

Comunicado 198

Técnico

ISSN 0103 5231
Dezembro, 2013
Rio de Janeiro, RJ

Ilustração: André Luis do Nascimento Gomes



Análise de Aflatoxinas B1, G1, B2 e G2 em Castanha-do-Brasil, Milho e Amendoim Utilizando Derivatização Pós-Coluna no Sistema Cromatográfico CLAE/ Kobra-Cell®/DFL

Izabela Miranda de Castro¹
Marianna Ramos dos Anjos²
Alessandra da Silva Teixeira³

Introdução

As micotoxinas são metabólitos fúngicos secundários altamente tóxicos e carcinogênicos, que provocam grandes perdas econômicas na cadeia produtiva agrícola e representam risco atual e potencial para o agronegócio brasileiro e para a saúde humana e animal. A crescente preocupação com a inocuidade e a qualidade dos produtos agrícolas tem levado os países importadores a serem mais exigentes quanto à segurança dos alimentos. A presença destes contaminantes nos alimentos representa, atualmente, um dos principais entraves técnicos à comercialização dos produtos agrícolas no mercado internacional.

Entre as micotoxinas de maior ocorrência nos alimentos estão as aflatoxinas (AFs), que são assim designadas por serem produzidas principalmente por fungos da espécie *Aspergillus flavus*. As aflatoxinas, cujas estruturas químicas são mostradas na Figura 1, ocorrem e exercem seus efeitos tóxicos mesmo em quantidades extremamente pequenas nos alimentos. Por isso mesmo, a sua identificação e sua avaliação quantitativa geralmente requerem amostragem

específica e métodos de extração e detecção sensíveis e eficientes. Estas micotoxinas estão entre as mais estudadas por apresentarem efeitos imunossupressores, carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos, quando comparados com outras micotoxinas (IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, 2002).

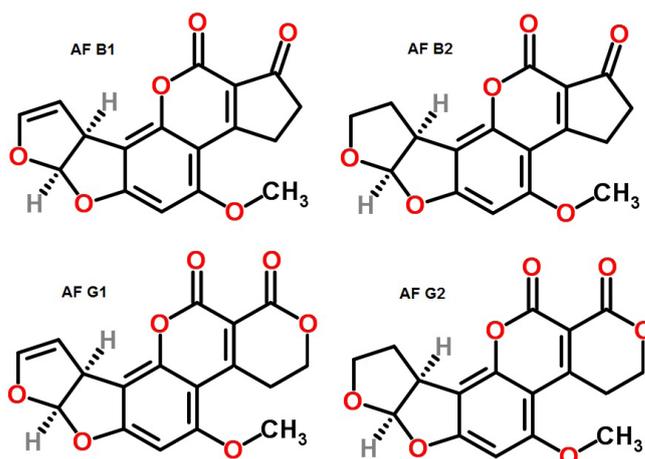


Figura 1. Estruturas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

¹ Química, Ph.D. em Geoquímica Orgânica Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, izabela.castro@embrapa.br

² Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, marianna.anjos@embrapa.br

³ Engenheira de Alimentos, M.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, técnica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, alessandra.teixeira@embrapa.br

Os sintomas de intoxicação por aflatoxinas em várias espécies de animais, incluindo mamíferos, são hipolipidemia, hipocolesterolemia e hipocarotenemia, associados com esteatose hepática e perda de peso. Podem provocar cirrose, necrose do fígado, proliferação dos canais biliares, síndrome de Reye (encefalopatia com degeneração gordurosa do cérebro), hemorragia nos rins e lesões sérias na pele pelo contato direto. Além disso, os produtos do seu metabolismo interferem com o sistema imunológico tanto de humanos como de outros animais. O tipo e intensidade do efeito tóxico dependem de vários fatores como espécie animal, idade, sexo e estado nutricional (HUSSEIN & BRASEL, 2001).

Sendo assim, a avaliação das aflatoxinas e do risco químico associado à presença destes contaminantes nos alimentos é de extrema importância. No Brasil, somente a partir de 2011 passamos a ter legislação com os limites máximos toleráveis de micotoxinas para a maioria dos alimentos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011).

