Statistica Software, version 10 (Dell Statistica, Tulsa, OK, USA). Pearson's correlation analysis was applied to determine the linear association between the variables ($p < 0.05$). All Pearson correlation analyzes were performed in the R statistical software (R Core Team, 2021).

3. Results and Discussion

3.1. *Quality Assurance*

The performance of three analytical methods for analysis of natural AFs contamination in peanut batches by IAC-Fluorometry, ic-ELISA and HPLC-FLD showed satisfactory results (Table 1). The validated ic-ELISA showed adequate linearity ($R^2 = 0.999$), detection and quantification limits of 1.13 and 3.59 µg.kg⁻¹, respectively; recovery rates of 104.4, 101.7 and 107.7% at concentrations of 4, 10, and 20 µg.kg⁻¹ AFB₁, respectively. The ic-ELISA showed good repeatability (intra-assay) and reproducibility (inter-assay) of 1.87% and 6.75%, respectively (Silva et al., 2018).

Table 1. Aflatoxin analysis in peanut: performance of rapid commercial IAC Fluorimetry versus validated *in-home* ic-ELISA and HPLC-FLD.

Method	Intralaboratory Validation								
	Sensibility		R ²	Linearity	AFB ₁ Spiked (µg kg ⁻¹)	Recovery		Precision	
	LOD	LOQ		Regression equation		Mean ± SD ²	(%)	Intra- assay (%) ³	Inter- assay (%) ⁴
IAC – Fluorimetry ¹ (commercial AflaTest P®)	1.0	-	-	-	50.0	-	99	-	-
ic-ELISA*	1.13	3.59	0.999	$y = -14.18\ln(x) + 48.116$	4.0	4.1 ± 0.20	104.4	1.87	6.75
					10.0	10.1 ± 0.81	101.7		
					20.0	21.5 ± 0.16	101.7		
HPLC-FLD	0.1	1.2	0.999	$y = 3550.6x - 653.94$	0.7	0,58 ± 0,09	82.8	3.35	9.94
					2.0	1,59 ± 0,10	79.3		
					7.0	6,67 ± 0,12	95.3		

¹ Information of manufacturer.

² Results expressed in mean ±SD of seven replicates each point in three consecutive days.

³ Relative standard deviation (RSD%) concerning intra-assay.

⁴ Relative standard deviation (RSD%) concerning inter-assay.

Both methodologies used in the AF analysis – Figure 1A and 1B – indicated a positive correlation between the results according to Pearson's coefficient. The correlation coefficient (r) between the results by HPLC-FLD and IAC-fluorimetry was 0.86, demonstrating the second method's suitability for rapid AF analysis in industry. Pearson's correlation coefficient between IAC-fluorimetry and ic-ELISA with positive correlation (r = 0.94) confirmed the statement, with the t-test indicating that there was no significant difference at 5.0% probability (p=0.4201, <0.05).

Therefore, the application of an adequate sampling plan and analysis of AFs *in loco*, using the IAC fluorimetry method - VICAM Aflatest (Truckess et al., 1991), combined with validated ic-ELISA (Silva et al., 2018) demonstrated being methods of easy application in processes of screening and monitoring of AFs in the field and in the food industry. Considering the reliable performance of real-time analysis of total AFs by IAC -fluorimetry, when matched with ic-ELISA and HPLC-FLD (Figure 1), the monitoring involved the global assessment of peanut batches received in the processing agroindustry. The study investigated the impact of contamination levels on the exposure risk of consumers concerning the limits established by legislation, as well as the internal procedure adopted for approving the batches for further processing stage.

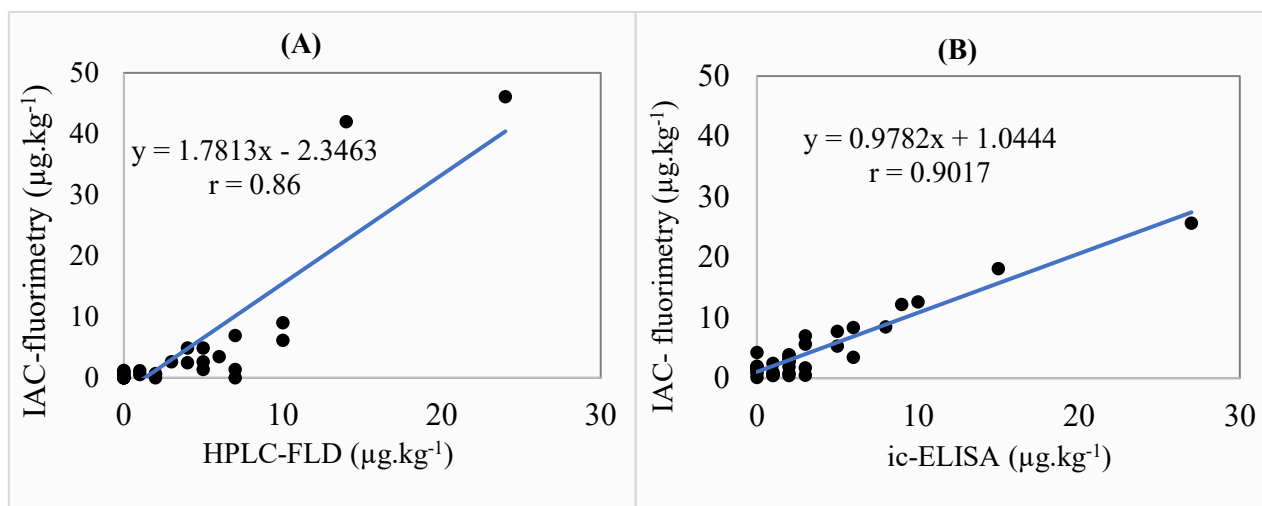


Fig. 1. Correlation coefficient between IAC-fluorimetry with HPLC-FLD and ic ELISA for aflatoxin determination in naturally contaminated peanut samples.

(A) Peanut batches, 2016-17, 2017-18, 2018-19 crop (30 samples); (B) Peanut batches, 2016-17 crop (37 samples).

Table 2 details the distribution of peanut batches based on different contamination thresholds, mean, and median concerning total AFs detected by IAC-fluorimetry. The levels were established based on Brazilian Legislation (Anvisa, 2011; MAPA, 2016), European Community EC No. 401/2006 (European Union, 2006), and the internal limits of the industry used as criteria for acceptance or rejection of batches based on HACCP program.

Table 2. Distribution of peanut batches based on different contamination thresholds and mean and median levels of total aflatoxins detected by IAC-fluorimetry.

Crops		Total aflatoxins levels ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)						Total (batches)
		n.d. - 4 ¹	5 - 11 ²	12 - 20 ³	21-50	51-100	101- 190	
2016-2017	N (%) ⁴	51 / (63.8)	17 (21.3)	4 (5.0)	5 (6.3)	1 (1.3)	2 (2.5)	80
	Mean ⁵	1.1 \pm 1.2	6.8 \pm 1.7	14.0 \pm 0.8	26.4 \pm 3.3	-	120.0 \pm 14.4	
	Median ⁶	1.0	6.0	14.0	25.0	-	120.0	
2017-2018	N (%) ⁴	120 (75.0)	10 (6.3)	8 (5.0)	12 (7.5)	8 (5.0)	2 (1.3)	160
	Mean ⁵	0.8 \pm 1.2	7.0 \pm 1.7	14.0 \pm 0.8	31.8 \pm 11.3	68.9 \pm 14.3	120 \pm 0.0	
	Median	1.0	6.0	14.0	28.0	65.0	120.0	
2018-2019	N (%) ⁴	106 (48.2)	42 (19.1)	32 (14.5)	19 (8.6)	16 (7.3)	5 (2.3)	220
	Mean ⁵	1.1 \pm 1.3	6.8 \pm 1.6	15.3 \pm 2.5	35.7 \pm 8.7	69.8 \pm 13.8	158.4 \pm 35.9	
	Median ⁶	1.0	6.0	15.00	34.0	67.5	170.0	

¹ $\leq 4.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$: Maximal Tolerable total AFs by European Community Regulation (EC) n^o 401/2006.

² $\leq 11.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$: Maximal Tolerable total AFs for batch acceptance-rejection threshold by Food Industry.

³ $\leq 20.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$: Maximal Tolerable total AFs by Brazilian Legislation. ⁴ Number of batches analyzed frequency). Total AF detected by rapid IAC-fluorimetry (AOAC, USA, 991.31).

⁵ Values expressed as mean of total aflatoxins \pm standard deviation

From a total of 460 batches analyzed, 15.2% (n=70) showed total AFs level higher than 20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ established by Brazilian legislation (BRASIL, 2011), with contamination ranging from 21.0 to 190.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. 60% of samples (N= 277 batches) were distributed into the undetectable level to $\leq 4.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, in the three crops analyzed, i.e., the maximum limit established by the European Community, indicating positive demand also for global agribusiness, where 80% of Brazilian peanut is exported (USDA, 2022; CONAB, 2021). In this scenario, it is inferred that the monitoring of this study corresponded to a small portion of the remaining 20% of peanuts for the national demand, used in the manufacture of sweets, confectionery, and value-added products (CONAB, 2021). This indirectly may predict some safety implications spreading from the main peanut-producing area, requiring continuous monitoring of AF levels or even the adoption of Critical Safety Limits, as per the procedure performed in this study.

All countries that export food and feed products to Europe are subject to monitoring by the EU rapid alert system (RASFF), which is an online database of serious human health risks from imported food/feed; RASFF recently reported that AFs were responsible for 89% of 5045 notifications for food and 439 notifications for feed (Alshannaq, Yu; 2021; Osaili et al., 2023). According to the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), the contribution of peanuts to AF exposure worldwide has been estimated to be more than 10% of the total (Eskola et al., 2020). AFs accounted for 20.9% (10, 302) of the total Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) notifications issued from 2002 to 2019 (Bhardwaj et al., 2023). Of all the potential chemical hazards, AFs represent one of the major food safety concerns worldwide (Bhardwaj et al., 2023). The regulation of AFs in peanuts and peanut-based products has changed in all world regions. However, with the exponential growth of the international market for food, feed, and raw materials used in food production, international legislative standards have been required to protect consumers and ensure fair trade (Meneely et al., 2022).

Fonseca (Fonseca, 2002) emphasized that the practice intending real safety must be targeted on monitoring of unprocessed peanuts considering the tolerable AF levels less than the value established in legislation. Such precaution would be essential, due to the high variability and heterogeneous AFs contamination in each batch, besides the influence of sampling plan, preparation, and analytical method

used; i.e., accepted batches with adequate analytical data but close to 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ may be unsafe (Fonseca, 2002). Considering the critical safety limit adopted by the food industry, of the total of 460 batches analyzed in the three crops, 346 batches (75.2%) were effectively accepted by the industry for the processing and manufacture of sweets, as they had aflatoxin levels $\leq 11.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Njoroge et al. (Njoroge et al., 2016) investigated the presence of AFs in 954 packages of 24 brands of peanut butter in Zambia, in sub-Saharan Africa from 2012 to 2014. Of those collected from 2012 to 2014, 73%, 80%, and 53% were contaminated with levels ranging from 20 to 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectively. Lien et al. (Lien et al., 2019) reported in a study carried out in Taiwan that 267 of 1089 samples of peanuts and derivatives (25% of the total samples imported from 2011 to 2017) were contaminated with AFs, and that 34 samples (3.1%) exceeded the limit, where 441 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ was the maximum AFs concentration. The maximum contamination values reported by Njoroge et al. (Njoroge et al., 2016) and Lien et al. (Lien et al., 2019) exceed by 5.2 and 2.3 the maximum value found for AFs in this study (190.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) (Table 3); considering that in this research, it is peanuts in-natura submitted to a screening process.

Table 3. Number of peanut batches, that exceeded the maximum limit allowed by Brazilian legislation (LMT 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$)

Levels of aflatoxin ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Crops			
	2016-2017 (N=80) ¹	2017-2018 (N=160)	2018-2019 (N=220)	
21-50	21-30 ²	4	6	6
	31-40	1	3	6
	41-50	-	3	7
51-100	51-60	-	3	7
	61-80	1	4	6
	81-100	-	1	3
101-130	101-110	1	-	1
	111-120	0	2	-
	121-130	1	-	-
131-190	131-160	-	-	1
	161-170	-	-	1
	171-190	-	-	2
Positive Batches³ (Frequency)	8 (10.0)	22 (13.8)	40 (12.8)	

¹ Number of lots analyzed per season.² Ranges and Levels of Total Aflatoxin Contamination;³ Total positive samples by season and relative frequency (%)

The occurrence of AF in this study was proportional to the number of samples analyzed per crop, and the contamination trend was probably related to climatic conditions. Four samples showed the highest contamination range (131 – 190 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) in the 2018-2019 crop, with two samples ranging from 171 to 190 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. The high AFs levels in this crop (dry season) may be due to abnormal drought climatic conditions affecting the region in unfavorable seasons during normal years. Then it caused a 20.4% of shrinking in cultivated land coupled with a 28.8% the decrease in productivity, with a decrease in production of 43.5% when compared with the preceding crop (raining season) (CONAB, 2018).

