



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

LIGIA MANOEL MARTINS

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS E AFLATOXINAS, CINÉTICA DA
DEGRADAÇÃO DE AFLATOXINAS DURANTE A TORRAÇÃO E
MODELAGEM PROBABILÍSTICA DO RISCO DE EXPOSIÇÃO PELO
CONSUMO DE AMENDOIM**

**OCCURRENCE OF FUNGI AND AFLATOXINS, KINETIC OF
AFLATOXINS DEGRADATION DURING ROASTING AND
PROBABILISTIC MODELING OF AFLATOXIN EXPOSURE BY
PEANUT CONSUMPTION**

Campinas
2015

LIGIA MANOEL MARTINS

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS E AFLATOXINAS, CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO DE
AFLATOXINAS DURANTE A TORRAÇÃO E MODELAGEM PROBABILÍSTICA DO
RISCO DE EXPOSIÇÃO PELO CONSUMO DE AMENDOIM**

**OCCURRENCE OF FUNGI AND AFLATOXINS, KINETIC OF AFLATOXINS
DEGRADATION DURING ROASTING AND PROBABILISTIC MODELING OF
AFLATOXIN EXPOSURE BY PEANUT CONSUMPTION**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de
Mestra em Ciência de Alimentos

Dissertation presented to the Faculty of Food
Engineering of the University of Campinas in
partial fulfillment of the requirements for the
degree of Master in Food Science

Supervisor / Orientador: Anderson de Souza Sant'Ana
Co-supervisor / Co-orientador: Marta Hiromi Taniwaki

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LIGIA
MANOEL MARTINS E ORIENTADA PELO PROF. DR.
ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA

Campinas
2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

M366o Martins, Ligia Manoel, 1989-
Ocorrência de fungos e aflatoxinas, cinética da degradação de aflatoxinas durante a torração e modelagem probabilística do risco de exposição pelo consumo de amendoim / Ligia Manoel Martins. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Anderson de Souza Sant'Ana.

Coorientador: Marta Hiromi Taniwaki.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Amendoim. 2. Aflatoxinas. 3. Aspergillus section flavi. 4. Processo térmico. 5. Avaliação de riscos. I. Sant'Ana, Anderson de Souza. II. Taniwaki, Marta Hiromi. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Occurrence of fungi and aflatoxins, kinetic of aflatoxins degradation during roasting and probabilistic modeling of aflatoxin exposure by peanut consumption

Palavras-chave em inglês:

Peanut

Aflatoxins

Aspergillus section flavi

Thermal process

Risk assessment

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Anderson de Souza Sant'Ana [Orientador]

Maria Antonia Calori Domingues

Maria Isabel Berto

Data de defesa: 14-10-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana (Orientador)

Universidade Estadual de Campinas

Dra. Beatriz Thie Iamanaka

Instituto de Tecnologia de Alimentos

Prof. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dra. Maria Antonia Calori Domingues

Universidade de São Paulo

Dra. Maria Isabel Berto

Instituto de Tecnologia de Alimentos

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno

DEDICATÓRIA

Aos meus pais William e Cleide e meu irmão Guilherme

Pelo constante apoio, incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por iluminar meu caminho e permitir a conclusão de mais uma etapa;

Ao Professor Anderson de Souza Sant'Ana, pela orientação, conversas e ensinamentos;

À Dra. Marta Hiromi Taniwaki, pela co-orientação, pelos ensinamentos, por ter acreditado em mim, por ser um exemplo de profissional a ser seguido e pelas ricas conversas que me fizeram crescer tanto profissionalmente como pessoalmente;

À Dra. Beatriz Thie Yamanaka, pela atenção, amizade, companheirismo no laboratório (até mais tarde), por estar sempre disposta a ajudar e ouvir;

À banca examinadora, pela disponibilidade, rapidez e considerações que auxiliaram na melhoria deste trabalho;

À Universidade Estadual de Campinas, à Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Departamento de Ciências de alimentos por permitir a realização deste trabalho;

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos, pelo desenvolvimento da parte prática;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida;

Á Dra Isabel Berto e Renato Pereira pela ajuda na parte de engenharia do projeto, pelos ensinamentos, conversas e orientações e principalmente por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Prof. Dra. Maristela da Silva do Nascimento, pela ajuda e fornecimento das amostras;

Aos meus amigos da pós-graduação da Unicamp: Juliana, que em tão pouco tempo se tornou uma irmã muito querida, ao meu lado em todos os momentos; Allan Munford e Mariana Batista, pela amizade desde o início do mestrado, paciência, conversas, risadas e companheirismo; Damares Vieira, pela amizade e companheirismo; Ramon Brexó, Larissa Margalho, Rafael Chaves, Monyca Dias e Rafael Chacon, pela amizade, risadas, e chamadas de atenção quando eu precisei; ao Amin, Carol Rezende e Ana Paula Pereira, pelas conversas e momentos de descontração; de modo geral, a todos que de alguma forma fizeram parte da minha vida nesses dois anos de mestrado;

Aos funcionários do ITAL: Adelaide, Luciara, Silvia, Gabriela, Fabiana, Cirene, Heloisa, por toda a ajuda, paciência e amizade, por tornar meus dias no ITAL muito agradáveis.

Aos alunos e estagiários do ITAL: Aline Morgan, Rachel Bertoldo, Camila Possari e Julia Silveira, por me ensinarem as técnicas, pela amizade e risadas; Aline Souza, por ter me recebido e ensinado

tudo com muito detalhe e carinho; Larissa Ferranti, por me ajudar no início do mestrado com a adaptação a esta nova fase; Alexandre Filho, meu estagiário, que me ajudou muito, com todos aqueles amendoins para descascar e moer, pelas conversas e risadas; Rodrigo Hattori e Alison Hideki pela ajuda no HPLC e nas extrações além das conversas e risadas; à todos os estagiários que passaram pelo ITAL;

À Aline Katsurayama, companheira de laboratório, viagens e academia, pela amizade, companheirismo, longas conversas e risadas; Josimara Nicolusi, pela amizade, companheirismo, pelas conversas que nunca me deixaram desanimar, pelas risadas e ensinamentos; Cristina Yasumura, pela amizade e ajuda no laboratório, Adriana Persson, pela amizade;

Às minhas amigas de Londrina, Angélica Tieme Ishikawa e Ana Rúbia Magalhães Ferreira, pelas horas no telefone e risadas que permitiram diminuir essa distância e matar um pouco da saudade;

À minha família, presente de Deus, que me apoiou e incentivou durante toda a minha vida, com palavras sábias, paciência e muita compreensão;

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

RESUMO

O presente trabalho teve os seguintes objetivos: (i) Isolar e identificar espécies de *Aspergillus* section *Flavi* de amendoim; investigar a capacidade de produção de aflatoxinas pelas cepas isoladas; avaliar a presença de aflatoxinas nas amostras de amendoim, (ii) determinar a cinética de destruição das aflatoxinas durante a etapa de torração do amendoim e (iii) realizar uma modelagem probabilística da exposição de aflatoxinas pelo consumo de amendoim no Brasil. Foram analisadas 119 amostras de amendoim e 6 amostras de solo coletadas no Estado de São Paulo. Os grãos de amendoim foram diretamente plaqueados em ágar dicloran 18% de glicerol (DG18), a 25 ° C durante 5 dias. Os resultados foram expressos como percentagem de infecção. O potencial para a produção de aflatoxinas pelos isolados foi testado utilizando a técnica de ágar plug. As aflatoxinas nas amostras de amendoim foram analisadas, extraíndo a toxina com clean up em coluna de imunoafinidade e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência. Para o estudo de cinética de degradação das aflatoxinas, as amostras foram torradas num torrador de leito de jorro vertical operando a 160, 180 e 200° C por 5, 10, 15, 20 e 25 min e a cor da torra medida através de valores CIELAB. Usando a concentração de aflatoxinas após a torração, as curvas foram ajustadas por meio de regressão dos dados de concentração de aflatoxinas em log *versus* tempo. A avaliação da exposição de risco de aflatoxinas pelo consumo de amendoim foi realizada utilizando um modelo determinístico e probabilístico. A população foi dividida em dois grupos etários (<1 a 19 anos e de 20 anos e acima). Os dados de consumo e contaminação do amendoim por aflatoxinas foram obtidos na literatura e usados para calcular a exposição. Além da exposição, foram calculados o risco de câncer e a margem de exposição (MOE) à toxina. Foram isoladas cinco espécies de *Aspergillus* section *Flavi*: *A. arachidicola* (2), *A. caelatus* (12), *A. flavus* (502), *A. parasiticus* (15) e *A. tamaritii* (9). Todos os isolados de *A. arachidicola* e *A. parasiticus* produziram aflatoxina B e G, e 52% dos isolados de *A. flavus* produziram aflatoxina B. Aflatoxinas foram detectadas em 12 amostras em concentrações que variaram de <0.05 a 100 µg/ kg. O estudo da cinética de degradação de aflatoxinas resultou em redução de 61,6; 83,6 e 89,7% quando torrado a 160, 180 e 200°C, respectivamente. A ingestão de aflatoxinas na abordagem determinística e probabilística variou de 0,76 – 7,49 ng/kg pc por dia e 0,04-10,22ng/kg pc por dia, respectivamente. O risco de câncer na abordagem determinística e probabilística variou de 0,001 – 0,76 câncer por ano por 10⁵ indivíduos e 0,0004-0,10 câncer por ano por 10⁵ indivíduos, respectivamente. A margem de exposição (MOE) variou de 22,7-2.112 e 16,6 – 4.695 para a abordagem determinística e probabilística, respectivamente.

ABSTRACT

The aim of this study was to: (i) isolate and identify species of *Aspergillus* section *Flavi* in peanut; investigate the aflatoxin production capacity by isolated strains; assessing the presence of aflatoxins in peanut samples, (ii) determine the kinetics of aflatoxin degradation during the roasting peanut step (iii) perform a deterministic and probabilistic model for aflatoxin exposure through peanut consumption in Brazil. The number of peanut samples collected in São Paulo was 119 while for soil there were six. Peanuts were directly plated on agar Dichloran Glycerol 18% (DG18) at 25 ° C for 5 days. The results were expressed as percentage of infection. The potential for aflatoxin production by isolates was tested using the agar plug technique. The aflatoxins in peanuts samples were analyzed extracting the toxin with an immunoaffinity column, and quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. For the degradation kinetics study, the samples were roasted in a vertical spouted bed roaster operating at 160, 180 and 200° C for 5, 10, 15, 20 and 25 min and the roasting color was measured using CIELAB values. Using aflatoxin concentration after roasting, curves were designed by regression of aflatoxin concentration data in log versus time. The assessment of risk exposure through peanut consumption was performed using a deterministic and probabilistic model. The population was divided into two age groups (<1 to 19 years and 20 years and above). Consumption and peanut contamination data obtained from the literature were used to calculate the exposure. The risk of cancer and the margin of exposure (MOE) to the toxin were also evaluated. Five species of *Aspergillus* section *Flavi* were isolated: *A. arachidicola* (2), *A. caelatus* (12), *A. flavus* (502), *Aspergillus parasiticus* (15), and *A. tamaritii* (9). All isolates of *A. parasiticus*, and *A. arachidicola* produced aflatoxin B and G, and 52% of isolates of *A. flavus* produced aflatoxin B. Aflatoxins were detected in 12 samples in concentrations ranging from <0.05 to 100 µg / kg. The study of aflatoxin degradation kinetics resulted in a reduction of 61.6, 83.6 and 89.7% when roasted at 160, 180 and 200 ° C respectively. The intake of aflatoxin using a deterministic and probabilistic approach ranged from 0.76 – 7.49ng/kg bw day and 0.04-10.22ng/kg bw day, respectively. The deterministic and probabilistic approach cancer risk ranged from 0.001 – 0.76 cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals and 0.0004-0.102 cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals respectively. The MOE ranged from 22.7-2,112 and 16.6 – 4,695 for the deterministic and probabilistic approach, respectively.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 AMENDOIM	14
2.1.1 ASPECTOS GERAIS	14
2.1.2 PRODUÇÃO DE AMENDOIM NO BRASIL	15
2.1.3 PROBLEMAS E PERDAS ECONÔMICAS NA PRODUÇÃO DE AMENDOIM	16
2.1.4 CADEIA PRODUTIVA DO AMENDOIM	16
2.1.4.1 SOLO	16
2.1.4.2 CULTIVARES	17
2.1.4.3 COLHEITA E PÓS COLHEITA	18
2.1.4.4 BENEFICIAMENTO DO AMENDOIM	20
2.1.5 MÉTODOS QUÍMICOS E FÍSICOS PARA REDUÇÃO DE AFLATOXINAS	23
2.1.6 OCORRÊNCIA DE FUNGOS E AFLATOXINAS NO AMENDOIM	24
2.2 <i>ASPERGILLUS SECTION FLAVI</i> PRODUTORES DE AFLATOXINAS.	27
2.3 AFLATOXINAS	29
2.3.1 CARACTERÍSTICAS E CONDIÇÃO PARA PRODUÇÃO	29
2.3.2 EXPOSIÇÃO AGUDA E CRÔNICA	30
2.3.3 TOXICOCINÉTICA E TOXICODINÂMICA	30
2.4 ANÁLISE DE RISCO DE MICOTOXINAS	32
2.4.1 AVALIAÇÃO DE RISCO	33
2.4.1.1 IDENTIFICAÇÃO DO PERIGO	33
2.4.1.2 CARACTERIZAÇÃO DO PERIGO	34
2.4.1.3 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO	34
2.4.1.4. CARACTERIZAÇÃO DO RISCO	35
2.4.5. APLICAÇÃO DOS CONCEITOS DOS OBJETIVOS DA SEGURANÇA DO ALIMENTO (FSO) NO GERENCIAMENTO DE RISCO DA AFLATOXINAS NO AMENDOIM	36
CAPITULO 1. THE BIODIVERSITY OF <i>ASPERGILLUS SECTION FLAVI</i> AND AFLATOXINS IN PEANUT PRODUCTION CHAIN IN BRAZIL	39
1. INTRODUCTION	41
2. MATERIAL AND METHODS	42
3. RESULTS	45
4. DISCUSSION	47
5. CONCLUSION	49
6. REFERENCES	50
CAPITULO 1. THE BIODIVERSITY OF <i>ASPERGILLUS SECTION FLAVI</i> AND AFLATOXINS IN PEANUT PRODUCTION CHAIN IN BRAZIL - TABLES AND FIGURES	53
CAPITULO 2. KINETICS OF AFLATOXIN DEGRADATION DURING PEANUT ROASTING	58
1. INTRODUCTION	60
2. MATERIAL AND METHODS	61
3. RESULTS	65

4. DISCUSSION	67
5. CONCLUSION	70
6. REFERENCES	71
CAPITULO 2. KINETICS OF AFLATOXIN DEGRADATION DURING PEANUT ROASTING - TABLES AND FIGURES	73
CAPITULO 3. EXPOSURE ASSESSMENT OF AFLATOXINS THROUGH PEANUTS CONSUMPTION IN BRAZIL, A DETERMINISTIC AND PROBABILISTIC APPROACH	79
1. INTRODUCTION	81
2. MATERIAL AND METHODS	82
3. RESULTS	85
4. DISCUSSION	88
5. CONCLUSION	91
6. REFERENCES	93
CAPITULO 3. EXPOSURE ASSESSMENT OF AFLATOXINS THROUGH PEANUTS CONSUMPTION IN BRAZIL, A DETERMINISTIC AND PROBABILISTIC APPROACH - TABLES AND FIGURES	96
3. DISCUSSÃO GERAL	105
4. CONCLUSÃO GERAL	107
5. REFERENCIAS	108

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o terceiro maior produtor de amendoim no continente americano, atrás apenas dos Estados Unidos e Argentina (USDA, 2015). Com o avanço das tecnologias e desenvolvimento de novas sementes, a produção de amendoim no Brasil tem apresentado aumento considerável da produtividade nos últimos anos (Conab, 2013). Aliado a isso, medidas de controle de qualidade estão sendo tomadas em todas as etapas da cadeia produtiva através de critérios e procedimentos para o controle higiênico-sanitário de amendoim e subprodutos a fim de garantir a qualidade do amendoim produzido (Brasil, 2009). Uma barreira fito-sanitária que compromete a qualidade do amendoim é a presença de aflatoxinas. As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus section Flavi*, principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Apresentam ação imunossupressora, genotóxica, sendo classificadas pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) pertencente ao grupo 1, i.e, carcinogênica ao homem (IARC, 2002). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estipulou o limite máximo tolerável de 20 µg/kg para aflatoxinas totais em amendoim e seus produtos (Brasil, 2011). A microbiota bem como a presença de aflatoxinas em amostras de amendoim já foram relatadas no Brasil (Nakai et al., 2008; Gonzalez et al., 2008; Freitas et al., 1998). O solo, no qual o amendoim se desenvolve, é o maior reservatório de *A. flavus* e *A. parasiticus* (Horn, 2003), qualquer falha no controle da temperatura e umidade do grão durante a cadeia produtiva pode resultar no crescimento e consequente produção de aflatoxinas.

A prevenção da formação é a melhor forma de controle, contudo, uma vez formada, as aflatoxinas podem comprometer a qualidade do grão, causar riscos ao consumidor e perdas econômicas ao produtor. O beneficiamento e processamento do amendoim podem resultar na diminuição da concentração de aflatoxinas no grão, como por exemplo, a seleção e torração. A etapa de seleção utiliza métodos eletrônicos de cor. Grãos contaminados apresentam uma descoloração, causada pelo crescimento fúngico, sendo assim, este tipo de seleção pode levar à redução de grãos infectados e possivelmente contaminados. Embora o processo de torração tenha mostrado que quanto maior a temperatura e o tempo de exposição ao calor, maior a degradação (Ogunsanwo et al., 2004; Arzandeh & Jinap., 2011; Mobee et al., 2011; Luter et al., 1982; Lee et al., 1969), ainda faltam trabalhos que correlacionem a cor de torração do amendoim com a degradação das aflatoxinas.

Por ser genotóxica e carcinogênica, qualquer concentração encontrada no alimento pode representar riscos a saúde humana (EFSA, 2007). Estudos epidemiológicos mostram uma correlação entre a ocorrência de câncer hepático na população exposta a esta micotoxina,

principalmente na população portadora do vírus da hepatite B, na qual, as aflatoxinas são aproximadamente 30 vezes mais potente (Bosetti et al., 2014, Williams et al., 2004, Wogan, 1992).

Visto que as aflatoxinas podem estar presentes no amendoim, e que a sua presença pode resultar em problemas de saúde pública, o presente estudo teve como objetivo principal:

Desenvolver uma avaliação de exposição às aflatoxinas a partir do consumo de amendoim pela população brasileira e determinar a cinética de degradação da aflatoxinas durante o processo de torração do amendoim.

Os objetivos específicos foram:

- Verificar a ocorrência de *A. section Flavi* na cadeia do amendoim, investigar a capacidade de produção de aflatoxinas pelas cepas e detectar aflatoxinas nas amostras de amendoim (Capítulo 1).
- Determinar a cinética de destruição das aflatoxinas durante a etapa de torração do amendoim (Capítulo 2).
- Desenvolver um modelo probabilístico para avaliação da exposição de aflatoxinas a partir do consumo do amendoim (Capítulo 3).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. AMENDOIM

2.1.1 ASPECTOS GERAIS

Pertencente à família *Fabaceae*, o amendoim (*Arachis hypogaeae* L.) é a quinta maior cultura oleaginosa do mundo, atrás apenas da soja, algodão, colza e girassol (Fageria et al., 2010). Originário do sul da Bolívia, ou norte da Argentina, acredita-se que praticamente todas as espécies do gênero *Arachis* (aproximadamente 69) são provenientes da América do Sul e cultivadas desde 2500 a. C (Krishna, 2013).

O amendoim possui uma característica peculiar por se tratar de uma planta na qual a flor fecundada encontra-se inicialmente sobre a terra e apresenta geotropismo positivo, com desenvolvimento do fruto embaixo do solo (Figura 1). É cultivado principalmente em regiões tropicais e temperadas, com faixa de latitude até 40°N e 40°S e temperatura ideal para o crescimento de 24 a 33°C (Nogueira & Távora, 2013).

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



Fonte: Conagin, 1955.

O amendoim é um alimento de alto valor energético (596 cal/100 g de sementes) (Freire et al., 2009), os grãos são compostos de 25-30% de proteína, 20% de carboidratos, 5% de fibras e cinzas e aproximadamente 50% de óleo, dos quais aproximadamente 90% corresponde aos ácidos palmítico (composto por 16 moléculas de carbono e nenhuma dupla ligação -16:0), oleico (18:1) e linoleico (18:2) (Knauff & Wynne, 1995). A porção lipídica do amendoim possui vitamina B₁, B₂ e também a vitamina E, um antioxidante natural. Outro antioxidante presente no amendoim é o resveratrol. Devido a sua composição, o amendoim pode ser considerado um alimento funcional, e quando consumido em quantidades adequadas pode atuar na prevenção de doenças cardiovasculares, controle das taxas

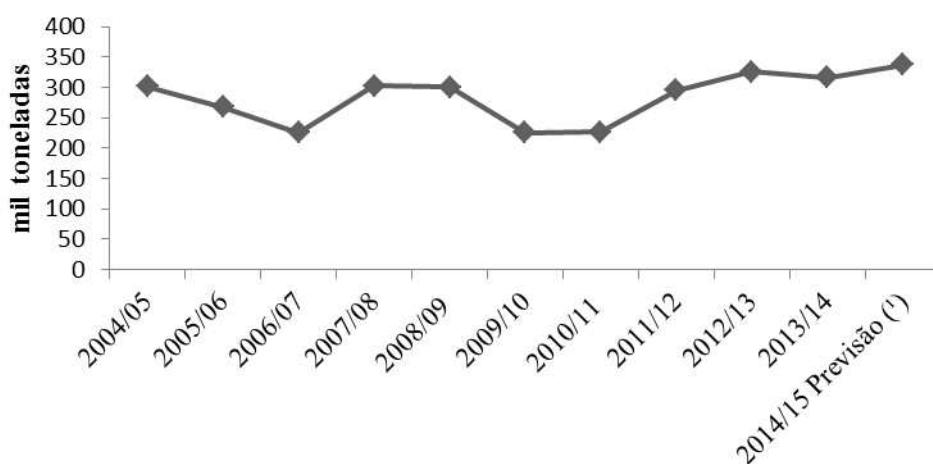
de colesterol e triglicérides, equilibrar o metabolismo, prevenir o desenvolvimento de câncer e reduzir os tumores existentes (Freire et al., 2009)

2.1.2 PRODUÇÃO DE AMENDOIM NO BRASIL

A previsão da produção mundial do amendoim em 2015 é de 41.209.000 toneladas sendo a China e a Índia os principais países produtores, responsáveis por 16.700.000 e 5.400.000 toneladas, respectivamente. No continente americano, os Estados Unidos se destacam como maior produtor (2.620.000 toneladas), seguido da Argentina (1.060.000) e Brasil (337.100) (USDA, 2015; Conab, 2015).

O gráfico de produção de amendoim no Brasil nos últimos anos está ilustrado na Figura 2. A queda na produção das safras de 2004/2005 e 2006/2007 ilustra a interferência do clima no desenvolvimento e produção do amendoim. Em 2004/2005 a seca nos meses de Janeiro e Fevereiro prejudicou a produção enquanto que na safra de 2006/2007, chuvas torrenciais foram responsáveis pela baixa produção (Pro-amendoim, 2015). A produção nacional de 2014/2015 apresentou um aumento de 6,7% em relação à safra anterior com 337,1 mil toneladas. São Paulo se destaca como maior Estado produtor, com produção em 2014/15 de 299,1 mil toneladas (aumento de 4,3% em relação à safra anterior). Aproximadamente 80% do amendoim produzido em São Paulo são destinados à exportação (Conab, 2015), principalmente para países europeus, como Holanda, Reino Unido, Rússia e africanos, como Argélia (Martins, 2011).

Figura 2. Produção de amendoim no Brasil (mil toneladas) nas safras de 2004/2005 a 2014/15 (previsão)



Fonte: Conab- séries históricas, 2015.

Os Estados de Minas Gerais e Tocantins também apresentam produção de amendoim, sendo este último o Estado com a maior média de produtividade, com produção de 232,1 mil toneladas. Essa produtividade pode ser explicada pela cultura ser explorada por produtores tecnificados, com mecanização intensiva no cultivo. A produção de amendoim no nordeste ocupa uma área de 6,4 mil hectares. A melhor produtividade da região é a de Sergipe (1605 kg/ha). No Estado do Rio Grande do Sul, a produção é de 7,4 mil toneladas, e a produtividade de 2450 kg/ha, representando um aumento de 42,8%, quando comparado à safra anterior (Conab, 2015)

2.1.3 PROBLEMAS E PERDAS ECONÔMICAS NA PRODUÇÃO DE AMENDOIM

As características de produção do amendoim fazem com que este grão seja suscetível a contaminação por fungos, principalmente *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, e consequente produção de micotoxinas, com destaque para aflatoxinas (Brasil, 2008) que serão discutidas com mais detalhes na seção 2.1.6.

A presença do fungo e da micotoxina no amendoim afeta tanto a segurança do alimento como a economia. Um estudo realizado por Lamb e Sternitzke (2001) avaliou a perda econômica na produção de amendoim nos anos de 1993-1996 nos Estados Unidos devido à contaminação por *Aspergillus flavus* e aflatoxinas, e concluíram que a presença destes contaminantes representaram uma perda de mais de US\$ 26 milhões por ano.

Em março de 2001, a Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (ABICAB) criou o programa de auto-regulamentação e expansão do amendoim denominado Pró-Amendoim. O programa tem por objetivo estimular a produção de amendoim dentro dos padrões nacionais e internacionais de qualidade, e evitar a formação de aflatoxinas, a fim de se obter um produto mais seguro ao consumidor. O selo Pró-Amendoim foi então criado e conferido às empresas que atendem aos requisitos da legislação e fabricam produtos totalmente seguros (Abicab, 2015). Em 2013, após 12 anos da implementação do programa, o Pró-Amendoim conseguiu baixar o índice de não conformidade na concentração de aflatoxinas de 40% para 10%. Nos últimos monitoramentos do mercado, a média de bons produtos foi de 89,7% em um universo de 220 amostras analisadas, evidenciando a melhoria do produto brasileiro no mercado consumidor.

2.1.4 CADEIA PRODUTIVA DO AMENDOIM

2.1.4.1 SOLO

O solo para o plantio do amendoim deve apresentar textura arenosa, garantir aeração e drenagem, permitindo o suprimento de oxigênio e nitrogênio, além de permitir a penetração dos ginóforos e desenvolvimento das vagens (Nogueira & Távora, 2013). O cultivo requer níveis adequados de fósforo, potássio, magnésio e principalmente cálcio. O cálcio, além de nutriente essencial, atua no controle do pH do solo, facilita o crescimento da planta ao prevenir o acúmulo de alumínio, aumenta a disponibilidade de elementos essenciais e reduz a contaminação por fungos por resultar na formação de vagens mais rígidas e espessas (FAO, 2010).