Em nosso estudo, foram avaliados e validados métodos para três produtos: a castanha-do-brasil, que envolve uma cadeia produtiva de milhares de pessoas na região norte do país; o milho, que é um item importante da dieta da população brasileira e constitui um dos componentes básicos principais das rações animais; e o amendoim, que é uma importante fonte de óleo e de proteína de alto valor nutricional, usado tanto para fins alimentares como em diversas aplicações na indústria química, farmacêutica, cosmética, entre outras.

Os grãos de amendoim podem estar contaminados por aflatoxinas que são produzidas quando as plantas são submetidas a estresse hídrico ou ainda quando os grãos são armazenados em condições inadequadas de temperatura e umidade. A contaminação do amendoim por micotoxinas é decorrente de falhas no controle da umidade e temperatura em todas as fases e etapas da cadeia produtiva, propiciando condições favoráveis para o desenvolvimento dos fungos toxigênicos. As aflatoxinas são, portanto, o principal perigo identificado na cadeia produtiva do amendoim.

A castanha-do-brasil é um dos principais produtos da região norte do país, cuja produção está voltada principalmente para a exportação. É um produto oriundo das áreas úmidas da região amazônica, sendo suscetível à contaminação por fungos cosmopolitas, como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, produtores de aflatoxinas. A obtenção da castanha-do-brasil é uma atividade exclusivamente extrativista, o que contribui bastante para a contaminação deste produto em função do tempo de coleta, manuseio, transporte e armazenamento (PACHECO & SCUSSEL, 2006).

O milho é um dos cultivos mais predispostos à contaminação por fungos toxigênicos e, por consequência, por micotoxinas, que pode ocorrer no

campo, antes e após a colheita, e também durante o transporte e armazenamento do produto. No Brasil, as condições climáticas são adequadas para a ocorrência de uma ampla gama de fungos toxigênicos e de contaminações por micotoxinas (MAZIEIRO & BERSOT, 2010). Cabe ressaltar que o milho é um dos cereais que compõem a base da dieta animal e a contaminação por micotoxinas pode provocar alterações patológicas nos animais, com implicações no seu desempenho zootécnico.

Considerando o risco associado à presença de aflatoxinas em diferentes cadeias produtivas, torna-se necessário o monitoramento constante destes contaminantes nos produtos agrícolas. Para isso, são necessários métodos analíticos rápidos, com alta precisão, exatidão, seletividade e sensibilidade, além de uniformidade, com métodos oficiais que tenham abrangência internacional.

Dentro desse contexto, o método proposto neste trabalho, implantado para as matrizes castanha-do-brasil, milho e amendoim, envolve a extração das aflatoxinas com solvente orgânico, seguida de purificação através de colunas de imunoafinidade ou de alumina, quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com derivatização pós-coluna com o derivatizador Kobra-Cell® (STROKA et al., 2000) e detecção por fluorescência (CLAE/ Kobra-Cell®/DFL). A quantificação das aflatoxinas é feita por padronização externa.

Método de Análise de Aflatoxinas em Castanha-do-brasil, Milho e Amendoim

Preparo das Amostras

Castanha-do-brasil: as castanhas foram retiradas da casca e trituradas em processador de alimentos com igual massa de água ultrapura, formando uma pasta;

Milho: as amostras foram trituradas em moinho de facas ou processador de alimentos até homogeneização e obtenção da farinha.

Amendoim: os grãos de amendoim foram retirados da casca e triturados em processador de alimentos até homogeneização do produto com a obtenção de uma farinha.

Extração

Amostras de castanha-do-brasil

Cerca de 100 g da pasta de castanha foram pesados em recipiente de vidro próprio do homogeneizador/dispersor de alta rotação Omni Mixer®, onde foram adicionados 5 g de cloreto de sódio, 200 mL de metanol (grau HPLC)

e 100 mL de hexano (grau HPLC). A mistura foi agitada por 3 minutos a 800 rpm e depois filtrada em papel de filtro rápido seguido de filtração em membrana de PTFE utilizando sistema de vácuo.