The water stress due to drought which reduced productivity probably also caused a notable increase in AFs levels by decreasing plant natural defense mechanisms (Foutain et al., 2016; Jallow et al., 2021). In parallel with decreased production in the 2018-2019 crop, an elevated peanut export rate occurred in the demanding market of the European Community as reported by National Supply Company – CONAB in Brazil (Conab, 2018), which probably inferred in the quality of products in the national market, with subsequent risk of provision with contaminated batches. The failed batch (AFs levels $>11\mu\text{g.kg}^{-1}$, Table 3, 4) was immediately turned back to grain processors, where it was submitted repetitively for mechanical, electronic, and manual classification processes based on seed size and density. This process is called “moreiramento,” based on flotation and separation of light grains by mechanical vibration and ventilation to eliminate damaged, broken, moldy and immature grains, reducing batch contamination levels. Its procedure has been obligatory in Brazilian legislation (BRASIL, 2002; 2016).

All 460 batches (396 batches – in natura raw peanut with skin; 64 batches – blanched, without skin) were analyzed for water activity and moisture content, as shown in Figure 2. The mean A_w (Figure 2; A-I, A-II and A-III) of in natura peanut batches with skin ranged from 0.5580 ± 0.0288 (2017/18 crop) to 0.5943 ± 0.0523 (2016/17 crop), with a triennium average of 0.5803 ± 0.0195 . The blanched peanut batches showed lower mean A_w values than the in nature, in all three annual crops ($p<0.05$). The mean A_w in blanched peanuts ranged from 0.5120 ± 0.0361 (2018/19

crop) to 0.5333 ± 0.0391 (2016/17 crop), with a triennium average of 0.5230 ± 0.0107 . Taking to account the impact of Aw and temperature in *A. flavus* growth and AFs biosynthesis, the Aw of both in natura and blanched peanuts were within the safe range. The minimum Aw ideal for the growth of *A. flavus* was 0.78 to 0.80, and AFs production was 0.82, whereas the optimal conditions for *A. flavus* growth in peanut kernels were 28–40 °C at Aw of 0.94–0.99; growth suppression occurred at temperatures lower than 20 °C, as well as aw lower than 0.90 (Pitt, Taniwaki, Cole; 2013).

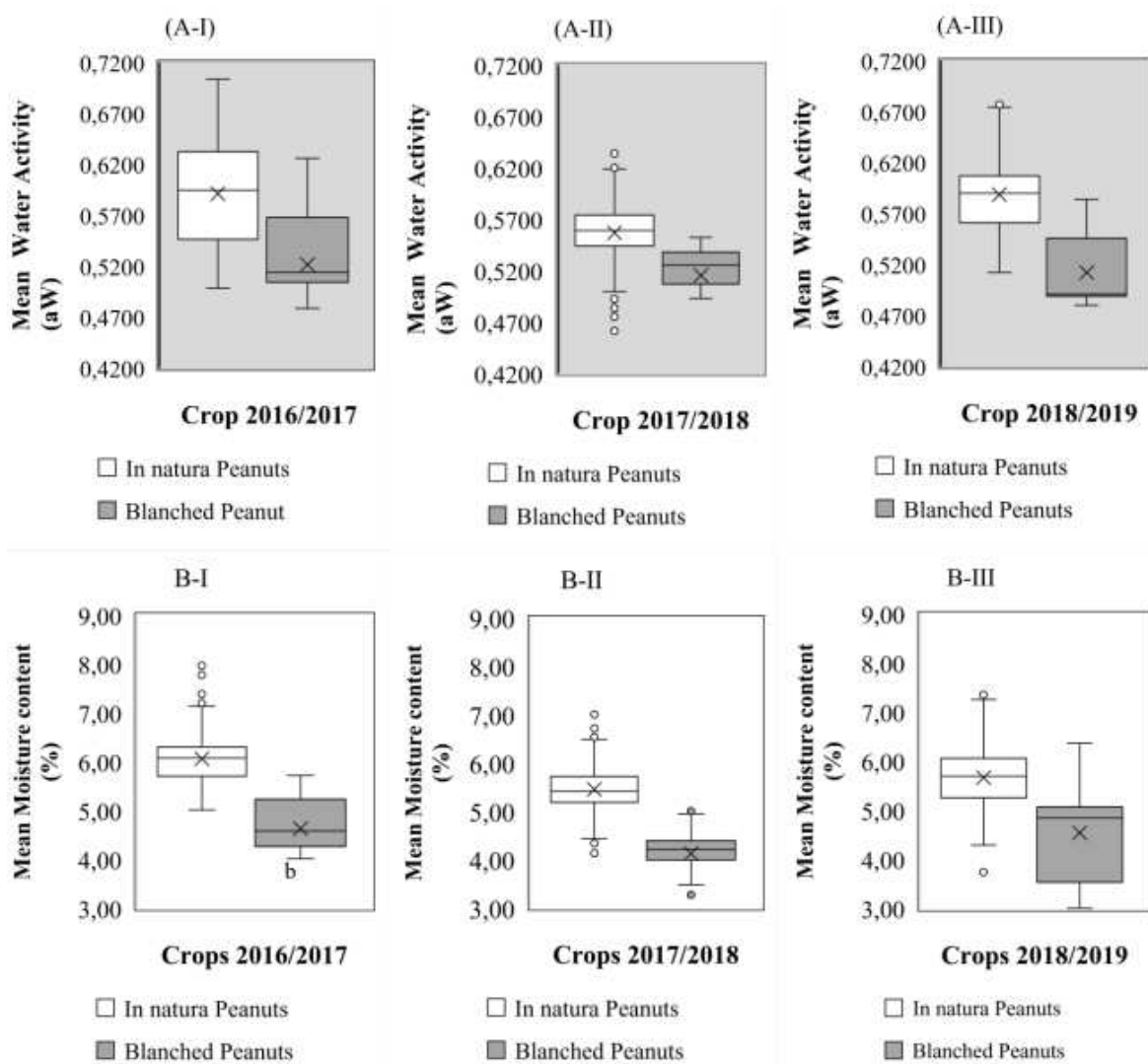


Fig 2. Mean results of water activity (A-I, A-II, A-III) and moisture content (B-I, B-II, B-III) of peanut batches according to crop and type of peanut (*in-natura* and *Blanched* peanuts).

The mean moisture content (Figure 2; B-I, B-II and B-III) of in natura peanut batches (n=369) in three crops was 5.74% (range, 5.47 to 6.09%). The blanched

peanut batches (n=64) showed lower mean moisture content than in natura peanut in three crops. The mean moisture content of triennium was 4.51% (range, 4.19 to 4.74%). There was a significant difference between the moisture content of in natura and blanched peanut batches in all three crops ($p < 0.05$). All 460 samples attended the exigence of maximum moisture limit criteria established in $\leq 8.0\%$ for shelled peanut intended for industrial processing (Figure 2; B-I; B-II and B-III), according to the resolution RDC n. 274 of ANVISA, BRASIL, 2002). The minimum moisture content required for *A. flavus* growth in peanut is 8-10% at approx. 82% of relative humidity, whereas the AFs production is related to $\geq 10\%$ kernel moisture content (Torres et al., 2014; Waliyar et al., 2015). Studies also reported that the maximum moisture content required for storage of unshelled peanut was 9%, while shelled peanut required 7%. Such moisture contents assured safe nut storage for approximately one year if the relative environmental humidity was maintained at 70% at 25– 27 °C (Waliyar et al., 2015).

Table 4 matched the mean moisture content and A_w with total AFs and the AF content considering the type of peanut - in natura or blanched kernels in three crops (2016/17, 2017/18, and 2018/19). The blanched peanut batches showed lower mean moisture content and A_w than fresh in natura peanut along three crops ($p < 0.05$). The difference could be due to heating applied in the blanching process to remove the peanut skin (seed coating) from kernels, reducing grain moisture (Jallow et al., 2021).

Table 4. Mean and standard deviation of the results of moisture, water activity and total aflatoxins of the batches analyzed in the three crops 2016/17, 2017/18 and 2018/19, according to the type of peanut (*in natura* and blanched).

Crops	Type of Peanut (N) ¹	Moisture ²	Activity Water ²	Total aflatoxin ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) ²
2016/2017	In natura (65)	6,09 \pm 0,55 ^{b 3}	0,5943 \pm 0,0523 ^b	9,97 \pm 22,75 ^a
	Blanched (15)	4,74 \pm 0,54 ^a	0,5333 \pm 0,0391 ^a	1,53 \pm 2,80 ^a
2017/2018	In natura (140)	5,47 \pm 0,49 ^b	0,5580 \pm 0,0288 ^b	9,71 \pm 22,18 ^a
	Blanched (20)	4,19 \pm 0,36 ^a	0,5328 \pm 0,0166 ^a	4,50 \pm 10,40 ^a
2018/2019	In natura (191)	5,86 \pm 0,55 ^b	0,5887 \pm 0,0320 ^b	17,21 \pm 31,25 ^a
	Blanched (29)	4,59 \pm 0,97 ^a	0,5120 \pm 0,0361 ^a	6,62 \pm 11,31 ^a

¹Number Total of batches analyzed in each crop. ²Results expressed in mean \pm SD; ³Means followed by different letters (comparison between in-natura and blanched peanuts per crop) show a statistically significant difference at the 5% probability level ($p < 0.05$).

The difference in moisture content between in natura (5.74%) and blanched (4.51%) peanut batches was attributed to an increase in kernel temperature during the blanching process. In this process, raw peanut kernels were exposed at 85-90 °C for 30-45 min, followed by immediate cooling, which promoted the kernel contraction, enabling skin removal by mechanical abrasion, vibration, and ventilation processes (Schirack et al., 2006; Jallow et al., 2021).

The blanched peanut batches also showed a lower mean of total AFs contamination than in natura peanut batches along three crops ($p < 0,05$). Blanching is an effective physical method in removing AF in contaminated nuts (Dorner, 2008). The significant difference between annual crops in terms of water activity, moisture content, and aflatoxin levels (Table 4) may be due to post-harvest management in the drying and bleaching phases, which played an essential role in maintaining fungal activity in steady state during system post-processing and storage. That is, bleaching (85-90 °C for 30-45 min) eliminated viable fungal cells, and low water activity prevented the growth of more airborne fungal contaminants (Jallow et al., 2021).

Mahoney, Cheng, and Palumbo. (Mahoney, Cheng, Palumbo., 2020), noted that blanching reduced total AFs in naturally contaminated beans by 13% to 76%, depending on the quality of the bean and the time and temperature combination of the process. To summarize, the immediate and correct handling of post-harvest peanut by proceeding with a reduction in moisture content and A_w would be an important procedure, where blanching may play an additional role. Such procedures would be the preventive process to avoid not only the fungal growth and stop the triggering of AF production in the following storage phase in grain processors (Oplatowka-Stachowiak et al., 2016). In addition to these procedures, monitoring of AFs in peanut batches prior to the by-product or export phases and applying accurate analytical technologies would be essential to ensure safe peanut products.

4. Conclusion

The rapid screening method using an immunoaffinity column and fluorimetry employed by the agroindustry showed a positive correlation with the standardized and validated methodologies of ic-ELISA and HPLC-FLD, indirectly demonstrating the

importance of the sampling procedure. Constant monitoring using a reliable analytical method and the decision to accept and reject lots based on the adoption of the Critical Limit according to the Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) program in the production chain is a way to protect consumers from exposure to high levels of aflatoxins. Both national and international legislation in a globalized peanut market must be considered for the control system of AFs in the agroindustry, which comprises the HACCP decision allied to rapid, reliable analyses in real time combined with validated analyses.

Acknowledgments

This research was funded by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development – Brazil). Special thanks to CNPq for the doctoral scholarship (scholarship number 142559/2018-0).

Referências

Alshannaq, A., & Yu, J. H. (2021). Analysis of EU rapid alert system (RASFF) notifications for aflatoxins in exported US food and feed products for 2010–2019. *Toxins*, 13(2), 90.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002. [Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho]. Diário Oficial da União, 16 out. 2002. Seção 1, p.45-46.