O cultivo de amendoim no mesmo local por um período prolongado pode levar ao aumento de fungos toxigênicos, como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, visto que o solo é um grande reservatório. Para evitar o acúmulo destes fungos e outros patógenos, a rotação de cultura é indicada no cultivo de amendoim. Devido à incidência de pragas e doenças no solo, o amendoim não deve ser cultivado após plantação de algodão, legumes, tomates e outros vegetais, devido ao acúmulo de nematoides (FAO, 2010). No Brasil, a rotação de cultura geralmente ocorre com a cana-de-açúcar ou pastagens, que apresentam resíduos de nutriente insuficiente após seu plantio. Por apresentar baixa exigência de fertilidade do solo, a plantação de amendoim após o cultivo dessas culturas mostra-se vantajosa por conservar o solo, controlar o crescimento de plantas daninhas e combater indiretamente as pragas (Beltrão et al., 2009)

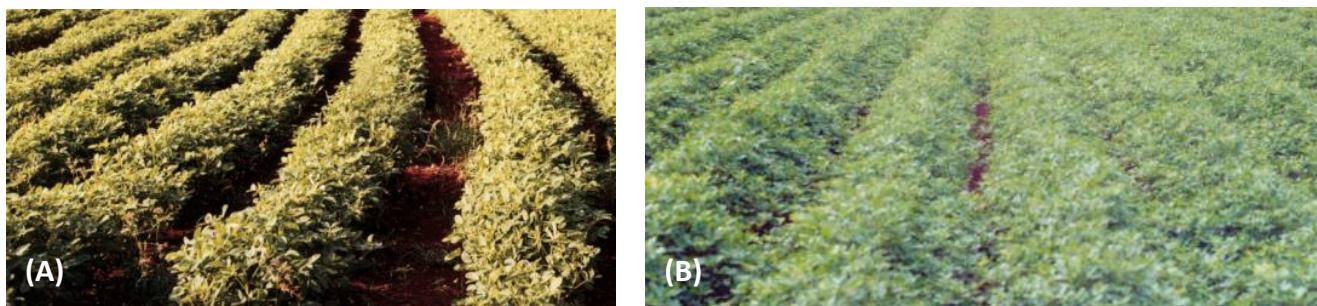
A produção de aflatoxinas em amendoim durante a etapa do campo pode ser minimizada garantindo condições ideais no solo. A temperatura e umidade do solo durante as etapas de maturação do amendoim influenciam na produção de aflatoxinas. Quando a umidade do solo é controlada, a atividade de água do grão se mantém constante, e a produção de fitoalexinas, que são substâncias de defesa da planta, é maior. A presença deste mecanismo de defesa da planta controla a produção de aflatoxinas pelo fungo. Em casos de estresse hídrico, a produção de fitoalexinas é menor. Somado ao aumento da temperatura, essas condições favorecem a infecção do amendoim e consequente produção da toxina (Doner et al, 1989). Sabendo da influência da umidade e temperatura do solo na produção de aflatoxinas, programas de prevenção estão sendo criados, como o *Afloman* na Austrália, desenvolvido pelo departamento de emprego, desenvolvimento econômico e inovação (DEEDI). Este programa foi criado para estipular a melhor época de colheita baseado na temperatura e umidade do solo. Ao adicionar dados da cultura, como o cultivar utilizado, a data do plantio, o tipo de solo, chuva ou irrigação no programa AfloMan disponível na internet, este indica o risco de contaminação por aflatoxinas. Quando o risco de produção de aflatoxinas é alto, com estresse hídrico e temperatura elevada, a colheita é feita antes do previsto, para evitar as condições ideais para a

produção da toxina. Quando as condições de umidade e temperatura são ideais, a colheita é feita no tempo correto de maturação do amendoim (DEEDI, 2015)

2.1.4.2 CULTIVARES

A espécie *Arachis hypogaea* apresenta duas subespécies: *Arachis hypogaea* subsp. *hypogaea* e *Arachis hypogaea* subsp. *fastigiata*. A subespécie *fastigiata* apresenta porte ereto (Figura 3 A) e ciclo curto, com florescimento no eixo central e inclui os tipos varietais Valência e Spanish. A subespécie *hypogaea* apresenta porte rasteiro (Figura 3 B) e ciclo tardio, não apresenta flores no eixo central e inclui os tipos *Runners* e *Virginia* (Santos et al., 2009). Esta subespécie de porte rasteiro apresenta como vantagem a possibilidade de colheita totalmente mecanizada, além de apresentar um ciclo mais longo, evitando assim períodos chuvosos durante a colheita (Godoy, 1990). A escolha do cultivar é importante para o controle da contaminação por aflatoxinas (Brasil, 2008). Ainda não foi desenvolvido cultivares com resistência comprovada a fungos aflatoxigênicos, contudo, características presentes em cultivares utilizados no Brasil podem contribuir para a diminuição da contaminação. Por exemplo, cultivares resistentes a insetos resultam na redução de danos mecânicos, especialmente nas vagens, dificultando a infecção por fungos (Brasil, 2008); cultivares resistentes a períodos de seca tendem a apresentar menor contaminação por aflatoxinas (Santos et al., 2009); e cultivares que apresentam dormência das sementes, característica importante em condições adversas e com umidade suficiente no solo, evitando o processo de germinação antes do arranquio, que causaria rupturas na película e vagem permitindo o acesso de fungos (Brasil, 2008)

Figura 3. Cultivar de porte ereto (A) e cultivar de porte rasteiro (B)



Fonte: Godoy et al., 2003

Os principais cultivares produzidos no sudeste do Brasil são os desenvolvidos pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Dentre eles, pode-se listar o cultivar de porte ereto IAC Tatu, e os cultivares de porte rasteiro Runner IAC 886, IAC 503 e IAC 505 (IAC, 2015). No nordeste do Brasil os cultivares mais adaptados são os desenvolvidos pela Empresa

Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (Embrapa), todos com porte ereto e resistência à seca: BR1, BRS 151 L7 e BRS Havana (Santos et al., 2009)

2.1.4.3 COLHEITA E PÓS COLHEITA

Quando 70% das vagens atingem a maturação fisiológica, a colheita do amendoim é iniciada. Este período varia de acordo com a cultivar plantada. No caso de cultivares de porte ereto, a colheita inicia-se entre 85 e 90 dias após a plantação, enquanto para cultivares de porte rasteiro, ocorre após 120 e 150 dias (Sofiatti et al., 2009). Uma colheita antecipada resulta no encolhimento da vagem durante a secagem, perda de óleo e qualidade do grão. Por outro lado, a colheita tardia reduz a qualidade dos grãos, resulta em perda de vagens por desprendimento no solo, possível germinação das sementes e maior susceptibilidade à contaminação por fungos (FAO, 2010).

O arranquio da planta no solo pode ser manual ou mecânico, e os cuidados que devem ser tomados nessa etapa são os de evitar danos físicos nas vagens e garantir a inversão adequada das plantas evitando o contato com o solo (Brasil 2008). No Estado de São Paulo, cerca de 90% da produção é colhida mecanicamente (Silva et al., 2009). A máquina utilizada para realizar o arranquio do amendoim é conhecida como “arrancador-invertedor de amendoim”, ela possui um sistema de corte da raiz principal do amendoim, um sistema de elevação e chacoalhamento das plantas e um sistema de inversão e enleiramento (Figura 4 A)

Figura 4. Arrancador- invertedor de amendoim (A), amendoim enleirado (B) e despencamento (bateção) do amendoim (C).



Fonte: Marques, 2011; Oliveira, 2012; Redação, 2015

Após o arranquio, o excesso de terra é removido das vagens durante o chacoalhamento para acelerar a secagem. As plantas são colocadas em leiras com a parte vegetal colocada para baixo e as vagens para cima, para que ocorra o processo de cura, no qual

ocorre o término do processo de maturação (Figura 4B). O amendoim adquire suas características sensoriais e o murchamento dos ramos facilita sua retirada do solo. A umidade nos grãos de amendoim no momento do arranque é de aproximadamente 45%, e estes permanecem em leiras até atingir umidade de 16 a 10%. Se não houver chuvas e conforme as condições do campo de insolação, temperatura e ventilação, esta etapa pode durar de 2 a 6 dias. (Câmara, 2014).

Em seguida, as vagens secas passam pela etapa de despencamento (bateção), que consiste na separação da vagem da planta. A máquina utilizada nesta etapa recolhe o amendoim disposto em leiras, a planta passa pelo cilindro batedor, no qual ocorre a separação física das vagens em relação a planta mãe (Câmara, 2014) (Figura 4C). Os cuidados nessa etapa consistem em: retirar a quantidade máxima de vagens perfeitas por planta, evitar danos mecânicos e remover terra, resto de planta e outros materiais que acompanham a vagem. Se houver a etapa de secagem artificial, o despencamento pode ocorrer com umidade do grão inferior a 20%, caso contrário, esta etapa deve ocorrer quando a umidade dos grãos atingir 8% (Brasil, 2008).

Após o recolhimento e despencamento do amendoim, uma etapa de pré-limpeza deve anteceder a etapa de secagem. A pré-limpeza retira materiais como solo, pedra, gravetos e restos de outras culturas através de um processo de vibração, peneiramento e ventilação (Câmara, 2014). A etapa de secagem pode ser natural ou artificial. Enquanto a secagem natural ocorre no campo até que a umidade do grão seja de 8%, a secagem artificial ocorre em secadores do tipo conjunto de carretas ou silos estáticos (Brasil, 2008). A temperatura do ar utilizada na secagem artificial deve ser baixa, aproximadamente 35°C e a umidade relativa 45%. Para o aquecimento do ar de secagem, geralmente utilizam-se queimadores de gás liquefeito de petróleo (GLP), que proporcionam um controle eficiente de umidade relativa e temperatura (Sofiatti et al, 2009)

2.1.4.4 BENEFICIAMENTO DO AMENDOIM

Após as etapas de pré-limpeza e secagem, o amendoim é debulhado, em seguida os grãos são classificados por tamanho em peneiras de crivos circulares e mesas densimétricas, passa por uma seleção eletrônica, seguida de uma seleção manual e enfim é acondicionado em sacas (Câmara, 2014).

A máquina responsável pelo debulhamento do amendoim apresenta um dispositivo de descascamento que possui um cilindro batedor de barras responsável pela quebra das vagens e um côncavo em forma de peneira pelo qual os fragmentos passam. A separação da casca e do grão ocorre pela força do ar produzido por um ventilador que remove a casca por ser

mais leve enquanto o grão segue para outro mecanismo de separação e limpeza (Silva et al., 2009)

Os grãos de amendoim são separados por tamanho, onde os de tamanho inferior ao da peneira 16/64 avos de polegada são encaminhados para produção de óleo e os grãos entre 16 e 17/64 avos de polegada são encaminhados para indústria de confeitos. Além dessa separação, o amendoim passa por mesas densimétricas que promovem a separação por peso específico. Os grãos mais pesados ficam na parte superior e são encaminhados para seleção eletrônica enquanto que a parte inferior é constituída pelos grãos mais leves e estes são encaminhados para a indústria de óleos. Os grãos partidos (amendoim banda) são encaminhados à indústria confeitaria (Câmara, 2014).

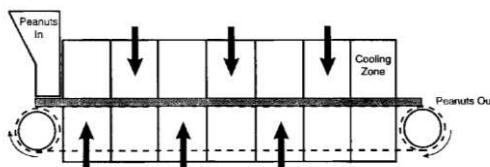
Em seguida ocorre o processo de seleção. A seleção eletrônica por cor e manual são as técnicas mais utilizadas. A seletora eletrônica possui um feixe de fibra ótica que causa um reflexo da tonalidade da cor do grão, que reconhece quatro cores: branco para o amendoim banda, amarelo para grãos imaturos ou grãos que pertencem a cultivares de coloração creme, preto para grãos ardidos, e vermelho para os grãos inteiros com película (Câmara, 2014). Neste processo, os grãos que apresentarem descoloração são rejeitados. O crescimento fúngico promove a descoloração do grão, sendo assim, este tipo de seleção pode levar à redução de grãos infectados e possivelmente contaminados com aflatoxinas. Em casos de seca acentuada durante as etapas do campo, o amendoim começa o processo de secagem antes da colheita, o que favorece a infecção e o crescimento fúngico. A separação por método colorimétrico nesses casos não é eficaz, sendo necessária a etapa de blanchamento e torração para que a descoloração seja evidenciada (ICMSF, 2002). O blanchamento consiste na remoção da película do amendoim. O amendoim é colocado em esteiras que se movem lentamente por fornos divididos em zonas de aquecimento, com aumento de temperatura de uma zona para outra. O fluxo de ar sobre esses fornos flui de forma alternada de cima para baixo. Na última zona, o amendoim é resfriado e a remoção da pele é feita por processo mecânico (Figura 5). Este processo de remoção altera a umidade e atividade enzimática do amendoim, fatores importantes na qualidade do grão (Adelsberg & Sanders, 1997).

A seleção colorimétrica manual provou ser o método mais eficaz quando comparado à seleção eletrônica, que apresenta eficácia de 72% na redução de aflatoxinas (Dickens & Whitaker, 1975). Contudo a técnica manual não é uma técnica comercialmente vantajosa, sendo que uma máquina de seleção colorimétrica substitui a mão de obra de 20 trabalhadores (Câmara, 2014). Apesar de aflatoxinas e fungos aflatoxingênicos apresentarem fluorescência, o uso de seleção através de métodos fluorimétricos para redução desta toxina no

grão não se mostrou eficaz, pois outros componentes do alimento podem apresentar fluorescência, dificultando a quantificação da toxina (Pelletier & Reizner, 1992)

O amendoim é ensacado após a seleção e em seguida armazenado.

Figura 5. Esquema do método de blanchamento. As setas indicam o fluxo de ar aquecido.



Fonte: Adelsberg & Sanders, 1997.

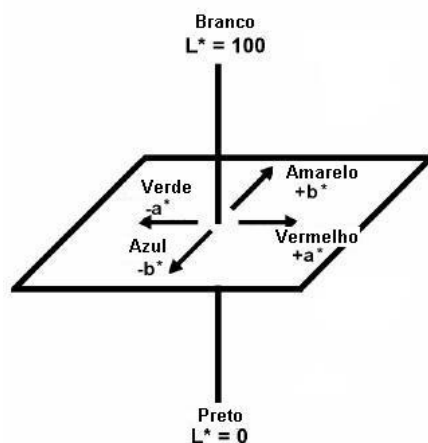
O processo de torração resulta na otimização do sabor, textura e aparência do amendoim. A formação da cor e os compostos aromáticos é resultado principalmente de uma reação de escurecimento não enzimático, a reação de Maillard. Esta reação ocorre em três etapas: na etapa inicial, ocorre a reação do grupo amino e um açúcar redutor, formando uma glicosilamina que sofre um rearranjo de Amadori, formando um produto de Amadori; na fase intermediária da reação, este composto é fragmentado a produtos sem coloração e um grupamento amínico é liberado; na fase final ocorre desidratação, ciclização e reação de polimerização, com a participação de grupamentos amínicos, formando pigmentos poliméricos de coloração marrom, as melanoidinas, e também, a formação de compostos de baixo peso molecular responsáveis pelo aroma característico do amendoim torrado, como metilpirazina, dimetilpirazina e metiletilpirazina (van Boekel, 2006; Smyth et al., 1998)

Os métodos utilizados para a torração do amendoim são: torração a seco (forno ou micro-ondas) e a torração a óleo. Ambos podem ser realizados em processo contínuo ou estático. Na torração a óleo, o amendoim sem a pele é adicionado em tanques contendo óleo aquecido (138-143°C) com o tempo de torração podendo variar de 3 a 10 minutos. A torração a seco pode ser realizada em fornos e em micro-ondas. Em uma escala industrial, a torração em fornos é mais utilizada. No processo contínuo o amendoim é movido pelo forno através de um transportador ou por alimentação gravimétrica. Este movimento garante que o ar quente passe pelos grãos promovendo uma torração uniforme. A temperatura e tempo de processo podem variar com a quantidade e umidade dos grãos (EPA, 1995)

Em muitos casos a cor do amendoim torrado é o primeiro parâmetro utilizado como controle comercial das condições de torração, uma vez que a reação responsável pela formação da cor é a mesma responsável por outras características como o aroma (Smyth et al., 1998). O sistema de cor CIELAB $L^*a^*b^*$ (Figura 6) está sendo utilizado para avaliar a cor do amendoim após a torração (Pattee et al., 1991). O sistema é composto pelos parâmetros L^* , que

indica a luminosidade e pode variar de 0 (preto) a 100 (branco), e os parâmetros cromáticos a^* e b^* . O parâmetro a^* indica a cor vermelha para valores positivos e para valores negativos a cor verde, enquanto que o parâmetro b^* indica a cor amarela para valores positivos e azul para valores negativos (Konica Minolta, 2015)

Figura 6. Representação esquemática do sistema CIELAB $L^*a^*b^*$



Fonte: Roda, 2011

2.1.5 MÉTODOS FÍSICOS PARA REDUÇÃO DE AFLATOXINAS

As aflatoxinas podem se transformar em moléculas não tóxicas ou com uma toxicidade inferior após absorver energia. Diferentes fontes de energia, como radiação gama, luz ultra violeta e visível, e calor podem ser eficazes na redução das aflatoxinas (Samarajeewa, 1990).

A utilização de radiação gama na redução de aflatoxinas apresenta várias limitações. A degradação da toxina por este método físico ocorre indiretamente, uma vez que as aflatoxinas são resistentes ao tratamento direto com a radiação, e a sua redução resulta de efeitos indiretos, como a formação de radicais livres (Fuell, 1966).

Dentre as aflatoxinas, a aflatoxina B1 mostra-se sensível ao tratamento com luz ultravioleta, contudo esta técnica não vem sendo aceita nas indústrias devido as suas limitações, que incluem baixa penetração e os compostos gerados nas etapas de degradação da toxina apresentarem toxicidade residual (Samarajeewa, 1990)

A eficácia na utilização de calor para redução de aflatoxinas depende do método utilizado (IARC, 2002). Um estudo conduzido por Njapau et al., (1998) avaliou a redução de aflatoxinas em amendoim pelo processo de cozimento a 95°C por 8 minutos. A redução

observada foi de apenas 19%. Por outro lado, a torração do amendoim por métodos secos mostra-se mais eficaz. Mann et al., (1967) obteve 34% de redução da aflatoxina após 2 horas de tratamento térmico a 100°C em amendoim com 30% de umidade. Lee et al., (1969) avaliou a destruição de aflatoxinas no processo de torração pelo calor seco, e em óleo, com variação de temperatura a 121-204°C e 162-173°C, respectivamente. Após a torração, a porcentagem de redução variou de 45 a 83% nos dois métodos, que não apresentaram diferença na destruição da toxina. Arzandeh & Jinap (2011) estudaram o efeito da concentração inicial, o tempo e temperatura de torração do amendoim na concentração de aflatoxinas e concluíram que estes são os fatores chaves que afetam a redução da toxina durante o processo. Em amostras naturalmente contaminadas, obteve-se uma redução de aflatoxina B₁ de 80,2%, e 69,7% para aflatoxina B₂ com concentração inicial de 174 e 25 µg/kg à temperatura de 150°C e 130°C respectivamente. Para amostras artificialmente contaminadas, a redução de aflatoxina B₁ e B₂ foi de 78,4 e 57,3% respectivamente a 150°C por 120 minutos.

Apesar dos estudos demonstrarem a utilização da torração para redução considerável da toxina, o tempo e temperatura necessários para que isso ocorra pode comprometer a qualidade sensorial do amendoim, sendo necessários estudos que avaliem a qualidade sensorial como a cor do amendoim torrado e a degradação da toxina concomitantemente.

2.1.6 OCORRÊNCIA DE FUNGOS E AFLATOXINAS NO AMENDOIM

Como abordado anteriormente, as características de produção do amendoim o tornam suscetíveis à contaminação fúngica. Seu desenvolvimento dentro do solo e variações climáticas durante sua maturação estão diretamente relacionadas com a contaminação fúngica e produção de toxinas.

O solo é o principal reservatório de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Horn & Doner (1998), ao analisar amostras de solo proveniente das principais regiões produtoras de amendoim dos Estados Unidos, obtiveram maior prevalência de *A. parasiticus* (56%) do que de *A. flavus* (40,7%). González et al. (2008), encontraram *A. flavus* em 8% das 25 amostras de solo coletadas no Estado de São Paulo enquanto no trabalho realizado por Atayde et al. (2012) o fungo mais frequente isolado foi *Penicillium spp* (52,1%) e a espécie mais frequente isolada no solo do gênero *Aspergillus* foi o *Aspergillus flavus* (13,4%).

A micobiota do amendoim em diferentes fases de seu desenvolvimento no campo foi estudada por González et al., (2008). Os fungos mais frequentemente isolados foram *Fusarium spp.* (26%), *A. flavus* (17%), *A. terreus* (9,5%), *Penicillium spp.* (5%), *Rhizopus spp.*

(4%), *A. parasiticus* (2,3%), *Curvularia* spp. (0,9%), *Beltrania* spp. (0,3%), *Mucor* spp. (0,3%), *A. niger* (0,3%) e *F. verticillioides* (0,3%). *A. flavus* foi mais frequente nas amostras de amendoim na etapa de enchimento da vagem (43,93%), na maturação total das vagens (33,6%) e na etapa das vagens secas (7,55%). Não foram isolados *A. flavus* e *A. parasiticus* nas etapas iniciais de desenvolvimento do amendoim que apresentavam atividade de água de 0,98. Aflatoxinas não foram detectadas nas etapas iniciais de desenvolvimento do amendoim, e estiveram presentes em 32% das amostras a partir das etapas de enchimento das vagens, com variação de 4,20 a 198,84 µg/kg. Resultados semelhantes foram observados por Zorzete et al. (2013), que analisou a micobiota em diferentes fases do desenvolvimento de amendoim e obteve como fungo mais frequente o *Fusarium* spp.

No estudo realizado por Zorzete et al., 2013 avaliou-se a presença de fungos e micotoxinas em amostras de amendoim dos cultivares IAC Runner 886 e IAC Caiapó armazenados por 6 meses. Os resultados obtidos mostraram prevalência de cepas de *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Nigri*, *Fusarium* spp, *Penicillium* spp e *Rhizopus* spp. nos dois cultivares analisados. As aflatoxinas estavam presentes em 11,8% das amostras dos grãos de amendoim dos dois cultivares e em 5,7% e 8,6% nas amostras de casca do cultivar IAC Caiapó e IAC Runner 886, respectivamente (Zorzete et al., 2013). Outro trabalho também analisou a micobiota e produção de aflatoxinas em amendoim da cultivar IAC Runner 886 em quatro cidades do estado de São Paulo: Jaboticabal, Tupã, Rosália e Cafelândia. Tanto na casca como no grão, *Fusarium* spp. foi o mais frequente (70,2%) e *A. flavus* (9,8%) foi o mais frequente do gênero *Aspergillus*. Foram encontradas as aflatoxinas em 5% das amostras de amendoim com concentração variando de 1 a 12,7 µg/kg e 13,8% das amostras da casca com variação de 1 a 117,8 µg/kg (Atayde et al., 2012).

Youssef et al. (2008) coletaram 60 amostras de amendoim, sendo 20 de amendoim cru, 20 torrado e 20 torrado com sal em mercados do Egito. Os fungos com maior frequência pertenciam ao gênero *Aspergillus* (95% das amostras), *Penicillium* (15%) e *Fusarium* (12%), sendo *A. niger* (36,7%), *A. flavus* (33,3%) e *A. ficuum* (26,7%), as espécies mais frequentes. Neste trabalho também foi avaliado a presença de aflatoxinas de forma qualitativa (TLC) e a presença de aflatoxina B₁ por imunoensaio ELISA. Apenas as amostras estocadas de 12 e 24 meses apresentaram contaminação que variaram de 6,2-10,6 µg/kg. Neste trabalho os autores não realizaram testes de potencial de produção de aflatoxinas pelos fungos isolados. Outro trabalho realizado nas regiões do Egito foi conduzido por Sultan & Magan (2010). Foram analisadas amostras de amendoim em casca durante os anos de 2007 e 2008. Os fungos toxigenicos mais prevalentes nos dois anos foram *Aspergillus* section *Flavi* (4,7-78,3%), *Aspergillus* section *Nigri* (9,4-52,6%), e *Aspergillus* section *Circumdati* (5,1-30,9%). O

potencial de produção de aflatoxinas pelos isolados foi testado sendo que 91% e 87% das cepas de *Aspergillus* section *Flavi* foram produtoras em 2007 e 2008, respectivamente. Dentre os *Aspergillus* section *Flavi* isolados, 95% foram identificados como *Aspergillus flavus*.

Pitt et al. (1993) analisaram 109 amostras de amendoim coletadas na Tailândia. *A. flavus* foi a espécie mais frequente, presente em 95% das amostras analisadas, seguido de *A. niger* (86%). Outras espécies de *Aspergillus* apresentaram baixa incidência. *Rhizopus oryzae* (60%) e *Eurotium rubrum* (51%) também apresentaram uma alta incidência.

Tabela 1. Ocorrência de aflatoxinas em amostras de amendoim no Brasil

Alimento	Nº de amostras	Incidência de AFT (%)	Variação (µg/kg)	Método	Referência
Amendoim	100	50	0,5-113	CLAE	Magrine et al., 2011
Grão amendoim (cultivar IAC 886)	35	11,4	0,03-16,6	CLAE	Zorzete et al., 2013
Casca amendoim (cultivar IAC 886)	35	8,6	1,3-3,3	CLAE	Zorzete et al., 2013
Grão amendoim (cultivar Ciapó)	35	11,4	0,3-2,7	CLAE	Zorzete et al., 2013
Casca amendoim (cultivar Ciapó)	35	5,7	0,5-2,3	CLAE	Zorzete et al., 2013
Grão amendoim (cultivar IAC 886)	25	32,0	3,79-125,07	CLAE	Gonçales et al., 2008
Amendoim cru	48	39,6	12,88	CLAE	Oliveira et al., 2009
Amendoim torrado salgado	48	31,3	1,60	CLAE	Oliveira et al., 2009
Amendoim salgado	48	41,7	3,32	CLAE	Oliveira et al., 2009
Amendoim doce	48	35,4	3,47	CLAE	Oliveira et al., 2009
Paçoca	48	72,9	8,79	CLAE	Oliveira et al., 2009
Amendoim	35	31,4	nd-936	CCD	Freitas & Brigido, 1998
Produto de amendoim	45	66,7	nd-1789	CCD	Freitas & Brigido, 1998
Amendoim	10	40,0	2-300	CCD	Silva et al., 2013
Paçoca	47	17,0	9-466	CCD	Silva et al., 2013
Amendoim	21	38,1	64	CCD	Rocha et al., 2008
Paçoca	15	13,3	26	CCD	Rocha et al., 2008
Amendoim in natura	12	58,3	nd-126,18	CCD	Oliveira & Koller., 2011
Paçoca	10	60,0	nd-3,5	CCD	Oliveira & Koller., 2011
Amendoim e derivados	664	31,3	nd-5476	CLAE	Mallman et al., 2003
Amendoim	58	8,6	nd-87,5	CCD	Hoeltz et al., 2012
Produto de amendoim	43	20,9	nd-84,6	CCD	Hoeltz et al., 2012
Casca de amendoim antes do arranquio	40	5	1-117,8	CLAE	Atayde et al., 2012
Casca de amendoim depois do arranquio	40	8,75	1-14,96	CLAE	Atayde et al., 2012

AFT: aflatoxinas totais. nd: não detectado. CLAE: Cromatografia Líquida de alta eficiência. CCD: Cromatografia em Camada Delgada.

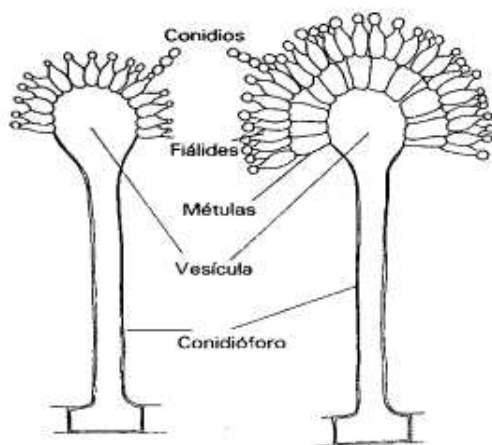
A produção de aflatoxinas pode ocorrer durante toda a cadeia produtiva do amendoim. A ocorrência de aflatoxinas em amostras de amendoim analisadas no Brasil está

ilustrada na Tabela 1. A comissão da comunidade europeia estabeleceu em 2006 através do regulamento (CE) nº 1881, limites máximos de 15µg/kg de aflatoxinas totais em amendoim destinado a processamento posterior (seleção ou outro tratamento físico) antes de ser consumido, e 4 µg/kg de aflatoxinas totais para amendoim pronto para consumo. No Brasil segue-se a RDC nº 07 criada em 2011 pela ANVISA com limites de 20µg/kg de aflatoxinas totais para amendoim e produtos (Brasil, 2011). Nota-se, a partir dos dados de ocorrência, uma frequência variada de aflatoxinas em amendoim, assim como a variação da contaminação, que atinge tanto valores abaixo dos estabelecidos pela legislação como também valores acima do permitido.

2.2 *ASPERGILLUS* SECTION *FLAVI* PRODUTORES DE AFLATOXINAS.

O gênero *Aspergillus* foi descrito em 1729 por um italiano chamado Pier Antonio Micheli (Micheli, 1729) e recebeu este nome devido a similaridade de sua estrutura ao instrumento utilizado pelo clero para aspergir água benta. Pertence à classe dos Hifomicetos, com colônias que diferem na coloração e estruturas de frutificação. Apresentam formação de conidióforos com as estipes grandes e largas, e vesícula geralmente esférica na extremidade (Pitt & Hocking, 2009). Na porção fértil da vesícula ocorre a formação das fiálides, estruturas responsáveis pela produção de esporos mitóticos denominados conídios. São classificados como monosseriados quando apresentam apenas fiálides e bisseriados quando apresentam métula e fiálide (Figura 7) (Samson et al., 2004). O tamanho, arranjo e a coloração do conídio são características importantes para identificação das espécies.

Figura 7. Estrutura do gênero *Aspergillus*.



Fonte: Samson et al., 2004

As espécies de *Aspergillus* section *Flavi* apresentam conídios geralmente nas colorações de verde amarelado ao marrom escuro e são capazes de produzir esclerócio. (Varga et al., 2011). As principais espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxinas são *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Outras espécies menos comuns que podem produzir aflatoxinas são: *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. minisclerotigenes*, *A. parvisclerotigenes*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonomius*, *A. pseudotamarii*, *A. togoensis*, *A. mottae*, *A. sergii*, *A. transmontanensis* e *A. novoparasiticus* (Pildain et al. 2008; Varga et al. 2011; Soares et al. 2012; Gonçalves et al. 2012; Massi et al., 2014).

Aspergillus flavus é caracterizado pelo rápido crescimento, apresentação de colônias verdes amarelada, de 65-70 mm de diâmetro após 7 dias a 25°C, ocorre em quase todos os alimentos em países tropicais. São capazes de produzir apenas aflatoxinas B₁ e B₂, apenas 40% de suas cepas são produtoras (Frisvad et al., 2007). A temperatura mínima para crescimento é de 10-12°C, a máxima de 43-48°C e a ótima de 33°C. A atividade de água mínima na faixa de temperatura ótima para crescimento é de 0,78. Crescem em faixa de pH que pode variar de 3,4 -10. Apresentam resistência térmica, com valor D_{45°C} acima de 160 horas, D_{50°C} de 16 horas, D_{52°C} de 40-15min e D_{60°C} igual a 1 minuto, apresentando valor Z de 3,3 – 4,1°C (Pitt & Hocking, 2009)

Aspergillus parasiticus não é encontrado em grandes variedades de alimentos, sendo mais descrito em amendoim. É mais restrito geograficamente quando comparado ao *A. flavus*. A maioria das cepas são produtoras de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (Frisvad et al., 2007). Apresentam temperatura de crescimento variando de 12-42°C com valor ótimo a 32°C. A a_w mínima para crescimento de 0,82 a 25°C, 0,81 a 30°C e 0,8 a 37°C. O crescimento pode ocorrer numa faixa de pH de 2,4-10. Apresenta baixa resistência ao tratamento térmico (Pitt & Hocking, 2009).

As espécies *A. arachidicola* e *A. minisclerotigenes* foram recentemente descritas isoladas de amostras de amendoim na Argentina. *A. arachidicola* cresce bem a 25, 37 e 42°C, apresentando colônias com diâmetro de 6-6,5 cm após 7 dias de incubação a 25°C em CYA e a 37°C as colônias apresentam diâmetro de 6-7 cm. Não há formação de esclerócio, pode ser uni ou bisseriado. *A. minisclerotigenes*, assim como *A. arachidicola*, cresce bem a 25,37 e 42°C, apresentando colônias com diâmetro de 6-7 cm após 7 dias de incubação a 25°C e também a 37°C em CYA. Há formação de esclerócios (150-300mm de diâmetro), é predominantemente bisseriado. Ambos *A. arachidicola* e *A. minisclerotigenes* são produtores de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (Pildain et al., 2008)

As espécies *A. pseudotamarii*, *A. parvisclerotigenes*, e *A. togoensis*, são produtoras de aflatoxina B (Ito et al., 2001; Frisvad et al., 2005; Varga et al., 2011; Rank et al., 2011).

