

Foto: André Luis do N. Gomes



## Análise de Contaminante em Suco de Maçã: Quantificação de Patulina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/UV-DAD)

Izabela Miranda de Castro<sup>1</sup>  
Danilo Batista de Sousa<sup>2</sup>  
Alessandra da Silva Teixeira<sup>3</sup>  
Marianna Ramos dos Anjos<sup>4</sup>  
Maria de Lourdes Mendes de Souza<sup>5</sup>

### Introdução

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. As micotoxinas, toxinas produzidas por fungos e presentes em produtos de origem vegetal e animal, podem prejudicar a saúde humana e de animais através da ingestão de alimentos contaminados. Notadamente nos últimos anos, as micotoxinas vêm ganhando atenção global devido aos efeitos adversos para saúde e economia (SCUSSEL et al., 2008).

A patulina (PAT) é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos do gênero *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssoschlamys*, que podem crescer em vários alimentos, sendo o fungo mais importante o *Penicillium expansum* (SOUZA, 2009). A podridão produzida por ele apresenta manchas macias e aquosas

e a parte deteriorada separa-se facilmente do tecido não contaminado. Estes focos de podridão podem conter uma grande proporção de patulina. Já foram detectados até 150 g desta micotoxina em 1 kg de suco extraído de maçãs deterioradas (SCUSSEL, 1998).

Os principais alimentos infectados são maçãs e peras, assim como seus derivados, sucos e sidras. A ocorrência de podridão nesses frutos promove a contaminação dos mesmos pela patulina. Esta micotoxina normalmente migra para o tecido sadio e é encontrada em concentrações mais altas na parte da fruta não deteriorada pelo fungo. Por esta razão, recomenda-se a retirada da podridão e do tecido sadio próximo para prevenção da contaminação pela patulina.

A contaminação de sucos de maçã acontece principalmente no período de entressafra, onde as frutas estragadas são utilizadas juntamente com as sadias.

<sup>1</sup> Química, Ph.D. em Geoquímica Orgânica Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, [izabela.castro@embrapa.br](mailto:izabela.castro@embrapa.br)

<sup>2</sup> Graduando em Engenharia Química, bolsista CNPq-Brasil, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, [daniilobsousa@hotmail.com](mailto:daniilobsousa@hotmail.com)

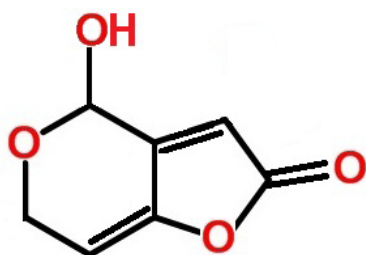
<sup>3</sup> Engenheira de Alimentos, M.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, técnica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, [alessandra.teixeira@embrapa.br](mailto:alessandra.teixeira@embrapa.br)

<sup>4</sup> Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, [marianna.anjos@embrapa.br](mailto:marianna.anjos@embrapa.br)

<sup>5</sup> Farmacêutica, D.Sc. em Química de Produtos Naturais, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, [marialourdes.msouza@embrapa.br](mailto:marialourdes.msouza@embrapa.br)

Muitos países têm adotado a recomendação do Codex Alimentarius, que indica um nível máximo permitido de 50 µg/L de patulina em suco de maçã. Esse fato estimula países exportadores, como o Brasil, a pesquisarem a qualidade micotoxicológica dos seus produtos, a fim de se tornarem competitivos no mercado internacional e de fornecerem alimentos seguros (MYCOTOXINS..., 2003). Até 2011, o Brasil não possuía limites estabelecidos para patulina na legislação, contudo, através da RDC nº 7 de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011), ficou estabelecido o limite de 50 µg/kg para suco e polpa de maçã.

A patulina é denominada como 4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]pirano-2(6H)-1. Sua fórmula molecular é  $C_7H_6O_4$  e seu peso molecular é de 154,12 g/mol (Figura 1). Sua atividade carcinogênica é atribuída à insaturação  $\alpha$ ,  $\beta$ , juntamente com uma dupla ligação conjugada externa na posição 4 do anel lactona. Sua absorção UV máxima é de 256,5 nm e apresenta solubilidade em água e solventes orgânicos comuns, exceto éter de petróleo. É instável em solução alcalina, observando-se queda em sua atividade biológica (SCUSSEL, 1998).



