

Comunicado Técnico 180

ISSN 0103-5231
Dezembro, 2011
Rio de Janeiro, RJ

Foto: Renata G. Borguini



Comparação entre colunas cromatográficas de diferentes tamanhos e tipos de partícula na análise de aflatoxinas em amendoim

Renata Galhardo Borguini¹
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy²
Sidney Pacheco³

Introdução

O amendoim é um grão importante para a alimentação humana, tanto no consumo *in natura*, quanto em alimentos processados. No entanto, é um dos cultivos predispostos à contaminação por aflatoxinas, que pode ocorrer no campo e também durante o transporte e armazenamento do produto (SUASSUNA, 2006). As aflatoxinas são metabólitos secundários de fungos, que provocam grandes perdas econômicas na cadeia produtiva agrícola, representando, atualmente, risco potencial para o agronegócio brasileiro e para a saúde humana e animal. Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas recebem maior atenção, devido à sua característica marcadamente hepatocarcinogênica e altamente toxigênica, quando comparada a outros contaminantes (SCUSSEL, 1998). Diversos estudos da *International Agency for Research on Cancer* confirmaram a carcinogenicidade das aflatoxinas em estudos realizados com animais (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2002).

A demanda por análise de micotoxinas em alimentos é crescente, uma vez que a maioria dos países estabeleceu limites legais com o objetivo de restringir a ingestão dessas toxinas. Entretanto, o monitoramento de micotoxinas nos produtos

agropecuários depende da disponibilidade de métodos analíticos sensíveis, eficientes e rápidos. A detecção de baixos níveis de micotoxinas em produtos agrícolas torna-se cada vez mais importante.

Vários métodos têm sido publicados com relação à quantificação das micotoxinas por Cromatografia Líquida. Estes variam, principalmente, quanto aos tipos de solventes utilizados para extração e como fase móvel, colunas para a separação cromatográfica e limpeza da amostra e detectores, dependendo do tipo de amostra e toxina a ser analisada (SCUSSEL, 1998). O objetivo deste trabalho foi comparar duas colunas cromatográficas de diferentes tamanhos de partícula de fase estacionária na detecção de aflatoxinas B1, G1, B2 e G2 em amendoim. Tais colunas apresentavam diferentes tamanhos de partícula e especificidade de uso, sendo uma para uso exclusivo em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, em inglês: *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) e outra com partículas tipo *core shell*, capazes de suportar as variações de pressão próprias das duas técnicas: CLAE e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE, em inglês: *Ultra Performance Liquid Chromatography* - UPLC).

¹Engenheira agrônoma, D.Sc. em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, renata@ctaa.embrapa.br

²Farmacêutico, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, ronoel@ctaa.embrapa.br

³Químico, M.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, sidney@ctaa.embrapa.br

Material e métodos

Amostras de 25g de amendoim *in natura* naturalmente contaminadas por aflatoxinas (conforme análise prévia realizada no Laboratório de Micotoxinas da ESALQ/USP, que disponibilizou a amostra) foram extraídas com 100 mL de acetonitrila:água (84:16 v/v) em agitador Marconi® por 30 minutos. Após filtração, os extratos foram purificados em coluna Mycosep®. A detecção foi realizada em HPLC acoplado ao detector de fluorescência em comprimento de onda 364 nm de excitação e 440 nm de emissão. Para aumentar a fluorescência das aflatoxinas, foi realizada derivatização pós-coluna, utilizando-se uma célula eletroquímica denominada Kobra cell®. A quantificação foi realizada por padronização externa, com base em curvas de calibração de 8 pontos, construídas de modo independente para cada coluna. As seguintes colunas cromatográficas foram utilizadas para a separação das aflatoxinas:

Coluna A: C¹⁸, 250 mm x 4,6 mm; 5,0 µ (XBridge® da Waters);

Coluna B: C¹⁸, 100 mm x 4,6 mm; 2,4 µ (BDS Hypersil da Thermo Scientific).

As condições cromatográficas comuns para ambas as colunas testadas foram: fase móvel composta de acetonitrila, metanol e água ultra-pura 15:20:65 (v/v/v) eluindo em modo isocrático. As colunas foram mantidas em forno a 40°C. Os parâmetros que variaram para as duas colunas foram:

a) coluna A: fluxo de 0,8 mL/min, volume de injeção 40 µL e tempo de corrida de 25 min;

b) coluna B: fluxo de 1,1 mL/min, volume de injeção 5 µL e tempo de corrida de 10 min.

Resultados e discussão

Com base na comparação dos cromatogramas (Figura 1) obtidos a partir das análises pelas colunas A e B, pode-se observar que o tempo de retenção dos quatro picos diminuiu em média 10 minutos. A diminuição do tempo de corrida, de 25 minutos na coluna A para 10 minutos na coluna B, resultou na redução de 55% do volume de fase móvel utilizada para cada corrida. Pode-se verificar ainda a qualidade

cromatográfica compatível obtida por meio de ambas as colunas. A partir do cálculo da resolução, considerando-se os picos de G1 e B2, obtiveram-se os valores 1,04 e 1,11 para as colunas de 10 e 25 cm, respectivamente, comprovando que foi mantida a qualidade da separação dos picos.