Bhardwaj, K., Meneely, J. P., Haughey, S. A., Dean, M., Wall, P., Zhang, G., ... & Elliott, C. T. (2023). Risk assessments for the dietary intake aflatoxins in food: a systematic review (2016–2022). *Food Control*, 109687.

Companhia Nacional de Abastecimento Acompanhamento da safra brasileira de Grãos: Safra 2017/18: décimo segundo levantamento, v.5 – Safra 2017/18, n. 12. 2018. 148 p. Available at:< <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos?start=40>>. Accessed on: Jun 07 2022.

Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de Grãos: Safra 2022/23: segundo levantamento, v.10, n.2, nov. 2022. 83p. Available at:< <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Accessed on: Mar 07 2023.

Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de Grãos: Safra 2021/22: primeiro levantamento, v.9, n.1, out. 2021. 86p. Available

at:<[https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-
graos?start=10](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-
graos?start=10)>. Accessed on: Mar 07, 2023.

Desmarchelier, A., Oberson, J. M., Tella, P., Gremaud, E., Seefelder, W., & Mottier, P. (2010). Development and comparison of two multiresidue methods for the analysis of 17 mycotoxins in cereals by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 7510-7519.

Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S., & Krska, R. (2020). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(16), 2773-2789.

EUROPEAN UNION. (2006) *Commission Regulation (EC) n° 401/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*. Official Journal of the European Union, L 364, Mar. 9 2006b. 23p.

Fonseca, H. (2002). Sistema de amostragem para análise de aflatoxinas em amendoim e milho: uma atualização. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 97-105.

Gorayeb, T. C. C., Casciatori, F. P., Del Bianchi, V. L., & Thoméo, J. C. (2009). HACCP plan proposal for a typical Brazilian peanut processing company. *Food control*, 20(7), 671-676.

Iha, M. H., Okada, I. A., Briganti, R. C., Mini, C. A., & Trucksess, M. W. (2016). Aflatoxins in Brazilian peanut confection. *Journal of AOAC International*, 99(3), 830-834.

Trucksess, M. W., Stack, M. E., Nesheim, S., Page, S. W., Albert, R. H., Hansen, T. J., & Donahue, K. F. (1991). Immunoaffinity column coupled with solution fluorometry or liquid chromatography postcolumn derivatization for determination of aflatoxins in corn, peanuts, and peanut butter: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 74(1), 81-88.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, & International Agency for Research on Cancer. (2002). *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene* (No. 82). World Health Organization.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008: orientação sobre validação de métodos e ensaios químicos. Brasília, 2020. Edição 9.

Jallow, A., Xie, H., Tang, X., Qi, Z., & Li, P. (2021). Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 20(3), 2332-2381

Kawamura, O., Nagayama, S., Sato, S., Ohtani, K., Ueno, I., & Ueno, Y. (1988). A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B 1 in peanut products. *Mycotoxin Research*, 4, 75-88.

Lien, K. W., Wang, X., Pan, M. H., & Ling, M. P. (2019). Assessing aflatoxin exposure risk from peanuts and peanut products imported to Taiwan. *Toxins*, 11(2), 80.

Mahoney, N. E., Cheng, L. W., & Palumbo, J. D. (2020). Effect of blanching on aflatoxin contamination and cross-contamination of almonds. *Journal of Food Protection*, 83(12), 2187-2192.

BRASIL, MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil). Instrução Normativa IN n. 32, de 24 de agosto de 2016. [Regulamento Técnico do Amendoim em Casca e em Grãos, destinado à alimentação humana, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade, a amostragem, o modo de apresentação e a marcação ou rotulagem, nos aspectos referentes à classificação do produto]. Diário Oficial da União, 25 ago. 2016. Seção 1, p.13. Available at: < <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-no-32-de-24-de-agosto-de-2016-21906518>>Accessed on: Jul 05 2022.

BRASIL, MAPA – Ministério Agricultura e Pecuária e Abastecimento (2016) Governo do Brasil, Instrução Normativa nº 32 de 24 de agosto de 2016. Available at: < <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-no-32-de-24-de-agosto-de-2016-21906518>>Accessed on: Jul 05 2022.

Martins, L. M., Sant'Ana, A. S., Iamanaka, B. T., Berto, M. I., Pitt, J. I., & Taniwaki, M. H. (2017). Kinetics of aflatoxin degradation during peanut roasting. *Food Research International*, 97, 178-183.

Osaili, T. M., Odeh, W. A. B., Al Ayoubi, M., Al Ali, A. A., Al Sallagi, M. S., Obaid, R. S., & El Darra, N. (2023). Occurrence of aflatoxins in nuts and peanut butter imported to UAE. *Heliyon*, 9(3).

Pitt, J. I., Taniwaki, M. H., & Cole, M. B. (2013). Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives. *Food control*, 32(1), 205-215.

R Core Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.

Santos, A. C. D., Souza, A. A. D., Silva, M. V., Nerilo, S. B., Souza, A. P. M. D., Bando, É., & Machinski Junior, M. (2018). Occurrence and exposure assessment to aflatoxins in peanuts commercialized in the northwest of Parana, Brazil. *Ciência Rural*, 48.

Schirack, A. V., Drake, M., Sanders, T. H., & Sandeep, K. P. (2006). Impact of microwave blanching on the flavor of roasted peanuts. *Journal of Sensory Studies*, 21(4), 428-440.

Shephard, G. S. (2018). Mycotoxin crises: Fit-for-purpose analytical responses in the developing world. *Journal of AOAC International*, 101(3), 609-612.

Silva, A. R. D., Zanin, L. M. M., Ishikawa, A. T., Yamashita, C. R. T., Fracalossi, F. P., Amorim, T. M., ... & Hirooka, E. Y. (2018). Development of ic-Elisa for the screening of aflatoxin contamination in the peanut production chain. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 53, 361-370.

Tengey, T. K., Kankam, F., Ndela, D. N., Frempong, D., & Appaw, W. O. (2022). Growth and Toxigenicity of *A. flavus* on Resistant and Susceptible Peanut Genotypes. *Toxins*, 14(8), 536.

Torres, A. M., Barros, G. G., Palacios, S. A., Chulze, S. N., & Battilani, P. (2014). Review on pre-and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. *Food Research International*, 62, 11⁻¹9.

Trombete, F. M., Santos, T. B., Direito, G. M., Fraga, M. E., & Saldanha, T. (2014). In-house validation of a method for determining aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in wheat and wheat by-products. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 44, 255-262.

USDA. United States Department of Agriculture. World agricultural production. 2022. (USDA. Foreign agricultural service. Circular serie, WAP 2-22, February 2022). Available at.<
<https://apps.fas.usda.gov/PSDOnline/Circulars/2022/02/production.pdf>>. Accessed on: Mar 02, 2022.

WALIYAR, F.; UMEH, V.; TRAORE, A.; OSIRU, M.; NTARE, B.; DIARRA, B.; KODIO, O.; VIJAY, K.; KUMAR, K.; SUDINI, H. Prevalence and distribution of aflatoxin contamination in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in Mali, West Africa. *Crop Protection*, v. 70, p.1-7. 2015. DOI:10.1016/j.cropro.2014.12.007

Whitaker, T. B. (2003). Detecting mycotoxins in agricultural commodities. *Molecular biotechnology*, 23, 61-71.

**CAPÍTULO IV: Aflatoxin and microbial safety in commercial confectionary
peanut “paçoca” produced in São Paulo State - Brazil**

ARTIGO II

Artigo redigido para ser submetido à revista Food Control

Abstract

Occurrence of aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) was interrelated with moisture content, water activity as well as the microbial safety in confectionary peanut named 'paçoca'. The survey involved 52 'paçoca' samples, where 37 were produced by non-heat pressed process, and 15 by cooked process, both manufactured and commercialized in 27 counties in the major Brazilian producing, São Paulo state. The microbial quality was assessed by mesophilic aerobic bacteria, fungi and yeast count, probable number of thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. The intra-laboratory validated Ultra-High-Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) showed limit of quantification (LOQ) of 0.29 µg.kg⁻¹ for AFB₁ and AFG₂; 0.36 µg.kg⁻¹ for AFG₁ and 0.37 µg.kg⁻¹ for AFB₂. The recovery averages were 89.2, 83.5, 80.5 and 82.8% for AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂, respectively. Aflatoxins were detected in 71% of samples, which ranged from 0.29 to 38.8 µg.kg⁻¹ (mean, 7.06 µg.kg⁻¹). Six samples (16%) exceeded the tolerable total aflatoxin limit (AFT, 20 µg.kg⁻¹) of the Brazilian guideline. The mean AFT content in cooked 'paçoca' (19.55 µg.kg⁻¹) was higher than the levels in pressed 'paçoca' with 9.08 µg.kg⁻¹ (p<0.05). AFB₁ occurred in the highest frequency in both 'paçoca' group (75% in pressed and 60% in cooked). The mean moisture content and water activity in cooked 'paçoca' (8.86% and 0.7081, respectively) were higher than in pressed 'paçoca' (2.08% and 0.4863, respectively). Twenty-one samples (56%) showed fungal and yeast contamination ranging from 1.0 to 4.25 log CFU.g⁻¹. The total aerobic mesophilic bacteria count in cooked (4.85 log CFU.g⁻¹) was higher than in pressed 'paçoca' (2.77 log CFU.g⁻¹) (p<0.05). Thermotolerant coliforms were detected in 7 pressed samples, which ranged from 3.6 to > 1100 NMP.g⁻¹; *E. coli* was confirmed in same samples in 3.0 to 160 NMP.g⁻¹ range. *Salmonella* was detected in two pressed 'paçoca', indicating fail in hygiene, inefficient heat-treatment, and/or possible cross-contamination. The study indicated that awareness targeted on control of 'paçocas' chain in field should be added by reinforced Good Manufacturing Practices procedure in the factory process stage, to prevent aflatoxins and pathogenic microorganism exposure in community.

Terms index: Paçoca; Aflatoxin B₁; *Salmonella* sp.; *Escherichia coli*; Mold and yeast.

1. Introduction

The state of São Paulo is the major peanut producer in Brazil, responsible for 90% of the country production estimated as 892.7 thousand tons in 2022/23 crop (Conab, 2023).

Currently, 80% of Brazilian peanuts are exported to Russia, the Netherlands, Algeria and some countries in the European community (USDA, 2023; Conab, 2023), the remainder supplies the national food industry, with many agribusinesses located in the State of São Paulo. These industries produce peanut-based confectionery, including roasted peanuts, peanut butter, coated peanuts and typical Brazilian sweets called 'Pé-de-moleque', 'Pé-de-moça', and 'Paçoca' (Conab, 2023).

Aflatoxins (AFs) are mycotoxins produced as fungal secondary metabolites by genus *Aspergillus*, especially by *A. flavus*, *A. parasiticus*, with strong carcinogenicity that associated with both acute and chronic toxicity for animals and humans (Tengey et al., 2022). Aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) are the prevalent naturally occurring toxins in food and crops, with the analogues commonly detected in peanut. This low mass molecular toxin with compact cyclic chemical structure, associated with distinctively reactive carcinogenicity provides a very stable character even in a drastic roast-thermal processing that is an obligatory step in peanut-based confectioneries (Tengey et al., 2022). Therefore, the initial step of the peanut chain, which determines the safe quality of very nutrient rich grain used in processing confectioneries should be important concern, mainly due to its susceptibility for toxigenic fungal growth and further AFs production / contamination (Lemos Júnior et al., 2016).

The International Agency for Research on Cancer classified the AFB₁ in Group I, indicating its carcinogenic nature to humans (IARC, 2002). The maximum level of AFs in food should be continuously controlled, which is based on the legislation of each country. The Brazilian Health Regulatory Agency (Anvisa) established a maximum limit of 20 µg/kg of total AFs in peanut and derived products (BRASIL, 2011). Similarly, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) established maximal aflatoxin limit in 20 µg/kg States (FDA, 2021). The European Commission Regulation (EC) n°. 1881/2006 established the maximum limit of 4 µg/kg for total AFs (AFB₁+ AFB₂+ AFG₁+AFG₂),

and 2 µg/kg for AFB₁ in peanut processed derived products for direct human consumption, or intended as ingredient (European Union, 2006b).