**Figura 1.** Estrutura molecular da patulina.

O objetivo deste trabalho foi implementar um procedimento analítico para determinação de patulina em suco de maçã. O método usado se baseia no procedimento descrito pela ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 1993). Nessa metodologia é feita a separação cromatográfica deste analito e de seu principal interferente, o HMF (5-hidroxi-metil-furfural), por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta com arranjo de diodos (sistema CLAE/UV-DAD).

## Parte Experimental

### Preparo de amostras

Onze amostras de suco de maçã foram obtidas no mercado varejista do município do Rio de Janeiro. As amostras foram filtradas em papel de filtro rápido devido ao alto teor de pectina presente no suco.

### Extração

A extração se baseou no método ISO 8128-1 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 1993) e foi realizada com 5 mL do

filtrado e 5 mL de acetato de etila, com homogeneização em Vórtex durante 1 minuto, sendo recolhida a fase orgânica. O procedimento foi repetido por duas vezes. Ao tubo contendo as três fases orgânicas extraídas, foram acrescentados 2 mL de solução de carbonato de sódio 1,4% (p/v) com posterior homogeneização em Vórtex por 1 minuto. A fase orgânica foi recolhida em tubo reservado. À fase aquosa foram acrescentados 5 mL de acetato de etila, que foram homogeneizados em Vórtex por 1 minuto. Recolheu-se a fase orgânica para o tubo de ensaio reservado, onde foram acrescentadas 5 gotas de ácido acético glacial. Após homogeneização, o extrato foi evaporado sob vácuo até que restasse aproximadamente 1 mL. Em seguida, foi transferido quantitativamente para frasco de 5 mL utilizando acetato de etila. Evaporou-se o extrato sob nitrogênio em banho-maria a 40°C, até a secura. Ressuspendeu-se o resíduo com 500 µL de tampão acetato (pH=4,0) e transferiu-se para o frasco de injeção no sistema CLAE-UV/DAD.

### Preparo da curva analítica

A partir de uma solução padrão certificada de patulina em acetonitrila, foram preparadas oito soluções com concentrações diferentes em tampão acetato (pH=4,0), para os oito pontos da curva. A concentração da curva de calibração variou na faixa de 0,1 a 2,0 µg/mL e as soluções foram injetadas em quintuplicata.

### Preparo do padrão de patulina com HMF

Preparou-se uma solução de patulina com concentração igual a 9,62 µg/mL, contendo 0,2 µg/mL de HMF em tampão acetato (pH=4,0). Esta solução serve para se monitorar a separação entre os picos de HMF (interferente) e patulina (analito de interesse) na análise por cromatografia líquida.

### Sistema CLAE/UV-DAD

Sistema LC Shimadzu Prominence composto por controlador CBM 20A, bomba LC 20AT, *degasser* DGU 20A<sub>5</sub>, detector de UVvis com arranjo de diodos SPD M20A, forno CTO 20A, injetor Rheodyne.

### Parâmetros cromatográficos

Utilizou-se coluna cromatográfica Symmetry® RP18 de 5 µm, (4,6 x 250 mm); fase móvel água:acetonitrila (90:10); fluxo de 1,0 mL/min;  $\lambda$ = 276 nm; e volume de injeção de 20 µL.

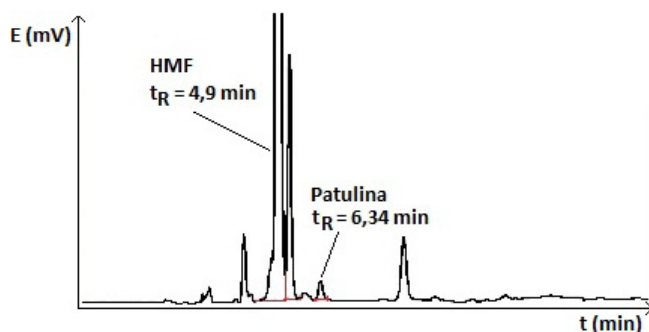
### Ensaio de recuperação

Foram conduzidos seis ensaios de recuperação em dois níveis (50 e 100 µg/kg) através de fortificação da amostra de suco (isenta de micotoxina) com as soluções padrão de patulina.

## Avaliação do Método de Análise

### Cromatograma obtido por CLAE-UV/DAD

O cromatograma obtido para a solução padrão de patulina e de seu interferente, o HMF, na matriz de suco de maçã está mostrado na Figura 2. Pode-se observar que o mesmo apresenta uma ótima resolução com as condições cromatográficas aplicadas, sendo possível distinguir os dois analitos, assim como outros interferentes.