Enquanto que as espécies *A. bombycis*, *A. pseudocaelatus*, *A. mottae*, *A. sergii*, *A. transmontanensis*, *A. pseudonomius* e *A. novoparasiticus* são produtoras de aflatoxinas B e G (Peterson et al., 2001; Varga et al., 2011; Soares et al., 2012; Gonçalves et al., 2012, Massi et al. 2014)

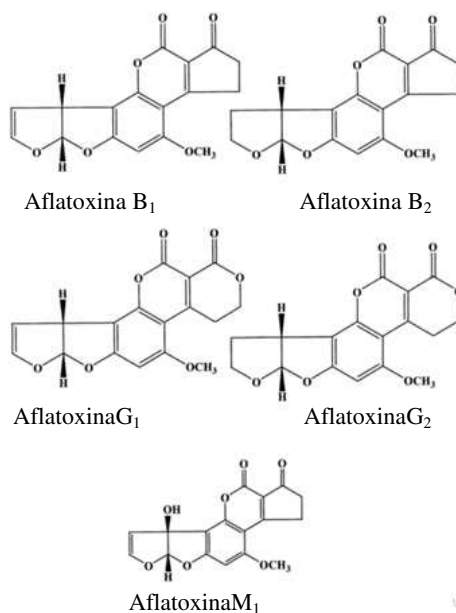
2.3 AFLATOXINAS

2.3.1 CARACTERÍSTICAS E CONDIÇÃO PARA PRODUÇÃO

As aflatoxinas são moléculas de dihidrofuranos unidas a anéis cumarínicos de baixo peso molecular. Apresentam-se na forma de cristais incolores ou levemente amarelados. São fluorescentes sob luz ultravioleta, com emissão de fluorescência azul pelas aflatoxinas B₁ e B₂, verde pela aflatoxina G₁, verde azulada pela aflatoxina G₂ e azul violeta pela aflatoxina M₁. A Figura 8 apresenta a estrutura das aflatoxinas. São pouco solúveis em água, insolúveis em solventes apolares e solúveis em solventes orgânicos, como clorofórmio e metanol, e especialmente em dimetil sulfóxido (IARC, 2002).

São metabolitos secundários, formados através da via biossintética das policetidas (Bennett & Klich, 2003). A produção de aflatoxina é influenciada por fatores intrínsecos (umidade, atividade de água (a_w), pH e composição nutricional) e extrínsecos (temperatura, umidade relativa, gases atmosférico).

Figura 8. Estrutura das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁.



Fonte: Moss, 2002 modificado.

A temperatura e a_w são fatores que além de influenciar o crescimento de cepas aflatoxigênicas, tem papel importante na expressão dos genes responsáveis pela biossíntese de aflatoxina, estimulando sua produção ou não. Enquanto a condição ótima para crescimento de *Aspergillus flavus* é de 30-35°C e a_w 0,99, a condição para produção de aflatoxinas é de 25-30°C e a_w 0,95 (Abdel-Hadi et al., 2012). Além das variáveis de temperatura e a_w , a constituição nutricional da matriz alimentar também interfere no crescimento e produção da toxina, por exemplo, em amendoim, as condições ideais para crescimento de *A. flavus* são 34°C e a_w 0,94 e para produção da toxina 32°C e a_w 0,99 (Sanchis & Magan, 2004).

2.3.2 EXPOSIÇÃO AGUDA E CRÔNICA

A exposição às aflatoxinas pode causar intoxicação aguda ou crônica. Os casos de intoxicação aguda são raros. Estima-se que o DL_{50} para intoxicação aguda em humanos seja de 5 mg/kg, mostrando uma certa tolerância à aflatoxina B₁ (Moss, 2002). Em 1974 foi relatado um surto de aflatoxicose na Índia, envolvendo 397 pacientes, que apresentaram febre, vômito e anorexia. Parte dos casos evoluiu com melhora dos sintomas e 106 pessoas morreram (Krishnamacharietal, 1975). A exposição crônica por aflatoxinas mostra-se mais crítica, pois além da ação imunossupressora e causar cirrose hepática, é considerada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) pertencente ao grupo 1, i.e, carcinogênica ao homem (IARC, 2002).

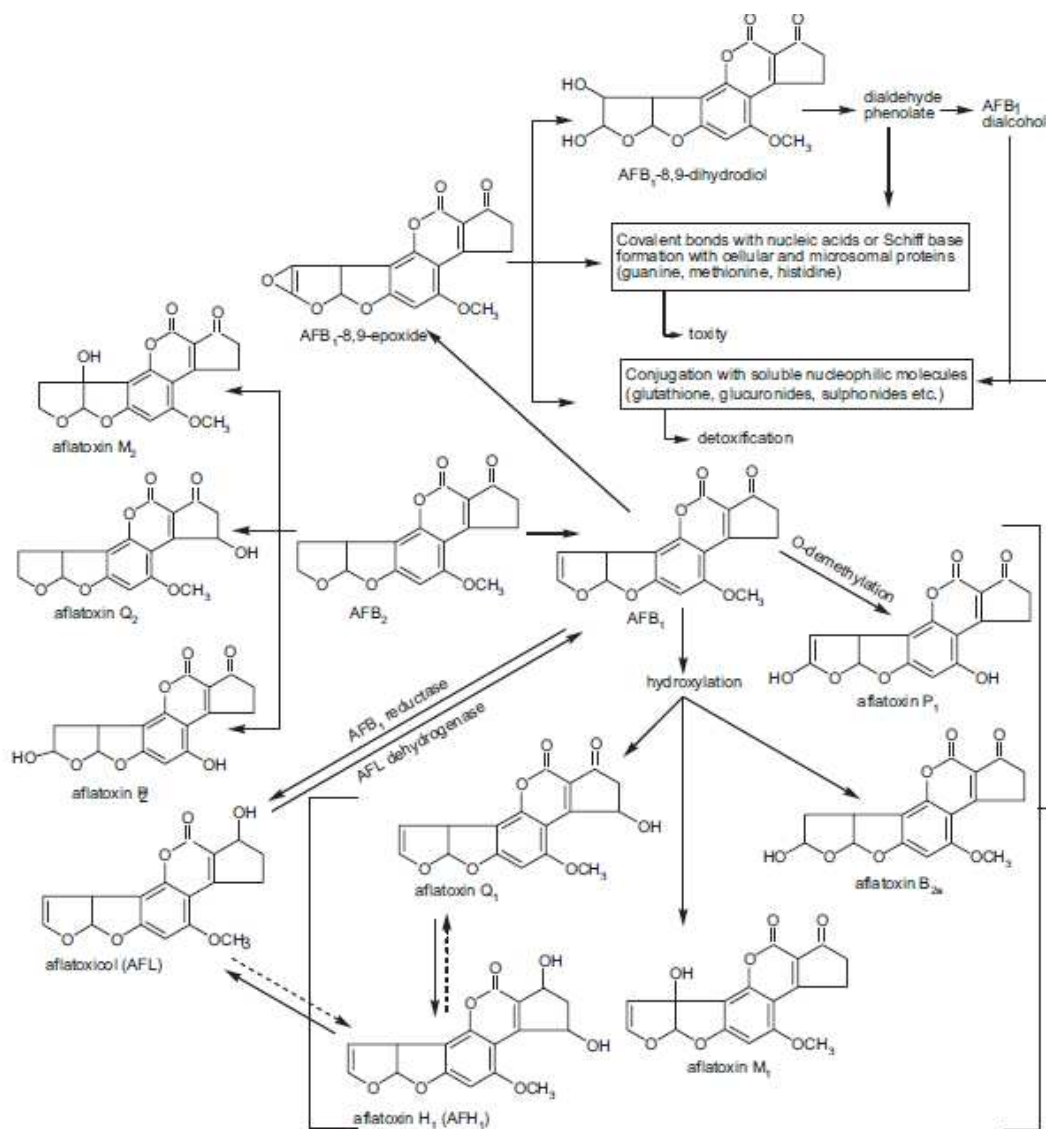
As ações imunossupressoras em animais incluem aplasia do timo, redução numérica e funcional dos linfócitos T, redução no mecanismo de fagocitose e do sistema complemento. Estudos epidemiológicos de exposição humana a dieta naturalmente contaminada com aflatoxinas evidenciam a associação entre o consumo e a incidência de carcinoma hepatocelular. Estudos controversos mostram que a presença de aflatoxinas é suficiente para desencadear a formação do câncer hepático, enquanto outros trabalhos mostram que é necessária a presença do vírus da hepatite B para iniciar este processo (ICMSF, 2002; WHO, 1999). A presença de aflatoxinas e do vírus de hepatite B apresenta uma ação sinérgica para o desenvolvimento do câncer. As aflatoxinas são aproximadamente 30 vezes mais potente na presença do antígeno de superfície da hepatite B que em pessoas que não apresentam este antígeno. Além disso, o risco de câncer em pacientes com o vírus da hepatite B passa de 5 para 60 quando a infecção é associada a exposição por aflatoxinas. Um fato que pode explicar essa ação sinérgica entre aflatoxinas e vírus da hepatite B é a presença do vírus reduzir a capacidade de detoxificação das aflatoxinas (Williams et al., 2004).

2.3.3 TOXICOCINÉTICA E TOXICODINÂMICA

A absorção via oral da toxina é facilitada devido a sua característica lipofílica. Após a ingestão, as aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal, distribuídas pela circulação sanguínea e se concentra no fígado, devido à alta permeabilidade da membrana do hepatócito pela toxina, e no rim, em menor quantidade (Eaton & Groopman, 1994).

A biotransformação da aflatoxina B₁ resulta tanto na ativação de compostos, responsáveis por seus efeitos tóxicos e carcinogênicos, como na inativação e eliminação. As principais reações que envolvem o metabolismo de aflatoxinas são de oxidação, hidroxilação e demetilação (Figura 9) (Wu et al., 2009).

Figura 9. Principais reações e produtos da biotransformação da aflatoxina B₁.



Fonte: Wu et al., 2009

A oxidação da ligação dupla do anel furano, realizada pela citocromo P450, resulta na formação de um epóxido AFB₁ – 8,9 – oxido. Por ser altamente instável, é uma molécula eletrofílica e altamente reativa. O carbono 8 do epóxido se liga de forma covalente ao nitrogênio na posição 7 da base nitrogenada guanina presente no DNA, tornando-se estável e conferindo mutagenicidade. O epóxido formado pode apresentar-se na forma de isômeros AFB₁ – endo – 8,9 – oxido e AFB₁ – exo – 8,9 – oxido. Apenas o isômero exo apresentou atividade genotóxica (Guengerich et al., 1998). Em soluções aquosas, o epóxido sofre uma hidrólise não enzimática, com a formação de AFB₁ – 8,9 – dihidrodio. Esta estrutura pode se apresentar como fenolato, através de ressonância, capaz de reagir com aminoácidos das proteínas, especialmente com lisina, e formar base de Schiff. Esta reação é responsável pela toxicidade aguda da aflatoxina (Eaton & Gallagher, 1994). A reação de hidroxilação da aflatoxina resulta na formação de moléculas com menor atividade biológica. A hidroxilação nas posições 3 e 9 resulta na formação de AFQ₁ e AFM₁ respectivamente. AFQ₁ é um produto de detoxificação da aflatoxina, apresenta baixa toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade. A AFM₁ é um metabolito encontrado no leite, é menos tóxica que a AFB₁, mas também é considerada carcinogênica (IARC, 2002; Eaton & Groopman, 1994). A demetilação da AFB₁ resulta na formação de AFP₁, substância com menor toxicidade.

A avaliação da exposição de aflatoxinas em humanos pode ser feita pela análise de biomarcadores na urina, sangue periférico e outros órgãos. Na urina, podem ser encontradas as aflatoxinas não metabolizadas (AFB₁ e AFG₁), os metabolitos originados da hidroxilação (AFM₁ e AFQ₁) e da demetilação (AFP₁). Apesar de muito utilizados para avaliação da exposição aguda, não podem ser utilizados para análise de exposição crônica. Os marcadores encontrados no sangue periférico são as aflatoxinas ligadas covalentemente às proteínas plasmáticas, principalmente a albumina. A análise deste biomarcador apresenta como vantagem maior praticidade na coleta de amostra, quando comparada à urina, e avalia a exposição da toxina por um período maior (2-3 meses), levando em consideração o tempo de meia vida da albumina em humanos (Eaton & Groopman, 1994).

2.4 ANÁLISE DE RISCO

Risco pode ser definido como a probabilidade de ocorrência de um efeito adverso à saúde, consequente a exposição a um perigo. Este, por sua vez é definido como um agente biológico, físico ou químico capaz de causar um efeito adverso (Codex, 1999).

Estes dois conceitos podem ser simbolicamente expressos através da equação:

$$risco = \frac{perigo}{medida\ de\ controle}$$

Apesar de nunca obter-se um risco igual a zero, a utilização de medidas de controle minimiza o risco (Kaplan & Garrick, 1980).

A análise de risco é um processo composto por três componentes: avaliação do risco, que confere a base científica, o gerenciamento do risco, realizado a partir da avaliação de risco por agências reguladoras e a comunicação do risco (figura 10). Estas etapas se correlacionam e visam garantir a segurança da saúde pública.

Figura 10. Etapas da análise de risco.



Fonte: Jardim & Caldas, 2009, Codex 1999.

2.4.1. AVALIAÇÃO DE RISCO DE MICOTOXINAS

A avaliação do risco tem como principal objetivo estimar a probabilidade e severidade da ocorrência do risco, além de identificar medidas de intervenção. É um processo distribuído em quatro etapas: (i) identificação do perigo, (ii) caracterização do perigo, (iii), avaliação da exposição e (iv) caracterização do risco (Codex, 1999).

2.4.1.1 IDENTIFICAÇÃO DO PERIGO

A etapa de identificação do perigo tem por objetivo identificar o agente responsável pelo efeito adverso na saúde. Esta é uma etapa qualitativa e pode ser analisada sob duas perspectivas: durante o desenvolvimento de um novo produto, com o objetivo de identificar possíveis perigos que devem ser evitados para garantir a segurança do alimento, ou por abordagem retrospectiva, através da análise de dados epidemiológicos a fim de caracterizar os efeitos adversos apresentados por consumidores, identificar o alimento que causou esse efeito adverso e isolar o agente causador (Codex, 1999).

Várias micotoxinas foram descobertas a partir de efeitos adversos observados tanto em humanos como em animais. Em 1960 o amendoim utilizado como fonte proteica na ração de animais domésticos foi responsável por causar uma síndrome de etiologia desconhecida até então, que foi denominada *turkey X disease*, pois acometeu primeiramente perus e em seguida outros animais domésticos. Após uma extensa investigação, o agente etiológico responsável pela doença foi identificado como aflatoxinas (Cole, 1986). A partir de então, estudos foram feitos para caracterização deste perigo.

2.4.1.2 CARACTERIZAÇÃO DO PERIGO

Uma vez identificado o perigo, a etapa de caracterização descreve de forma qualitativa ou quantitativa a severidade e duração do efeito adverso resultante da ingestão do microrganismo ou sua toxina. Relaciona a quantidade consumida (dose) e a probabilidade ou severidade do efeito adverso observado (resposta). O estudo de dose-resposta varia de acordo com o agente causal, o tipo de resposta e o hospedeiro (Codex, 1999).

Quando a substância estudada não apresenta efeito carcinogênico, os estudos de dose-resposta levam em consideração pontos como NOAEL (no observed adverse effect level), o que corresponde a maior dose testada na qual efeitos adversos não são observados e LOAEL (lowest observed adverse effect level), o qual representa o nível do menor efeito observado. Os valores observados de NOAEL podem ser utilizados para estipular doses de referência (RfD) e doses que podem ser consumidas diariamente com segurança ao longo da vida sem apresentar efeitos adversos à saúde (TDI). Para substâncias carcinogênicas e genotóxicas, como as aflatoxinas, essa abordagem não é feita, uma vez que uma dose diária (TDI) estipulada a partir do valor de NOAEL não pode ser determinada, pois a exposição a qualquer concentração da substância seria suficiente para observação de um efeito (Kuiper-Goodman, 2004).

Uma alternativa para avaliação de dose-resposta em substâncias genotóxicas e carcinogênicas é o método da dose padrão (BMD- Benchmark Dose). Esta análise baseia-se em um modelo matemático ajustado em dados experimentais dentro de uma variação observada e estima a dose que causa a menor resposta mensurável (BMR), geralmente escolhida a 5 ou 10% de incidência do efeito acima do controle. O comitê científico da autoridade europeia de segurança alimentar (EFSA) recomenda a utilização do limite inferior da dose padrão (BMDL) com a BMR de 10% (BMDL10) como ponto de referência adequado para compostos genotóxicos e carcinogênicos. Este valor representa o menor aumento estatisticamente significativo que pode ser mensurado nos estudos desenvolvidos (EFSA, 2007).

2.4.1.3 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO

Esta etapa avalia qualitativa ou quantitativamente a ingestão de agentes biológicos, químicos e físicos (Codex, 1999). Para realizar a avaliação de exposição são considerados dados de concentração da substância no alimento, o consumo do alimento e o peso corpóreo, como ilustrado na equação:

$$\text{Exposição} = \frac{\text{concentração da substância} \times \text{Consumo do alimento}}{\text{peso corpóreo}}$$

A determinação da concentração da substância no alimento pode ser influenciada por vários fatores, como processo de amostragem, o método analítico utilizado, sua precisão e exatidão, além dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) (Jardim & Caldas, 2009). Os valores relatados como não detectáveis nas análises das amostras do alimento em estudo devem ser substituídos pelo valor de LOD (limite superior), pelo valor de LOD dividido por 2 (limite mediano) ou por zero (limite inferior) dependendo da porcentagem dos resultados reportados abaixo do limite de detecção (GEMS/Food-EURO, 1995)

Os dados de consumo podem ser obtidos através de balanços alimentares, dados de Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) e questionários alimentares individuais (FAO, 2001). A escolha dos dados dependerá dos objetivos, alimentos e necessidade de cada estudo. Quando não estiver associado ao consumo, o peso corpóreo médio pode ser utilizado (Jardim & Caldas, 2009).

Dois modelos podem ser utilizados para avaliação da exposição, o modelo determinístico e o probabilístico. No modelo determinístico, os dados de concentração da substância, consumo e peso corpóreo são valores pontuais como média, mediana, percentil ou valor máximo. Esta abordagem tem como vantagem uma maior facilidade para gerar os resultados, contudo, a interpretação dos dados gerados pode não ser tão representativa, uma vez que os dados utilizados são pontuais. Devido as limitações, a análise determinística é indicada como metodologia de *screening* com o objetivo de identificar se o consumo da substância estudada pelo consumo de alimento oferece risco à saúde. Caso o risco não seja de preocupação para saúde pública, estudos como análise probabilística não são realizados (WHO, 2005). O modelo probabilístico permite uma visão mais realista da exposição à substância estudada, pois considera todas as fontes de variabilidade e incerteza. Neste modelo, toda informação disponível das variações no consumo do alimento, concentração da substância no alimento e peso corpóreo da população é considerado (Arcella & Leclercq, 2004).

2.4.1.4. CARACTERIZAÇÃO DO RISCO

A etapa de caracterização do risco representa a integração da identificação e caracterização do perigo e a avaliação da exposição para obtenção da estimativa do risco, considerando as incertezas. O desenvolvimento desta etapa da análise do risco requer disponibilidade de dados e recursos humanos especializados (Codex, 1999).

O cálculo da margem de exposição (MOE) é uma das metodologias utilizadas para caracterização do risco em substâncias carcinogênicas e genotóxicas e pode ser calculada segundo a fórmula:

$$MOE = \frac{\textit{Referência toxicológica}}{\textit{Exposição}}$$

A BMDL é a referência toxicológica utilizada neste cálculo, preferencialmente a BMDL10 (Jardim & Caldas, 2009). Valores de MOE igual a 10.000 ou maiores, quando baseados em BMDL10 proveniente de um estudo em animais indicariam risco de baixa preocupação do ponto de vista de saúde pública e pode ser considerado como uma prioridade baixa para a gestão de risco. Entretanto, esse julgamento deverá ser feito pelos gestores de risco durante o gerenciamento de risco, outra área da análise de risco (EFSA, 2005).

Diversos estudos de avaliação de risco para micotoxinas em alimentos têm sido realizados devido à ocorrência em diversos alimentos. Estudos de avaliação de risco para aflatoxinas foram realizados em diversos países como Japão (Sugita-Konishi et al, 2010), continente africano (Shephard, 2008), e Brasil (Jager et al., 2013). Andrade et al.(2013) desenvolveram uma avaliação da exposição de risco às aflatoxinas em produtos consumidos no Brasil e obtiveram resultados que apontam o amendoim e seus produtos derivados como alimento de maior preocupação, responsável pela exposição da população a esta toxina. Estes dados ressaltam a importância do monitoramento deste alimento, durante toda a cadeia produtiva do amendoim, para assegurar sua qualidade e segurança no produto final.

2.4.5. APLICAÇÃO DO CONCEITO DOS OBJETIVOS DE INOCUIDADE DE ALIMENTO (FSO) NO GERENCIAMENTO DE RISCO DAS AFLATOXINAS NO AMENDOIM

O uso da análise de risco tem aumentado o interesse da utilização de métricas baseadas no risco para uma relação mais direta com a saúde pública. Os governos são responsáveis pelo estabelecimento de metas de saúde pública. O uso das metas baseadas na análise de risco introduzem ferramentas e conceitos como ALOPE (*Appropriate Level of*

Protection), FSO (*Food safety objective*) e PO (*Performance Objective*). O ALOPE é o nível de risco assumido por uma sociedade. Resulta de uma avaliação de risco, e leva em consideração os custos envolvidos nas medidas de controle. Os valores assumidos de ALOPE não esclarecem aos produtores de alimentos as medidas necessárias para obter este nível de proteção. Como auxílio a obtenção destes níveis, o FSO estabelece de forma flexível, metas que devem ser atingidas pela cadeia produtiva para obter uma frequência ou concentração máxima permitida de um perigo em um alimento no momento do consumo. Em casos que o FSO representa praticamente a ausência de perigo no produto final, o produtor de alimentos precisa estabelecer um nível, o PO, a ser atingido na cadeia produtiva antes de obter o produto final (ICMSF, 2006).

O conceito de FSO foi aplicado qualitativamente na cadeia produtiva do amendoim por Pitt et al. (2013) (Figura 11), para entendimento das etapas que pode haver crescimento ou diminuição da toxina no amendoim.

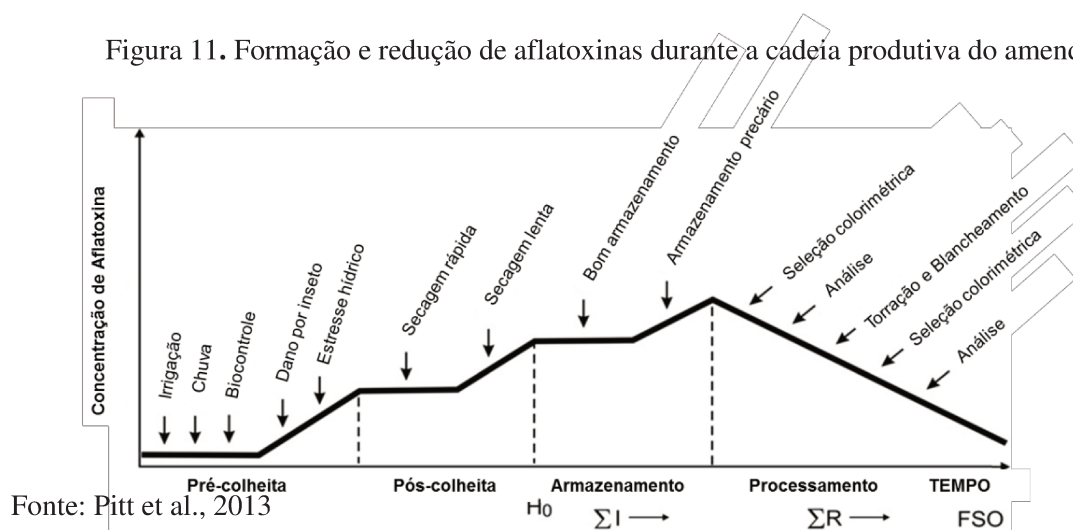
Para melhor compreensão de como os valores máximos de aflatoxinas permitidos em amendoim podem ser alcançados pelo produtor, garantindo a produção de um alimento seguro, o conhecimento das etapas de produção, e dos pontos onde pode haver aumento e diminuição na concentração desta toxina são importantes. Tendo em vista essa necessidade, o conceito de objetivo de inocuidade de alimentos (FSO – food safety objectives) foi utilizado por Pitt et al. (2013) (Figura 11). Este conceito, geralmente aplicado para bactérias patogênicas e toxigênicas, tem uma ampla aplicação e pode ser usado como ferramenta para auxiliar no entendimento da formação de micotoxinas e realçar as medidas de controle disponíveis para gerenciar os níveis de micotoxinas no alimento. O FSO pode ser determinado segundo a equação:

$$H_0 + \sum I - \sum R = FSO$$

onde H_0 representa a concentração inicial da toxina, $\sum I$ representa a somatória do aumento da toxina e $\sum R$ a somatória da redução da toxina.

Durante a etapa de pré-colheita, sob condições adequadas de chuva e irrigação, não ocorre a produção de aflatoxinas, enquanto que em situações de estresse hídrico, como discutido anteriormente, e danos causados por insetos, a infecção do amendoim por fungos favorecem a produção das mesmas.

Figura 11. Formação e redução de aflatoxinas durante a cadeia produtiva do amendoim



Na etapa de pós-colheita, a secagem artificial promove uma secagem rápida, prevenindo a formação e/ou aumento da produção das aflatoxinas. Porém uma secagem no campo com o amendoim disposto em leiras pode levar dias para atingir uma umidade segura permitindo a formação das toxinas. O controle da umidade ou armazenamento sob refrigeração abaixo de 10°C são as condições ideais de armazenamento, entretanto, isto não ocorre em países em desenvolvimento de clima tropical. Neste caso a umidade e a temperatura elevada podem resultar no aumento da produção de aflatoxinas. Durante o processamento, a seleção colorimétrica auxilia na redução dos grãos contaminados devido à descoloração causada pelos fungos. Após o blanchamento e torração a descoloração fica mais bem evidenciada na seleção colorimétrica (Pitt et al., 2008).

Desta forma, várias ferramentas como FSO, Análise de Risco e Pontos Críticos de Controle (HACCP), PO entre outros, já foram introduzidas para o controle de aflatoxinas no amendoim desde o plantio até o consumidor. O conhecimento destas ferramentas, dos pontos críticos de controle, do crescimento e fisiologia dos fungos toxigênicos entre outros pode prevenir e minimizar os riscos de aflatoxinas no amendoim.

Capítulo 1

The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in peanut production chain in Brazil

Ligia Manoel Martins, Anderson de Souza Sant’Ana, Beatriz Thie Yamanaka e Marta Hiromi Taniwaki

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista “Food Microbiology”

Abstract

A total of 125 samples (119 peanut and six soil samples) were collected throughout peanut production chain in São Paulo State, Brazil. The peanuts were directly plated for determination of percentages of infection. Further, the potential for aflatoxin production by the isolates was tested using the agar plug technique, and aflatoxins in peanuts was assessed using an immunoaffinity column followed by quantification using HPLC with reverse phase column and fluorescence detection. The limit of detection and quantification were 0.05 and 0.17 µg/kg for total aflatoxins, respectively. *Mycelia sterilia* group were the most common at field, sorting and blanching stages (48.15%, 80% and 57.14% respectively). *Aspergillus* section *Nigri* was the most common during the drying stage (84.21%), while *Aspergillus flavus* was the most prevalent at ready-to-eat (31.25%). *Aspergillus flavus* was the most common species from *Aspergillus* section *Flavi*, in soil samples. Five species of *Aspergillus* section *Flavi* were isolated from soil and peanuts: *A. arachidicola* (2), *A. caelatus* (12), *A. flavus* (502), *A. parasiticus* (15) and *A. tamaritii* (9). All isolates of *A. arachidicola* and *A. parasiticus* were able to produce aflatoxin B and G whereas aflatoxin B was produced by 52% of *A. flavus* isolates. Aflatoxin was found in 12 samples at concentrations ranging from <0.05 to 100 µg/kg. The data reported in this study add information on the occurrence and biodiversity of fungi in peanut in several stages of production chain. Also, the data on the occurrence of aflatoxins are of major relevance for continuous monitoring and assessment of likely exposure of consumers to aflatoxins through consumption of peanuts.

1. Introduction

Peanut (*Arachis hipogaea*), also named as groundnut, belongs to Leguminosae family and is original from South America (Fageria, 2010). Brazil is the third largest peanut producer in the Americas, behind the United States and Argentina (USDA, 2015). The state of São Paulo stands out as the largest national producer and approximately 80% of the peanuts produced in the state are exported to European countries such as Netherlands, United Kingdom and Russia, and Algeria in Africa (Conab, 2015; Martins, 2011)

Aspergillus section *Flavi* occurrence during peanut production chain represents a major concern due to the production of aflatoxin by some species such as *Aspergillus flavus* (aflatoxin B producer) and *Aspergillus parasiticus* (aflatoxin B and G producer). Aflatoxins are the secondary metabolites produced by molds known as the most potent carcinogens known considered by *International Agency for Research on Cancer* (IARC) as group 1. (IARC, 2002). Aflatoxin occurrence in peanuts has been reported in Brazil (Nakai et al., 2008; Gonçalves et al., 2008; Freitas et al., 1998) and in a range of countries such as Spanish, South Africa, Egypt, Malawi, Pakistan (Cano-Sancho et al., 2013; Kamika et al., 2014; Youssef et al., 2008; Matumba et al., 2014; Mushtaq et al., 2012). As peanut contamination by aflatoxin is a well-known problem, some countries established limits of this toxin in peanut. The commission of the European community established in 2006 by Regulation (EC) N° 1881 maximum 15 µg/kg total aflatoxins in peanuts to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs, and 4 µg/kg for peanuts processed an ready to eat (EC, 2006). Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) established in 2011, through the RDC No. 07, limits of 20 µg/kg total aflatoxins (Brasil, 2011).

The Brazilian Chocolate, Cocoa, Peanuts, Candies and Byproducts Industry Association (ABICAB) created in 2001 a program named “Pro-Peanut” to prevent aflatoxin production during peanut production chain. This program created the Pro-Peanut Seal, awarded to

companies that meet the legislation requirements to prevent aflatoxin production and to manufacture peanut products considered safe (ABICAB, 2015).