Paçoca is a typical Brazilian candy of Indigenous origin prepared by mixing the high temperature roasted and ground peanut with sugar, salt and other peculiar ingredients, with some recipes including corn flour, cassava starch and glucose syrup, and commercialized in various formats, commonly as square or cork shape (Iha et al., 2016; Lemos Júnior et al., 2016; Nascimento et al., 2018). According to the production, the two types can be defined as non-heating pressed '*paçoca*', where the roast-ground peanut is mixed with other ingredients (sugar, cassava flour and salt), immediately pressed to commercialized format and packaged, resulting in a soft and breakable confection. The other type is cooked '*paçoca*', where the roast-ground peanut is mixed with glucose syrup, sugar, water, and submitted to a second heat treatment, i.e., subjected to additional cooking under continuous mixing until sugar crystallization; it is placed on table, and completely crystallized product is cut, cooled, and packaged (Carminati et al., 2016).

Occurrence of AFs in peanut confectioneries produced and commercialized in Brazil has been a recurrent problem (Caldas, Silva, Oliveira., 2002; Glória et al., 2006; Iha et al., 2016; Lemos Junior et al., 2016). Moreover, the peanut processing chain involves handling step, where the asymptomatic manipulators can contaminate the product with some pathogenic bacteria such as *Salmonella* (Carminati et al., 2016). In this context, the indicator microorganisms can approach a predictable hygienic condition; specific *Enterobacteriaceae*, yeasts and / or molds, total aerobic mesophilic count overcoming limits is an indicator of poor hygiene or occurrence of pathogens (ICMS, 2011; Halkman & Halkman., 2014). The Commission for Microbiological Food Specifications (ICMS, 2011) considers it essential to check *Salmonella* in raw materials, processing environments and final products. Other *Enterobacteriaceae* should also be checked (coliforms and *E. coli*) as indicative of deviations in hygiene control (ICMSF 2011; Carminati et al., 2016).

This survey aimed to determine the overall safety situation of peanut product '*paçoca*' (pressed and cooked) consumed in Brazilian community by assessing the occurrence of aflatoxins interrelated with moisture content, water activity as well as the

microbial contamination (pathogenic *Salmonella*, *Escherichia coli*, molds & yeasts, and total aerobic mesophyll count). The study was targeted on popular confectionary 'paçoca' produced and commercialized in the major Brazilian peanut producing São Paulo state, Brazil.

2. Experimental section

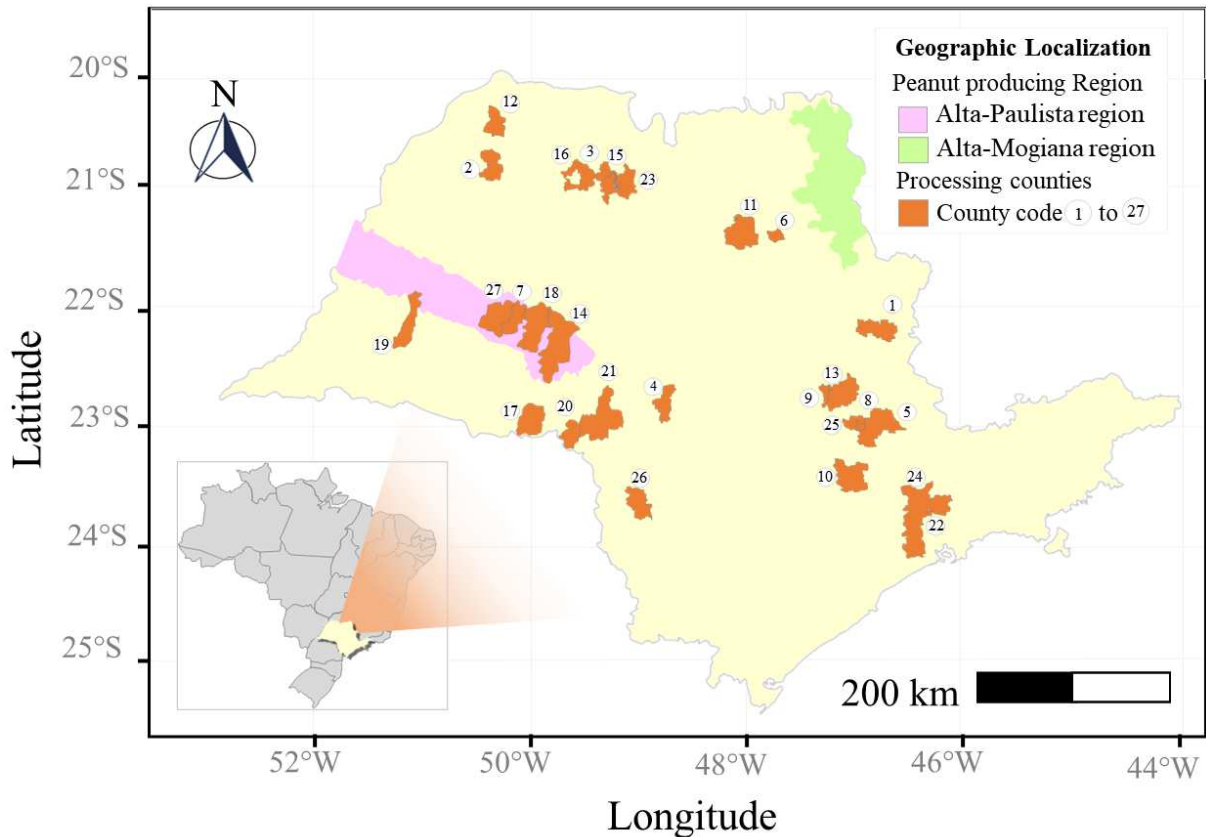
2.1. Materials and Reagents

The reagents and chemicals used were: anhydrous magnesium sulfate (MgSO₄) P.A. grade, methanol and acetonitrile HPLC and UPLC grade (J.T Baker, USA); Hexane (Synth, Brasil); standard Aflatoxins Total (Wako Pure Chemical Industries Ltd – Japan); octadecyl (C18) (Sigma-Aldrich, USA); formic acid HPLC grade (Fluka, Germany); ultrapure water from the 107 Mili-Q purification system (Elga LabWater, UK); Peptone water buffered (Merck, Germany); Plate Count Agar (PCA), Potato Dextrose Agar (PDA), Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD), Hektoen Enteric Agar (HE), EC Broth, Lauryl sulfate broth, Eosin Methylene Blue Agar Levine and MR-VP Broth (Kasvi, Italy); Simmons Citrate Agar and Triple Sugar Iron Agar (TSI) (Kasvi, Espanha); Rappaport-Vassiliardis R10 Broth and Tetrathionate Broth Base (Difco, USA); tartaric acid and potassium iodide P.A (Dinâmica, Brazil); Iodine (Hades Química, Brazil), Kovacs Indole Reagent (Laborclin, Brazil); Difco Salmonella H Antiserum Poly a-z (Difco, USA).

2.2. Samples

A total of 52 samples of peanut confection (*paçoca*) industrially produced and commercialized in the state of São Paulo, were purchased from specialized sweets stores from July 2018 to August 2019. Samples were collected in twenty-seven counties in the state of São Paulo, as shown in Figure 1. Sampling at collection points was performed as proposed by Glória et al., (2016). At each point of commercialized, one or more batches of products on display, holding packages with a minimum of 50 g and a maximum of 250 g, were randomly chosen, totaling at least 1000 g per sample.

In this study, for discussion purposes, the total samples (n=52) were classified according to the difference in the production process in pressed *paçocas* (n=37) and cooked *paçocas* (n=15).



*** County (n = samples collected)**

- ①* Aguaí (n=2), ② Auriflama (n=1), ③ Bálamo (n=1), ④ Borebi (n=1), ⑤ Campinas (n=3), ⑥ Dumont (n=1), ⑦ Herculândia (n=1), ⑧ Hortolândia (n=1), ⑨ Iracemápolis (n=1), ⑩ Itú (n=1), ⑪ Jaboticabal (n=1), ⑫ Jales (n=2), ⑬ Limeira (n=1), ⑭ Marília (n=12), ⑮ Mirassol (n=1), ⑯ Monte Aprazível (n=2), ⑰ Palmital (n=1), ⑱ Pompéia (n=1), ⑲ Presidente Prudente (n=1), ⑳ Ourinhos (n=1), ㉑ Santa C. Rio Pardo (n=1), ㉒ São Caetano do Sul (n=1), ㉓ São José do Rio Preto (n=2), ㉔ São Paulo (n=4), ㉕ Sumaré (n=1), ㉖ Taquarituba (n=2) and ㉗ Tupã (n=5).

Fig. 1. Geographic localization of Peanut producing regions and sampling counties, São Paulo state - Brazil.

The sample packages were sanitized with 70% alcohol and the samples were aseptically homogenized to remove an aliquot of approximately 200 g for immediate microbiological analysis and determination of moisture content and water activity. The remainder of each sample was packed in individual packages (polypropylene bags) identified as to origin (manufacturer, type of *paçoca*, date of acquisition and expiration

date) and submitted to storage in a freezer at -18 °C for subsequent analysis of aflatoxins.

2.3. Determination of water activity and moisture content

The water activity (A_w) of 'paçoca' samples was measured in triplicate using a water activity meter (MOD 137 4TE water activity meter, Aqualab Decagon Devices®, Pullman, USA). The moisture content was determined by drying at 105 °C in triplicate until reaching constant weight (MOD NV 1.5 chamber, Nevoni, SP-Brazil) (IAL, 2005).

2.4. Microbiological analysis

The Most Probable Number (MPN) of thermotolerant coliforms and *E. coli* were determined according to the American Public Health Association APHA 9:2015 methodology (Kornacki et al., 2015). Then 25 g of sample was diluted in 225 g of peptone water, proceeding with dilutions up to 10^3 in the same diluent. In the presumptive test, 1 mL of each dilution was inoculated in triplicate, in 10 mL of Lauryl Sulfate Tryptose Broth (LST) and incubated at 35 ± 0.5 °C/24-48 ± 2h. A loop of LST Tubes with growth and gas production was transferred to tubes containing *E. coli* Broth and incubated at 45.5 ± 0.2 °C/24 ± 2h in a water bath. The confirmation of *E. coli* was carried out from the streaking of each positive tube on plates with Levine Eosin Methylene Blue Agar (L-EMB) incubated at 35 °C/18-24h. Typical colonies were maintained on Citrate Test, Voges–Proskauer Test and Methyl Red, Indole Test and Gram Stain.

The count of Molds and Yeasts was performed in duplicate by plating on the surface in acidified Potato Dextrose Agar incubated at 25 °C for 7 days, according to the APHA 21:2015 methodology (Ryu & Wolf-Hall, 2015). The count of aerobic mesophilic bacteria was performed in duplicate by plating on the surface in Standard Agar for Counting (PCA). PCA plates were incubated for 48 ± 2 h at 35 ± 1 °C, according to the APHA 08:2015 methodology (Ryser & Schuman, 2015).

Salmonella analysis was performed according to the ISO 6579:2002 method. 25 grams of samples were weighed in 225 mL of Buffered Peptone Water for non-selective pre-enrichment step for 18 h at 37 °C. Following the incubation, for selective enrichment step 0.1 mL and 1mL were transferred to 10 mL of Rappaport Vassiliadis Broth and 10 mL of Tetrathionate Broth and incubated at 41.5±1 °C and 37±1 °C for 24±3 h, respectively. After incubation a loopful were streaked on both Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar and Hektoen Enteric Agar and incubated at 37 °C for 24-48 h. Presumptive colonies were transferred to nutrient agar plates and incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, the cultures were submitted to tests for fermentation of glucose, hydrolysis of urea, decarboxylation of lysine, production of β-galactosidase, production of acetoin (Voges–Proskauer test) and indole. Cultures were also submitted to agglutination reaction using *Salmonella* polyvalent antisera (Difco, USA).

2.5. Aflatoxin analysis

2.5.1. Extraction and purification

The sample clean-up was based on QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) extraction proposed by Juan et al., (2017) with some modifications. A 5.0 g (±0.1) sample was mixed with 7.5 mL of acetonitrile, 4 g of MgSO₄, and 100 mg of octadecyl (C₁₈), vortexed for 3 min, and centrifuged for 3 min at 4500 rpm (2260 g). The upper layer (5 mL) was submitted to a dispersive SPE clean-up with a mixture of 900 mg of MgSO₄ and 70 mg of C₁₈, vortexed for 30 s and centrifuged for 1 min at 4500 rpm (2260 g). Then, 2 mL of the upper layer was cleaned twice in hexane (1:1 v/v) and dried at 35 °C under a nitrogen stream. The extract was reconstituted in 500 µL of acetonitrile/water (50:50 v/v), vortexed for 1 min, and filtered in polyvinylidene fluoride syringe filters (PVDF, 0.22 µm, 13 mm).