Amostras de milho e amendoim

Cerca de 25 g de amostra da farinha (milho ou amendoim) foram pesados em recipiente de vidro próprio do homogeneizador/dispersor de alta rotação Omni Mixer®, onde foram adicionados 100 mL de solução de acetonitrila (grau HPLC) / água ultrapura (84:16 v/v). A mistura foi agitada por 3 minutos a 800 rpm e depois filtrada em papel de filtro rápido.

Purificação

Amostras de castanha-do-brasil

10 mL do filtrado foram transferidos para erlenmeyer onde foram adicionados 60 mL de tampão PBS. A solução foi passada pela coluna de imunoafinidade AFLAPREP P07 da R-Biopharm, instalada no Manifold, usando fluxo de 2 mL/min. Em seguida, a coluna foi lavada com 15 mL de água deionizada e seca com ar; foram adicionados 2 mL de metanol na coluna, e, após 2 min de permanência, eluíram-se as aflatoxinas com fluxo de 2 mL/min usando o sistema de vácuo; esta solução contendo as AFs foi então evaporada sob fluxo de nitrogênio, em banho-maria a 40°C, e ressuspensa em 3 mL de MeOH (grau HPLC) : H₂O ultrapura (2:3).

Amostras de milho e amendoim

5 mL do filtrado (extrato) foram transferidos para o tubo de vidro próprio da coluna Mycosep® 224 da Romerlabs. A coluna foi introduzida no tubo com a solução forçando a filtração do extrato. Foram retirados 2 mL do eluato; esta solução contendo as AFs foi evaporada sob fluxo de nitrogênio, em banho-maria a 40°C, e ressuspensa em 3 mL de MeOH (grau HPLC) : H₂O ultrapura (2:3).

Quantificação usando o Sistema Clae/ Kobra-Cell®/DFL

Curva Analítica

Partindo de uma solução padrão certificada contendo as quatro aflatoxinas, foram preparadas soluções com concentrações diferentes das AFs para os sete pontos da curva.

As concentrações das curvas analíticas para B1 e G1 variaram na faixa de 0,0004 a 0,030 µg/mL, enquanto que para B2 e G2 a faixa foi de 0,0002 a 0,015 µg/mL.

Sistema CLAE/ Kobra-Cell®/DFL

As aflatoxinas foram analisadas em um sistema cromatográfico fabricado pela Waters, composto de injetor automático WAT717, bomba quaternária WAT600, desgaseificador *online*, forno de colunas mantido a 40 °C e detector de fluorescência WAT2475. O derivatizador pós-coluna Kobra-Cell® da R-Biopharm foi colocado entre a saída da coluna e a entrada do detector de fluorescência.

Parâmetros Cromatográficos

Coluna cromatográfica: X-Terra® RP18 (Waters), 5 µm, (4,6 x 150 mm);

Fase móvel: fase ternária composta por acetonitrila/ metanol/água ultra-pura na proporção (15:20:65 v/v) contendo 198 g/L de KBr e 585 µL da solução de HNO₃ 4 M;

Fluxo: 0,8 mL/min em modo isocrático;

Detector de fluorescência: excitação - 360 nm e emissão - 440 nm;

Volume de injeção: 40 µL.

Ensaio de Recuperação

Foram conduzidos ensaios de recuperação em três níveis de contaminação, utilizando a solução padrão com o mix das quatro aflatoxinas, conforme descrito a seguir, com sete replicatas em cada nível. As amostras de castanha-do-brasil, de milho e de amendoim usadas nestes ensaios estavam isentas de micotoxinas, e foram utilizados os mesmos procedimentos de preparo de amostra, extração, purificação e quantificação empregados para as amostras pelo sistema CLAE/ Kobra-Cell®/DFL. Os níveis de contaminação aplicados estão descritos a seguir:

1) nível 1: para as aflatoxinas B1 e G1 - 2,0 µg/kg e para B2 e G2 - 1,0 µg/kg;

2) nível 2: para as aflatoxinas B1 e G1 - 4,0 µg/kg e para B2 e G2 - 2,0 µg/kg;

3) nível 3: para as aflatoxinas B1 e G1 - 8,0 µg/kg e para B2 e G2 - 4,0 µg/kg.