Aflatoxin in Brazilian peanut has been reported by several studies. González et al. (2008) analyzed mycotoxin in peanuts and showed that aflatoxins were present in 32% of total samples ranging from 4.20 to 198.84 µg/kg. Zorzete et al., 2013 studied the aflatoxins occurrence in peanuts from two different cultivars (Runner IAC Caiapó and Runner IAC 886) stored for 6 months and found that 11.4% of peanuts were contaminated with aflatoxins with mean levels ranging from 0.03 to 16.6 µg/kg. Magrini et al., 2011 found that 50% of the peanut products samples were contaminated with aflatoxins ranging from 0.5 to 113 µg/kg.

Studies have agreed that avoiding aflatoxigenic molds comprises the best method to reduce aflatoxin contamination in peanuts (Goldblatt.,1970; Dickens, 1977; Torres et al., 2014). To improve and ensure low aflatoxigenic fungi contamination and consequent aflatoxin production, knowledge of ideal conditions for the production and assessment of occurrence of these fungi at every stage of production chain are important. Therefore, the present study aimed to isolate and identify *Aspergillus* section *Flavi* species throughout peanut production chain; investigate the ability of aflatoxin production by the isolates and assess the presence of aflatoxins in peanut samples from field to ready-to-eat samples.

2. Materials and Methods

2.1 Peanut samples

Peanut samples, each of approximately 2kg, were collected at different stages of the production chain directly from farmers and processing plants located in the state of São Paulo, Brazil during 2013 and 2014. A total of 119 samples were collected at: field stage (27) which include uprooting (3), windrow (9), pulling (11), and transport (4), and from processing stage, the drying (19), threshing (11), sorting (25), blanching (21), and ready-to-eat (16). Six soil

samples from peanut fields were also analyzed. The amount of samples was taken according to availability in each stage the day they were collected.

2.2 Water activity

The peanut water activity was determined using an Aqualab Series 3TE instrument (Decagon, Pullman, WA, USA) at 25 ± 1 °C, in duplicate.

2.3 Fungal isolation from soil and peanut samples

From each sample, 50 grains were superficially disinfected by immersion in 0.4% sodium hypochlorite solution for 2 min, following direct plating onto dichloran 18% glycerol agar (DG18), according to Pitt and Hocking (2009). The plates were then incubated for 5 days at 25 °C. For soil samples the dilution plating method was used (Pitt and Hocking, 2009). From each sample, 25 g were added to 225 mL of sterile peptone water 0.1% and serial dilutions were inoculated on plates containing DG18, following incubation at 25 °C for 7 days.

2.4 Morphological examination.

The isolates were grown on czapek yeast agar (CYA) and incubated at 25 °C for 7 days. *Aspergillus* section *Flavi* were examined on standard identification media for *Aspergillus* species (CYA), at 25 °C, 37 °C and 42 °C and on *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar (AFPA) at 25 °C for 7 days (Pitt and Hocking, 2009). Other isolates belonging to other genres were identified according to Pitt and Hocking (2009) and Samson et al. (2010).

2.5 Aflatoxin production potential by *Aspergillus* section *Flavi* isolates

Aflatoxin production potential was tested according to methodology described by Filtenborg et al. (1983). *Aspergillus* section *Flavi* isolates were inoculated onto yeast extract sucrose agar (YES) at 25°C for 7 days. Then, fungal extracts were taken as plugs and placed on TLC plates with a mixture of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 standard (Sigma Aldrich, St. Louis,

MO, USA), developed in a toluene: ethyl acetate: formic acid 90%: chloroform (7:5:2:5, v/v/v/v) mobile phase, and visualized under UV light at 365 nm.

2.6 Aflatoxin analysis in peanut samples

The aflatoxin analysis was carried out according to Stroka et al. (2000) with modifications.

2.6.1 *Clean-up*

Twenty-five grams of ground peanuts were added to 2.5g of NaCl and extracted with 100 mL of methanol: water solution (8:2, v/v) for 30 min at high speed (10,000 rpm) using a horizontal shaker (New Brunswick Scientific Company, USA). The solution was filtered through quantitative filter paper (Nalgon, Germany), followed by glass microfiber filter (Vicom, USA). Then, 10 mL of the filtrate was diluted in 60 mL phosphate buffered saline (pH 7.0) and applied to an immunoaffinity column (Aflatest WB Vicam, USA) at a flow rate of 2–3 mL/min. The column was then washed with 30 mL of distilled water and aflatoxins eluted with 1250 μ L of methanol and 1750 μ L of Milli Q water.

2.6.2 *Chromatographic conditions*

Agilent 1260 Infinity LC system (Agilent, EUA) was used with fluorescence detection at 362nm excitation and 455nm emission, isocratic system, reverse-phase, C18 column. The system was associated with a KobraCell electrochemical reactor (R-Biopharm, Germany) connected to a current of 100 μ A for post-column derivatization of aflatoxins B1 and G1. The mobile phase was water: acetonitrile: methanol (6: 2: 3, v / v / v), with 119 mg of KBr and 350 μ L of 4M nitric acid per liter at a flow rate of 1 mL / min and injection volume of 20 μ L.

2.6.3 Methodology validation

Detection and quantification limits were determined according to Eurachem Guides (1998). To determine aflatoxins recovery on peanut samples, test were carried out with three different levels of contamination were used (0.5, 5 and 25µg/kg) in triplicate.

3. Results

3.1 Water activity and fungal infection

Results of frequency of occurrence (number of samples with a fungal species/total of samples evaluated), average infection (sum of infection level/total number of samples), range of infection (range of infected grains in a sample) and the water activity of the samples are shown in Table 1. The mean values of a_w of the soil samples analyzed were 0.979 (0.952-0.999). The peanut production steps from field to ready-to-eat resulted in a water activity reduction from 0.776 to 0.394. Peanut samples from field included uprooting, windrow, pulling and transport stages. The water activity of peanuts ranged from 0.482 to 0.998 (mean 0.776); in which uprooting and windrow had the higher mean values (0.995 and 0.955 respectively) while transport had the lowest at this stage (0.745). The drying stage resulted in an important water activity decrease giving microbiological stability for peanut, with an average of 0.538 (0.471-0.652). During threshing, sorting and blanching the mean values were 0.571, 0.570 and 0.461 respectively and ready-to-eat samples showed water activity of 0.394.

Peanut mycobiota varied depending on the production stage. Fungi from *Mycelia sterilia* group was the most common at field, sorting and blanching stages (48.15%, 80% and 57.14% respectively). *Aspergillus* section *Nigri* was the most prevalent during the drying stage (84.21%) and *Aspergillus flavus* at ready-to-eat (31.25%). The number of isolates on soil samples was low (10^2 CFU/g). *Aspergillus flavus* was the most common species from *Aspergillus* section *Flavi*, present in three samples. From eight isolates of *Aspergillus flavus*, none were aflatoxin B producers while the only *Aspergillus parasiticus* isolate was aflatoxin B and G producer.

Five species of *Aspergillus* section *Flavi* were identified from all stages of the peanut chain using morphological and physiological characteristics. *Aspergillus arachidicola* was found with low frequency (3.7 and 5.3%) and average of infection (0.07 and 0.11%) in samples from field and drying stages. *Aspergillus caelatus* was present at almost all stages except for ready to eat samples. The frequency of occurrence was from 7.4%, with an average of infection of 0.52 and 0.31% during postharvest and drying, to 4% and average of infection of 0.1% at the sorting stage. *Aspergillus flavus* was the most common fungi from *Aspergillus* section *Flavi*, present in all stages of the peanut production chain. It occurred more frequently in samples from sorting (78.3%), followed by drying (63.2%), threshing (54.5%), blanching (47.6%), field (40.7%) and ready-to-eat (31.3%). The average of infection was from 12.5% during drying to 1.3% in ready-to-eat samples. *Aspergillus parasiticus* was found in samples from postharvest, drying and sorting stages with a frequency of occurrence of 7.9, 21.1 and 20% and average of infection of 0.2, 0.6 and 0.5% respectively. *Aspergillus tamaraii* was present at all stages, except field and threshing, and most frequent at sorting (12%) with 0.5% being the average of infection.

A total of 571 strains of *Aspergillus* section *Flavi* were isolated from the peanut production chain (Table 2). All *Aspergillus arachidicola* (2 isolates) and *Aspergillus parasiticus* (16) were aflatoxin B and G producers. *Aspergillus caelatus*, *Aspergillus tamaraii* and other *Aspergillus* section *Flavi* were non-producers. Isolates of *Aspergillus* section *Flavi* and the aflatoxin producers are shown in Table 2. Most of the isolates were recovered from the sorting stage (174), followed by drying (119), field (93), blanching (77), threshing (30) and ready-to-eat (10). Aflatoxin B production by *A. flavus* isolates occurring in isolates from field, drying, threshing, sorting, blanching and ready to eat were 83%, 41%, 30%, 31%, 53% and 50% respectively.

3.2 Aflatoxin analysis

Table 3 shows the aflatoxin analyses of samples from each stage of the peanut chain. The detection and quantification limit for total aflatoxins was 0.05µg/kg and 0.17µg/kg respectively. The recovery percentage of samples contaminated with 0.5, 5.0, and 25 µg/kg was: 96.8, 88.2 and 99.4% respectively. The mean values of contamination were presented as lower bound (Lb), where the values below the limit of detection (LOD) were replaced by zero and upper bound (Ub) where the values were replaced by LOD divided by 2. The occurrence of aflatoxin in samples was low as only 12 from 119 were positive (10%). Aflatoxins were not present in samples from the field and threshing stage.

The average of contamination from drying, blanching, sorting and ready to eat stages samples were 7.63 µg/kg, 0.3 µg/kg, 5.06µg/kg and 1.29µg/kg. Separated values from each positive sample and aflatoxigenic fungi incidence are detailed in Table 4. The highest concentration of total aflatoxin was found in a sorting sample with 100.91 µg/kg, followed by 95.46µg/kg from a drying stage sample. The drying sample showed only aflatoxin B, while the sorting sample showed aflatoxin B and G contamination and no aflatoxin B and G fungi producer. Aflatoxins in ready-to-eat samples ranged from 0.82µg/kg to 14.07µg/kg. The water activity in these samples was low (0.341- 0,376) preventing fungal growth.

4. Discussion

The wide variety of fungi isolated in peanut samples during the production chain can be explained by variations in water activity and related production stages. Samples from field had a higher water activity average when compared to other steps, which favored mold growth mainly of the genera *Mycelia sterilia*, *Aspergillus*, *dematiaceous fungi*, *Cladosporium*, *Eurotium* and *Fusarium*. González et al. (2008) analyzed peanut samples from different maturity stages and after drying with the most frequently observed being *Fusarium* spp. (26%), *A. flavus* (17%), *A. terreus* (9,5%) and *Penicillium* spp. (5%).

The results observed in soil samples were similar to Horn & Doner (1998) that studied the soil population of *Aspergillus* section *Flavi* in peanut fields and found that *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* were the dominant species in the soil. Their prevalence may depend on regional differences, frequency of water shortage and soil temperature. Drought stress results in a plant having lower phytoalexin production, as well as reduced competitive microbiota, which favors *A. flavus* and *A. parasiticus* growth, as xerophiles molds. These conditions, plus fungi density and insect damage, lead to a direct access for peanut infection through the shell (Pitt & Hocking, 2009).

Five species of *Aspergillus* section *Flavi* were identified from samples of different production stages: *A. arachidicola*, *A. caelatus*, *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. tamarii*. These species have been reported in other peanut mycobiota studies (Pitt et al., 1993; Pitt et al., 1998; Nakai et al., 2008; González et al., 2008) including the work which first described *A. arachidicola* species, isolated from peanut in Argentina (Pildain et al., 2008). In Pildain et al., 2008 work with peanuts from Argentina, another *Aspergillus* section *Flavi* was first described as *Aspergillus minisclerotigenes*, which was not present in the samples analyzed in our study.

A. flavus, *A. parasiticus* and *A. arachidicola* were potentially aflatoxin producers. All *A. parasiticus* and *A. arachidicola* isolates were aflatoxin B and G producers. The average of *A. flavus* aflatoxin B producer isolates was 46% and ranged from 31% at the threshing stage to 83% at field. These results agree with Frisvad et al., (2007) that about 40% of *A. flavus* isolates are aflatoxin B producer. Vaamonde et al., (2003) studied strains isolated from different substrates including peanuts (37 strains), with different susceptibility to aflatoxin contamination and observed that the incidence of aflatoxigenic *A. flavus* strains was of 73% in peanuts. Another study conducted by Schroeder and Boller (1973) showed that from 419 strains of *A. flavus* isolated in 3 years (1969, 1970 and 1971), 96% were aflatoxin B producer.

A low incidence (10%) of aflatoxin throughout peanut production chain was found in this study. The quantification of total aflatoxins resulted in values ranging from ND-100.91 µg/kg. From eight positive samples collected at drying, blanching and sorting stages, four

samples were above the limit established by European and Brazilian regulations (24.46, 49.26, 95.46 and 100.91 $\mu\text{g/kg}$). Two samples of ready to eat stage had presented amounts of total aflatoxins above European regulation (14.07 and 4.21 $\mu\text{g/kg}$), and for Brazilian regulation, the values were acceptable which makes Brazilian population more exposed to this toxin. The peanut sample with the highest total aflatoxin contamination (100.91 $\mu\text{g / kg}$) belonging to the sorting stage was collected during the selection by density and was smaller than the 16/64 inch screen. In Brazil, these grains are directed to oil production (Câmara, 2014). During the refining process for obtaining oil, the mycotoxin is removed, so that sample despite having high contamination by aflatoxins, would not present a direct risk to the consumer (Parlker & Melnick, 1966).

The mycobiota analyses of the samples contaminated with aflatoxins showed that the fungi isolated were not necessarily the toxin producers in the sample, since the field samples were not contaminated by aflatoxins but were infected by producing fungi, and ready to eat samples were contaminated by aflatoxin but the aflatoxin producer was absent.

5. Conclusion

The results of this survey showed that the peanuts samples are infected with strains of *Aspergillus flavus*, and approximately half of them have the potential for aflatoxin B production. Not only strains of *Aspergillus flavus*, but also *A. parasiticus* and *A. arachidilola* were isolated, both aflatoxin B and G producers. This reveals the importance of knowing the peanut mycobiota, since even with low aflatoxin contamination in samples analyzed, the fungi with potential production was present and eventual problems in moisture and temperature during the production chain can result in increase of aflatoxin production. Furthermore, even though measures have being taken to improve the quality of peanuts, studies of occurrence are extremely important for monitoring and verification of improvements and provides material for analysis population exposure to toxins through food consumption.

References

- Brazilian Chocolate, Cocoa, Peanuts, Candies and Byproducts Industry Association (ABICAB). Programa Pró-Amendoim. Available in: <http://www.abicab.org.br/amendoim/pro-amendoim/selo-de-qualidade>. Access: July 2015
- Brazil. 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 da União. Seção 1. Nº 46. 2011.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). 2015. Acompanhamento da Safra Brasileira Grãos. Vol.2. Safra 2014/2015. Nono Levantamento, Brasília, p. 1-104
- Dickens, J. W., 1977. Aflatoxin Occurrence and Control During Growth, Harvest and Storage of Peanuts. Journal Series of the North Carolina Agricultural Experiment Station, Raleigh, North Carolina 27607.
- Eurachem Guides, 1998. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. LGC, Teddington.
- European Commission 2006. Commission regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union. L364:5-24
- Fageria, N. K., Baligar, V.C., Jones, C. A., 2010. Growth and Mineral Nutrition of Field Crops, third ed. CRC press.
- Filtenborg, O.; Frisvad, J.C. & Svendsen, J.A., 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. Applied and Environmental Microbiology. 45, 581-585
- Freitas, V. P.S. & Brigido, B. M., 1998. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in peanuts and their products marketed in the region of Campinas, Brazil in 1995 and 1996. Food Additives and Contaminants. 15, 807-811
- Frisvad, J.C., Thrane, U., Samson, R.A., 2007. Mycotoxin producers. In: Dijksterhuis, J., Samson, R.A. (Eds.), Food Mycology, a multifaceted approach to fungi and food. CRC press., pp. 135-159.
- Goldblatt, L.A., 1971. Control and Removal of Aflatoxin. Journal of the American Oil Chemists' Society. 48, 605-610.
- Gonçalves, E.; Nogueira, J. H. C.; Fonseca, H.; Felício, J. D., Pino, F.A.; Corrêa, B., 2008. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanuts kernels from sowing to harvest. International Journal of Food Microbiology. 123, 184-190.
- Horn, B. W. & Dorner, J. W., 1998. Soil population of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut-growing regions of the United States. Mycologia. 90, 767-776.
- Horn, B.W., 2003. Ecology and Population Biology of Aflatoxigenic Fungi in Soil. Journal of Toxicology. 22, 351-379.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 2002. WHO IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins naphthalene and styrene. Aflatoxins. 82, 1-556.

Kamika, I., Mngqawa, P., Rheeder, J.P., Teffo, S.L., Katerere, D.R., 2014. Mycological and aflatoxin contamination of peanuts sold at market in Kinshasa, Democratic Republic of Congo, and Pretoria, South Africa. Food Additives & Contaminants: Part B. 2, 120-126.

Martins, R. Amendoim: Produção, Exportação e a Safra 2011/2012. Análise e Indicadores do Agronegócio, [S.I], v.6, n.11, 2011. ISSN 1980-0711. Available in: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=122421>>. Acesso em: 1 mai. 2013.

Matumba, L., Monjerezi, M., Biswick, T., Mwatseteza, J., Makumba, W., Kamangira, D., Mtukuso, A., 2014. A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of locally and imported processed foods on Malawian retail market. Food Control. 39, 87-91.

Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Khan, M.Z., Ashrafuzzaman, M., 2012. Occurrence of Aflatoxins in Selected Processed Foods from Pakistan. International Journal of Molecular Sciences. 13,8324-8337.

Nakai, V. K., Rocha, L. O., Gonçalves, E., Fonseca, H., Ortega, E. M. M., Corrêa, B., 2008. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. Food chemistry. 106, 285-290

Pildain, M., Frisvad, J. C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., Samson, R. A., 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58,725-735.

Pitt, J.I., Hocking, A. D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B. F., Wheeler, K. A., Tanboon-Ek., P., 1993. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. International Journal of Food Microbiology. 20, 211-226.

Pitt, J.I., Hocking, A.D. Fungi and Food Spoilage. 2009. 3rd ed. New York. Springer.

Pitt, J.I., Hocking, A.D., Miscamble, B.F., Dharmaputra, O. S., Kuswanto, K.R., Rahayu, E.S., and Sardjono., 1998. The mycoflora of food commodities from Indonesia. Journal of Food Mycology. 1, 41-60.

Sabino, M., Milanez, T.V., Lamardo, L. C. A., Inomata, E. I., Zorzetto, M. A. P., Navas, S. A., Stofer, M., 1999. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the state of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. 1999. Revista de Microbiologia. 30, 85-88

Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B., 2010. Food and Indoor Fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.

Schroeder, H. W. & Boller, R. A., 1973. Aflatoxin production of species and strains of the *Aspergillus flavus* group isolated from field crops. Applied Microbiology. 25, 885-889.

Stroka, J., Anklam, E., Jorissen, U., Gilbert, J., 2000. Immunoaffinity Column cleanup with liquid chromatography using post-column oxidation for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste and paprika powder: collaborative study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists International. 83, 320-340.

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.

United States Department of Agriculture (USDA). Foreign Agricultural Service. Production, Supply and Distribution online. Available in: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>. Assess: June, 2015

Vaamonde, G., Patriarca, A., Pinto, V. F., Comerio, R., Degrossi, C., 2003. Variability of aflatoxin and cyclopazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 79-84

Youssef, M.S., El-Maghraby, O.M.O., Ibhaim, Y.M., 2008. Mycobiota and Mycotoxins of Egyptian Peanut (*Arachis hyoigeae* L.) Seeds. *International Journal of Botany*. 4, 349-360.

Capítulo 1

The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in peanut production chain in Brazil

(Tables and figures)

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista “Food Microbiology”

Table 1. Frequency of occurrence, mean and variation in the level of infection by fungi in different stages of peanut chain

Stage of peanut chain (n° of samples)	Field (27)			Drying (19)			Threshing (11)			Sorting (25)			Blanching (21)			Ready to eat (16)		
Mean a _w (range)	0,776 (0,482 - 0,998)			0,538 (0,471 - 0,652)			0,571 (0,482-0,664)			0,570 (0,457 - 0,690)			0,461 (0,404 - 0, 639)			0,394 (0,287 - 0,652)		
Fungi	FO (%)	AI (%)	RI (%)	FO (%)	AI (%)	RI (%)	FO (%)	AI (%)	RI (%)	FO (%)	AI (%)	RI (%)	FO (%)	AI (%)	RI (%)	FO (%)	AI (%)	RI (%)
<i>Aspergillus arachidicola</i>	3.7	0.07	ND-2	5.26	0.11	ND-2	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND
<i>Aspergillus caelatus</i>	7.4	0.52	ND-8	5.26	0.31	ND-6	0	0	ND	4	0.08	ND-2	4.76	0.09	ND-2	0	0	ND
<i>Aspergillus flavus</i>	40.7	6.96	ND-90	63.16	12.53	ND-46	54.54	5.27	ND-20	78.26	12.27	ND-52	47.62	7.33	ND-44	31.25	1.25	ND-8
<i>Aspergillus parasiticus</i>	7.89	0.21	ND-4	21.05	0.63	ND-6	0	0	ND	17.39	0.43	ND-4	0	0	ND	0	0	ND
<i>Aspergillus tamarii</i>	0	0	ND	10.52	0.21	ND-2	0	0	ND	8.7	0.26	ND-4	4.76	0.28	ND-6	6.25	0.12	ND-2
Other <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	25.93	0.74	ND-8	26.31	0.63	ND-4	18.18	0.54	ND-4	13.04	0.35	ND-4	9.52	0.19	ND-2	0	0	ND
<i>A. terreus</i>	3.7	0.15	ND-4	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	25.93	2.29	ND-24	84.21	6.1	ND-36	63.64	3.81	ND-10	80	7.92	ND-24	33.3	1.05	ND-6	12.5	0.37	ND-4
<i>Penicillium sp</i>	0	0	ND	5.26	0.21	ND-4	0	0	ND	12	0.32	ND-4	4.76	0.09	ND-2	0	0	ND
<i>Fusarium sp</i>	22.22	3.26	ND-60	10.53	0.74	ND-12	9.1	1.09	ND-12	4	0.24	ND-6	0	0	ND	0	0	ND
<i>Eurotium sp</i>	22.22	0.59	ND-6	42.1	70.95	ND-30	72.72	26.9	ND-82	44	14.8	ND-82	33.3	2.57	ND-26	25	3	ND-26
<i>Another ascomycetes</i>	3.70	0.07	ND-2	5.26	0.5	ND-10	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND
<i>Cladosporium sp</i>	44.44	2.15	ND-16	26.31	1.16	ND-8	27.28	0.54	ND-2	4	0.08	ND-2	4.76	0.09	ND-2	6.25	0.25	ND-4
<i>Syncephalastrum sp</i>	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	4	0.08	ND-2	0	0	ND	0	0	ND
<i>Rhizopus sp</i>	14.81	1.85	ND-30	31.58	1.68	ND-12	18.18	1.27	ND-8	16	1.76	ND-18	14.29	1.14	ND-20	0	0	ND
<i>Mucor sp</i>	3.7	0.07	ND-2	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND
<i>Neurospora sp</i>	0	0	ND	5.26	0.53	ND-10	0	0	ND	0	0	N	0	0	ND	0	0	ND
<i>Dematiaceos fungi</i>	40.74	6.59	ND-32	21.05	1.37	ND-18	36.36	8.54	ND-44	44	3.44	ND-20	19.05	1.05	ND-14	0	0	ND
<i>Mycelia sterilia</i>	48.15	10.37	ND-48	73.68	10.21	ND-40	63.63	9.1	ND-24	80	10.4	ND-34	57.14	3.14	ND-12	18.75	1.75	ND-14
<i>Wallemia sp.</i>	0	0	ND	0	0	ND	9.1	0.72	ND-8	0	0	ND	19.05	2.38	ND-28	18.75	5.37	ND-36

FO = frequency of occurrence % (number of samples that contained a fungal species/total of samples evaluated); AI = average of infection (sum of infection level/total number of samples); RI = range of infection % (range of infected grains in a sample); and ND = not detected.

Table 2. *Aspergillus* section *Flavi* isolates and A.section *Flavi* aflatoxin producers

	N° of isolates (aflatoxin producers)					
	Field	Drying	Threshing	Sorting	Blanching	Ready to eat
<i>Aspergillus arachidicola</i> ^a	1 (1)	1 (1)	0	0	0	0
<i>Aspergillus caelatus</i>	7 (0)	3 (0)	0	1 (0)	1 (0)	0
<i>Aspergillus flavus</i> ^b	93 (77)	119 (49)	29 (9)	174 (77)	77 (41)	10 (5)
<i>Aspergillus parasiticus</i> ^a	4 (4)	6 (6)	0	5 (5)	0	0
<i>Aspergillus tamaris</i>	0	2 (0)	0	3 (0)	3 (0)	1 (0)
Other <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	13 (0)	6 (0)	4 (0)	4 (0)	2 (0)	0

^a aflatoxin B and G, ^b aflatoxin B

Table 3. Aflatoxins ($\mu\text{g/kg}$) incidence in peanuts from field to ready-to-eat

Stage of peanut chain	Aflatoxin B ₁	Aflatoxin B ₂	Aflatoxin G ₁	Aflatoxin G ₂	Total aflatoxins
Field (27)					
mean (Lb)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	< LOD
mean (Ub)	0.025	0.02	0.015	0.01	0.07
median	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	< LOD
Range	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
No of positive samples ^a	0	0	0	0	0
Drying (19)					
mean (Lb)	6.534	1.102	0.004	<LOD	7.64
mean (Ub)	6.555	1.120	0.018	0.01	7.70
median	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Range	<LOD-83.26	<LOD-12.21	<LOD-0.07	<LOD	<LOD - 95.48
No of positive samples ^a	3 (16%)	2 (11%)	1 (5%)	0	3 (16%)
Threshing (11)					
mean (Lb)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	< LOD
mean (Ub)	0.025	0.02	0.015	0.01	0.07
median	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	< LOD
Range	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
No of positive samples ^a	0	0	0	0	0
Sorting (25)					
mean (Lb)	3.946	0.201	0.897	0.016	5.06
mean (Ub)	3.967	0.219	0.912	0.026	5.12
median	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	< LOD
Range	<LOD-76.71	<LOD-1.36	<LOD-22.43	<LOD-0.41	< LOD - 100.92
No of positive samples ^a	4 (16%)	2 (8%)	1 (4%)	1 (4%)	4 (16%)
Blanching (21)					
mean (Lb)	0.149	0.059	0.074	0.020	0.30
mean (Ub)	0.173	0.078	0.089	0.029	0.37
median	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Range	<LOD-3.13	<LOD-1.24	<LOD-1.56	<LOD-0.41	< LOD - 6.34
No of positive samples ^a	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)
Ready to eat (16)					
mean (Lb)	1.133	0.157	<LOD	<LOD	1.29
mean (Ub)	1.151	0.172	0.015	0.01	1.35
median	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	< LOD
Range	<LOD-12,77	<LOD-1,28	<LOD	<LOD	< LOD - 14,05
No of positive samples ^a	4 (25%)	4 (25%)	0	0	4 (25%)
Limit of detection (LOD)	0.02	0.01	0.01	0.01	0.05
Limit of quantification (LOQ)	0.06	0.05	0.04	0.02	0.17

^a Higher than LOQ; Lb: lower bound; Ub: upper bound.

Table 4. Peanut samples with highest aflatoxin ($\mu\text{g/kg}$) and aflatoxigenic fungi incidence at each stage of production chain.

Stage (Sample code)	Aflatoxins ($\mu\text{g/kg}$)					Aw	A. section <i>Flavi</i> infection (%)
	B1	B2	G1	G2	Total		
Drying	83.26	12.2	N.D	N.D	95.46	0.569	8% <i>A. flavus</i>
	0.35	N.D	0.07	N.D	0.43	0.602	38% <i>A. flavus</i> 2% <i>A. arachidicola</i> 2% <i>A. parasiticus</i>
Blanching Sorting	40.53	8.73	N.D	N.D	49.26	0.471	46% <i>A. flavus</i>
	3.13	1.24	1.56	0.41	6.34	0.444	0% A. section <i>Flavi</i>
	0.82	N.D	N.D	N.D	0.82	0.585	56% <i>A. flavus</i> 2% <i>A. parasiticus</i>
Ready to eat	76.71	1.36	22.43	0.41	100.91	0.690	4% <i>A. flavus</i>
	0.3	N.D	N.D	N.D	0.3	0.682	4% <i>A. flavus</i>
	20.80	3.66	N.D	N.D	24.46	0.605	14% <i>A. flavus</i>
	12.77	1.28	N.D	N.D	14.075	0.342	0% A. section <i>Flavi</i>
	0.68	0.120	N.D	N.D	0.82	0.341	0% A. section <i>Flavi</i>
	3.38	0.801	N.D	N.D	4.21	0.376	0% A. section <i>Flavi</i>
	1.29	0.304	N.D	N.D	1.62	0.359	0% A. section <i>Flavi</i>

ND= not detected.