2.5.2. Chromatographic conditions

To determine AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂, a LC-MS/MS system (Acquity UPLC, Waters, USA) was used. Samples were analyzed in duplicate. The

chromatographic separation was performed using an Acquity UPLC BEH C18 reverse-phase analytical column (2.1 mm x 50 mm, 1.7 μm particle size, Waters, Milford, MA, USA) maintained at 40 °C and with an injection volume of 10 μL . The mobile phase was a time-programmed gradient using 0.1% formic acid in ultrapure water as phase A, and 0.1% formic acid in acetonitrile as phase B at a flow rate of 0.4 mL min^{-1} . The gradient started with an equilibrating for 3 min at 90-10% B, 90-10% B for additional 3 min, 30-70% B in 10 min, 10-90% B for 2 min and 90-10% B for 3 min, totalizing 15 min. The system was coupled with a triple quadrupole mass spectrometer (TQD, Waters, USA). MS detection was performed in a multiple reaction monitoring mode (MRM) at electrospray ionization (ESI) in positive mode (ES+); a capillary voltage of 4 kV, a desolvation temperature of 450 °C, a source temperature of 120 °C and a desolvation gas flow rate of 800 L min^{-1} . Nitrogen was used as the spray gas. Operating in the MS/MS mode, the collision gas used was Argon with a pressure of approximately 4×10^{-3} mbar in the collision cell (0.15 mL min^{-1}). Automatic dwell times were used. The selected MRM transitions for precursor and product ion (m/z) were respectively: 313.2 > 241.1 and 313.2 > 285.1 for AFB₁; 315.2 > 259.1 and 315.2 > 287.1 for AFB₂; 329.2 > 243.1 and 329.2 > 283.1 for AFG₁ and 331.2 > 245.1 and 331.2 > 257.1 for AFG₂. The cone voltage (V) was settled at 50 V for AFB₁, AFB₂ and AFG₂, while AFG₁ was settled at 45 V. The collision energy (V) applied was 36/24, 30/26, 25/25 and 30/30 for both pairs of mass of each aflatoxin, respectively. The retention time was 7.53 min, 7.22 min, 7.20 min and 6.82 min for AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂, respectively. Then, a Mass Lynx (Mass Lynx v. 4.1, Waters, Manchester, UK) software was used for data acquisition and processing.

2.5.2.1. *Intra-laboratory validation*

For analytical quality assurance purposes, the method was validated according to the guidelines established by the Brazilian Metrology Institute (INMETRO, DOC-CGCRE-008, 2020). The linearity, sensitivity (limit of detection – LOD; and limit of quantification LOQ) intra- and inter precision, and accuracy (as recovery) were evaluated, based on the maximum tolerable limit in peanut established by Brazilian legislation (BRASIL, 2011).

2.6. Data analysis

The results of the analysis of water activity, moisture content and aflatoxin levels were expressed as mean, standard deviation, minimum, maximum and median contamination, being analyzed using variance analysis (ANOVA). Standard counts of aerobic mesophilic bacteria, molds and yeasts were expressed in log CFU/g. Differences between the mean moisture content, water activity, mesophilic aerobic bacteria count, mold and yeast count of cooked and pressed '*paçoca*' were evaluated using the t-test with *Tukey's* adjustment, at a significance level of 0.05. The software used was Statistica version 10.0 (StatSoft, USA). Pearson's correlation analysis was applied to determine the linear association between the variables (aflatoxins, moisture content and water activity). These analyzes were performed in the statistical software R (R Core Team, 2022) with the *corrplot* package (Wei & Simko, 2021).

3. Results and Discussion

3.1. Intra-laboratory validation

The reliability of the results was assured by carrying out the analytical validation of the method for aflatoxin analysis. The main results of the validated method are described in Table 1. The analytical method used for the extraction of aflatoxins in '*paçoca*' is considered economical because it does not use an immunoaffinity column. Among the analyzed parameters, the linearity was evaluated by a non-matrix curve prepared with a standard solution of aflatoxin mixture (Makor Chemicals, Israel) diluted in acetonitrile/water (50:50 v/v). The curves were plotted with seven points: 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 and 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for AFB₁ and AFG₁ and 0.46, 0.93, 1.87, 3.50, 7.50, 15 and 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ for AFB₂ and AFG₂ and injected in triplicate. The coefficient of determination (R^2) was evaluated for each curve (INMETRO, 2020), and the results were satisfactory due to values greater than 0.99 for each aflatoxin. However, the application of a correction value to correct the areas obtained in each sample was

necessary to minimize matrix effects. The correction values were: 0.9 for AFB₁ and AFG₁ and 0.8 for AFB₂ and AFG₂, respectively.

Table 1. Intra-laboratory validation of aflatoxin analysis in ‘Paçocas’ by UPLC-MS/MS.

Toxins	Parameters							
	Linearity (R ²)	Sensibility		Spiked aflatoxins (µg.kg ⁻¹)	Recovery		Precision	
		LOD	LOQ		Mean ± SD	(%) ⁽¹⁾	Intra- assay (%) ⁽²⁾	Inter- assay (%) ⁽³⁾
AFB ₁	0,9948	0,10	0,29	0,8	0,71 ± 0,01	88,8	6,5	11,8
				8,0	7,37 ± 0,37	92,1		
				18	15,6 ± 0,44	86,6		
AFB ₂	0,9915	0,12	0,37	1,3	0,98 ± 0,06	75,3	7,8	11,2
				3,0	2,66 ± 0,26	88,7		
				13	11,53 ± 0,12	86,9		
AFG ₁	0,9957	0,12	0,36	0,8	0,62 ± 0,03	77,5	7,9	11,2
				8,0	6,60 ± 0,37	82,5		
				18	14,7 ± 0,45	81,6		
AFG ₂	0,9982	0,10	0,29	1,3	1,04 ± 0,05	80	9,6	12,1
				3,0	2,71 ± 0,09	90,3		
				13	10,17 ± 0,26	78,2		

(1) Relative standard deviation (RSD%): three data in seven replicates.

(2) Relative standard deviation (RSD%): a data in seven replicates for each concentration.

(3) Relative standard deviation (RSD%): three data in seven replicates for each concentration on different days.

The sensibility was estimated by a limit of detection (LOD = 3.3 s/b) and a limit of quantification (LOQ = 10 s/b), where “s” is the standard deviation of the lowest level, and “b” is the slope of the calibration curve (INMETRO, 2020). Recoveries assays were determined at three different concentration levels of the analytical curve. Therefore, 5.0 g of mixed (pressed and cooked ‘paçoca’ types) blank samples were spiked with aflatoxin standard solution before extraction, each one performed in triplicate with 0.8, 8.0 and 18.0 µg.kg⁻¹ for AFB₁ and AFG₁ and 1.3, 3.0 and 13.0 µg.kg⁻¹ for AFB₂ and AFG₂. The accuracy results expressed in recovery percentage were acceptable for all aflatoxins in accordance with the 40 – 120% range for concentrations of 1 ppb (INMETRO, 2020). Data showed a recovery of 75.3 and 92.1% of minimum and

maximum values. The same mixed samples were also used to determine the precision, evaluated by determining the repeatability, which was the assay of three concentrations in seven replicates on the same day (intra-assay), followed by such analysis on three different days (inter-assay). Repeatability ranged from 2 to 11%, and intermediate precision from 9 to 11%. Despite the variation, the results agree with the value of up to 30% proposed by Inmetro (INMETRO, 2020). Therefore, the extraction and analytical method showed satisfactory reproducibility and effective recovery, sensitivity, and linearity.

3.2. Occurrence of aflatoxins in “paçoca”

The Table 2 showed the occurrence of 71% of AFT in ‘paçoca’, when 52 samples were analyzed, with 37 contaminated with at least one of aflatoxins with levels >LOQ. AFB₁ was the predominant mycotoxin with 37 samples (71%) at levels ranging from 0.29 to 16.0 ng/g, with median and mean of 3.63 µg.kg⁻¹ and 5.85 µg.kg⁻¹, respectively. Within AFB₁ positive samples, 14 (37%) exceeded the maximal tolerated by European Union of 2 µg.kg⁻¹ (European Union, 2006a). The AFT in positive samples ranged from 0.29 to 38.8 µg.kg⁻¹ (median of 2.18 µg.kg⁻¹ and mean 7.06 µg.kg⁻¹), with six (16%) exceeding the Brazilian tolerable AFT limit of 20 µg.kg⁻¹ (Anvisa, 2011).

Table 2. Occurrence of aflatoxin (µg.kg⁻¹) in total ‘paçocas’ (n=52) sampled in 27 counties of the São Paulo state, Brazil.

	Positives (%)	AFLATOXIN (µg.kg ⁻¹)				
		Mean ± SD	Median	Min. – Max.	> limit of Legislation	
					Regulation EC*	Brazil**
AFB₁	37 (71)	5.85 ± 5.29	3.63	0.29 - 16.0	14	N.A.
AFB₂	30 (57)	2.07 ± 1.25	1.25	0.37 - 7.17	N.A.	N.A.
AFG₁	32 (61)	4.60 ± 4.48	3.43	0.36 - 13.7	N.A.	N.A.
AFG₂	29 (55)	2.65 ± 2.39	1.60	0.29 - 9.0	N.A.	N.A.
AFT^a	37 (71)	7.06 ± 9.25	2.18	0.29 - 38.8	15	6

^a AFT = AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂. * European Commission Regulation: limit of 4 µg.kg⁻¹ for total AFs and 2 µg.kg⁻¹ for AFB₁ (EC n°1881/2006).

** National Health Surveillance Agency: limit of 20 µg.kg⁻¹ for total AFs (ANVISA, 2011).

N.A.: Not applicable.

When *paçoca* was classified in two groups (Table 3) according the manufacturing process named pressed (n=37) and cooked (n=15), the occurrence of AFT contamination was 75 and 60%, respectively. The mean AFT in cooked *paçoca* (19.55 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) was higher than in pressed (9.08 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), with highest occurrence of AFB₁ in both groups (75% pressed and 60% cooked, p<0.05). The cooked *paçoca* showed higher average concerning contamination of AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFT, with means values of 9.43, 1.74, 6.47 and 19.55 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectively. The mean values of contamination for AFB₁, AFG₂ and AFT were significantly different, when compared between the two *paçoca* groups (p <0.05).

Caldas, Silva, and Oliveira (2002) analyzed 41 *paçocas* and peanut candy samples commercialized in the Federal District Brasilia, which were produced with peanut from the São Paulo state, 1998 to 2001; 21 (51%) showed AFT from 25.0 to 1710 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, corresponding to 85-fold the maximum Brazilian tolerable limit.

Table 3. Occurrence of aflatoxin in pressed and cooked *paçoca* produced with peanut of the São Paulo state, Brazil.

	AFLATOXIN ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)							
	Pressed (n=37)				Cooked (n=15)			
	Positives (%)	Mean	Median	Max	Positives (%)	Mean	Median	Max
AFB₁	28 (75)	4.65 ^a	3.16	16.03	9 (60)	9.43 ^b	10.56	12.87
AFB₂	22 (59)	2.26 ^a	1.39	7.17	8 (53)	1.74 ^a	1.12	4.37
AFG₁	24 (64)	3.82 ^a	1.59	13.39	8 (53)	6.47 ^b	6.67	13.76
AFG₂	21 (56)	3.07 ^a	3.08	9.0	8 (53)	1.91 ^a	1.33	4.98
AFT*	28 (75)	9.08 ^a	4.65	38.8	9 (60)	19.55 ^b	19.68	35.98

* AFT = AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂.

^a Means followed by different letters show a significant difference by Tukey's test, at the 5% level (p<0.05) (Pressed x Cooked).

The contamination showed in Table 2 and 3 was lower than Gloria et al (2006), when 135 *paçoca* samples were analyzed in Piracicaba county-, years 2002 to 2003; 61 (45%) showed AFT levels ranging from 1.0 to 346.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, with 18 (29%) exceeding the limit of 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. In 2001, the major Brazilian peanut companies launched the "Pró-amendoim" seal program, a self-regulation focused on prevention and monitoring of aflatoxin in peanut chain, to introduce national and international quality standard (Kujibda et al., 2019). The Brazilian National Health Surveillance

Agency (Anvisa, Ministry of Health – BR) also recognized specific legislation for Industrializing Establishments of Processed Peanuts (Resolution RDC No. 172, of July 4, 2003) (Anvisa, 2003). In 2011, the same agency expanded the monitoring of other mycotoxins in various food categories (Resolution RDC n.7 of February 18, 2011) (Anvisa, 2011), remain the AFT limit at $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ in peanuts and peanuts products.