Em cada análise, a concentração encontrada para cada aflatoxina foi comparada à quantidade teórica adicionada em cada nível de fortificação para efeito do cálculo da porcentagem de recuperação.

Avaliação do Método de Análise

O cromatograma obtido para a análise das quatro aflatoxinas utilizando-se o derivatizador pós-coluna Kobra-Cell® está mostrado na Figura 2. A ordem de eluição observada é AFG2, AFG1, AFB2 e por último a AFB1. Convém ressaltar que a eluição é diferente daquela observada no método onde se fazia a pré-derivatização por ácido trifluoroacético *off-line* (ANJOS et al., 2009; BORGUINI et al., 2009).

A validação de um procedimento analítico tem como objetivo a comprovação de que o método a ser utilizado é apropriado à finalidade para a qual

foi desenvolvido, fornecendo resultados confiáveis, precisos e reprodutíveis. Os parâmetros considerados neste trabalho incluem a linearidade (coeficiente de correlação), a porcentagem de recuperação e os limites de quantificação e de detecção.

A linearidade do método, avaliada para uma determinada faixa de trabalho que corresponde ao intervalo de concentrações do analito usadas na composição da curva de calibração, deve apresentar coeficiente de correlação (R^2) maior que 0,9. As curvas analíticas obtidas para as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, com seus respectivos coeficientes de correlação (R^2), se encontram na Figura 3.

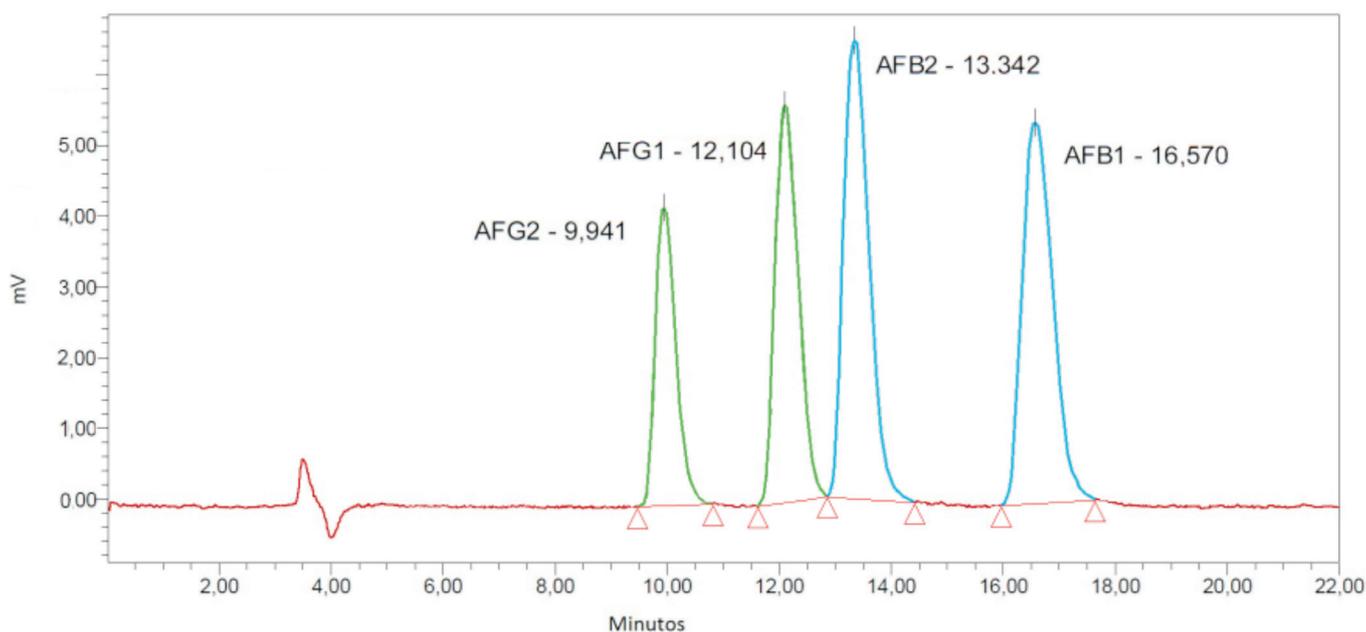


Figura 2. Cromatograma da solução padrão de aflatoxinas usando sistema cromatográfico CLAE/Kobra-Cell®/DFL