Capítulo 2

Kinetics of Aflatoxin Degradation during Peanut Roasting

Ligia Manoel Martins, Anderson de Souza Sant’Ana, Maria Isabel Berto, Beatriz Thie
Yamanaka e Marta Hiromi Taniwaki

**Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da
revista “Food Chemistry”**

Abstract

The aim of this study was to evaluate the kinetic of aflatoxins degradation during peanut roasting. Two portions of 100g skinless peanuts were roasted in a vertical spouted bed roaster operating at 160, 180 and 200° C for 5, 10, 15, 20 and 25 min. Then, samples were ground and the three color reflectance values, CIELAB L^*a^*b and aflatoxin concentration by high performance liquid chromatography (HPLC) were determined. The aflatoxin inactivation rate (k) was calculated for each initial concentration and it was $0.08 \pm 0.01 \log \mu\text{g/kg/min}$ for $702 \mu\text{g/kg}$ ($R^2=0.9821$), $0.06 \pm 0.02 \log \mu\text{g/kg/min}$ for $346 \mu\text{g/kg}$ ($R^2=0.7543$), $0.04 \pm 0.01 \log \mu\text{g/kg/min}$ for $175 \mu\text{g/kg}$ ($R^2=0.8830$) and $0.04 \pm 0.01 \mu\text{g/kg/min}$ for $35 \mu\text{g/kg}$ ($R^2=0.9455$). For fixed initial concentration ($84.8 \mu\text{g/kg}$), roasting at 160, 180 and 200°C resulted in an aflatoxin content reduction of 61.6, 83.6 and 89.7%, respectively. For 160°C the aflatoxin degradation was fitted using the Geereard model, with a $k_{max} = 0.13 \pm 0.08$, for 180°C the aflatoxin degradation was fitted using the Weibull model, resulting in a delta (δ) and p parameters $44.58 \pm 14 \text{ min}$ and 0.7 ± 0.27 , ($R^2=0.92$), respectively. For 200°C the aflatoxin degradation was fitted using the double weillbull and this model had two delta values: $\delta_1 8.23 \pm 0.27$ and $\delta_2 73.61 \pm 19.80 \text{ min}$. Alfa (α) and p parameters were 0.82 ± 0.03 and 2.92 ± 0.22 respectively ($R^2=0.99$). Considering the color analysis, the L^* values for temperature of 160°C for five minutes was statistically similar ($p < 0.05$) to one of the standards analyzed. The evaluation of color parameter L^* compared with the aflatoxin degradation at each time and temperature allows a better use of the data obtained, since the roasting could be used in industry as a tool, in addition to the sensory characteristics, to adjust the concentration of aflatoxin to acceptable levels.

1. Introduction

Aflatoxins are secondary metabolites produced by *Aspergillus* section *Flavi*, mainly by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* (Pitt & Hocking, 2009; Pildain et al., 2008). Aflatoxins are the most potent liver carcinogens known, besides the acute, chronic, genotoxic and immunosuppressive poison (ICMSF, 2002; Williams et al., 2004). The *International Agency for Research on Cancer* classifies aflatoxins as group 1, i.e. carcinogenic to humans (IARC, 2002).

Limits for aflatoxin in peanuts have been established in several countries. The European Commission established in 2006 the Regulation (EC) N° 1881 with a maximum limit of 15 µg/kg total aflatoxins in peanuts to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption and 4 µg/kg total aflatoxins in ready to eat peanuts (EC, 2006). Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) established in 2011, through the RDC No. 07, limits of 20 µg/kg total aflatoxins (Brazil, 2011).

The best strategy for the control of aflatoxin in peanuts is preventing its formation during production chain. Some important practices for aflatoxin production prevention are control of soil moisture, harvest at peanut maturity, drying to safe moisture content (up to 8%), storage at constant temperature with moisture control and cleaning before transport for control and removal of damaged nuts (Torres et al., 2014; ICMSF, 2002). However, once produced, some strategy for aflatoxin removal from foodstuffs can be done by chemical and physical methods. Among the chemical methods, chlorinating, oxidizing and hydrolytic agents showed effectiveness. For physical methods, irradiation, ultraviolet and visible light and heat can cause aflatoxin degradation (Samarajeewa et al., 1990).

Studies have demonstrated the degradation of aflatoxins heat during roasting of peanuts in oven (Ogunsanwo et al., 2004; Arzandeh&Jinap., 2011), microwave (Mobee et al., 2011; Luter et al., 1982) and oil (Lee et al., 1969). Among these methodologies, roasting peanuts in oven is the conventional method and the most widely used in Brazil. Some limitations found in

studies that evaluated the degradation of aflatoxin during the roasting process is to use not appropriate time and temperature for obtaining roasted peanuts with commercial characteristics (color and flavor) and not consider the toxin degradation differences in different initial concentrations of roasting. Furthermore, many studies used different times for different temperatures. This difference does not evaluate the toxin degradation kinetics as a function of temperature. Few kinetics studies for mycotoxin degradation have been carried out. These studies would assist peanut producers to design specific process which allows obtaining roasted peanuts with sensory quality (color and flavor) and promotes the degradation of aflatoxin. The aim of this study was to evaluate the kinetics of aflatoxin degradation during peanut roasting processing, investigate the influence of the initial aflatoxin concentration in raw peanuts degradation kinetics, and analyze the peanut color for each roasting time and temperature in order to stipulate the best conditions of peanut roasting.

2. Material and methods

2.1. Raw peanut sample

Approximately 20kg of raw shelled peanuts with skin were purchased directly from a peanut cooperative located in the São Paulo State, Brazil.

2.2 Peanut mycobiota and aflatoxin production stimulation

In order to verify if the acquired peanut sample showed natural contamination by fungi producers of aflatoxins, a portion with 50 grains was superficially disinfected by immersion in 0.4% sodium hypochlorite solution for 2 min, and directly plated onto Dichloran 18% Glycerol agar (DG18) at 25°C, according to Pitt & Hocking (2009) methodology. After five days, the sample showed 100% of infection with *Aspergillus* section *Flavi* and as such, the peanut acquired were used as substrate for aflatoxin production. To stimulate aflatoxin production by mycobiota naturally present in peanut acquired, water activity was raised from 0.5 to 0.9 by

addition of 10mL/g of sterile water, following incubation at 25°C and 80% relative humidity. As soon as visible fungi growth was observed, after four days of incubation, the peanut was removed and dried until reaching initial water activity (0.5) in an incubator at 55°C for 10 hours. Further, the peanut skin was removed, the grains were homogenized and 100 g peanut portions were separated for each roasting time and temperature analysis.

2.3 Influence of initial concentration on aflatoxin degradation kinetics

A preliminary study was conducted to verify whether the initial concentration influences the aflatoxin degradation kinetics. To obtain portions with low (35 µg/kg), medians (175 and 346 µg/kg) and high concentration (702 µg/kg), peanuts with 0.9 water activity incubated at 25 ° C with relative humidity of 80% was removed at different incubation times. Samples were dried and the skin removed as described above. To assess the interference of the initial concentration in aflatoxin degradation, the roasting temperature selected was 180 ° C, the mean temperature used in this study, for 5, 10, 15 and 20 minutes.

2.4. Peanut roasting

Peanut samples (100 g) with the same initial concentration were roasted in duplicate in a vertical spouted bed roaster (105 mm diameter, 590 mm height, 20 mm screen, 45 angle), designed at the process engineering laboratory at Institute of Food Technology (ITAL) (Figure 1), operating at 160, 180 and 200° C for 5, 10, 15, 20 and 25 min. The roaster was previously heated with hot air until the roasting temperature was achieved. After roasting, the equipment resistance was turned off and air passed through the sample to accelerate the cooling process. The roasted peanut samples were ground using a laboratory mill (IKA A 11, USA) for further color and aflatoxin analyses.

2.5. Modeling

In order to describe aflatoxin degradation as a function of temperature, the data obtained at different times were fitted to models through the use of Glnafit add-in (Geeraerd et al., 2005).

2.5.1 Assessment of initial concentration influence on aflatoxin degradation

First-order kinetics was used to fit the preliminary study (equation 1). Using the aflatoxin concentration after roasting and respective heating times, curves were drawn by regression of the data of log aflatoxin concentration against the time.

$$\log \frac{C}{C_0} = k \cdot t \quad (1)$$

where C represents the final concentration of aflatoxin, C_0 the initial aflatoxin concentration, t the roasting time and k represents the aflatoxin inactivation rate.

2.5.2 Modeling aflatoxin degradation kinetics in peanut roasting as affected by temperature

For non log-linear kinetics, log linear + tail model (equation 2) described by Geeraerd et al (2000) was used to determine the degradation kinetic of aflatoxin at 160°C

$$\frac{dC}{dt} = -k \cdot C \quad (2)$$

$$\text{where } k = k_{max} \cdot \left(1 - \frac{C_{res}}{C}\right)$$

with C as the final concentration of aflatoxin, C_{res} the residual concentration, k_{max} the maximum specific inactivation rate and t the roasting time.

Weibull model (equation 3) described by Mafart et al. (2002) was used to determine the degradation kinetic of aflatoxin at 180°C

$$\log_{10} \frac{C}{C_0} = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (3)$$

where C represents the final concentration of aflatoxin, C_0 the initial aflatoxin concentration, t the roasting time, δ (time of first decimal reduction) whose significance is restricted to the treatment time for the first decimal reduction, and p represents the shape parameter.

Double weibull, described by Coroller et al. (2006) was used to determine the degradation kinetic of aflatoxin at for 200°C (equation 4).

(4)

$$C(t) = \frac{C_0}{1 + 10^\alpha} \left[10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^p + \alpha} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^p} \right]$$

where C represents the final concentration of aflatoxin, C_0 the initial aflatoxin concentration, t the roasting time, subscripts 1 and 2 indicate the two different resistance profiles in which 1 is more sensitive to roasting than 2 ($\delta_1 < \delta_2$), α is the fraction portion 1 represents from the total and p represents the shape parameter.

2.6. Aflatoxin analysis

The aflatoxin analysis was carried out according to Stroka et al. (2000) with modifications, as follows.

Clean-up

Twenty-five grams of ground peanuts were added to 2.5g of NaCl and extracted with 100mL of methanol: water solution (8:2, v/v) for 30 min at high speed (10,000 rpm) using a horizontal shaker (New Brunswick Scientific Company, New Brunswick, USA) The solution was filtered through quantitative filter paper (Nalgon, Germany), followed by glass microfiber filter (Vicom, USA). Then, 4 ml of the filtrate was diluted in 60 mL phosphate buffered saline (pH 7.0) and applied to an immunoaffinity column (Aflatest WB Vicam, USA) at a flow rate of 2–3 mL/min. The column was then washed with 30 mL of distilled water and aflatoxins eluted with 1,250 μ L of methanol and 1,750 μ L of Milli Q water.

Chromatographic conditions

An Agilent 1260 infinity HPLC system (Agilent, EUA) was used with fluorescence detection at 362nm excitation and 455nm emission, C18 column, isocratic system and reverse phase. The system was associated with a Kobracell electrochemical reactor (R-Biopharm, Germany) connected to a current of 100 μ A for post-column derivatization of aflatoxins B1 and G1. The mobile phase was water: acetonitrile: methanol (6: 2: 3, v / v / v), with 119 mg of KBr and 350 μ L of 4M nitric acid per liter at a flow rate of 1 ml / min. The injection volume was 20 μ L and the LOD and LOQ was 0.05 and 0.17 μ g/kg respectively.

2.7. Color analysis

Samples were ground and the three color reflectance values, CIELAB L*a*b, were measured in duplicate at ambient temperature using a Konica Minolta CM-5 spectrophotometer (Konica Minolta, Chiyoda, Japan). A reflectance specular method was used with a 3 cm area view, illuminant D65 and 10° standard observer angle. Two samples of roasted peanut were purchased in the market to be used as standard and to compare the color with the peanuts roasted in this work. The color results were compared by Tukey test ($p < 0,05$).

3. Results

In order to verify the initial concentration effect on aflatoxin degradation kinetics, samples with different initial concentrations (702, 346, 175 and 35 μ g/kg) were roasted at 180 °C for 5, 10, 15 and 20 minutes. For all these different initial concentrations, the degradation kinetics was log-linear and was fitted at Bigelow model. The aflatoxin inactivation rate (k) was calculated and it was $0.08 \pm 0.01 \log \mu\text{g/kg/min}$ for 702 μ g/kg ($R^2=0.9821$), $0.06 \pm 0.02 \log \mu\text{g/kg/min}$ for 346 μ g/kg ($R^2=0.7543$), $0.04 \pm 0.01 \log \mu\text{g/kg/min}$ for 175 μ g/kg ($R^2=0.8830$) and

$0.04 \pm 0.01 \mu\text{g/kg/min}$ for $35 \mu\text{g/kg}$ ($R^2=0.9455$). The results showed that after 20 min of roasting the higher the initial aflatoxin concentration, the greater the reduction percentage. For instance, an initial concentration of aflatoxin of $702 \mu\text{g/kg}$ resulted in 74% reduction while initial concentration of $35 \mu\text{g/kg}$, obtained a reduction of 54 %. Initial concentration values of aflatoxin and aflatoxin inactivation rate showed a linear correlation (Figure 1). The percentage of reduction and root squared of initial concentration also presented a linear correlation (Figure 2).

The average value of aflatoxin concentration in the raw peanut used for roasting was determined from 12 assays and was $84.77 \pm 52.39 \mu\text{g/kg}$. Results of aflatoxin concentration, percentage of reduction in aflatoxin content and color analysis for each time and temperature are depicted in Table 2. After 25 min at 160, 180 and 200°C aflatoxin content reduction were 61.6, 83.6 and 89.7 %, respectively. Aflatoxin content reduction after 25 min of roasting at 160°C presented a non log-linear kinetic and Geereard model was fitted to the data (figure 3). The k_{max} parameter was 0.13 ± 0.08 ($R^2=0.87$). At 180°C the weibull model (Figure 4) was used to fit the data and δ and p values of 44.58 ± 14 and 0.7 ± 0.27 , respectively were found ($R^2=0.92$). For the determination of the degradation kinetics of aflatoxin at 200°C , the Double Weibull presented the best fit (Figure 5). The kinetics at 200°C showed two profiles of aflatoxin reduction, a shoulder from 0 to 10 minutes and a linear degradation from 10 to 25 minutes. Considering these profiles, this model gives two delta values: δ_1 8.23 ± 0.27 min and δ_2 73.61 ± 19.80 . Alfa (α) and p parameters were 0.82 ± 0.03 and 2.92 ± 0.22 respectively ($R^2=0.99$).

Peanut color after roasting was analyzed (Figure 6) using the CIELAB method. The L^* values decreased with increasing roasting time for all temperatures studied. L^* values for temperatures at 160, 180 and 200°C from 5 to 25 min of roasting ranged from 69.21 to 63.2, 60.79 to 48.41 and 57.53 to 39.29, respectively. The a^* value increased with roasting times at 160 and 180°C , ranging from 3.66 to 11.01 and 9.14 to 12.98 respectively but for 200°C there was a decrease from 13.15 to 7.44. For b^* values, at 160°C an increase was observed from

24.06 to 28.3 and for 180 and 200°C the values decreased from 29.96 to 19.2 and 27.04 to 7.36, respectively.

4. Discussion

Natural production of aflatoxins by *Aspergillus* section *Flavi* does not occur homogeneously, since only a few kernels are contaminated and those can have high levels of contamination (Whitaker, 2003; Whitaker & Wiser, 1969). As such, this is a cause of uncertainty in the measurement and determination of the contamination level in the samples used in the experiment. Irregular aflatoxin production in kernels has been reported not only in peanuts (Cucullu et al., 1966), but also in different foodstuffs such as Brazil nuts and pistachios (Steiner et al., 1992).

A preliminary study was performed to verify the initial concentration of aflatoxin effect on degradation kinetics (Table 1). Although aflatoxin inactivation rate at 180° have presented close values between the concentrations 35, 175 and 346 µg/kg (0,04, 0,04 and 0,06 log µg/kg/min, respectively), the influence of aflatoxin initial concentration is evident when the inactivation rate at 35 µg/kg and 702 µg/kg (0,04 and 0,08 log µg/kg/min) are compared. These results indicate that the higher the initial concentration, the greater the inactivation of aflatoxin rate (Figure 1). To investigate the relationship between the percentage of reduction and the initial concentration of the toxin, the concentration values were passed to logarithm and natural logarithm, though only showed linearity when the square root was taken (Figure 2). Therefore, the square root of the initial concentration was plotted with the percentage of reduction, and there was a linear relationship. Although the square root is not normally used in such cases, this mathematical feature allowed the linearization and better understanding of the results.

Besides roasting time and temperature, other factors, such as moisture content and food matrix could affect experimental results of toxin degradation (Scott, 1984). The variability in aflatoxin degradation in different matrix submitted to similar heat treatments can indicate a

protective effect by aflatoxin binding or association with proteins or other food constituents (Samarajeewa et al., 1990). This could explain the lower aflatoxin inactivation rate for low initial concentrations, since the majority of aflatoxin present in this sample may be bound to a component, hindering its degradation. On the other hand, samples with high initial concentration may present a portion of the aflatoxin bound to components of the matrix, while others are more exposed, facilitating their degradation and generating a high aflatoxin inactivation rate. The linear correlation between initial concentration values and aflatoxin inactivation rate allows prediction of reduction rate for roasting at 180°C and initial concentration values among the ones studied. It is important to consider that the *D value* (time needed to reduce 90% of initial aflatoxin concentration) could have been calculated considering the inverse of aflatoxin inactivation rate, however, in this study, the interval of time has not presented a reduction higher than 90% of the initial concentration. Therefore, the aflatoxin reduction rate can only be assumed as a value *D* considering the first log reduction, since it is not known if the behavior of reduction remains linear. Another study worked with different concentrations under the same conditions of roasting, and obtained variations in the percentage of aflatoxin B1 reduction, however, no correlation between the initial concentration of the toxin and the percentage ratio was found (Pluyer et al., 1987). This result differs from those found in our study, which allowed observing the interference and correlation between the initial concentration and the percentage reduction.

After the preliminary analyses of different initial concentration, the following experiments were conducted with fixed initial concentration (84.8 µg/kg) and same roasting time (5, 10, 15, 20 and 25 min), thus, the influence of temperature could be assessed (Table 2). The percentage of aflatoxin reduction was higher at 200°C (89.7%) than at 180°C (86.3%) which was higher than 160°C that had 61.6%, proving the importance of temperature in this process. The aflatoxin reduction by heating has been studied through different methods of roasting (microwave, oven, oil and electric heating), in different time and temperature. Pluyer et al.

(1987) studied the effects of oven (150°C for 30 min) and microwave (8.5 min at 0.7kW) roasting on different natural and artificial aflatoxin content in peanuts. For artificially contaminated, oven and microwave roasting showed similar aflatoxin B₁ reduction (30 – 45%). On the other hand, samples naturally contaminated resulted in aflatoxin B₁ reduction of 48-61% for both oven and microwave roasting. Luter et al. (1982) estimated aflatoxin reduction through microwave roasting and found a minimum reduction of 20.8% total aflatoxin at 140°C for 4.5 min. A maximum aflatoxin reduction of 100% at 137°C for 20 min and 185°C for 7 min, but both temperature and time conditions resulted in excessively dark peanut. Mann et al. (1967) after 2 hour roasting at 100°C and 30% of moisture, reduced aflatoxin content from 111 to 73 ppb (34%). The average of all results in oil and dry roasting with four different levels of aflatoxin (2200, 960, 90 and 50 ppb for aflatoxin B₁ and 4100, 1600, 150 and 80 ppb for aflatoxin G₁) were 64.5% (B₁) 61.5% (G₁), 68.8% (B₁) and 66.8% (G₁) respectively (Lee et al., 1969). A recent study applied a response surface methodology to evaluate the effect of initial aflatoxin concentration, roasting time and temperature on aflatoxin reduction (Arzandeh & Jinap, 2011). For artificially contaminated samples, the maximum aflatoxin B₁ and B₂ reduction was 78.4 and 57.3% respectively, while for naturally contaminated samples was 80.2% for aflatoxin B₁ and 69.7% for B₂.

The roasted peanut color is usually considered a control parameter since it is related to flavor development (Smyth et al., 1998). Color analysis allowed the comparison between standard peanut roasting and the samples from different roasting time and temperature. The L* values defines lightness ranging from 0 (black) to 100 (white), a* describes red (for positive values) and green (for negative values) and b* describes yellow (for positive values) and blue (for negative values). Although standard L* values ranged from 68.4 to 71.61, only roasting at 160°C for 5 minutes presented a statistically similar L* value compared to the standard sample analyzed. Under these conditions, only 15% of initial aflatoxin concentration was reduced. Pattee et al. (1991) indicate that the peanut samples should be roasted up to the L* parameter

values of 58 to 59 when the optimum roasted peanut attribute is of primary interest. Further, L* values near to 58 and 59, such as 60.23 when roasted at 160°C for 20 minutes and 57.51 at 200°C for 5 minutes lead to an aflatoxin reduction of 54.9 and 45.1% respectively.

5. Conclusion

Aflatoxin degradation during peanut roasting process varies with the initial concentration of the toxin in food, time and temperature process. The roasting process gives the food color and flavor characteristics. The determination of the optimal time and temperature conditions for obtaining these parameters is important for industry. In the present study, the roasted peanuts at different times and temperatures, showed a variation in color and concentration of aflatoxin. The roasting conditions that resulted in a peanut color close to the standard of roasted peanut had aflatoxin reduction percentage of 15% (160 ° C / 5 min), and when compared to the literature, 45.1% (200 ° C / 5 min) and 54.9% (160 ° C / 20min). This work provides data that can be used by producers as it provides both a sensory evaluation in addition to aflatoxins degradation, being differential in work of the area, assessing only the degradation.

References

- Arzandeh, S., & Jinap, S., (2011). Effect of initial aflatoxin concentration, heating time and roasting temperature on aflatoxin reduction in contaminated peanuts and process optimization using response surface modeling. *International Journal of Food Science & Tecnology*, 46, 485-491.
- Brazil. Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA).(2011) 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 da União. Seção 1. Nº 46.
- Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N., Mafart, N. 2006. General Model Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6493-6502
- Cucullu, A.F.; Lee, L.S.; Mayne, R.Y. & Goldblatt, L.A. (1966). Determination of aflatoxin in individual peanuts and peanut sections. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 43, 89-92
- European Commission. (2006). Commission regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. L364:5-24
- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., Van Impe, J.F. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 185-209
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., Van Impe, J. F., (2005). GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 95-105.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods).(2002) *Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management*. New York. Kluwer academic/ Plenum Publishers.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2002). WHO IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins naphthalene and styrene. Aflatoxins, 82, 1-556.
- Lee, L. S., Cucullu, A. O., Franz, Jr., Pons, W.A. (1969). Destruction of aflatoxins in peanuts during dry and oil roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17, 451-453
- Luter, L., Wyslouzil, W., Kashyap, S. C., (1982). The destruction of aflatoxins in peanuts by microwave roasting. *Canadian Institute of food science and thecnology*, 15, 236-238.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 107-113
- Mobeen, A.K., Aftab, A., Asif, A., Zuzzer, A. A., (2011). Aflatoxins B₁ and B₂ contamination of peanut and peanut products and subsequent microwave detoxification. *Journal of pharmacy and nutrition sciences*, 1, 1-3.

Ogunsanwo, B. M., Faboya, O. O. P., Idowu, O.R., Lawal, O. S., Bankole, S. A., (2004) Effect of roasting on the aflatoxin contents of Nigerian peanuts seeds. *African Journal of Biotechnology*, 3, 451-455.

Pattee, H. E., Giesbrecht, F. G., Young, C. T., (1991). Comparison of Peanut Butter Color Determination by CIELAB L*a*b*and Hunter Color-Difference Methods and the Relationship of Roasted Peanut Color to Roasted Peanut Flavor Response. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 519-523.

Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. (3rd ed). New York. Springer.

Pluyer, H. R., Ahmed, E. M., Wei, C. I., (1987). Destruction of Aflatoxins on Peanuts by Oven- and Microwave-Roasting. *Journal of Food Protection*, 50, 504-508.

Samarajeewa, U., Sen, A. C., Cohen, M. D., Wei, C. I., (1990). Detoxification of aflatoxin in foods and feeds by physical and chemical methods. *Journal of Food Protection*, 53, 489-501.

Scott, P. M., (1984). Effects of food processing on mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 47, 489-499.

Steiner, W.E.; Brunschweiler, K.; Leimbacher, E. and Schneider, R. (1992). Aflatoxins and Fluorescence in Brazil Nuts and Pistachio Nut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2453-2457

Stroka, J., Anklam, E., Jorissen, U., Gilbert, J., (2000). Immunoaffinity Column cleanup with liquid chromatography using post-column romination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste and paprika powder: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 83, 320–340.

Capítulo 2

Kinetics of Aflatoxin Degradation During Peanut Roasting (Tables and Figures)

**Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da
revista “Food Chemistry”**

Table 1. Aflatoxin initial concentration and respective aflatoxin inactivation rate (k) and % of reduction obtained after roasting at 180°C for up to 20 minutes.

Initial Concentration ($\mu\text{g/kg}$)	R^2	K_{max} (log $\mu\text{g/kg/min}$)	% of reduction
702	0.9821	0.08 $\pm$ 0.01	74.5
346	0.7543	0.06 $\pm$ 0.02	64.24
175	0.8830	0.04 $\pm$ 0.01	56.13
35	0.9455	0.04 $\pm$ 0.01	54.71

Figure 1. Influence of aflatoxin initial concentration on the aflatoxin inactivation rate (k) at 180°C

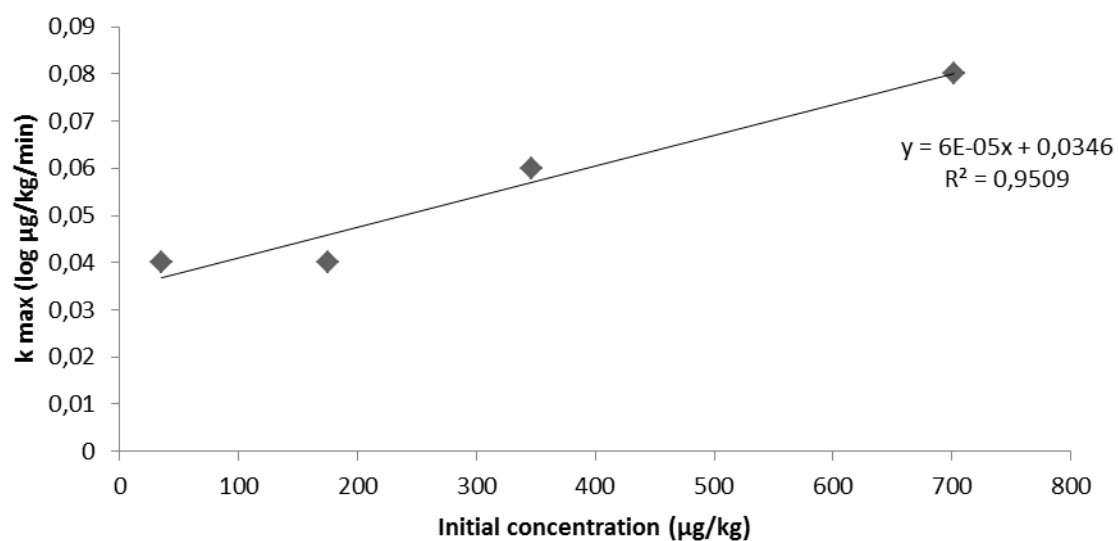


Figure 2. Percentage of reduction at 180°C according to initial concentration

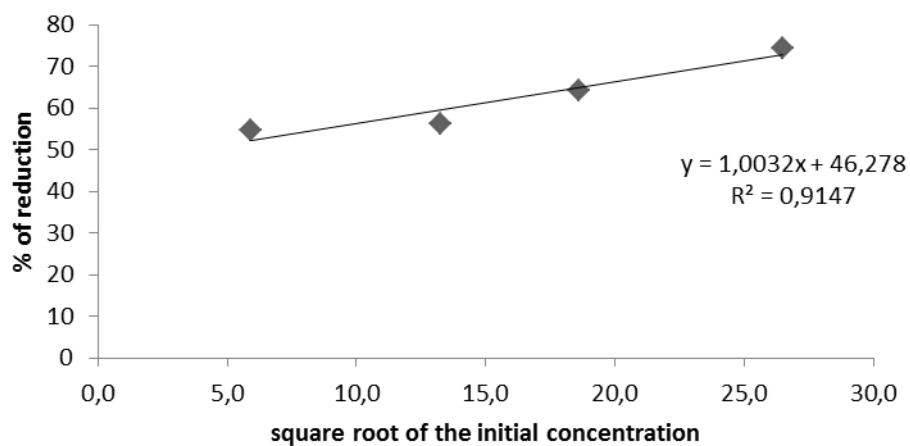


Table 2. Temperature and time conditions of roasting, aflatoxin concentration, aflatoxin loss and color analysis in peanuts

Roasting conditions		Aflatoxin ($\mu\text{g/kg}$)	Aflatoxin degradation (%)	Color analysis**		
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Time (min)			L*	a*	b*
Raw Peanut	-	84.8 $\pm$ 52.4	-	-	-	-
160	5	71.5 $\pm$ 50.2	15.7	69.21 $\pm$ 0.57 ^b	3.66 $\pm$ 0.04 ^j	24.06 $\pm$ 0.08 ^f
	10	41.9 $\pm$ 4.9	50.6	64.0 $\pm$ 0.09 ^c	6.82 $\pm$ 0.02 ^h	27.81 $\pm$ 0.06 ^{bc}
	15	36.2 $\pm$ 29.7	57.4	61.50 $\pm$ 0.33 ^{de}	8.26 $\pm$ 0.02 ^f	28.42 $\pm$ 0.48 ^b
	20	38.2 $\pm$ 0.3	54.9	60.23 $\pm$ 1.20 ^e	9.08 $\pm$ 0.20 ^e	27.55 $\pm$ 0.55 ^{bc}
	25	32.6 $\pm$ 9.9	61.6	63.2 $\pm$ 0.02 ^{cd}	11.01 $\pm$ 0.13 ^c	28.3 $\pm$ 0.11 ^b
180	5	51.3 $\pm$ 32.9	39.5	60.79 $\pm$ 0.07 ^e	9.14 $\pm$ 0.09 ^e	29.96 $\pm$ 0.43 ^a
	10	26.6 $\pm$ 13.8	68.6	54.08 $\pm$ 0.16 ^g	12.36 $\pm$ 0.08 ^b	29.68 $\pm$ 0.08 ^a
	15	32.2 $\pm$ 14.3	62.0	52.06 $\pm$ 0.70 ^h	12.9 $\pm$ 0.00 ^a	25.69 $\pm$ 0.43 ^e
	20	21.1 $\pm$ 2.4	75.1	51.21 $\pm$ 1.04 ^h	12.92 $\pm$ 0.09 ^a	23.76 $\pm$ 0.43 ^f
	25	13.9 $\pm$ 2.7	83.6	48.41 $\pm$ 0.08 ⁱ	12.98 $\pm$ 0.08 ^a	19.2 $\pm$ 0.07 ^g
200	5	46.6 $\pm$ 2.1	45.1	57.53 $\pm$ 0.03 ^f	13.15 $\pm$ 0.01 ^a	27.04 $\pm$ 0.13 ^{cd}
	10	10.7 $\pm$ 1.9	87.4	46.94 $\pm$ 0.04 ⁱ	12.44 $\pm$ 0.06 ^b	17.27 $\pm$ 0.04 ^h
	15	9.5 $\pm$ 0.1	88.8	44.12 $\pm$ 0.02 ^j	10.86 $\pm$ 0.09 ^c	13.65 $\pm$ 0.08 ⁱ
	20	8.8 $\pm$ 0.4	89.7	41.98 $\pm$ 0.17 ^l	9.71 $\pm$ 0.03 ^d	10.74 $\pm$ 0.08 ^j
	25	8.7 $\pm$ 0.0	89.7	39.29 $\pm$ 0.06 ^m	7.44 $\pm$ 0.12 ^g	7.36 $\pm$ 0.01 ^l