Efforts to improve the quality of the Brazilian peanut chain have positively reflected increasing exports to European Union countries (CONAB, 2023), where the strictness regarding the maximum tolerated limits of aflatoxins is greater than in Brazil. The levels of contamination detected and described in the literature in studies checking peanuts, the main raw material to produce *paçocas*, also decreased (Atayde et al., 2012; Martins et al., 2017; Silva et al, 2018; Martins et al, 2023).

The aflatoxins detected in *paçocas* in this study (mean AFT) was similar to that reported by Oliveira et al (2009); In the period from 2006 to 2007, the authors analyzed 48 samples of *paçocas* commercialized in cities in the state of São Paulo, of these samples, 72% (n=35) had an average AFT of $9.0 \pm 1.6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ and 8% (n=4) exceeded the limit of $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (Oliveira et al., 2009). The maximum AFT value detected in this study ($38.8 \mu\text{g.kg}^{-1}$) was similar the described by Lemos et al., (2016). Of 72 samples of *paçoca* commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 37% (n=27) showed AFT at levels from 4.9 to $39.6 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

3.3. Water activity and moisture content

Figure 2 shows the box-plots of the average values of moisture content (A) and water activity (B) of samples of pressed *paçoca* (PP) and cooked *paçoca* (CP). The CP samples showed higher mean values of moisture and water activity than those of PP. The average moisture content (Fig. 2A) of CP was 8.88 ± 1.16 (median of 9.24%) and of PP was 2.08 ± 0.84 (median of 1.94%) with a statistically significant difference ($p < 0.05$). The same occurred with the water activity values (Fig. 2B), CP had a mean of 0.7081 ± 0.3910 (median 0.7077) and PP 0.4863 ± 0.0579 (median 0.4934) ($p < 0.05$). The mean aw of CP in this study (0.7081 ± 0.3901) was identical to that found by Carminatti et al. (2016), who examined ten samples of this type of '*paçoca*',

revealing mean aw values of 0.746 0.3920. The aw described by the authors in pressed *paçoca* (0.299 ± 0.085) was lower than that found in this study (0.4863 ± 0.0579).

The significant difference in the average of moisture content and water activity between two types of *paçocas* was due to difference in manufacturing process and ingredients ($p = 0,003$). While the pressed *paçoca* was processed blending dry and raw ingredients with roast-ground peanut, the cooked type was also added with water, producing crystallized *paçoca* with higher moisture content (Carminati et al., 2016).

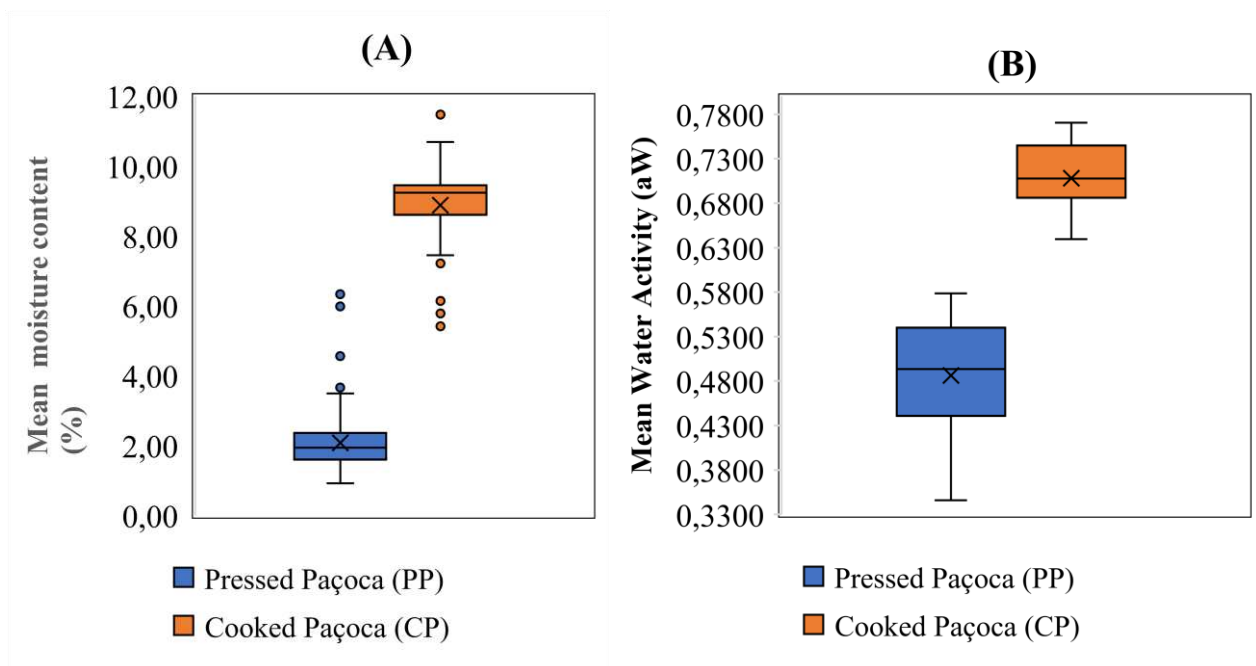


Fig. 2. Box plot of the content moisture (A) and water activity (B), in pressed (PP) and cooked ‘paçoca’ (CP). x is the media, 75th and 25th percentile is denoted by box and median is the line inside the box.

Water activity and moisture content are critical and limiting factors for the growth of the genus *Aspergillus* sp., and consequent production of aflatoxins. The minimum water activity for *A. flavus* growth is 0.78 in the optimal temperature at 33 °C, while *A. parasiticus* is 0.80 at 37°C (Pitt & Hocking, 2009). Nakai et al. (2008) reported optimal conditions for the growth of *A. flavus* and *A. parasiticus* in peanuts at 30-33 °C, relative humidity of 83 – 85%, water activity of 0.83 -0.97 and moisture content > 14%. Although the samples of CP presented mean values of aw greater (0.7077) than the PP (0.4863), none of the samples exceeded the value of 0.78 and 0.80, the minimum for the

development of *A. flavus* and *A. parasiticus*, respectively (Pitt & Hocking, 2009). Water activity values above 0.78 may be related to the possible growth of aflatoxigenic fungi in *paçocas* during retail, in case of fungal contamination of peanuts after roasting, or contamination during packaging; considering that *A. flavus* has low resistance (D_{52} of 40-45 min and D_{60} of 1 min, with a z value in the range of 3.3 to 4.1 °C) (ICMSF, 1996; Pitt & Hocking, 2009) and are inactivated by the peanut roasting temperatures usually used in Brazil (150 °C / 1 h) (Carminati et al., 2016; Martins et al., 2017).

Figure 3. demonstrates *Pearson's* correlation coefficients for total aflatoxins, AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, moisture content and aw in PP and CP. There was no strong direct correlation between moisture content, water activity and the occurrence of aflatoxins in the two types of '*paçocas*' analyzed (PP and CP). This indicates that the moisture content and aw of the ready-to-eat product were not determinant in the occurrence and incidence of aflatoxins. Contamination of peanuts by aflatoxins can occur at various stages of the production chain; however, susceptibility is greater in the initial stages of processing, even during planting, harvesting, transport, drying and storage, when grains have high levels of moisture. and water activity (Pitt & Hocking, 2009).

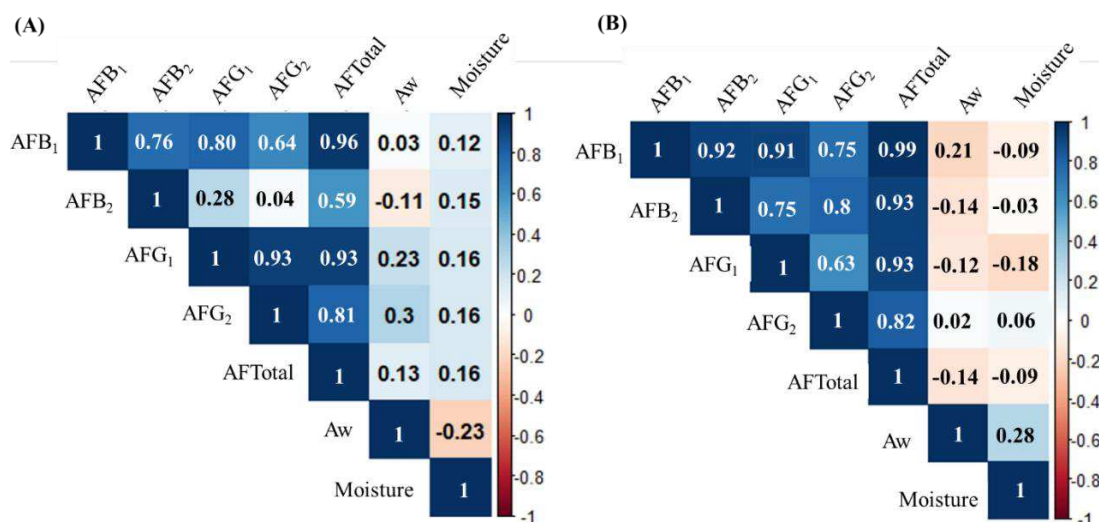


Fig. 3. Pearson correlation coefficients for AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, Total aflatoxins, moisture content and water activity in cooked (A) and pressed (B) '*paçoca*'.

Silva et al., (2018), demonstrated that the water activity and moisture content had no direct correlation with the aflatoxin contents of processed and blanched peanuts. The correlation coefficients observed between total aflatoxins and AFB₁ assumed a positive direct relationship of 0.96 (Fig. 2 A) and 0.99 (Fig. 2 B), for CP and PP, respectively, demonstrating that aflatoxin is the one with the highest incidence and occurrence.

Considering that AFB₁ carcinogenic effect in humans (Aflatoxins, 2002), the higher incidence of this mycotoxin suggests the need for greater control or the establishment of a specific maximum limit for this aflatoxin in peanuts, as is the case in other countries.

3.4. Microbiological Quality

3.4.1. Molds and yeasts and Total Count Bacteria

Table 4 shows occurrence, incidence (number of positive samples), count range of molds and yeasts and aerobic mesophilic bacteria in a sample of 'paçoca', according to the production process (pressed, n=37 and cooked, n=15). Populations of molds and yeasts and aerobic mesophilic bacteria were expressed as mean log CFU/g of 'paçoca' sample under the assumption of a log normal distribution for plate counts.

Table 4. Occurrence and count of Molds and yeasts and Aerobic mesophilic bacteria in pressed 'paçoca' (n=37) and cooked (n=15).

Type of 'Paçoca'	Samples (n)	Molds and Yeasts (log cfu.g ⁻¹) **		Aerobic mesophilic bacteria **	
		No. of positive (%)	Range count in positives (mean)	No. of positive (%)	Range count in positives (mean)
*PP	37	21 (56)	1.0 to 4.10 (3.30) ^a	32 (86)	1.0 to 6.25 (4.85) ^a
*CP	15	4 (26)	1.0 to 4.25 (3.10) ^b	11 (73)	1.0 to 3.55 (2.77) ^b

* PP: Pressed *Paçoca*; CP: Cooked *Paçoca*.

** log cfu.g⁻¹: Colony Forming Unit per gram of sample

^{a, b}: Values marked with different letters in the same column are significantly different (p<0,05).

Of the total of 37 samples of PP analyzed, 21 (56%) showed contamination by molds and yeasts, ranging from the limit of detection (1.0 log CFU/g) to 4.05 log CFU/g (mean 3.30 log CFU/g). Of the 15 CP samples, 4 (26%) exceeded the detection limit, ranging from 1.0 to 4.25 log CFU/g (mean 3.10 log CFU/g). The number of molds and yeasts in PP was higher than in CP, and the difference was statistically significant ($p < 0.05$). The total count of aerobic mesophilic bacteria in PP (4.85 log CFU/g) was also higher than in CP (2.77 log CFU/g) ($p < 0.05$). The presence of molds and yeasts, as well as the total count of aerobic mesophilic bacteria in high quantities in food are indicative of unsanitary conditions, product multiplication due to inadequate heat treatment or excessive contamination of the raw material, and result in a decrease in the shelf life of peanut-based products (Martín et al., 2018).

The difference in contamination by molds and yeasts and mesophilic aerobic bacteria between the types of *paçoca* can be explained by the extra heat treatment used to produce CP. In this type of process, in addition to the initial roasting, the ingredients are heated for approximately one hour at 110 – 120 °C (Carminati et al., 2016). Another factor can be attributed to the effectiveness of using potassium sorbate as an additive. Despite the higher average moisture content and water activity of the CP compared to the PP; it was possible to verify that 94% (14 of 15) of the cooked *paçoca* samples mentioned the use of potassium sorbate as a preservative on the labels. In the samples of pressed *paçoca*, only 10% (4 of 37) described the use of this additive.