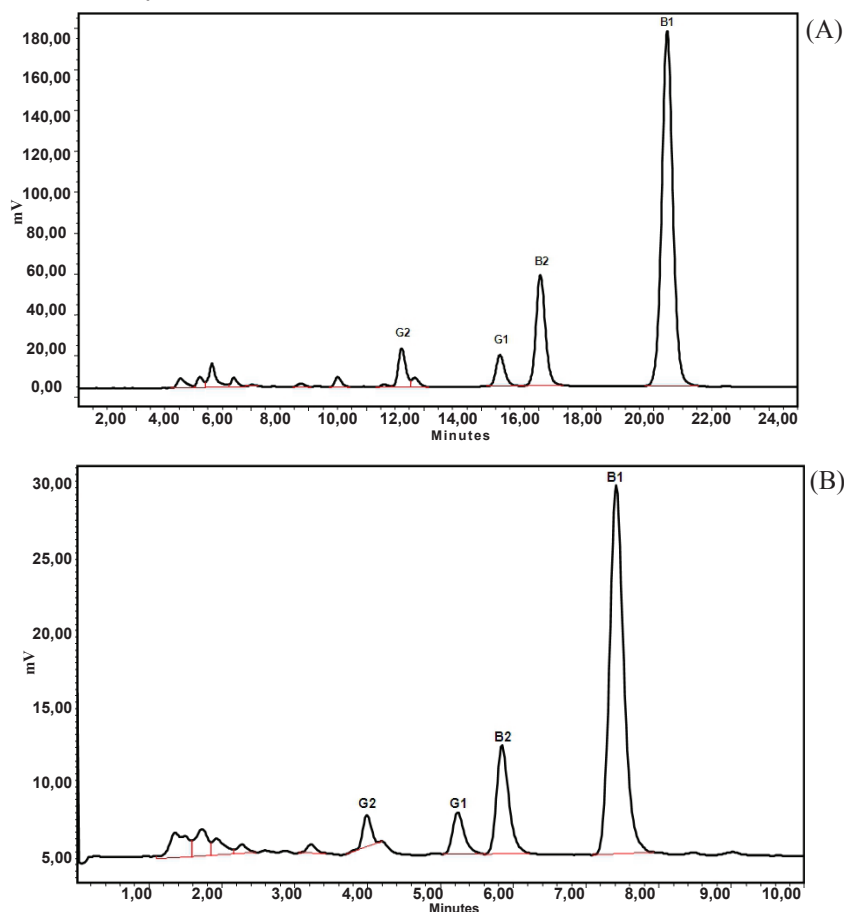


Figura 1. Cromatogramas de análise de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em amendoim por CLAE em diferentes colunas (A = 5,0 µ e B = 2,4 µ).

Considerando-se a quantificação das aflatoxinas em amostras de amendoim naturalmente contaminadas, os níveis de aflatoxinas totais foram muito próximos, de 16,74 e 16,42 µg/kg para as análises realizadas pelas colunas A e B, respectivamente (Tabela 1)

Tabela 1. Níveis de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (expressos em µg/kg) em amendoim analisado por meio das colunas A e B.

Aflatoxinas	Coluna A (µg/kg)*	Coluna B (µg/kg)*
B1	12,70	12,29
B2	1,86	1,88
G1	1,14	1,30
G2	1,03	0,95
TOTAIS	16,74	16,42

*média das duplicatas.

A transição da técnica de HPLC para UPLC é uma tendência na área analítica e na química verde. Conforme os resultados obtidos nesse trabalho, o uso de colunas de partículas menores que 3 μ (tipo *core shell*), destinadas a ambas as técnicas, resultou em economia de tempo e de reagentes, o que significa otimização do trabalho do analista e redução de custos e de uso de recursos ambientais para a produção de insumos, além de diminuir o descarte de resíduos gerados na análise.

Referências Bibliográficas

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Aflatoxins. In: _____. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon, 2002. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 82). Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/index.php>>. Acesso em: 19 jul. 2011.

SCUSSEL, V. M. Micotoxinas em alimentos. Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.

SUASSUNA, T. de M. F. (Ed.). Cultivo do amendoim. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Embrapa Algodão. Sistemas de produção, 7). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amendoim/CultivodoAmendoim/index.html>>. Acesso em: 19 jul. 2011.

Comunicado Técnico, 180

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ

Fone: (0XX21) 3622-9600

Fax: (0XX21) 3622-9713

Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>

E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2011): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: Virgínia Martins da Matta

Membros: Andre Luis do Nascimento Gomes, Daniela De Grandi Castro Freitas, Luciana Sampaio de Araújo, Ilana Felberg, Marília Penteado Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Galhardo Borguini, Renata Torrezan

Expediente

Supervisão editorial: Daniela De Grandi C. Freitas

Normalização bibliográfica: Luciana S. de Araújo

Editoração eletrônica: Marcos Moulin, André Luis do Nascimento Gomes e Chris Maciel.

Revisão de texto: Edson Watanabe