**Different letter in the same column represents statistically significant difference ($p < 0.05$)

Figure 3. Aflatoxin degradation during roasting at 160°C fitted using Geereard model

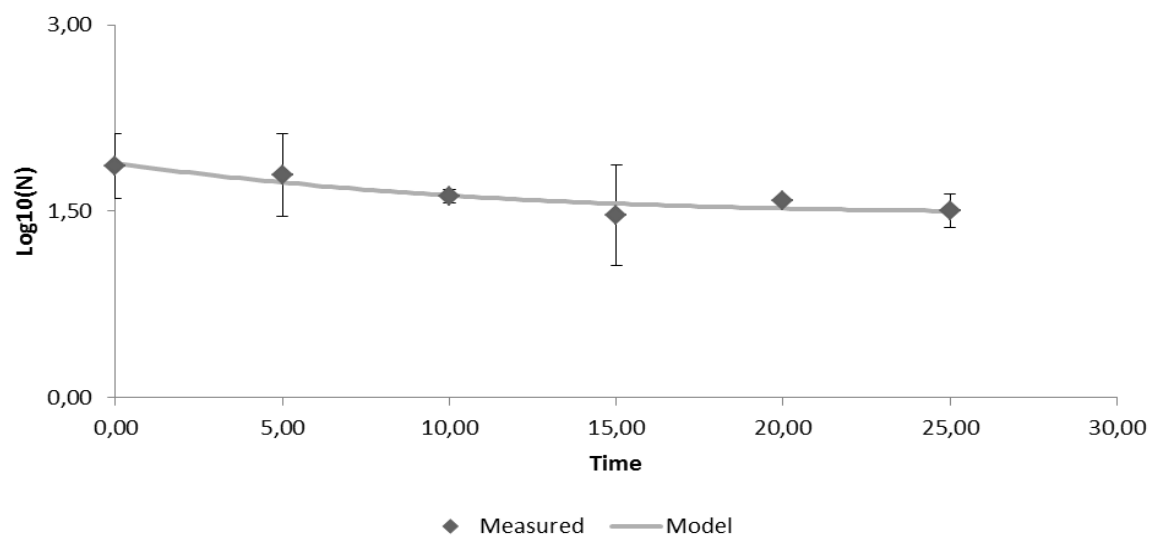


Figure 4. Aflatoxin degradation during roasting at 180°C fitted using Weibull model

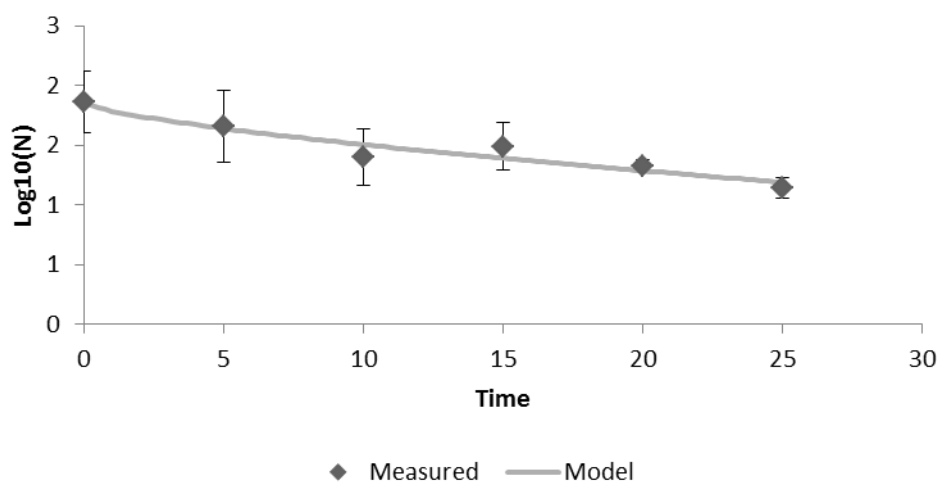


Figure 5. Aflatoxin degradation during roasting at 200°C fitted using Double Weibull model

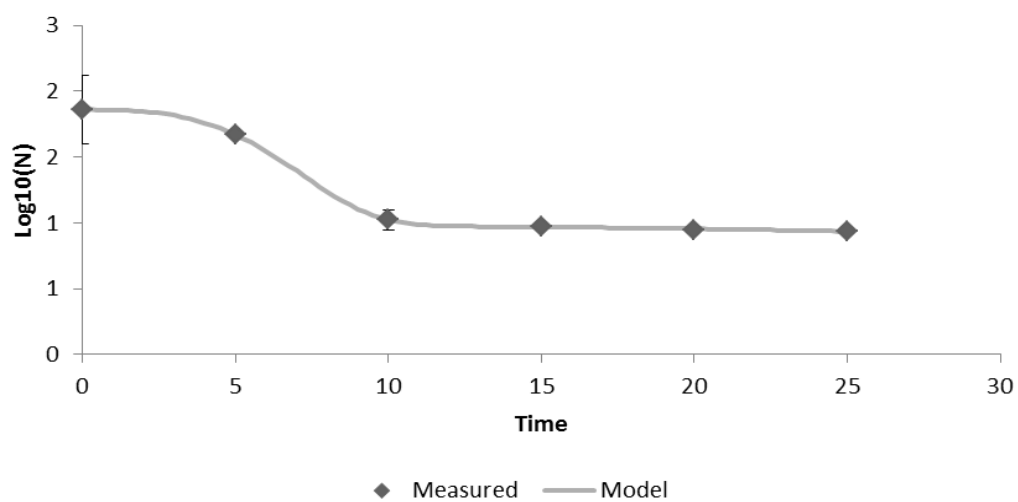
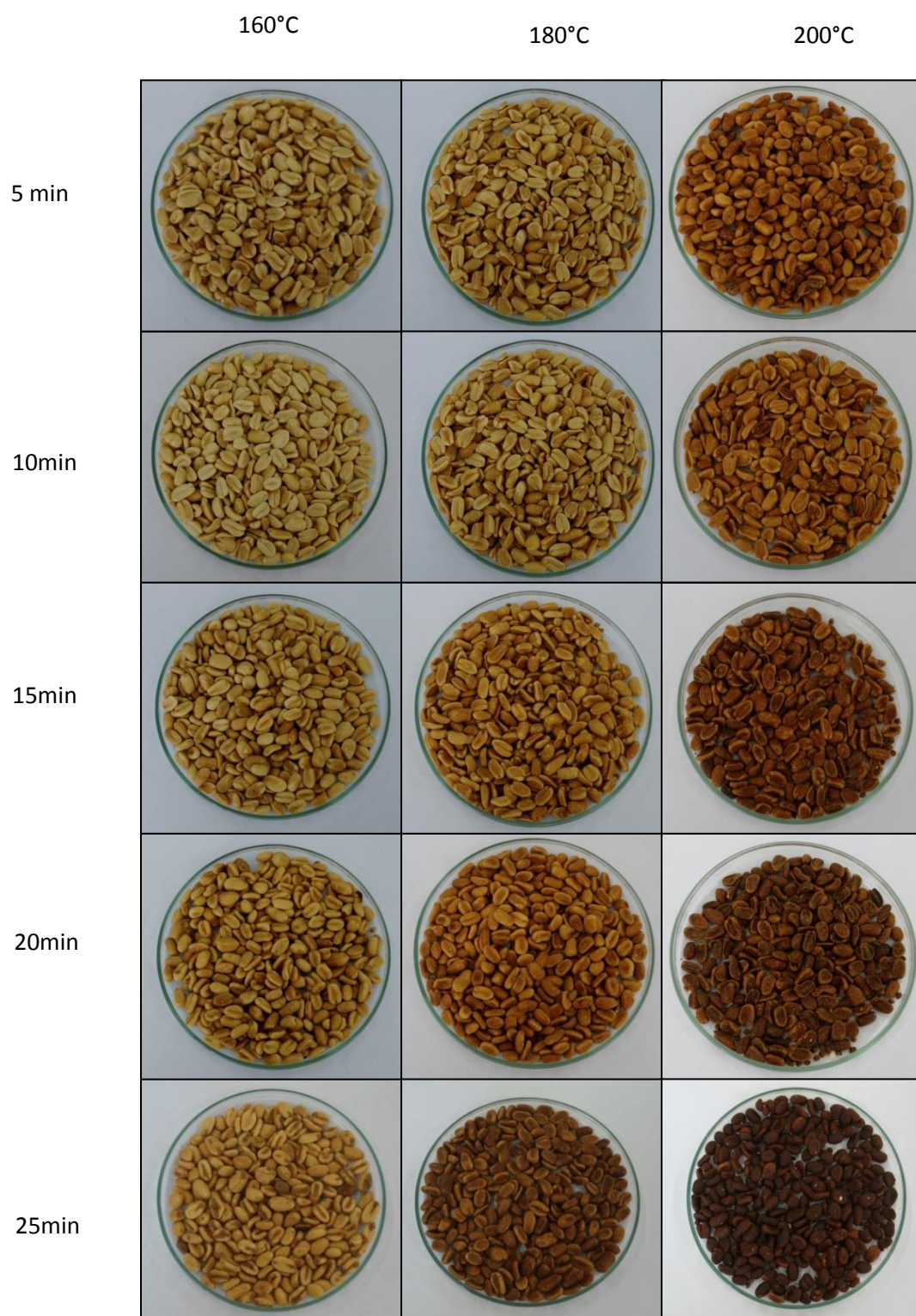


Figure 6. Peanut color as affected by time and temperature of roasting



Capítulo 3

Exposure assessment of aflatoxins through peanuts consumption in Brazil, a deterministic and probabilistic approach

Ligia Manoel Martins, Anderson de Souza Sant’Ana, Beatriz Thie Yamanaka e Marta
Hiromi Taniwaki

**Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da
revista “Journal of Exposure Science and Environmental
Epidemiology”**

Abstract

A deterministic and probabilistic approach was used to estimate the intake of total aflatoxin from raw and roasted peanuts through aflatoxin concentration and peanut consumption in different States of Brazil from 2005 to 2013. The cancer risk and Margin of Exposure (MOE) were also calculated. The average value of peanut consumption in Brazil was 2.41g per person day⁻¹. From total samples analyzed (1,727), aflatoxin contamination was present only in 33% of samples (575 samples), in which almost 42% reached contamination levels above the maximum level allowed in Brazil (20µg/kg). The intake of aflatoxin using a deterministic and probabilistic approach ranged from 0.76 – 7.491ng/kg bw day and 0.04-10.23ng/kg bw day, respectively. The deterministic and probabilistic cancer risk approach ranged from 0.001 – 0.76 cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals and 0.0004-0.102 cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals respectively. The MOE ranged from 22.7 - 2,112.23 and 16.6 – 4,694.6 for the deterministic and probabilistic approach, respectively. The age group of <1 to 19 years old and female gender proved to be the most exposed to the toxin due to the smaller body weight when compared to the male gender, and the age group of ≥20 years-old. The probabilistic approach enabled a better exposure frame visualization of the population exposure to aflatoxin with a range of 90% confidence on the data obtained. Better monitoring of consumption and the use of recent peanut contamination data by aflatoxins would improve assessment of exposure from this toxin to the Brazilian population.

1. Introduction

Aflatoxins are secondary metabolites mainly produced by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. The main aflatoxins found in foods are aflatoxin B1, B2, G1 and G2; the letters refer to the color of their fluorescence under ultraviolet light (B for blue and G for green) (Klich, 2007). Exposure to aflatoxins can cause acute or chronic poisoning although acute cases are rare. Chronic exposure to aflatoxins appears to be more critical, since besides immunosuppressive action it can lead to liver cirrhosis (ICMSF, 2002), being considered by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a mycotoxin belonging to group 1, i.e., compounds carcinogenic to humans (IARC, 2002). The negative effects of aflatoxins to human can be exacerbated due to its synergistic action with other substances or agents. For example, it is known that aflatoxin is approximately 30 times more potent in the presence of the surface antigen of hepatitis B than in people who do not have this antigen. Therefore, aflatoxins and the hepatitis B virus present synergistic action for the development of cancer. As a result, the risk of cancer in patients with hepatitis B is increased from 5 to 60 when the infection is associated with exposure to aflatoxins (Williams et al., 2004).

What regards to aflatoxin exposure by humans, it is known that peanuts comprise the one of the major sources of this mycotoxin in human diet. Peanut underground growth characteristics make this crop susceptible to fungi contamination and subsequent production of mycotoxins, especially aflatoxins, due to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* (Horn, 2003). The control of aflatoxin production in peanuts is not an easy task. Drought stress and high temperatures during peanut production can induce aflatoxins production before the peanuts are harvested, making it difficult to control once the toxin has already been formed and its removal does not occur effectively during peanut processing (ICMSF, 2002).

Due to their toxicity, several countries have established limits for aflatoxins in peanuts and other foods. The Commission of the European Communities, established a maximum level of 15 µg/kg for total aflatoxins in peanuts to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs, and 4 µg/kg for peanuts

processed and ready to eat (EC, 2006). The Codex Alimentarius, as the commission of the European communities, established 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ as maximum level of aflatoxin in peanuts intended for further processing (Codex, 2009). The Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) established limits of 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for total aflatoxins in peanuts (Brazil, 2011).

Studies conducted by Oliveira et al. (2009), Andrade et al. (2012) and Magrine et al. (2011) investigated the intake of aflatoxins in peanut consumption highlighting that the exposure to this mycotoxin comprises a risk to public health. Despite their important findings, these results were obtained through a deterministic approach, in which a limited information, since working with average values, is provided, not allowing a more realistic assessment of the population exposure. A more specific analysis, such as probabilistic approach, should be used to further characterize this intake, giving a more realistic foundation that will enable decision making for risk managers. Thus, the aim of this study was to evaluate the exposure of aflatoxins through peanut consumption in Brazil at different age groups, using a deterministic approach followed by a probabilistic approach to better characterize the risk.

2. Materials and Methods

2.1. Consumption data

Peanut consumption data were obtained from an N&P Consultants survey conducted in 2007/2008 using the methodology of food balance sheets (FBS), available at the Brazilian Chocolate, Cocoa, Peanuts, Candies and Byproducts Industry Association (ABICAB). Consumption data from the main regions of Brazil were available but consumption from North region were not, since there was no monitoring in that area. Values of per capita consumption took into account a population of 171.1 million Brazilian citizens in 2007 (ABICAB, 2015). The peanut consumption data in different age group are not available in Brazil. Even so, the chronic dietary intake was estimated by age group, taking into account body weight in different age groups available in a survey conducted by the Brazilian Institute of Geography and Statistics

(IBGE) from 2008 to 2009 (IBGE, 2011). The population studied was divided into age-gender groups: <1 to 19 years-old, representing childhood and adolescence, and ≥ 20 years-old, representing adults and elderly.

2.2. Aflatoxin occurrence

Data of peanut contamination with aflatoxin were obtained from the Global Environment Monitoring System/Food Contamination Monitoring and Assessment Program (GEMS/Food) database. The research was carried out considering total aflatoxin (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂), sampling period from 2005 to 2013 (the last data available) and only data from Brazil (WHO, 2015). Aflatoxin contamination data were separated by years (2005/2006; 2007/2008; 2009/2010 and 2011 to 2013) and in raw and roasted peanuts. The data reported as not detected (ND) for aflatoxins were treated using four different cases: Case 1, data were replaced by limit of detection (LOD) value (upper bound); Case 2, data were replaced by LOD/2 value (medium bound); Case 3, data were replaced by zero (lower bound); Case 4, data were replaced by a uniform distribution with minimum value as zero and the maximum value as LOD (EFSA, 2010; Baert et al., 2007). The cases 1, 2 and 3 were used for deterministic approach while cases 1,2,3 and 4 for probabilistic.

2.3. Assessment of aflatoxin exposure

Deterministic and probabilistic approaches were used to evaluate aflatoxin exposure through peanut consumption. For the deterministic approach the mean values of aflatoxin concentration in peanuts, peanut consumption and body weight were used. For the probabilistic approach, a normal distribution was used to fit the peanut consumption data. Concentration of aflatoxins in peanuts was calculated by exponential distribution and body weight by discrete distribution.

The chronic aflatoxin intake was estimated by the ratio between consumption data (g/day) multiplied by aflatoxin concentration in peanuts (ng/g) and body weight (kg). The same

equation was used for the determinist and probabilistic calculations (equation 1) (FAO/WHO, 2005)

$$\text{Aflatoxin intake} \left[\frac{\text{ng}}{\text{kg bw} \cdot \text{day}} \right] = \frac{\text{concentration of aflatoxin in peanuts} \left[\frac{\text{ng}}{\text{g}} \right] \times \text{peanut consumption} \left[\frac{\text{g}}{\text{day}} \right]}{\text{body weight} [\text{kg}]} \quad (1)$$

For the probabilistic approach, aflatoxin intake was simulated using Monte Carlo simulation, with @Risk 5.7 for excel (Palisade corporation, NY, EUA). The simulation was carried out with 10,000 iterations, enough to converge the model.

2.4 Cancer risk estimation

The FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) estimated aflatoxin carcinogenic potencies (P estimated) divided into two groups: potency in individuals without hepatitis B infection ($P_{HBsAg^-} = 0.01 \text{ cancers year}^{-1} \text{ per } 100,000 \text{ individuals}$) and in individuals with chronic hepatitis B infection ($P_{HBsAg^+} = 0.3 \text{ cancers year}^{-1} \text{ per } 100,000 \text{ individuals}$). The percentage of the population with ($HBsAg^+$) and without ($HBsAg^-$) hepatitis B infection was also considered. According to the Brazilian Ministry of Health (2010), the prevalences of $HBsAg^+$ in Brazil are 0.055% for those from 10 to 19 years old and 0.60% for those from 20 to 69. The potency was estimated according to equation 2 (WHO, 1999). The cancer risk was calculated considering the aflatoxin carcinogenic potency obtained in equation 2 multiplied by aflatoxin intake, as illustrated in equation 3 (WHO, 1999).

$$P_{\text{estimated}} = [P_{HBsAg^+} \times \% \text{ pop } HBsAg^+] + [P_{HBsAg^-} \times \% \text{ pop } HBsAg^-] \quad (2)$$

$$\text{Cancer risk} = P_{\text{estimated}} \times \text{Aflatoxin intake} \quad (3)$$

2.5 Margin of exposure (MOE)

The margin of exposure approach was calculated through the ratio between a defined point on the dose-response curve for the adverse effect and the aflatoxin intake (EFSA, 2005). The point on the dose-response curve used in this study was the lower bound value of a benchmark dose level from a cancer incidence of 10% in rodents (BMDL10). A BMDL10 of $0.17 \text{ mg kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$ was estimated by EFSA (2007) based on a study involving aflatoxin B1 administration at a range of dietary doses to male Fischer rats. A MOE value of 10,000 or higher would indicate low concern from the public health point of view.

3. Results

Consumption data

For probabilistic approach, peanut consumption data in the main States and regions of Brazil have been adjusted to a normal distribution (Figure 1). The average was used for deterministic approach. The peanut consumption ranged from 1.10 to $2.96 \text{ g per person day}^{-1}$ from São Paulo State and Northeast region, respectively, and the average value of peanut consumption in Brazil was $2.41 \text{ g per person day}^{-1}$. The discrete distribution of body weight in the age group of <1 to 19 years old was 36.8 kg for male and 32 kg for female, and for the age group of ≥ 20 years old was 72.7 kg for male and 60.3 kg for female.

Aflatoxin occurrence

A total of 1,727 aflatoxin occurrence data in raw and roasted peanut were available at GEMS/Food data base from 2005 to 2013. The distribution of aflatoxin occurrence in years and divided in raw and roasted peanut is shown in Table 1. From total samples analyzed, aflatoxin contamination was present only in 33% of samples (575 samples), in which almost 42% reached contamination levels above the maximum level allowed in Brazil ($20 \mu\text{g/kg}$). The mean lower and upper bound values of aflatoxins in raw peanuts ranged from 34.38-34.89 to

18.44-18.91 $\mu\text{g/kg}$ and for roasted peanuts, aflatoxin concentration ranged from 98.67-99.05 to 2.42-3.64 $\mu\text{g/kg}$ in 2005-2006 and 2011-2012-2013 respectively. Figure 2 shows the aflatoxin contamination in the period analyzed. For deterministic analysis, the left censored aflatoxin data were not treated as case 4 since it is a uniform distribution and only mean values were used.

Assessment of aflatoxin exposure

Deterministic approach

Aflatoxin intake through consumption of raw and roasted peanuts, cancer risk and MOE determined by a deterministic approach are shown in Table 2. In general, aflatoxin intake through both raw and roasted peanut consumption was higher in the age group of <1 to 19 years-old, and female gender. The highest aflatoxin intake through raw peanut consumption was observed in 2007-2008. The upper and lower bound range in these years were from 2.81-2.74 ng/kg bw day for female <1 to 19 years-old. The highest aflatoxin intake through roasted peanut consumption was observed in 2005-2006. The upper and lower bound range in these years from 7.48-7.45ng/kg bw day for female <1 to 19 years-old. The lowest aflatoxin intake through raw and roasted peanut consumption was observed in 2011-2012-2013 and 2009-2010 respectively. The upper and lower bound intake in raw peanut ranged from 0.63-0.61ng/kg bw day for male ≥ 20 years-old and for roasted peanut there was no aflatoxin exposure since none of the samples analyzed showed aflatoxin contamination.

The prevalence of hepatitis B virus in Brazil for 10 to 19 years old (0.055%) and for 20 to 69 years-old (0.60%) was considered in this study to evaluate the cancer risk to the two age groups studied (Ministry of Health, 2010). As observed in the intake results, the highest risk of cancer through raw peanut consumption was observed in 2007-2008 in females from <1 to 19 years-old group with upper and lower bound ranging from 0.029 to 0.028 cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals. For risk of cancer through roasted peanut consumption, the highest value was observed in 2005-2006 in female from <1 to 19 years-old group with 0.06 cancer year⁻¹ per 10⁵

individuals, while in 2009-2010, the absence of aflatoxin contamination in peanuts roasted highlights the lack of risk of cancer in these years.

As the MOE value is also dependent on aflatoxin intake by peanut consumption, the lower the intake, the greater its value. The lowest value was observed in 2005-2006 for roasted peanuts in the female <1-19 year old group (22.7) and in 2007-2008 for raw peanut in the same group with 60.53.

The highest MOE value was 2112.3 for roasted peanut in 2011-2012-2013 years in the male 20 to 69 year old group and for raw peanut was 331.9 from 2009-2010 in the same group.

Probabilistic approach

The mean values, 5th and 95th percentile of aflatoxin intake, cancer risk and MOE resulted from a Monte Carlo simulation with 10,000 interactions are shown in Tables 3 and 4 for male results and Tables 5 and 6 for female results. The mean values observed from the probabilistic approach were higher than those observed through the deterministic approach.

The female population belonging to <1 to 19 years-old showed the highest mean aflatoxin intake for raw peanuts of 3.87 ng/kg bw day which ranged from 0.11 (5th percentile) to 14.39 ng/kg bw day (95th percentile) when left censored data were treated as case 4 in 2007-2008. For the age group of ≥ 20 years-old group in the same period, the highest mean value was 1.47 ng/kg bw day and ranged from 0.06 (5th percentile) to 4.69 ng/kg bw day (95th percentile) when left censored data were treated as case 2. For females belonging to both age groups, the lowest value observed was in 2009-2010, for censored data treated in case 3 (lower bound) and showed mean value of 1.57 ng/kg bw day, ranging from 0.05 (5th percentile) to 5.71 ng/kg bw day (95th percentile) for <1 to 19 years old and 0.61 ng/kg bw day, ranging from 0.03 (5th percentile) to 1.93 ng/kg bw day (95th percentile) for ≥ 20 years-old. For roasted peanuts, the period with higher intake was 2005-2006 for females in both age groups with means and 5th-95th

ranges of 10.22 ng/kg bw day (0.18-36.80 ng/kg bw day) and 3.89 ng/kg bw day (0.06-12.52 ng/kg bw day) for to <1 to 19 years-old and ≥ 20 years-old respectively.

The higher exposure for males at <1 to 19 years-old and 20 to older group was observed in 2007-2008 for raw peanuts and in 2005-2006 for roasted peanuts and mean (5th-95th) values ranged from 3.40 ng/kg bw day (0.10-12.29) for raw peanuts and the first age group to 1.22 ng/kg bw day (0.05-3.91) for the second, while for roasted peanuts was from 8.76 ng/kg bw day (0.15-32) to 3.23 ng/kg bw day (0.05-10.40). Lowest values for raw peanut were found in 2009-2010 with mean values and 5th-95th percentile ranging from 1.39 ng/kg bw day (0.04-5.10) for <1-19 years old to 0.51 ng/kg bw day (0.02-1.61) for ≥ 20 years-old. As roasted peanut samples from 2009-2010 had no aflatoxin contamination, this period presented no intake through this peanut consumption for both gender and age groups.

The mean value observed for the risk of cancer through consumption of roasted peanuts ranged from 0.001 cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals (0.000-0.003) for males from ≥ 20 year-old group from 2011-2013, to 0.104 cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals (0.002-0.374), in 2005-2006 by females from <1 to 19 years old group.

The MOE 5th percentile results showed values above 10,000 in both gender and age groups for roasted peanuts, when left censored data were treated as case 3 (lower bound), from 2007-2008 and 2011-2012-2013 years, ranging from 21,152 for females 1 to 19 years old to 83,307 for males from ≥ 20 years-old group.

4. Discussion

Consumption data used in this study ranged from 2.10 to 2.96 g per person day⁻¹, averaging 2.41g per person day⁻¹. Three methodologies are usually used to estimate food consumption: food balance sheets (FBS), household budget survey data (HBS) and individual dietary surveys (IDS). The FBS approach take into account the supply (food production, import, export, decrease in stock and others) during a reference time divided by the total population to estimate the *per caput* supply available for human consumption (FAO, 2001). The GEMS/Food

consumption data uses this method and for cluster K to which Brazil is inserted, the consumption is 0.9 g per day for shelled peanut and 1.3g per day for peanut in shell, with a total of 2.1g per day if considered both together, indicating an average value similar to those used in this work (WHO, 2007). The main drawbacks of this method comprise the fact that it is a country estimate approach, so food consumption data on households and individuals are not available and since it takes into account the food supply, it only considers raw and semi-processed commodities, and the home production practice is not taken into account (Héraud et al., 2013). The HBS collect data of food purchased in each household, which is not necessarily the amount consumed (Serra-Majen et al., 2003). This methodology was used by Andrade et al (2012) to access aflatoxins in food products consumed in Brazil, and for peanut consumption by total population and for high consumers the consumption was 0.04g and 21.35g per day, respectively. IDS is the approach which reports most closely food consumption data compared with the other two analyzed. To collect this data, record methodology that takes into account current intake, or recall methodology, that reflects past consumption can be used. Magrine et al (2011) applied a questionnaire of frequency and amount of consumption of peanut products to a total of 384 individuals interviewed in Paraná state, Brazil and the consumption averaged 6.7 g per day. It is noteworthy that the methodology used can influence the outcome, generating a wide variation of the data obtained, therefore, each individual case must be taken into account. The concentration of aflatoxins throughout the years analyzed showed a decrease which may be related to the development of programs such as Pro-peanut which aims to ensure the quality of peanuts through all the production chain (ABICAB, 2015) as well as the compliance with the requirements from ministry of agriculture (Brazil, 2009) and Brazilian Health Surveillance Agency (Brazil, 2011).

The mean values of aflatoxin intake observed in the deterministic approach were lower than those observed in the probabilistic; however, they were within the 90% confidence interval delimited by the values of 5th and 95th percentile. The implementation of the deterministic model is relatively simple, using a single point estimate for each variable. Nevertheless, this model has

limited information and subsequent interpretation of results of the exposure. It should be used as a screening step to check if the hazard present in the studied food offers risk to human health (FAO, 2005). In this study the intake results, risk of cancer and MOE observed in the deterministic analysis justify the use of a more elaborate method as probabilistic analysis to obtain more realistic results of population exposure to aflatoxins due to peanut consumption.

Most assessments of aflatoxin exposure developed in Brazil and other countries use the deterministic approach. Magrine et al., (2011) studied the intake of aflatoxins through consumption of peanuts products by the Paraná State (Brazil) population. The average of aflatoxin B₁ intake was 0.6 and 10 ng kg⁻¹ bw day⁻¹ for medium and high consumption respectively. Andrade et al. (2012) studied aflatoxin intake in a range of food products in Brazil. The lower and upper bound of aflatoxin intake through peanut consumption was 0.004 and 0.01 ng kg⁻¹ bw day⁻¹ for total population and 2.3 and 4.1 ng kg⁻¹ bw day⁻¹. This paper also estimated cancer risk of 0.0731-0.0753 and 0.1794-0.3056 and MOE of 25.8-25 and 10.4-6.2 for total population and high consumers, respectively. Oliveira et al. (2009) found an aflatoxin intake of 0.23 ng kg⁻¹ bw day⁻¹. These values reported by these studies are similar to those observed in our study. However, none of those studied the aflatoxin intake in different age groups since the consumption of peanuts by children and adolescents was not available. Thus, the intake was estimated taking into account different body weight for each age group. This approach may lead to an overestimated aflatoxin intake, but it can be useful to draw attention to the risk of exposure.