Potassium sorbate, calcium sorbate are salts of sorbic acid. It is used as a food additive due to its low toxicity to mammals, and it is also used in foods and beverages to prevent fungal infections (Brunner, 1985). It effectively controls many fungi, such as *Aspergillus niger* and *A. flavus*, as well as certain yeasts and bacteria (Dunkel and Read, 1991). Normative Instruction No. 60 of the National Health Surveillance Agency (Anvisa) does not establish the standard for molds and yeasts for *paçocas*; however, it establishes for other food categories, such as nut bars, almonds, peanuts, and edible seeds with or without added other ingredients, and can be used as a parameter (Anvisa, 2019). According to this legislation, a count of 2.70 logs CFU/g of molds and yeasts for the indicative sample (equivalent to 5.0×10^2 CFU/g) represents acceptable quality. Values greater than 4.0 log CFU (10^4) are of unacceptable quality.

Of the 37 samples of PP, 1 (2%) had more than 4.0 log CFU. Of the 15 samples of CP, none exceeded the limit of 4.0 log CFU. This legislation does not establish a standard for counting aerobics in paçocas, however, high counts (> 4.0 log CFU) in confectionery products may show failures in hygiene, heat treatment and processing conditions (Ryser & Schuman, 2015). Only one sample of PP exceeded this mesophilic aerobic bacteria count (6.25 log CFU), indicating failure in hygiene conditions and possible processing. This is a factor that can reduce the shelf life of the product, as all samples were acquired and analyzed in the first month from the date of manufacture.

3.4.2. Thermotolerant Coliforms, *E. coli* and *Salmonella*

The Most Probable Number (MPN) of thermotolerant coliforms, *E. coli*, and *Salmonella* sp. in 'paçoca' samples, according to the production process (pressed, n=37 and cooked, n=15) is shown in Table 5. Of 37 samples of PP analyzed, thermotolerant coliforms were recovered in 7 (19%) ranging from 3.6 to > 1100 MPN/g, and one of the samples showed high contamination (>1100 MPN/g). *E. coli* was isolated from seven samples of PP, with a range of 3.0 to 160 MPN/g. A sample exceeded 10 MPN/g; the maximum limit tolerated by Brazilian legislation for indicative samples (BRASIL, 2019).

Table 5. Occurrence and most probable number per gram of Thermotolerant coliforms, *E. coli* and *Salmonella* in pressed (n=37) and cooked paçoca (n=15).

Type of 'Paçoca'	Samples (n)	Thermotolerant coliforms ^a		<i>E. coli</i> ^a			<i>Salmonella</i> ^b
		No. of positive (%)	Range MPN in positives	No. of positive (%)	Range MPN in positives	Above legislation ^c (%)	N°. of positive (%)
PP*	37	7 (19)	3.6 to >1.100	7 (19)	3.0 to 160	1 (2)	2 (5)
CP	15	0	-	0	-	-	0

* PP: Pressed Paçoca; CP: Cooked Paçoca.

^a MPN/g: Most probable number per gram. ^b Presence or absence in 25g.

^c Instruction Normative N.60 of December, 23rd, 2019 (ANVISA, 2019).

Until 2019, in Brazil, only thermotolerant coliforms and *Salmonella* sp. were used as microbiological standards to indicate the hygienic-sanitary conditions of this

food category. Current Brazilian legislation eliminated the requirement for monitoring thermotolerant coliforms and started to implement a microbiological standard for *E. coli* and *Salmonella sp.*, preserving the maximum tolerated limit of 10 MPN/g or 10 CFU/g for *E. coli* and the absence of from *Salmonella sp.* in 25 grams (BRASIL, 2019).

Salmonella sp. was detected in two samples of PP. The results suggest the possibility of an initial count of these microorganisms in peanuts, failure in the roasting heat treatment, or cross-contamination in processing plants (Nascimento et al., 2018). The presence of this microorganism in final products would indicate contamination after processing (Carminati et al., 2016). The intensity of heat treatment used in the roasting process is considered an important control point to minimize initial microbial contamination (ICMSF, 2011).

The peanut roasting process varies according to the equipment used and the characteristics of the final product, being used at 160°C for 60 min. (Woodroof, 1983). In CP, in addition to the initial peanut roasting process, ground roasted peanuts are cooked together with sucrose, glucose syrup and water until the sucrose crystallization. This additional thermal treatment used in the manufacturing process of CP explains the absence of contamination by thermotolerant coliforms, *E. coli* and *Salmonella sp.*, when compared to PP.

Similar contamination was reported by Nascimento et al., (2018) when assessing the prevalence and contamination by *Salmonella*, *E. coli* and *Enterobacteriaceae* in the peanut production chain in Brazil. The authors examined 129 samples of peanuts after harvest, 185 in secondary processing, and 100 in the retail market, including 26 samples of 'paçoca' and other products (roasted peanuts, boiled peanuts, coated peanuts, peanut butter, *pé-de-moleque* and *pé-de moça*).

The peanut confection samples (coated peanut, *pé-de-moleque* and *pé-de-moça*) that underwent an additional heat treatment, typical of the production process, were not contaminated with *Enterobacteriaceae*, *E. coli* or *Salmonella*. However, the authors reported high counts of *Enterobacteriaceae* in post-harvest peanut samples and at the end of secondary processing, where 16% of the samples were still contaminated with this group of microorganisms. *Salmonella* was detected in 9

samples (2.2%), 6 post-harvest, 2 secondary processing stage and 1 retail (peanut butter sample) which also tested positive for *E. coli*.

According to Li *et al.* (2013), *Salmonella* is unable to grow at a_w below 0.94. The presence of these bacteria in the PP samples analyzed in this study indicates that a_w was not a limiting factor. The average value of a_w was 0.4863 ± 0.0579 , and the median value was 0.4934 (item 3.3). This information is significant for the food industry and demonstrates that *Salmonella* has been identified in peanut products with low water activity (Nascimento *et al.*, 2018) and has been associated with outbreaks (CDC, 2009, 2007). Furthermore, several studies have reported *Salmonella* survivability for long periods in low water activity products (Nummer, Shrestha, Smith., 2012; Kataoka, Enache, Black., 2014; Nascimento *et al.*, 2018). The high fat content and low water activity in peanuts results in an increase in *Salmonella* heat resistance (ICMSF, 2011). The osmotic stress induced by low a_w results in the activation of defense mechanisms within the microbial cell, resulting in the production of solutes such as proline, trehalose, and glutamine. Increasing the intracellular concentration of these compounds results in a greater thermal and osmotic resistance (Cánovas *et al.*, 2001).

Nascimento *et al.* (2018) conducted an evaluation of the survival of *Salmonella typhimurium* ATCC14028 in various peanut products that were stored at 28 °C for 420 days, including 'paçoca' samples. The results indicated that *Salmonella* survived beyond shelf life in peanut products (>420 days), mainly in products with an a_w of around 0.4. The viability of *Salmonella* population in paçoca was demonstrated to exceed the detection limit (1 CFU/g) throughout the study period (420 days). Paçocas samples inoculated with *Salmonella* at concentrations of 3.0 and 6.0 log CFU/g showed a small rate of decline, with counts of 1.1 and 3.1 log CFU/g after 14 and 420 days.

Carminati *et al.* (2016) studied *Enterobacteriaceae*, coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* in three peanut derivatives processing companies. The study involved analyzing the peanut used as an ingredient, environment (equipment, utensils, and installations), surface of food handlers hands and ready-to-eat products. *Enterobacteriaceae* and coliforms were identified from the hands of food handlers, while *Salmonella* was detected in one of the processing plants. The authors isolated

Salmonella from the floor near to the *paçoca* mixer, which poses a potential risk of contamination of the final product, and because PP is not subjected to any type of heat treatment after the mixing step. The factory environment, including food handlers, was thought to be the main source of contamination of peanut products (Carminati et al., 2016).

The PP showed higher contamination for the indicator microorganisms analyzed than CP, due to the characteristic production process. The detection of *E. coli* and *Salmonella* in PP in this study reinforce the importance of complying with sanitary guidelines, process control and implementation of good manufacturing practices (GMP) to ensure food safety and protect consumers against pathogenic microorganisms.

4. Conclusion

The study showed that 71% of the *paçoca* samples were contaminated with total aflatoxins, and each sample contained at least one of the aflatoxin types (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂). The average level of total contamination by aflatoxins (7.06 µg.kg⁻¹) remained constant and showed a decrease in relation to studies conducted in recent decades for the same type of product. The frequency, severity and levels of aflatoxins detected in *paçocas* may have been reduced by the implementation of specific regulations in the peanut production chain in Brazil. However, microbiological analyzes suggest that pressed *paçocas* are more likely to carry pathogenic microorganisms, including *Salmonella* and *E. coli*. These microorganisms were not restricted by water activity or moisture content in this specific type of *paçoca*, indicating hygiene failures during processing, heat treatment or cross-contamination. The extra heat treatment applied in the preparation of cooked *paçocas* can be considered a control point, resulting in lower counts of molds and yeasts, aerobic mesophilic bacteria, thermotolerant coliforms, *E. coli* and *Salmonella*. This study indicates that peanut products need to be constantly monitored and that food industries need to adopt Good Manufacturing Practices (GMP) to make sure that consumers are safe from exposure to aflatoxins and potentially pathogenic microorganisms.

Acknowledgments

This research was funded by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development – Brazil). Special thanks to CNPq for the doctoral scholarship (scholarship number 142559/2018-0).

References

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial da União*, 22 fev. 2011. Seção 1, p.72-73.

Anvisa. Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA). (2001). Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1.

Anvisa. Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA). (2019). Instrução Normativa Nº60 de 23 de Dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 26 dez. 2019. Seção 1.

Anvisa. Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA). Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário oficial*. Seção 1. Nº 46. 2011

Atayde, D. D., Reis, T. A., Godoy, I. J., Zorzete, P., Reis, G. M., Corrêa, B. (2012). Mycobiota and aflatoxins in a peanut variety grown in different regions in the state of São Paulo, Brazil. *Crop Protection*, 33, 7⁻¹ 2. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.11.013>.

Brunner, U. (1985). Some antifungal properties of sorbic acid extracted from berries of rowan (*Sorbus aucupatia*). *J. Biol. Educ.* 19, 41–47. <https://doi.org/10.1080/00219266.1985.9654685>

Caldas, E. D., Silva, S. C., Oliveira, J. N. Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health. (2002). *Rev. Saúde Pública.* 36 (3). <https://doi.org/10.1590/S0034-89102002000300010>

Cánovas, D., Fletcher, S. A., Hayashi, M., Csonka, L. N. (2001). Role of trehalose in growth at high temperature of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 183 (11), 3365–3371. <https://doi.org/10.1128/JB.183.11.3365-3371.2001>

Carminati, J. A., Amorim Neto, D. P., Morishita, K. N., Takano, L. V., Bernardi, A. O., Copetti, M. V., Nascimento, M. E. (2016). Microbiological contamination in peanut

confectionery processing plants. *J. Appl. Microbiol.* 121, 1071–1078. <https://doi.org/10.1111/jam.13235>

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2007). *Multistate outbreak of Salmonella serotype Tennessee infections associated with peanut butter* – United States, 2006–2007. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 56, 521–524.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2009). *Multistate outbreak of Salmonella infections associated with peanut butter and peanut butter-containing products* – United States, 2008–2009. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 58, 85–90.

Conab. Companhia Nacional de Abastecimento Acompanhamento da safra brasileira de Grãos: *Safra 2022/23, n. 9 – Nono levantamento*, p. 1⁻¹ 16, junho 2023. (2023). Available at: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Accessed on: Jul 08 2023.

Dunkel, F. V., Read, N. R. (1991). Review of the effect of sorbic acid on insect survival in rearing diets with reference to other antimicrobials. *Am. Entomol.* 37, 172–178. <https://doi.org/10.1093/ae/37.3.172>

EUROPEAN UNION. Commission Regulation (EC) n° 401/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 364, Mar. 9 2006b. 23p.

Food and Drug Administration (FDA). CPG Sec 570.375 *Aflatoxins in peanuts and peanuts products*, 2021. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cpg-sec570375-aflatoxins-peanuts-and-peanut-product>

Glória, E. M., Romero, A. C., Carvalho, A. P. P., Domingues, M. A. C., Gonçalves, P. V. M. (2006). Aflatoxin contamination profile among packages of peanut candies. *Food Sci. Technol.* 26 (3). <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000300027>

Halkman, H. B. D., Halkman, A. K. Indicator Organisms. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, Academic Press. 358-363. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00396-7>.