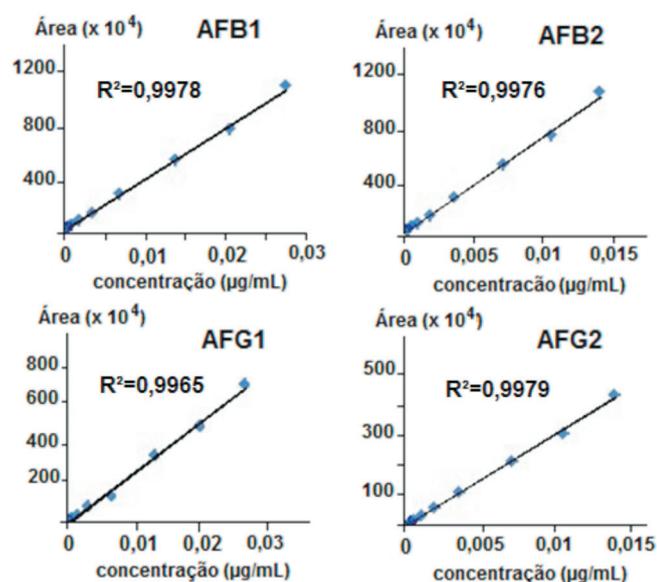


Figura 3. Curvas analíticas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas no sistema CLAE/Kobra-Cell®/DFL.

Os valores obtidos de R^2 para as quatro aflatoxinas foram maiores que 0,996, o que demonstra que o método proposto apresenta boa linearidade das curvas obtidas para a faixa de concentrações avaliada.

Outro parâmetro importante na validação de um método é a porcentagem de recuperação. Este valor corresponde à razão entre a quantidade do analito adicionada à amostra e quantificada pelo método analítico e a quantidade teórica adicionada à matriz antes do procedimento. Os valores médios de recuperação obtidos para as quatro aflatoxinas analisadas pelo presente método nas matrizes castanha-do-brasil, milho e amendoim se encontram, respectivamente, nas Tabelas 1, 2 e 3. Os coeficientes de variação obtidos para as sete replicatas em cada ensaio foram inferiores a 20%. Os resultados de recuperação encontrados estão de acordo com as recomendações da União Europeia (METHOD..., 2012) onde a faixa de aceitação é de 70 a 120%.

Tabela 1. Porcentagens (%) de recuperação de aflatoxinas em castanha-do-brasil para três níveis de contaminação; os valores apresentados representam a média de sete replicatas

Aflatoxina	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Média
B1	97	96	98	97
B2	97	92	97	95
G1	95	99	97	97
G2	98	87	82	89

Tabela 2. Porcentagens (%) de recuperação de aflatoxinas em milho para três níveis de contaminação; os valores apresentados representam a média de sete replicatas

Aflatoxina	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Média
B1	83	95	92	90
B2	99	82	100	94
G1	96	92	101	96
G2	99	87	89	92

Tabela 3. Porcentagens (%) de recuperação de aflatoxinas em amendoim para três níveis de contaminação; os valores apresentados representam a média de sete replicatas

Aflatoxina	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Média
B1	87	96	92	92
B2	95	92	102	96
G1	98	95	98	97
G2	102	93	89	95

Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) são as menores concentrações do analito que se pode detectar e quantificar, respectivamente, com precisão e exatidão. Quando se utilizou o sistema CLAE/Kobra-Cell®/DFL, o cálculo dos limites de detecção e de quantificação foi feito utilizando a relação sinal/ruído, onde é aceita a razão 3:1 e 10:1 para o LD e LQ, respectivamente. Para se estabelecer estes limites foi usada a menor concentração de cada uma das quatro aflatoxinas, capaz de fornecer um pico que tenha três ou dez vezes a amplitude do sinal de ruído. Os ensaios foram feitos em triplicata para cada concentração testada, sendo os resultados obtidos apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Limites de detecção e de quantificação das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 do método em estudo

Aflatoxina	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)
B1	0,04	0,13
B2	0,02	0,08
G1	0,03	0,10
G2	0,03	0,11

Considerações Finais

O método proposto para análise de aflatoxinas, empregando a análise por CLAE/Kobra-Cell®/DFL, demonstrou ser adequado para todas as matrizes estudadas – castanha-do-brasil, milho e amendoim – considerando os parâmetros de desempenho avaliados. O tempo de execução do método foi melhorado usando-se procedimentos de extração e purificação específicos.

O uso de um detector seletivo e sensível como o detector de fluorescência permitiu a obtenção de cromatogramas onde a presença de interferentes não prejudica a quantificação dos analitos nas amostras. A seletividade do método foi assegurada tanto pelo uso de colunas de imunoafinidade, como pela utilização dos comprimentos de onda de emissão e de absorção no detector de fluorescência específicos para as aflatoxinas. Observou-se comportamento linear das quatro curvas analíticas na faixa de trabalho do método para as quatro aflatoxinas, refletido nos valores de R^2 ; os limites de detecção e de quantificação obtidos atendem aos requisitos de qualidade recomendados pela União Europeia. Os ensaios de recuperação das quatro aflatoxinas estão dentro da faixa aceitável (70 a 120%) com LQ situados na faixa de 0,08 a 0,13 µg/kg indicando que este método é adequado para a quantificação de concentrações baixas destas micotoxinas em amostras de castanha-do-brasil, milho e amendoim.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 mar. 2011.

ANJOS, M. R.; CASTRO, I. M.; LABORÃO, L. S. Estudo da recuperação de aflatoxinas em castanha-do-brasil por CLAE/DF com pré-derivatização por TFA. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 8., 2009, Campinas. **Ciência de alimentos no mundo globalizado: novos desafios, novas perspectivas**. Campinas: Unicamp, 2009. 1 CD-ROM.

BORGUINI, R. G.; GODOY, R. L. O.; ROSA, J. S.; PACHECO, S.; ANJOS, M. R.; TEIXEIRA, A. S.; CASTRO, I. M. Detecção de aflatoxinas em amendoim por CLAE-DF com derivatização pré-coluna. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 8., 2009, Campinas. **Ciência de alimentos no mundo globalizado: novos desafios, novas perspectivas**. Campinas: Unicamp, 2009. 1 CD-ROM.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicology, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, Oct. 2001.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. **Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene**. Lyon, 2002. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 82).

MAZIEIRO, M. T.; BERSOT, L. dos S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

METHOD validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed: document n. SANCO/12495/2011: supersedes document n. SANCO/10684/2009: implemented by 01/01/2012. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol_en.pdf>. Acesso em: 7 jul. 2012.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. **Castanha-do-brasil: da Floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis: Editograf, 2006. 176 p.

STROKA, J.; ANKLAM, E.; JÖRISSEN, U.; GILBERT, J. Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, piastachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 2, p. 320-340, Mar./Apr. 2000.

Comunicado Técnico, 198

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: ctaa.sac@embrapa.br

1ª edição
 1ª impressão (2013): tiragem (50 exemplares)

Comitê de Publicações

Presidente: Virgínia Martins da Matta
Membros: André Luis do Nascimento Gomes, Daniela De Grandi Castro Freitas, Leda Maria Fortes Gottschalk, Luciana Sampaio de Araújo, Ilana Felberg, Marília Penteado Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Torrezan

Expediente

Supervisão editorial: Daniela De Grandi C. Freitas
Revisão de texto: Renata Valeriano Tonon
Normalização bibliográfica: Luciana S. de Araújo
Editoração eletrônica: André Luis do N. Gomes e Marcos Moulin