Ding et al. (2012) through a probabilistic expert analysis of aflatoxin exposure in raw peanuts in China, considered the consumption in the two age groups, children and adults, and as well as in our work, observed a higher exposure in the first age group. For children from a high-consumption area, the mean and 97th percentile was 3.28-3.33 ng kg⁻¹ bw day⁻¹ and 17.1 ng kg⁻¹ bw day⁻¹, respectively, whereas for adults it ranged from 1.25-1.27 to 6.55 ng kg⁻¹ bw day⁻¹. Another probabilistic approach was conducted by Sugita-Konishi et al. (2010) and divided the population in age groups to evaluate exposure of aflatoxin in a range of food products. The 95th

percentile of estimated intake for age group from 1-6 years old was higher than in more than 20 years old ($0.014 \text{ ng kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$ and $0.003 \text{ ng kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$, respectively). Since children have more future years of life when compared to adults, their time of exposure and to develop a chronic disease is higher. Besides, this age group presents a less developed metabolism and rates of cell production, change and higher growth (Sherif et al., 2009).

The cancer risk was higher than that observed by Sugita-Konishi et al. (2010), which found a 95th percentile of 0.00004 and 0.00005 cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals for lower and upper bound respectively in the Japanese population, and closely to that observed by Ding et al. (2012) that found 0.003 and 0.17 cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals for mean and 97.5th percentile respectively. Andrade et al. (2012) calculated the cancer risk considering all food products studied and found a cancer risk of 0.073-0.075 cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals for total population and 0.18-0.31 cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals for high consumers. The MOE values obtained from the deterministic approach was lower than 10,000 while some 5th percentile in the probabilistic approach from 2007-2008 and 2011-2012-2013 years showed higher values. The Scientific Committee of the European Food Safety Authority (EFSA) agree that values of 10,000 or higher observed in a MOE that used a BMDL10 from an animal study indicates a low concern for public health. However, this judgment and decision is a risk manager's responsibility (EFSA, 2005).

5. Conclusion

In conclusion, the exposure of aflatoxins through peanut consumption is still a concern, although the latest data on peanut aflatoxin contamination has shown a decline, which indicates a lower exposure. The age group of <1 to 19 years old and female gender proved to be the most exposed to the toxin due to the smaller body weight when compared to the male gender, and the age group of ≥ 20 years-old. The probabilistic approach enabled a better exposure frame visualization of the population exposure to aflatoxin with a range of 90% confidence on the data

obtained. Better monitoring of consumption and recent peanut contamination data by aflatoxins would improve assessment of exposure from this toxin to the Brazilian population.

References

- Andrade, P.D., Homem de Melo, M., França, J.A., Caldas, E.D. 2013. Aflatoxins in food products consumed in Brazil: a preliminar dietary risk assessment. *Food Additives & Contaminants: part A*, 30:127-136
- Baert, K., Meulenaer, B., Verdonck, F., Huybrechts, I., Henauw, S., Vanrolleghem, P. A., Debevere, J., Devlieghere, F. 2007. Variability and uncertainty assessment of patulin exposure for preschool children in Flanders. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 1745-1751.
- BRAZIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N°7 de 18 de fevereiro de 2011. *Diário Oficial da União*. n. 37, seção 1, 22 de fevereiro de 2011.
- BRAZIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Produção Integrada no Brasil: agropecuária sustentável, alimentos seguros. 2008. Available in: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Produ%C3%A7%C3%A3o%20Integrada/PI_Brasil.pdf>. Access in: 21 June 2015
- Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE). 2011. Pesquisa de orçamentos familiares 2008–2009. Raw data. Rio de Janeiro (Brazil): IBGE.
- Brazilian Chocolate, Cocoa, Peanuts, Candies and Byproducts Industry Association (ABICAB). Programa Pró-Amendoim. Available in: <http://www.abicab.org.br/amendoim/pro-amendoim/selo-de-qualidade>. Access: July 2015
- CODEX ALIMENTARIUS. Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed (codex stan 193-1995). Available in: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/1_CXS_193e.pdf. Access: 15 July 2015.
- Ding X, Li P, Bai Y, Zhou H. 2012. Aflatoxin B1 in postharvest peanuts and dietary risk in China. *Food Control*. 23:143–148.
- European Commission. Commission regulation No 165/2010 of 16 February 2010. Amending regulation (EC) N. 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union*, 2010
- European Food Safety Authority (EFSA). 2010 Scientific report of EFSA. Management of left censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. *EFSA journal*; 8(3): 1557. Available in: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/1557.pdf. Access: 20 July 2015.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2005. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a harmonized approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. *EFSA J*. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/282.pdf>/ Accessed: 20 July, 2015

European Food Safety Authority (EFSA). 2007. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products EFSA J. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/446.pdf>/ Accessed: 20 July, 2015

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).2001. Food balance sheets – A handbook. Available from: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/x9892e/x9892e00.pdf>. Accessed: 15 June 2015.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). 2005. Dietary exposure assessment of chemicals in food: report of a joint FAO/WHO consultation [Internet]. Annapolis (USA): FAO/WHO. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/97892415597470_eng.pdf/. Accessed 27 June 2015

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (2002). Aflatoxins in peanuts. In Microorganisms in foods. 7. Microbiological testing in food safety management (pp. 263e271). New York: Kluwer Academic/ Plenum Press.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 2002. WHO IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins naphthalene and styrene. Aflatoxins. 82, 1-556

Klich, M.A. 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. Molecular plant pathology, 8: 713-722.

Magrine, I.C.O., Ferrari, S.S.C., Souza, G.F., Minamihara, L., Kemmelmier, C. Bando, E., Machinski Jr, M. 2011. Intake of aflatoxins through the consumption of peanut products in Brazil. Food additives & Contaminants: part B, 4: 99-105.

Ministry of Health. 2010. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. Available from: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2010/50071/estudo_prevalencia_hepatites_pdf_26830.pdf/. Accessed: 20 June 2015

Oliveira CAF, Gonçalves NB, Rosim RE, Fernandes AM. 2009. Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. Int J Mol Sci. 10:174–183.

Pro-amendoim, 2015a. Selo de qualidade, garantia de um produto seguro. Available in: <http://www.proamendoim.com.br/selo.php>. Access: 20 June 2015

Pro-amendoim, 2015b. Consumo per capita. Available in http://www.proamendoim.com.br/safras_estatisticas_per_capita.php. Access: 23 May 2015.

Serra-Majem, L., MacLean, D., Ribas, L., Brulé, D., Sekula, W., Prattala, R., Garcia-Closas, R., Yngve, A., Lalonde, M., Petrasovits, A. 2003. Comparative analysis of nutrition data from national, household, and individual levels: results from a WHO-CINDI collaborative Project in Canada, Finland, Poland, and Spain. Journal of epidemiology & Community Health, 57: 74-80.

Sherif, S. O., Salama, E. E., Abdel-Wahhab, M. A. 2009. Mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. *International Journal of Hygiene and Environmental health*, 212: 347-368.

Sugita-Konishi Y, Sato T, Saito S, Nakajima M, Tabata S, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y, Kai S, Sujiyama K, et al. 2010. Exposure to aflatoxins in Japan: risk assessment for aflatoxin B1. *Food Addit Contam.* 27:365–372.

Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr.* 80:1106–1122.

World Health Organization (WHO). 1999. WHO Technical Report Series. Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-ninth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) [Internet]. Geneva (Switzerland): WHO. Available from: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_884.pdf/. Accessed: 20 July, 2015

World Health Organization (WHO). 2005. Consultations and workshops: Dietary exposure assessment of chemicals in food. Report of a Joint FAO/WHO consultation. Annapolis, Maryland, USA, 2-6 May 2005.

World Health Organization (WHO). 2007. GEMS/Food total diet studies: report of the 4th International Workshop on Total Diet Studies, Beijing, China. Available in: http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/TDS_Beijing_2006_en.pdf. Access: 13 May 2015.

World Health Organization (WHO). 2015. Gems/Food. Available in <https://extranet.who.int/gemsfood/Search.aspx>. Access in : 15 May 2015.

Capítulo 3

**Exposure assessment of aflatoxins by peanuts
consumption in Brazil, a deterministic and
probabilistic approach**

(Tables and figures)

**Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da
revista “Journal of Exposure Science and Environmental
Epidemiology”**

Figure 1. Normal distribution of peanut consumption data.

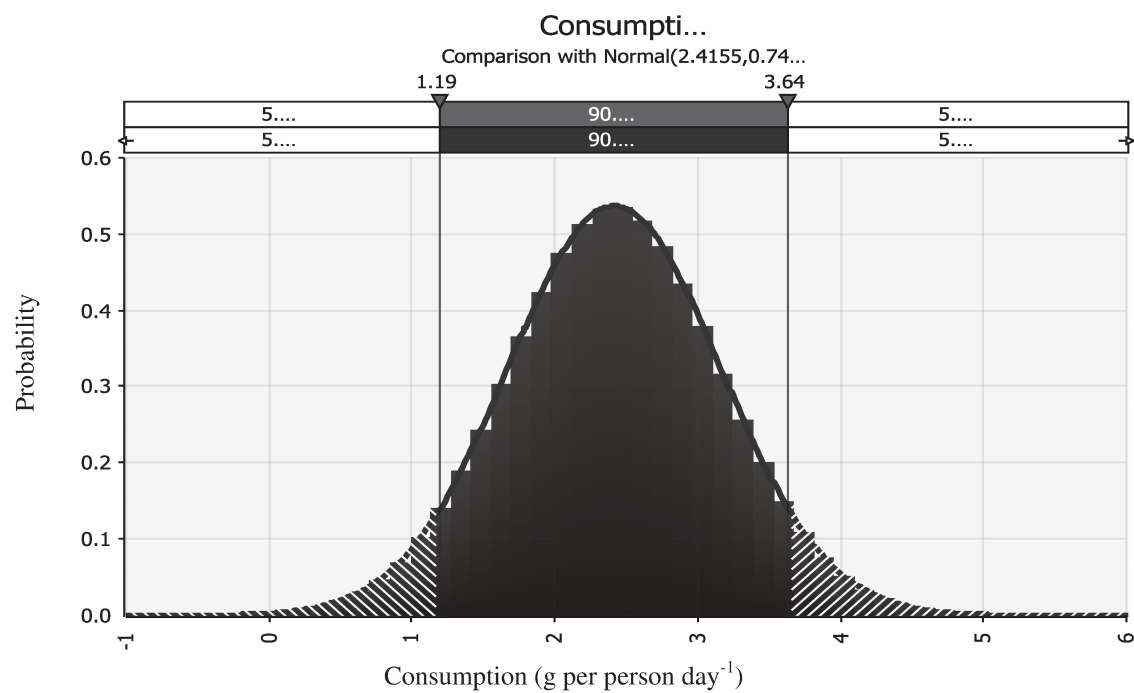


Table 1. Aflatoxin contamination in raw and roasted peanut samples in different years

Year	Peanut	N° samples	Positive samples (%)	Samples >20µg/kg	Range (µg/kg)
2005-2006	Raw	276	91 (33)	40	1.7-2,483.9
	Roasted	28	20 (71)	20	26.7-595.05
2007-2008	Raw	319	98 (31)	71	0.22-926.81
	Roasted	94	6 (6)	2	5.5-176.74
2009-2010	Raw	500	183 (37)	49	0.12-572.03
	Roasted	41	0	0	nd
2011-2012-2013	Raw	422	173 (41)	57	1.26-624.69
	Roasted	47	4(9)	1	6.63-79
Total		1727	575 (33)	240	nd-2,483.9

n.d = non detectable

Figure 2. Upper and Lower bound of aflatoxin contamination in different years

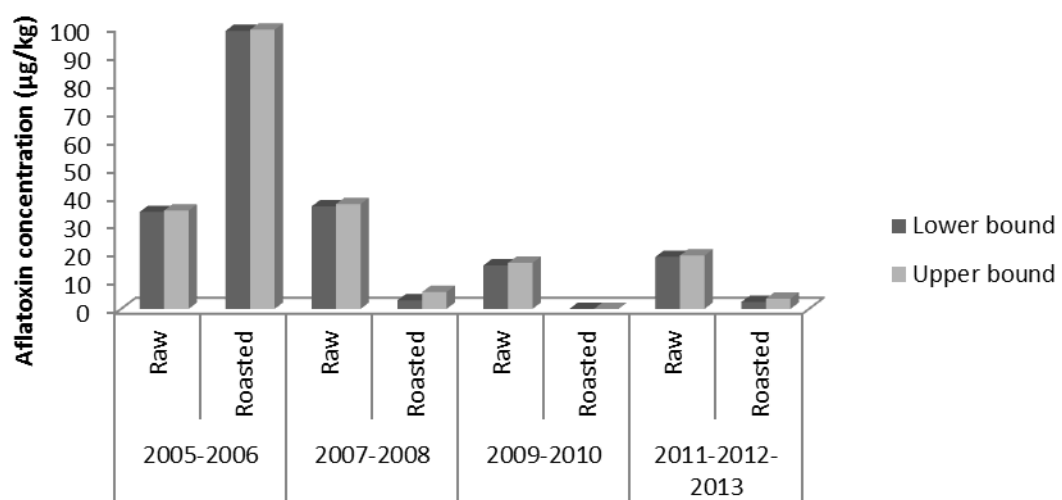


Table 2. Aflatoxin intake through peanut consumption, cancer risk and MOE determinate by a deterministic approach

	Male												Female											
	<1-19years-old						≥20 years-old						<1-19years-old						≥20 years-old					
	Raw Peanut			Roasted Peanut			Raw Peanut			Roasted Peanut			Raw Peanut			Roasted Peanut			Raw Peanut			Roasted Peanut		
	UB	MB	LB	UB	MB	LB	UB	MB	LB	UB	MB	LB	UB	MB	LB	UB	MB	LB	UB	MB	LB	UB	MB	LB
2005-2006																								
Intake	2.29	2.27	2.26	6.50	6.49	6.48	1.16	1.15	1.14	3.29	3.28	3.28	2.63	2.61	2.60	7.48	7.46	7.45	1.40	1.39	1.38	3.97	3.96	3.95
Cancer Risk	0.023	0.023	0.023	0.066	0.066	0.066	0.014	0.013	0.013	0.039	0.038	0.038	0.027	0.027	0.026	0.076	0.076	0.076	0.016	0.016	0.016	0.046	0.046	0.046
MOE	74.2	74.8	75.3	26.1	26.2	26.2	146.6	147.7	148.8	51.7	51.8	51.9	64.5	65.0	65.5	22.7	22.8	22.8	121.6	122.5	123.4	42.8	42.9	43.0
2007-2008																								
Intake	2.44	2.41	2.39	0.39	0.30	0.20	1.24	1.22	1.21	0.20	0.15	0.10	2.81	2.78	2.74	0.45	0.34	0.23	1.49	1.47	1.46	0.24	0.18	0.12
Cancer Risk	0.025	0.025	0.024	0.004	0.003	0.002	0.014	0.014	0.014	0.002	0.002	0.001	0.029	0.028	0.028	0.005	0.003	0.002	0.017	0.017	0.017	0.003	0.002	0.001
MOE	69.61	70.42	71.26	434.91	576.09	852.97	137.51	139.12	140.78	859.19	1138.08	1685.08	60.53	61.24	61.96	378.18	500.95	741.71	114.05	115.39	116.76	712.64	943.97	1397.66
2009-2010																								
Intake	1.07	1.04	1.01	0.14	0.07	-	0.54	0.53	0.51	0.07	0.04	-	1.23	1.20	1.16	0.17	0.08	-	0.65	0.64	0.62	0.09	0.04	-
Cancer Risk	0.011	0.011	0.010	0.001	0.001	-	0.006	0.006	0.006	0.001	0.000	-	0.013	0.012	0.012	0.002	0.001	-	0.008	0.007	0.007	0.001	0.000	-
MOE	158.79	163.27	168.01	1244.06	2488.12	-	313.70	322.55	331.91	2331.01	4662.01	-	138.08	141.97	146.09	1026.03	2052.06	-	260.19	267.53	275.30	1933.42	3866.84	-
2011-2012-2013																								
Intake	1.24	1.23	1.21	0.24	0.20	0.16	0.63	0.62	0.61	0.12	0.10	0.08	1.43	1.41	1.39	0.27	0.23	0.18	0.76	0.75	0.74	0.15	0.12	0.10
Cancer Risk	0.013	0.013	0.012	0.002	0.002	0.002	0.007	0.007	0.007	0.001	0.001	0.001	0.015	0.014	0.014	0.003	0.002	0.002	0.009	0.009	0.009	0.002	0.001	0.001
MOE	136.93	138.65	140.42	711.69	854.56	1069.19	270.51	273.91	277.40	1405.97	1688.21	2112.23	119.07	120.57	122.10	618.86	743.09	929.73	224.37	227.19	230.08	1166.16	1400.26	1751.96

UB: upper bound; MB: medium bound; LB: lower bound. Intake: ng/g bw day. Cancer risk: Cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals.

Table 3. Aflatoxin intake through peanut consumption, cancer risk and MOE determinate by a probabilistic approach for male from <1-19 years old.

	Mean (5th-95th percentile)							
	<1-19years-old							
	Raw Peanut				Roasted Peanut			
	UB	MB	LB	UD	UB	MB	LB	UD
2005-2006								
Intake	3.16 (0.12-11.31)	3.07 (0.11-10.91)	3.05 (0.09-11.21)	3.09 (0.10-10.99)	8.76 (0.15 -32)	8.57 (0.11-31.11)	8.75 (0.10-32.41)	8.44 (0.10-30.85)
Cancer Risk	0.032 (0.001-0.115)	0.031 (0.001-0.111)	0.031 (0.001-0.114)	0.031 (0.001-0.112)	0.089 (0.002-0.325)	0.087 (0.001-0.316)	0.089 (0.001-0.329)	0.086 (0.001-0.313)
MOE	53.8 (1361.6-15)	55.3 (1484.5-15.6)	55.7 (1927.6-15.2)	55.1 (1657.3-15.5)	19.4 (1100.9-5.3)	19.8 (1558.9-5.5)	19.4 (1741.2-5.2)	20.1 (1756.0-5-5)
2007-2008								
Intake	3.35 (0.11-11.54)	3.40 (0.10-12.29)	3.35 (0.10-12.14)	3.34 (0.10-11.98)	0.53 (0.07-1.73)	0.40 (0.04-1.35)	0.28 (0.01-0.99)	0.41 (0.04-1.34)
Cancer Risk	0.034 (0.001-0.117)	0.034 (0.001-0.125)	0.034 (0.001-0.123)	0.034 (0.001-0.122)	0.005 (0.001-0.018)	0.004 (0.000-0.014)	0.003 (0.000-0.010)	0.004 (0.000-0.014)
MOE	50.8 (1614.2-14.7)	50.0 (1718.7-13.8)	50.8 (1656.0-14.0)	50.9 (1710.2-14.2)	318.0 (2484.3-98.2)	422.7 (4234.0-125.5)	611.3 (23124.1-170)	415.3 (4286.7-126.6)
2009-2010								
Intake	1.46 (0.04-5.24)	1.46 (0.04-5.30)	1.39 (0.04-5.10)	1.43 (0.05-5.04)	0.20 (0.05-0.55)	0.10 (0.02-0.28)	-	0.10 (0.02-0.28)
Cancer Risk	0.015 (0.000-0.053)	0.015 (0.000-0.054)	0.014 (0.000-0.052)	0.015 (0.000-0.051)	0.002 (0.000-0.006)	0.001 (0.000-0.003)	-	0.001 (0.000-0.003)
MOE	116.3 (3921.7-32.5)	117.3 (3940.9-32.0)	122.6 (3862.9-33.4)	118.8 (3497.2-33.7)	864.0 (3740.7-309.3)	1724.4 (7491.4-614.8)	-	1709.7 (7618.1-609.5)
2011-2012-2013								
Intake	1.73 (0.07-6.19)	1.72 (0.06-6.22)	1.66 (0.05-5.83)	1.71 (0.06-6.07)	0.32 (0.06-0.98)	0.27 (0.03-0.88)	0.22 (0.00-0.79)	0.27 (0.03-0.88)
Cancer Risk	0.018 (0.001-0.063)	0.017 (0.001-0.063)	0.017 (0.000-0.059)	0.017 (0.001-0.062)	0.003 (0.001-0.010)	0.003 (0.000-0.009)	0.002 (0.000-0.008)	0.003 (0.000-0.009)
MOE	98.0 (2317.0-27.5)	98.9 (2829.7-27.3)	102.3 (3456.0-29.2)	99.6 (2657.9-28.0)	525.1 (3081.1-173.0)	622.4 (5018.4-193.8)	785.6 (40976.2-215.7)	631.4 (5126.5-192.9)

UB: upper bound; MB: medium bound; LB: lower bound, UD: Uniform distribution. Intake: ng/g bw day. Cancer risk: Cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals.

Table 4. Aflatoxin intake through peanut consumption, cancer risk and MOE determinate by a probabilistic approach for male from 20-> 65 years old.

	Mean (5th-95th percentile)							
	≥20 years-old							
	Raw Peanut				Roasted Peanut			
	UB	MB	LB	UD	UB	MB	LB	UD
2005-2006								
Intake	1.16 (0.06-3.57)	1.14 (0.06-3.64)	1.13 (0.05-3.56)	1.15 (0.05-3.67)	3.21 (0.08-10.14)	3.15 (0.06-10.05)	3.23 (0.05-10.40)	3.13 (0.05-10.01)
Cancer Risk	0.014 (0.001-0.042)	0.013 (0.001-0.043)	0.013 (0.001-0.042)	0.013 (0.001-0.043)	0.038 (0.001-0.119)	0.037 (0.001-0.118)	0.038 (0.001-0.122)	0.037 (0.001-0.117)
MOE	146.7 (2702.1-47.6)	149.1 (3055.0-46.7)	151.0 (3748.9-47.8)	148.4 (3241.8-46.4)	52.9 (2083.3-16.8)	53.9 (3047.9-16.9)	52.6 (3489.4-16.3)	54.2 (3238.1-84.3)
2007-2008								
Intake	1.22 (0.05-3.82)	1.22 (0.05-3.90)	1.22 (0.05-3.91)	1.21 (0.05-3.86)	0.19 (0.04-0.53)	0.15 (0.02-0.41)	0.10 (0.00-0.32)	0.15 (0.02-0.42)
Cancer Risk	0.014 (0.001-0.045)	0.014 (0.001-0.046)	0.014 (0.001-0.046)	0.014 (0.001-0.045)	0.002 (0.000-0.006)	0.002 (0.000-0.05)	0.001 (0.000-0.004)	0.002 (0.000-0.005)
MOE	139.7 (3176.7-44.5)	138.9 (3249.7-43.6)	139.8 (3342.0-43.5)	140.4 (3436.1-44.1)	874.9 (4100.2-321.9)	1148.1 (7178.1-411.1)	1684.1 (45916.3-534.5)	1139.3 (7313.7-404.9)
2009-2010								
Intake	0.54 (0.02-1.72)	0.52 (0.02-1.66)	0.51 (0.02-1.61)	0.53 (0.02-1.64)	0.07 (0.03-0.14)	0.04 (0.01-0.07)	-	0.04 (0.01-0.07)
Cancer Risk	0.006 (0.000-0.020)	0.006 (0.000-0.019)	0.006 (0.000-0.019)	0.006 (0.000-0.019)	0.0008 (0.0003-0.0017)	0.0004 (0.0002-0.0009)	-	0.0004 (0.0002-0.0009)
MOE	316.6 (7840.0-98.8)	324.6 (7684.7-102.6)	335.2 (7602.4-105.7)	322.4 (6904.9-103.9)	2358.7 (5995.9-1189.5)	4694.6 (12036.3-2341.1)	-	4682.1 (12089.9-2312.4)
2011-2012-2013								
Intake	0.63 (0.04-1.92)	0.62 (0.03-1.98)	0.61 (0.02-1.92)	0.63 (0.03-1.98)	0.12 (0.03-0.29)	0.10 (0.02-0.28)	0.08 (0.00-0.25)	0.10 (0.02-0.26)
Cancer Risk	0.07 (0.000-0.023)	0.007 (0.000-0.023)	0.007 (0.000-0.023)	0.007 (0.000-0.023)	0.001 (0.000-0.003)	0.001 (0.000-0.003)	0.001 (0.000-0.003)	0.001 (0.000-0.003)
MOE	272.0 (4443.4-88.4)	272.2 (5549.8-85.8)	279.6 (6810.1-88.6)	270.9 (5450.1-86.0)	1438.0 (4858.2-594.5)	1699.2 (8407.4-615.5)	2149.2 (83306.7-674.3)	1725.1 (8391.3-647.0)

UB: upper bound; MB: medium bound; LB: lower bound; UD: Uniform distribution. Intake: ng/g bw day. Cancer risk: Cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals.

Table 5. Aflatoxin intake through peanut consumption, cancer risk and MOE determinate by a probabilistic approach for female from <1-19 years old.

	Mean (5th-95th pecentile)							
	<1-19years-old							
	Raw Peanut				Roasted Peanut			
	UB	MB	LB	UD	UB	MB	LB	UD
2005-2006								
Intake	3.69 (0.14-12.99)	3.58 (0.13-12.56)	3.52 (0.10-12.54)	3.59 (0.12-12.77)	10.22 (0.18-36.80)	10.07 (0.13-36.44)	10.16 (0.10-37.69)	9.99 (0.11-36.09)
Cancer Risk	0.038 (0.001-0.132)	0.036 (0.001-0.128)	0.036 (0.001-0.127)	0.036 (0.001-0.130)	0.104 (0.002-0.374)	0.102 (0.001-0.370)	0.103 (0.001-0.383)	0.101 (0.001-0.367)
MOE	46.0 (1179.6-13.1)	47.5 (1281.0-13.5)	48.3 (1659.5-13.6)	47.4 (1409.7-13.3)	16.6 (949.9-4.6)	16.9 (1354.2-4.7)	16.7 (1624.3-4.5)	17.0 (1486.6-4.7)
2007-2008								
Intake	3.80 (0.12-13.71)	3.83 (0.12-13.56)	3.79 (0.12-13.94)	3.87 (0.11-14.39)	0.61 (0.08-1.98)	0.46 (0.05-1.55)	0.32 (0.01-1.12)	0.47 (0.05-1.60)
Cancer Risk	0.039 (0.001-0.139)	0.039 (0.001-0.138)	0.039 (0.001-0.142)	0.039 (0.001-0.146)	0.006 (0.001-0.020)	0.005 (0.000-0.016)	0.003 (0.000-0.011)	0.005 (0.000-0.016)
MOE	44.7 (1421.8-12.4)	44.4 (1477.9-12.5)	44.8 (1429.1-12.2)	43.9 (1489.8-11.8)	276.8 (2154.2-85.9)	366.4 (3591.4-109.7)	537.8 (21151.9-151.2)	361.5 (3658.0-106.5)
2009-2010								
Intake	1.65 (0.05-5.99)	1.63 (0.05-5.74)	1.57 (0.05-5.71)	1.64 (0.06-5.93)	0.23 (0.05-0.63)	0.11 (0.03-0.32)	-	0.11 (0.03-0.31)
Cancer Risk	0.017 (0.001-0.061)	0.017 (0.001-0.058)	0.016 (0.001-0.058)	0.017 (0.001-0.060)	0.002 (0.001-0.006)	0.001 (0.001-0.006)	-	0.001 (0.000-0.003)
MOE	103.0 (3383.9-28.4)	104.4 (3217.8-29.6)	108.6 (3224.3-29.8)	103.7 (3084.2-28.7)	754.9 (3261.8-271.4)	1494.2 (6293.7-537)	-	1487.2 (6489.4-549.2)
2011-2012-2013								
Intake	1.97 (0.09-7.02)	1.96 (0.07-6.86)	1.91 (0.06-7.01)	1.98 (0.07-7.08)	0.37 (0.07-1.09)	0.31 (0.04-1.01)	0.25 (0.00-0.89)	0.31 (0.04-1.01)
Cancer Risk	0.020 (0.001-0.071)	0.020 (0.001-0.070)	0.019 (0.001-0.071)	0.020 (0.001-0.072)	0.004 (0.001-0.011)	0.003 (0.000-0.010)	0.003 (0.000-0.009)	0.003 (0.000-0.010)
MOE	86.2 (1903.6-24.2)	86.8 (2457.9-24.8)	89.1 (2893.9-24.3)	85.9 (2372.2-24.0)	460.1 (2568.0-155.6)	543.8 (4363.2-167.8)	686.4 (35335.1-191.9)	549.4 (4268.6-168.3)

UB: upper bound; MB: medium bound; LB: lower bound; UD: Uniform distribution. Intake: ng/g bw day. Cancer risk: Cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals.