IARC. (2002). *Aflatoxins. Chemical agents and Related Occupations. A review of Human Carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 100F pp. 225–248). International Agency for Research on Cancer.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Food) (2011). *Microorganisms in foods 8 – Use of data for assessing process control and product acceptance*. New York: Springer

ICMSF- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microorganisms in Foods* London: Academic, 1996. p.347-381.

Iha, M. H., Okada, I. A., Briganti, R. C., Mini, C. A., Trucksess, M. W. (2016). Aflatoxins in Brazilian Peanut Confection, *Journal of AOAC international*. 99 (3), 830–834. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0256>

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. *DOQ-CGCRE-008: orientação sobre validação de métodos analíticos*. Brasília, 2020. Revisão 8.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 6579: *Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of Salmonella spp.* 4th ed. Geneva, 2002. Amendment 1: 15 jul. 2007.

Juan, C., Mañes, J., Font, G., Juan-Garcia, A. (2017). Determination of mycotoxins in fruit berry by-products using QuEChERS extraction method. *LWT, Food Science and Technology*. 86, 344-351. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.020>.

Kataoka, A. I., Enache, E., Black, D. G. (2014) Survival of *Salmonella* Tennessee, *Salmonella* Typhimurium DT104, and *Enterococcus faecium* in peanut paste formulations at two different levels of water activity and fat. *J Food Prot* 77, 1252-1259. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-553>.

Kornacki, J. L., Gurtler, J. B., Stawick, B. A. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Salfinger, Y., Tortorello, M. L. (eds), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 5th ed. American Public Health Association, Washington, D. C., 2015. Chapter 9, pp. 103-120.

Kujbida, P., Maia, P. P., Araújo, A. N., Mendes, L. D., Oliveira, M. L., Silva-Rocha, W. P., Brito, G. Q., Chaves, G. M., Martins, I. Risk assessment of the occurrence of aflatoxin and fungi in peanuts and cashew nuts (2019). *Braz. J. Pharm. Sci.* 1-10. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000118135>

Lemos Junior, W. J. F., Trombete, F. M., Reis, L. P. A., Direito, G. M., Randow, A. V., Saldanha, T. Aflatoxins intake from peanut candy marketed in Rio de Janeiro city, Brazil. (2016). *Int. Food Res. Journal*. 23 (2), 733-738. <https://doi.org/10.47836/ifrj.28.2.20>

Li, H., Wang, H., D'Aoust, J. Y., Maurer, J. (2013). *Salmonella* species. In M. P. Doyle, & R. L. Buchanan (Eds.). *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. 225–262. (fourth ed.). Washington DC: ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch10>

Martín, M. P., Grosso, A. L., Nepote, V., Grosso, N. R. (2018). Sensory and chemical stabilities of high-oleic and normal-oleic peanuts in shell during long-term storage. *J. Food Sci.* 83, 2362–2368. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14295>

Martins, L. M., Braganolo, N., Calori, M. A., Iamanaka, B. T., Alves, M. C., Martins, W. P., Godoy, I. J., Taniwaki, M. H. (2023). The effect of harvest dates on production, lipid composition, *Aspergillus Section Flavi* Contamination, and aflatoxin production in high oleic acid peanut cultivars in Brazil. *ACS Food Science & Technology*, 3 (6), 1006-1013. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.2c00427>

Martins, L. M., Santa'Ana, A. S., Fungaro, M. H. P., Silva, J. J., Nascimento, M. S., Frisvad, J. C., Taniwaki, M. H. (2017). The biodiversity of *Aspergillus* section Flavi and aflatoxins in the Brazilian peanut production chain. *Food Research International*, 94, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.006>

Nakai, V. K., Rocha, L. O., Gonçalez, E., Fonseca, H., Ortega, E. M. M., Corrêa, B. (2008). Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. *Food Chemistry*, 106: 1, 285-290. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.087>

Nascimento, M. S., Carminati, J. A., Morishita, K. N., Amorim Neto, D. P., Pinheiro, H. P., Maia, R. P. (2018). Long-term kinetics of *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 survival on peanuts and peanut confectionery products. *PLoS ONE*.13 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192457>

Nummer, B. A., Shrestha, S., Smith, J. V. (2012) Survival of *Salmonella* in a high sugar, low water- activity, peanut butter flavored candy fondant. *Food Control* 27, 184–187. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2011.11.037>

Oliveira, C. A. F., Gonçalves, N. B., Rosim, R. E., Fernandes, A. M. (2009). Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. *Int. J. Mol. Sci.*, 10 (1), 174-183. <https://doi.org/10.3390/ijms10010174>

PITT, J. I., HOCKING, A. D. *Fungi and food spoilage*. 3rd ed. New York: Springer, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

Ryser, E. T., Schuman, J. D. Mesophilic aerobic Plate Count. In: Salfinger, Y., Tortorello, M. L (eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 5th ed., American Public Health Association (APHA), Washington, DC, 2015. Chapter 8, p. 95- 101. <https://doi.org/10.2105/MBEF.0222.013>

Ryu, D., Wolf-Hall, C. (2015). Yeasts and Molds. In: Salfinger, Y., Tortorello, M. L (eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 5th ed., Washington, DC, 2015. Chapter 21, p. 277-286. <https://doi.org/10.2105/MBEF.0222.026>

Taiyun, W., Simko, V. (2021). R package 'corrplot': Visualization of Correlation Matrix (Version 0.92). Available from: <https://github.com/taiyun/corrplot>.

Tengey, T. K., Kankam, F., Ndela, D. N., Frempong, D., Appaw, W. O. (2022). Growth and Toxicity of *A. flavus* on Resistant and Susceptible Peanut Genotypes. *Toxins*. 14, 536. <https://doi.org/10.3390/toxins14080536>

USDA. United States Department of Agriculture. World agricultural production. 2023. (USDA. Foreign agricultural service. **Circular series, WAP 6-23**, June2023).

Available at. <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>.
Accessed on: Jul 07, 2023.

Woodroof., J. G. (1983) Peanut: production, processing, products 3rd ed. Westport:
The Avi Publishing Company. 291 p.

CAPÍTULO V: Conclusões e Sugestão para Pesquisas

1. Conclusões Gerais

Nas duas últimas décadas houve um aumento expressivo nas exportações do amendoim brasileiro, resultado de esforços e controles dos níveis de aflatoxinas aplicados ao longo de toda a cadeia produtiva. O Estado de São Paulo têm sido o maior representante destes índices, onde também se concentram inúmeras indústrias produtoras de alimentos derivados de amendoim. A adoção de programas de segurança de alimentos, como as Boas Práticas Agrícolas, as Boas Práticas de Fabricação e a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, desempenhou um papel crucial na redução da contaminação por aflatoxinas. Esses programas ajudam a identificar e controlar os pontos críticos de contaminação ao longo da cadeia produtiva.

O resultado desse esforço é evidente nos níveis de contaminação atualmente observados, que são mais baixos em comparação com os da década de 70. Isso demonstra um maior cuidado e compromisso com a qualidade e a segurança dos produtos à base de amendoim destinados ao mercado nacional. Além disso, essa melhoria na qualidade contribuiu para a competitividade do amendoim brasileiro nos mercados internacionais, fortalecendo a posição do país como um importante produtor e exportador desse produto.

O processo de amostragem representativo indicou a concordância nos resultados dos níveis de aflatoxinas entre as metodologias testadas (HPL-FLD e ic-ELISA), demonstrando a eficácia do uso da metodologia de coluna de imunoafinidade e fluorimetria em processos de triagem. O estudo destaca a importância desse controle na cadeia produtiva do amendoim, com foco especial na etapa de recepção em indústrias processadoras de amendoim e seus derivados. Essa etapa é considerada um Ponto Crítico de Controle (PCC) devido à sua relevância na garantia da qualidade e segurança dos produtos. Monitorar e controlar os níveis de aflatoxinas nesse estágio é fundamental para reduzir, controlar ou eliminar a contaminação. Ao identificar a presença de aflatoxinas no amendoim logo na etapa de recepção, as indústrias podem adotar medidas imediatas, como a segregação ou descarte de lotes

contaminados, evitando que essas toxinas permaneçam nos grãos e comprometam a qualidade dos produtos finais.

De maneira geral, a conscientização dos produtores de amendoim, o melhoramento genético, controle da época de plantio, condições de colheita, métodos de redução de umidade (branqueamento, secagem, torrefação) armazenamento e distribuição, implementação de novas legislações estão associados a melhoria da qualidade do amendoim brasileiro. Uma abordagem integrada que envolve conscientização, regulamentações mais rigorosas, práticas agrícolas seguras e monitoramento contínuo é fundamental para a melhoria contínua da qualidade do amendoim brasileiro, tanto para o mercado nacional quanto para as exportações.

Os níveis de aflatoxinas detectados em paçocas produzidas e comercializadas no estado de São Paulo acompanharam a tendência em relação a melhoria da qualidade, quando se compara com as publicações das últimas duas décadas. Este estudo é o primeiro a comparar a contaminação de aflatoxinas em paçocas, focado nas diferenças de processo dos tipos de paçoca (cozida e prensada) comercializadas no estado de São Paulo. A paçoca é, de fato, um doce de amendoim muito apreciado no Brasil, especialmente durante as festas juninas e julinas, mas também consumido ao longo do ano. Dado o seu amplo consumo, a presença de aflatoxinas neste produto é uma preocupação significativa, pois pode representar uma fonte crônica de exposição às aflatoxinas.

Apesar das melhorias na qualidade dos níveis de aflatoxinas em paçocas, ainda há desafios significativos relacionados à qualidade microbiológica desses produtos. Os resultados que indicaram a presença de microrganismos patogênicos, como *Salmonella*, são preocupantes e apontam para a necessidade de um maior controle no processo produtivo para evitar contaminações. Isso destaca a importância de medidas rigorosas de higiene, controle de processos e Boas Práticas de Fabricação (BPF) nas instalações de produção de paçoca e em toda a cadeia de produção.

A detecção de *Salmonella* sp. é um indicativo de possível contaminação cruzada, falha no tratamento térmico, higiene de equipamentos e utensílios ou contaminação do ambiente fabril. Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a necessidade de maior controle no processamento de paçocas prensadas, onde o próprio processo de fabricação (ausência de tratamento térmico secundário) pode

favorecer a sobrevivência de possíveis microrganismos patogênicos. Os valores de atividade de água das paçocas não foram limitantes para a ocorrência de *Salmonella*, conforme indicado por outros estudos. Neste estudo o patógeno foi detectado em duas amostras, após no máximo um mês a partir da data de fabricação. Não foram realizadas análises de monitoramento durante ou no final do prazo de validade do produto, no entanto a literatura demonstra a viabilidade deste microrganismo em produtos derivados de amendoim pelo período superior ao prazo de validade.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a importância do emprego de boas práticas de fabricação em paçocas, afim de evitar que ocorra contaminação com potenciais microrganismos patogênicos, tais como *E. coli* e *Salmonella*. Além disso, a implantação de sistemas de segurança de alimentos pode representar uma possível redução e melhoria da contagem dos microrganismos indicadores analisados neste estudo (coliformes termotolerantes, contagem de bactérias mesófilas aeróbias e bolores e leveduras), microrganismos que podem estar diretamente associados a deterioração do produto e ou potenciais produtores de toxinas ou micotoxinas.

A sugestão para trabalhos futuros é monitorar a cadeia produtiva do amendoim, caracterizando as indústrias alimentícias de acordo com o porte (pequenas, médias e grandes), realizando amostragem em diferentes fases do processo de produção. Isso permitiria uma compreensão mais abrangente dos pontos críticos de controle na produção de paçocas, e ajudaria a identificar áreas específicas que podem precisar de melhorias em termos de qualidade e segurança alimentar.

Além disso, a amostragem após a torrefação do amendoim, mistura, prensagem, cozimento, embalagem e até mesmo a avaliação dos ambientes de fabricação e a higiene dos manipuladores de alimentos, forneceria informações valiosas sobre onde ocorrem potenciais contaminações ou problemas de qualidade.

Estudos desse tipo também podem contribuir para o desenvolvimento de diretrizes e regulamentações mais eficazes para garantir a qualidade e a segurança dos produtos à base de amendoim. Em síntese, o monitoramento abrangente da cadeia produtiva do amendoim e de produtos derivados, como a paçoca, é uma iniciativa crucial para melhorar a segurança alimentar e garantir que esses produtos atendam aos padrões de qualidade estabelecidos, protegendo a saúde dos consumidores da exposição às aflatoxinas e potenciais microrganismos patogênicos.