Table 6. Aflatoxin intake through peanut consumption, cancer risk and MOE determinate by a probabilistic approach for female from 20-> 65 years old

	Mean (5th-95th percentile)							
	≥20 years-old							
	Raw Peanut				Roasted Peanut			
	UB	MB	LB	UD	UB	MB	LB	UD
2005-2006								
Intake	1.39 (0.07-4.25)	1.37 (0.07-4.38)	1.35 (0.05-4.27)	1.38 (0.06-4.44)	3.86 (0.10-12.33)	3.79 (0.07-12.07)	3.89 (0.06-12.52)	3.77 (0.06-12.11)
Cancer Risk	0.016 (0.001-0.050)	0.016 (0.001-0.051)	0.016 (0.001-0.050)	0.016 (0.001-0.052)	0.045 (0.001-0.145)	0.045 (0.001-0.142)	0.046 (0.001-0.147)	0.044 (0.001-0.142)
MOE	122.0 (2283.6-40.0)	123.9 (2537.3-38.8)	125.5 (3122.7-39.8)	123.3 (2730.8-38.3)	44.0 (1734.2-13.8)	44.8 (2525.8-14.1)	43.7 (2880.5-13.6)	45.1 (2724.6-14.0)
2007-2008								
Intake	1.46 (0.06-4.57)	1.47 (0.06-4.69)	1.46 (0.06-4.69)	1.46 (0.06-4.64)	0.23 (0.05-0.64)	0.18 (0.03-0.50)	0.12 (0.00-0.38)	0.18 (0.03-0.51)
Cancer Risk	0.017 (0.001-0.054)	0.017 (0.001-0.055)	0.017 (0.001-0.055)	0.017 (0.001-0.055)	0.003 (0.001-0.007)	0.002 (0.000-0.006)	0.001 (0.000-0.005)	0.002 (0.000-0.006)
MOE	116.2 (2644.7-37.2)	115.5 (2714.8-36.2)	116.2 (2777.8-36.2)	116.8 (2884.2-36.6)	727.8 (3412.0-267.3)	955.6 (5983.3-340.5)	1400.5 (37775.8-442.6)	948.0 (6098.7-336.6)
2009-2010								
Intake	0.65 (0.03-2.09)	0.63 (0.03-1.98)	0.61 (0.03-1.93)	0.63 (0.03-1.96)	0.09 (0.03-0.17)	0.04 (0.02-0.09)	-	0.04 (0.02-0.09)
Cancer Risk	0.008 (0.000-0.0025)	0.007 (0.000-0.023)	0.007 (0.000-0.023)	0.007 (0.000-0.023)	0.001 (0.000-0.002)	0.001 (0.000-0.001)	-	0.001 (0.000-0.001)
MOE	263.1 (6511.0-81.4)	270.0 (6353.4-85.8)	278.7 (6395.8-88.1)	267.9 (5779.6-86.9)	1962.2 (4964.7-994.1)	3905.3 (9994.4-1945.1)	-	3894.9 (10132.3-1944.9)
2011-2012-2013								
Intake	0.75 (0.05-2.29)	0.75 (0.04-2.39)	0.73 (0.03-2.33)	0.76 (0.04-2.39)	0.14 (0.04-0.34)	0.12 (0.02-0.33)	0.10 (0.00-0.31)	0.12 (0.02-0.32)
Cancer Risk	0.009 (0.001-0.027)	0.009 (0.000-0.028)	0.009 (0.000-0.027)	0.009 (0.000-0.028)	0.002 (0.000-0.004)	0.001 (0.000-0.004)	0.001 (0.000-0.004)	0.001 (0.000-0.004)
MOE	226.2 (3716.3-74.1)	226.2 (4659.4-71.0)	232.4 (5773.4-73.1)	225.1 (4506.4-71.3)	1194.8 (4032.9-493.8)	1412.8 (7090.6-514.2)	1786.2 (69519.0-551.3)	1433.8 (6990.3-537.3)

UB: upper bound; MB: medium bound; LB: lower bound; UD: Uniform distribution. Intake: ng/g bw day. Cancer risk: Cancer year⁻¹ per 10⁵ individuals.

3. DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho analisou a micobiota e a presença de aflatoxinas em amendoim nas diferentes etapas da cadeia de produção, estudou a cinética de degradação durante a etapa de torração e por fim, desenvolveu uma avaliação de exposição às aflatoxinas através do consumo de amendoim.

A análise da micobiota do amendoim mostrou uma grande variedade de fungos isolados, inclusive potencialmente produtores de aflatoxinas durante toda a cadeia produtiva. Dentre os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, foram isolados: *A. arachidicola*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. caelatus* e *A. tamarii*. As aflatoxinas tiveram uma baixa ocorrência nas amostras analisadas (apenas 12 de 119 amostras de amendoim) em concentrações que variaram de não detectáveis a 100,91 µg/kg. As amostras que apresentaram níveis acima do permitido pela legislação brasileira (20 µg/kg) pertenciam as etapas de secagem (95,46 e 49,26 µg/kg) e seleção (100,91 e 24,46 µg/kg). As amostras de secagem ainda passariam pela seleção, portanto, existe a possibilidade dela ser eliminada. A amostra da etapa de seleção que apresentou a maior contaminação (100,91 µg/kg) foi coletada na parte dos grãos de tamanho inferior ao da peneira 16/64 avos de polegada. Estes são encaminhados para produção de óleo e durante o refinamento do óleo, a maior parte das aflatoxinas é removida. Já a amostra com 24,46 µg/kg ainda poderia passar pelo processo de torração e ter sua concentração diminuída.

O estudo da cinética de degradação das aflatoxinas mostrou que a concentração inicial da toxina no alimento interfere na cinética de destruição. Amostras mais contaminadas necessitam de menos tempo para a primeira redução decimal que amostras com contaminação menor. Além disso, pode-se observar a influência da temperatura na degradação, uma vez que as amostras expostas a 200°C obtiveram 89,7% de redução, a 180°C 86,3% e a 160°C 61,6%. A cor do amendoim em cada tempo e temperatura estudado permitiu observar a redução da aflatoxina na obtenção de uma amostra torrada similar ao padrão utilizado. Apenas a torração a 160°C por 5 minutos apresentou o parâmetro L* da cor similar ao padrão utilizado na análise. Contudo, levando em consideração os trabalhos que fizeram análise sensorial e determinaram que o parâmetro L* da análise de cor deve ser de 58 a 59, uma redução maior pode ser observada: 54,9% de redução a 160° por 20 minutos e 45,1% a 200°C por 5 minutos.

A curva obtida no trabalho que avaliou a porcentagem de redução em função da concentração inicial permite prever a redução da concentração das amostras que apresentaram contaminação por aflatoxinas nas etapas da cadeia de produção do amendoim. Das amostras que apresentaram contaminação, os valores observados foram: 95,46, 49,26 e 0,43 µg/kg em amostras na etapa de secagem, 6,34 na amostra de blanchamento, 0,82, 100,91, 0,3 e 24,46 µg/kg durante a seleção e 14,07, 0,82, 4,21 e 1,62 nas amostras prontas para consumo. Como o

menor ponto da curva era a concentração de 35µg/kg, a previsão da porcentagem de redução após 20 minutos de torração a 180°C só pode ser calculada para as concentrações de 49,26, 95,46 e 100,91 µg/kg e apresentaram 53,31%, 56,08% e 56,36% de redução respectivamente. Nestes casos, apesar da redução, a concentração final ainda estaria acima do limite permitido pela legislação.

A avaliação da exposição à aflatoxinas pelo consumo de amendoim foi avaliada com modelos determinísticos e probabilísticos. A análise determinística do consumo, risco de câncer e margem de exposição (MOE) mostrou que a população brasileira está exposta a essa toxina pelo consumo de amendoim e uma análise probabilística, mais detalhada e realista se fez necessário. Essa análise permitiu observar que a população mais exposta é a feminina na faixa etária de <1 a 19 anos, devido ao peso corpóreo ser menor, uma vez que não há dados de consumo por faixa e os grupos foram diferenciados apenas pelo peso corpóreo.

4. CONCLUSÃO GERAL

A cadeia produtiva do amendoim pode estar contaminada com *Aspergillus section Flavi* potencialmente produtores de aflatoxinas, mostrando a importância do conhecimento da microbiota, uma vez que qualquer falha no controle de temperatura e umidade pode resultar na produção de toxina. A ocorrência de aflatoxinas nas amostras foi baixa, e apesar de algumas apresentarem valores elevados, não atingiriam diretamente o consumidor. O processo de torração do amendoim reduziu a concentração da aflatoxina, contudo, a redução nas condições ideais de cor, comparada com uma amostra padrão foi baixa. A exposição de aflatoxinas pelo consumo de amendoim ainda é um fator de risco para a população, contudo, os últimos dados de contaminação apresentaram uma redução, mostrando uma tendência à exposição cada vez menor.

5. REFERENCIAS

Abdel-Hadi, A., Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., Magan, N. 2012. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. Journal of the Royal Society 9: 757-767.

Associação Brasileira da Indústria de chocolates, cacao, amendoim, balas e derivados (ABICAB). Programa Pró-Amendoim. Disponível em: <http://www.abicab.org.br/amendoim/pro-amendoim/selo-de-qualidade>. Acesso: 10 de julho 2015

Adelsberg, G.D., Sanders, T.H. 1997. Effect of peanut blanching protocols on bed and seed temperatures, seed moisture, and blanchability. Peanut Science, 24: 46-46.

Andrade, P.D., Homem de Melo, M., França, J.A., Caldas, E.D. 2013. Aflatoxins in food products consumed in Brazil: a preliminar dietary risk assessment. Food Additives & Contaminants: part A, 30:127-136

Arcella, D., Leclercq, C. 2004. Modelling exposure to mycotoxins. In: Magan, N., Olsen, M. (Eds). Mycotoxins in food, detection and control. CRC press.

Atayde, D. D., Reis, T. A., Godoy, I. J., Zorzete, P., Reis, G. M. Corrêa, B. 2012. Mycobiota and aflatoxins in peanut variety grown in diferente regions in the state of São Paulo, Brazil. Crop Protection, 33: 7-12

Basaran, P., Ozcan, M. 2009. Occurrence of aflatoxins in various nuts commercialized in Turkey. Journal of Food Safety, 29: 95-105.

Beltrão, N. E. M., Santos, R. C., Gondim, T. M. S., Nogueira, R. J. M. C., Filho, P. A. M. 2009. Ecofisiologia e manejo cultural. In: dos Santos, R. C., Freire, R. M. M., Suassuna, T. M. F. (Eds). Amendoim : o produtor pergunta, a Embrapa responde/ Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica.

Bennett, J. W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. Clinical Microbiology reviews, 16: 497-516.

Bosetti , C., Turati, F., Vecchia, C. L. 2014. Hepatocellular carcinoma epidemiology. Best practice& Research clinical gastroenterology, 28: 753-770

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Produção Integrada no Brasil: agropecuária sustentável, alimentos seguros. 2008. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Produ%C3%A7%C3%A3o%20Integrada/PI_Brasil.pdf>. Acesso em: 21 de outubro de 2014

Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 de 28 de Janeiro de 2009. Critérios e procedimentos para o controle higiênico-sanitário do amendoim e seus subprodutos na cadeia produtiva.

Brasil.ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N°7 de 18 de fevereiro de 2011. *Diário Oficial da União*. n. 37, seção 1, 22 de fevereiro de 2011.

Câmara, G. M. S. 2014. Introdução ao agronegócio amendoim. Disponível em: <http://www.lpv.esalq.usp.br/lpv506/LPV%20506%20A01%20-%20Amendoim%20Apostila%20Agronegocio.pdf>. Acesso em: 15 de julho de 2015

Cano-Sancho, G., Sanchis, V., Marín, S., Ramos, A.J. 2013. Occurrence and exposure assessment of aflatoxins in Catalonia (Spain). *Food and Chemical Toxicology*, 51: 188-193

Chen, R., Ma, F., Li., P.W., Zhang, W., Ding, X. X., Zhang, Q., Li, M., Wang, Y.R., Xu, B.C. 2014. Effect of ozone on aflatoxins detoxification and nutritional quality of peanuts. *Food Chemistry*, 146: 284-288.

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 19 de outubro de 2014.

Cole, R. J. 1986. Etiology of turkey “X” disease in retrospect: A case for the involvement of cyclopiazonic acid. *Mycotoxin Research*, 2: 3-7

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). 2013. Proposta de preços mínimos. Safra 2013/2014. Produtos da safra de verão. Vol. II. Texto completo. Superintendência de gestão da oferta – SUGOF.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). 2015 Séries Históricas. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&>. Acesso em: 20 de julho de 2015

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). 2015. Acompanhamento da Safra Brasileira Grãos. Vol.2. Safra 2014/2015. Nono Levantamento, Brasília, p. 1-104

Conagin, C. H.T.M. 1955. Morfologia da flor e formação do fruto no amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L). *Bragrantia: Boletim técnico do instituto agrônomo de São Paulo*, vol. 14, n° 24, pp 259-266

Department of Employment, Economic Development and Innovation (DEEDI). 2015. DEEDI aflatoxin monitoring program on the web. Disponível em <https://www.apsim.info/afloman/background.htm>. Acesso, 20 junho 2015.

Dickens, J.W., Whitaker, T.B. 1975. Efficacy of Electronic Color Sorting and Hand Picking to Remove Aflatoxin Contaminated Kernels from Commercial Lots of Shelled Peanuts. *Peanut Science*, 2: 45-50

Ding, X., Li, P., Bai, Y., Zhou, H. 2012. Aflatoxin B₁ in post-harvest peanuts and dietary risk in China. *Food Control*, 23: 143-148

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

Eaton, D. L., Gallagher, E. P. 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34: 135-172

Eaton, D. L., Groopman, J. D. 1994. *The toxicology of Aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance*. Academic Press.

Environmental Protection Agency (EPA). 1995. Peanut processing. Disponível em: <http://www.epa.gov/ttnchie1/ap42/ch09/final/c9s10-2b.pdf>. Acesso em: 28 de junho de 2015

European Commission. Commission regulation No 165/2010 of 16 February 2010. Amending regulation (EC) N. 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union*, 2010

European Food Safety Authority (EFSA). 2005. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a harmonized approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic [Internet]. EFSA J. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/282.pdf>/ Accessed> 20 July, 2015

European Food Safety Authority (EFSA). 2007. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products [Internet]. EFSA J. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/446.pdf>/ Accessed> 20 July, 2015

Fageria, N. K., Baligar, V. C., Jones, C. A. *Growth and Mineral Nutrition of Field Crops*. 3rd ed. CRC Press. 2010

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2010. Groundnut agronomic and post harvest practices. Disponível em: <[http://teca.fao.org/sites/default/files/technology_files/Groundnut%20Agronomic%20and%20Post%20harvest%20practices%20\(Autosaved\).pdf](http://teca.fao.org/sites/default/files/technology_files/Groundnut%20Agronomic%20and%20Post%20harvest%20practices%20(Autosaved).pdf)>. Acesso em: 18 de Abril de 2015.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2001. Food balance sheets – A handbook. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/x9892e/x9892e00.pdf>. Acesso: 15 de junho de 2015.

Freire, R. M. M., dos Santos, R. C., Silva, A. C., Lima, L. M. 2009. Propriedades nutricionais e processamento. In: dos Santos, R. C., Freire, R. M. M., Suassuna, T. M. F. (Eds). *Amendoim : o produtor pergunta, a Embrapa responde/ Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica*.

- Freitas, V. P.S. & Brigido, B. M., 1998. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in peanuts and their products marketed in the region of Campinas, Brazil in 1995 and 1996. *Food Additives and Contaminants*, 15, 807-811
- Frisvad, J. C., Thrane, U., Samson, R.A. 2007. Mycotoxin producers. In: *Food mycology – a multifaceted approach to fungi and food*. New York (NY): CRC Press.
- Frisvad, J. C., Skouboe, P., Samson, R. A. 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 442–453
- Frisvad, J. C., Thrane, U., Samson, R. A., Pitt, J. I. Important Mycotoxins and the fungi which produce them. In: *ADVANCES in food mycology*. New York: Springer, 2006. Cap. 1. p. 3-31
- Galvez, F.C.F., Francisco, M.L.D.L., Villarino, B.J., Lustr, A.O., Resurreccion, A.V.A. 2003. Manual sorting to eliminate aflatoxin from peanuts. *Journal of Food Protection*, 66: 1879-1884
- Godoy, I. J., Morae, S. A., Martins, A. L. M., Pereira, J. C. V. N. A., Veiga, R. F. A. 1990. Avaliação do potencial agrônomo de introduções de amendoim com vistas ao melhoramento genético. *Bragantia*, Campinas, 49: 127-140.
- Godoy, I. J., Moraes, S. A., Kasai, F. S., Martins, A. L. M., Pereira, J. C. V. N. A., Moraes, A. R. A., Teixeira, J. P. F. 2003. Cultivares IAC de amendoim. *O agrônomo*, Campinas, 55 (1).
- González, E.; Nogueira, J. H. C.; Fonseca, H.; Felicio, J. D., Pino, F.A.; Corrêa, B., 2008. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanuts kernels from sowing to harvest. *International Journal of Food Microbiology*. 123, 184-190.
- Gonçalves, S. S., Stchigel, A. M., Cano, J. P., Godoy-Martinez, P. C., Colombo, A. L., Guarro, J. 2012. *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section Flavi. *Medical Mycology*, 50: 152–160
- Gonçalves, E., Nogueira, J. H. C., Fonseca, H., Felicio, J. D., Pino, F. A., Corrêa, B. 2008. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanut kernels from sowing to harvest. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 184-190.
- Guengerich, F. P., Johnson, W., Shimada, T., Ueng, Y.F., Yamazaki, H., Langoët, S. 1998. Activation and detoxication of aflatoxin B₁. *Mutation Research*, 402: 121-128
- Hoeltz, M., Einloft, T. C., Oldoni, V. P., Dottori, H. A., Noll, I. B. 2012. The occurrence of aflatoxin B₁ contamination in peanuts and peanuts products marketed in southern Brazil. *Brazilian archives of biology and technology*, 55: 313-317.

Horn, B.W. 2005. Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycologia*, 97:202-217

Horn, B.W., 2003. Ecology and Population Biology of Aflatoxigenic Fungi in Soil. *Journal of Toxicology*. 22, 351-379.

Horn, B.W., Dorner, J.W. 1998. Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut-growing regions of the United States. *Mycologia*, 90: 767-776.

Iamanaka, B. T., Oliveira, I. S., Taniwaki, M. H. 2010. Micotoxinas em alimentos. *Anais da Academia de Ciência Agronômica*, 7: 138-161.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (2002). Aflatoxins in peanuts. In *Microorganisms in foods. 7. Microbiological testing in food safety management* (pp. 263e271). New York: Kluwer Academic/ Plenum Press.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). Guia Simplificado para a compreensão e uso de Objetivos de Inocuidade de Alimentos (FSO) e Objetivos de Desempenho (PO). 2006. Disponível em: <<http://www.icmsf.org/pdf/FSO%20Objectives/GuiaSimplificadoPO.pdf>>. Acesso: 20 de outubro de 2014

Instituto Agronômico de Campinas (IAC). 2015. Centro de Grãos e Fibras. Cultivares – Amendoim. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/graos/amendoim.php>. Acesso: 20 de setembro de 2015.

Inan, F., Pala, M., Doymaz, I. 2007. Use of ozone in detoxification of aflatoxin B₁ in red pepper. *Journal of Stored Products Research*, 43: 425–429

International Agency for Research on Cancer (IARC). 2002. WHO IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins naphthalene and styrene. *Aflatoxins*. 82, 1-556.

Ito, Y., Peterson, S. W., Wicklow, D. T., Goto, T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research*, 105: 233-239

Jager, A.V., Tedesco, M.P., Souto, P.C.M.C., Oliveira, C.A.F. 2013. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 33: 87-92.

Jardim, A. N. O., Caldas, E. D. 2009. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. *Química Nova*, 32: 1898-1909.

Juan, C., Zinedine, A., Moltó, J.C., Idrissi, L., Mañes, J. 2008. Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Salé area, Morocco. *Food Control*, 19: 849-853

Kamika, I., Mngqawa, P., Rheeder, J.P., Teffo, S.L., Katerere, D.R. 2014. Mycological and aflatoxin contamination of peanuts sold at markets in Kinshasa, Democratic Republic of Congo, and Pretoria, South Africa. *Food additives & Contaminants: part B*, 7: 120-126.

- Kaplan, S., Garrick, B.J. 1981. On the quantitative Definition of Risk. *Risk Analysis*, 1: 11-27
- Kelly, J.D., Eaton, D.L., Guengerich, F.P., Coulombe, R.A. 1997. Aflatoxin B₁ activation in human lung. *Toxicology and applied pharmacology*, 144: 88-95.
- Klich, M.A. 2007. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular plant pathology*, 8: 713-722.
- Knaft, D. A., Wynne, J. C. 1995. Peanut breeding and genetics. *Advances in agronomy*, 55: 393-445.
- Konica Minolta. 2015. Entendendo o espaço de cor L*a*b*. Disponível em: <http://sensing.konicaminolta.com.br/2013/11/entendendo-o-espaco-de-cor-lab/>. Acesso em: 28 de julho de 2015.
- Krishna, K. R. *Agroecosystems: Soils, Climate, Crops, Nutrient Dynamics and Productivity*. CRC Press. 2013.
- Krishnamachari, K. A., Bhat, R. V., Nagarajan, V., Tilak, T.B.G. 1975. Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in Western India. *Lancet*, 1(7915): 1061-1063.
- Lamb, M. C., Sternitzke, D. A. 2001. Cost of Aflatoxin to the Farmer, Buying Point, and Sheller Segments of the Southeast United States Peanut Industry. *Peanut Science*, 28: 59-63.
- Lee, L. S., Cucullu, A. O., Franz, Jr., Pons, W.A. 1969. Destruction of aflatoxins in peanuts during dry and oil roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17: 451-453
- Leong, Y.H., Ismail, N., Latif, A.A., Ahmad, R. 2010. Aflatoxin occurrence in nuts and commercial nutty products in Malaysia. *Food Control*, 21: 334-338
- Magrine, I.C.O., Ferrari, S.S.C., Souza, G.F., Minamihara, L., Kemmelmier, C. Bando, E., Machinski Jr, M. 2011. Intake of aflatoxins through the consumption of peanut products in Brazil. *Food additives & Contaminants: part B*, 4: 99-105.
- Mallmann, C. A., Kowalski, C. H., Almeida, C. A., Mürmann, L., Silveira, V.G. 2003. Prevalência de aflatoxinas em amendoim e seus derivados, destinados ao consumo humano, no estado do Rio Grande do Sul. *Anais 2º Simpósio em Ciência de Alimentos*.
- Mann, G.E., Codifer, L.P., Dollear, F.G. 1967. Effect of Heat on aflatoxins in oilseed meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15: 1090-1092.
- Marques, 2011. Amendoim ganha destaque no norte paulista. Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI222692-18283,00-AMENDOIM+GANHA+DESTAQUE+NO+NORTE+PAULISTA.html>. Acesso: 13 de junho de 2015.
- Martins, R. 2011. Amendoim: produção, exportação e a safra de 2011/2012. *Análise e indicadores do Agronegócio*, vol. 6. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=12242>. Acesso: 10 de outubro de 2014.

- Massi, F. P.; Vieira, M.L.C.; Sartori, D.; Penha, R.E.S.; Munhoz, C.F.; Ferreira, J.M.; Iamanaka, B.T.; Taniwaki, M. H.; Frisvad, J.C. & Fungaro, M.H.P. 2014. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. International Journal of Food Microbiology, 186: 14-21.
- Matumba, L., Monjerezi, M., Biswick, T., Mwatseteza, J., Makumba, W., Kamangira, D., Mtukuso, A. 2014. A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of locally and imported processes foods on Malawian retail market. Food control, 39: 87-91
- Micheli PA (1729). Nova plantarvm genera ivxta Tovrnefortii methodvm disposita. Florence.
- Moss, M. 2002. Risk assessmten for aflatoxins in foodstuffs. International Biodeterioration & Biodegradation, 50: 137-142
- Mushtaq, M., Sultana, B., Anwar, F., Khan, M.Z., Ashrafuzzaman, M. 2012. Occurrence of aflatoxins in selected processed foods from Pakistan. International Journal of Molecular Sciences, 13:8324-8337
- Nakai, V. K., Rocha, L. O., Gonçalves, E., Fonseca, H., Ortega, E. M. M., Corrêa, B., 2008. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. Food chemistry. 106, 285-290
- Njapau, H., Muzungaile, E. M., Changa, R. C. 1998. The effect of Village procesing techniques on the contente of aflatoxins in corn and peanuts in Zambia. Journal of the Science of Food and Agriculture, 76: 450-456.
- Nogueira, R. J. M. C., Távora, F. J. A. F. Ecofisiologia do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In: O agronegócio do Amendoim. 2ª ed. Embrapa, 2013. Cap. 3
- Oliveira, C. A. F, Goncalves, N.B., Rosim, R.E., Fernandes, A. M. 2009. Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. International Journal of Molecular Science.10:174–183.
- Oliveira, L.S.F., Koller, F.F.C. 2011. Occurrence of *Aspergillus* and aflatoxin in samples of peanuts in natura and peanut sweet. Revista de Ciências Ambientais. 5:57–68.
- Ostadrahimi, A., Ashrafnejad, F., Kazemi, A., Sargheini, N., Mahdavi, R., Farshchian, M., Mahluji, S. 2014. Aflatoxin in raw and salt-roasted nuts (Pistachios, Peanuts and Walnuts) sold in markets of Tabriz, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology, 7:e8674
- Pattee, H. E., Giesbrecht, F. G., Young. C. T. 1991. Comparison of peanut butter color determination by CIELAB L*a*b* and Hunter Color-Difference methods and the relationship of roasted peanut color to roasted peanut flavor response. Journal of agricultural and food chemistry,39: 519-523.
- Pelletiel, M.J., Reizner, J.R. 1992. Comparison of fluorescence sorting and color sorting for the removal of aflatoxin from large groups of peanuts. Peanut Science, 19: 15-20
- Peterson, S. W., Ito, Y., Horn, B. W., Goto, T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. Mycologia, 93: 689-703.
- Pildain, M., Frisvad, J. C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., Samson, R. A., 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. International Journal of Systematic and Evolutionay Microbiology. 58,725-735.

Pitt, J.I., Hocking, A. D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B. F., Wheeler, K. A., Tanboon-Ek., P. 1993. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. *International Journal of Food Microbiology*, 20: 211-226.

Pitt, J.I., Hocking, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. 3nd ed. New York. Springer. 2009.

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: 205-215

Pro-amendoim. 2015. Safras/ Estatísticas. Produção mundial e Brasil. Disponível em: http://www.proamendoim.com.br/safras_estatisticas_producao_mundial.php. Acesso em: 14 maio de 2015.

Rank, C., Nielsen, K. F., Larsen, T. O., Varga, J., Samson, R. A., Frisvad, J. C. 2011. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology*, 115: 406 -420

Redação 2015. Para colher amendoim. Disponível em: <http://www.portalmaquinasagricolas.com.br/para-colher-amendoim/>; Acesso: 25 de junho de 2015.

Rocha, M.D., Maia, P.P., Rodrigues, M.A., Martins, I. 2008. Incidence of aflatoxins in samples of peanuts and pacoca marketed in the city of Alfenas-MG, Brazil. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 21:15–19.

Roda, 2011. Colorimetria e o sistema CIE L*a*b*. Disponível em: <http://www.tudosobreplasticos.com/cores/colorimetria.asp>. Acesso: 13 de junho de 2015.

Samarajeewa, U., Sen, A. C., Cohen, M. D., Wei, C. I., (1990). Detoxification of aflatoxin in foods and feeds by physical and chemical methods. *Journal of Food Protection*, 53, 489-501.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. 2004. *Introduction to food- and airborne fungi*. ASM Press, 7th edition.

Sanchis, V., Magan, N. 2004. Environmental profiles for growth and mycotoxin production. In: *Mycotoxins in food: detection and control*, Woodhead Publishing Ltd.

Sanders, T.H., Adelsberg, G.D., Hendrix, K.W., McMichael, R.W. 1999. Effect of blanching on peanut shelf-life. *Peanut Science*, 26: 8-13.

Santos, R. C., Nogueira, R. J. M. C., Carvalho, J. M. F. C. 2009. Melhoramento e cultivares nacionais. In: dos Santos, R. C., Freire, R. M. M., Suassuna, T. M. F. (Eds). *Amendoim : o produtor pergunta, a Embrapa responde/ Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica*.

Schirack, A.V., Sanders, T.H., Sandeep, K.P. 2007. Effect of processing parameters on the temperature and moisture content of microwave-blanching peanuts. *Journal of Food Process Engineering*, 30: 225-240.

Scott, P. M., (1984). Effects of food processing on mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 47, 489-499.

Shephard, G.S. 2008. Risk assessment of aflatoxins in food in Africa. *Food Additives & Contaminants*, 25: 1246-1256

Silva, R. A., Yamamoto, I. T., Ferreira, L. O., Marques, L. R. M. 2013. Detecção e quantificação de aflatoxinas em amostras de grãos de amendoim e derivados comercializados na região de Marília-SP. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 24: 61-64.

Smyth, D. A., Macku, C., Holloway, O.E., Deming, D. M., Slade, L., Levine, H. 1998. Evaluation of analytical methods for optimizing peanut roasting for snack foods. *Peanut Science*, 25: 70-76.

Soares, C., Rodrigues, P., Peterson, S. W., Lima, N., Venâncio, A. 2012. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. *Mycologia*, 104(3): 682-697

Sofiatti, V., Queiroga, V. P. 2009. Colheita e Pós-Colheita. In: dos Santos, R. C., Freire, R. M. M., Suassuna, T. M. F. (Eds). *Amendoim : o produtor pergunta, a Embrapa responde/ Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica*.

Sugita-Konishi Y, Sato T, Saito S, Nakajima M, Tabata S, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y, Kai S, Sujiyama K, et al. 2010. Exposure to aflatoxins in Japan: risk assessment for aflatoxin B1. *Food Addit Contam.* 27:365-372.

Sultan, Y., Magan, N. 2010. Mycotoxigenic fungi in peanuts from different geographic regions of Egypt. *Mycotoxin Research*, 26: 133-140.

Tansakul, N., Limsuwan, S., Böhm, J., Hollmann, M., Razzazi-Fazeli, E. 2013. Aflatoxins in selected Thai commodities. *Food Additives & Contaminants: part B*, 6: 254-259

United States Department of Agriculture (USDA). Foreign Agricultural Service. Production, Supply and Distribution online. Available in: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>. Assess: June, 2015

Van Boekel, M. A. J. S. 2006. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances*, 24: 230 – 233

Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in mycology*, 69: 57-80.

Whitaker, T. B. 2003. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. *Food control*, 14: 233-237.

Whitaker, T. B., Wiser, E. H. 1969. Theoretical investigations into the accuracy of sampling shelled peanuts for aflatoxin. *Journal of American oil Chemists' Society*, 46: 377-379.

Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr.* 80:1106-1122.

Wogan, G. N. 1992. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer research*, 52: 2114-2118

World Health Organization (WHO). 1999. WHO Technical Report Series. Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-ninth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva (Switzerland): WHO. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_884.pdf/. Acesso em: 12 junho de 2015

World Health Organization (WHO). 2005. Consultations and workshops: Dietary exposure assessment of chemicals in food. Report of a Joint FAO/WHO consultation. Annapolis, Maryland, USA, 2-6 May 2005.

Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V., Kuca, K. 2009. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews*, 41: 1-7

Youssef, M.S., El-Maghraby, O.M.O., Ibrahim, Y. M. 2008. Mycobiota and mycotoxins of Egyptian peanut (*Arachis hypogaeae* L.) seeds. *International Journal of Botany*, 4: 349-360

Zorzete, P., Baquião, A.C., Atayde, D.D., Reis, T.A., Gonçalves, E., Corrêa, B. 2013. Mycobiota, aflatoxins and cyclopiazonic acid in stored peanut cultivars. *Food Research International*, 52: 380-386

Zorzete, P., Reis, T. A., Felício, J. D., Baquião, A. C., Makimoto. P. 2011. Fungi, mycotoxins and phytoalexin in peanuts varieties, during plant growth in the field. *Food Chemistry*, 129: 957-964.