**Figura 2.** Cromatograma obtido para a solução padrão de Patulina contendo o HMF na matriz de suco de maçã.

### Curva analítica

A validação de um procedimento analítico visa à comprovação de que o método utilizado é adequado à finalidade para a qual foi desenvolvido, fornecendo resultados confiáveis, precisos e reprodutíveis. Os parâmetros considerados neste trabalho incluem a linearidade (coeficiente de correlação) e a porcentagem de recuperação.

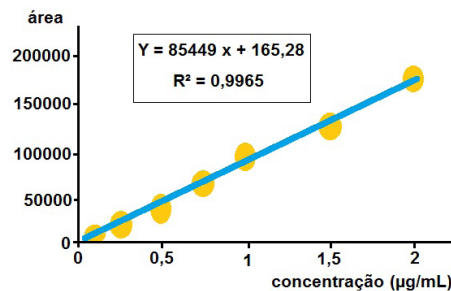
### Linearidade do método

A linearidade da curva analítica é avaliada para uma determinada faixa de trabalho, que corresponde ao intervalo de concentrações do analito usadas na composição da curva analítica e deve, obrigatoriamente, apresentar coeficiente de correlação ( $R^2$ ) adequado, ou seja, maior que 0,9. A construção da curva analítica através do método dos mínimos quadrados permite a quantificação do analito caso a curva obedeça a certos critérios de desempenho. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido para a curva de patulina foi de 0,9965 e a equação de reta foi  $y=85449x + 165,28$  (Figura 3). Isto demonstra que o método é linear para este analito na faixa de 0,1 a 2,0  $\mu\text{g/mL}$ .

### Resultados dos ensaios de recuperação

Um parâmetro importante na validação de um método é a porcentagem de recuperação. Este valor corresponde à razão entre a quantidade do analito quantificada pelo método analítico e a quantidade teórica adicionada à matriz antes do procedimento (Equação 1).

$$\% \text{ recuperação} = \frac{\text{massa analito quantificada}}{\text{massa de padrão teórica adicionada}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$



**Figura 3.** Curva de patulina na faixa de trabalho, 0,1 a 2,0  $\mu\text{g/mL}$ , obtida no sistema CLAE-UV/DAD.

As médias e os desvios padrões relativos (RSD) das recuperações obtidas das seis replicatas para a patulina encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Taxas de recuperação da patulina em suco de maçã para os dois níveis de contaminação.

Nível de Contaminação ( $\mu\text{g/L}$ )	RSD (%)	Recuperação* (%)
50,0	9,0	86,0
100,0	11,0	88,0

\*os valores apresentados representam a média de 6 replicatas

Estes resultados se adéquam às recomendações da União Europeia (METHOD..., 2012) que estabelece um percentual de recuperação entre 70 e 120% e  $RSD \leq 20$ . Dentre as 11 amostras de suco de maçã analisadas, apenas duas apresentaram contaminação de patulina de 9 e 13  $\mu\text{g/kg}$ .

## Considerações Finais

O método utilizado neste estudo demonstrou ser adequado para quantificação de patulina na matriz suco de maçã. As porcentagens de recuperação obtidas para os diferentes níveis de concentração foram satisfatórias considerando as exigências da União Europeia. O método de análise por CLAE/UV-DAD permitiu a obtenção de cromatogramas com boa resolução entre os picos e a presença do interferente HMF não prejudicou a quantificação da patulina na amostra. A quantificação deste analito sem a etapa de purificação dos extratos com colunas de imunoafinidade demonstrou ser bastante conveniente.

## Referências

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 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.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 8128-1**: apple juice, apple juice concentrates and drinks containing apple juice: determination of patulin content. Part I: method using high-performance liquid chromatography. Geneva, 1993.

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](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol_en.pdf)>. Acesso em: 7 jul. 2012.

MYCOTOXINS: risk in plant, animal, and human systems. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, 2003. 199 p.

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

SCUSSEL, V. M.; ROCHA, M. U. J. da; LORINI, I.; SABINO, M.; ROSA, C. A. da R.; CARVAJAL, M. M. (Ed.). **Atualidades em micotoxinas e armazenagem qualitativa de grãos II**. Florianópolis: Imprensa Universitária, 2008. 586 p.

SOUZA, M. de L. M. de. **Determinação simultânea de micotoxinas em milho e ração para frangos pelo método multianálito por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem**. 116 f. 2009. Tese (Doutorado em Química de Produtos Naturais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

### Comunicado Técnico, 202

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:** (21) 3622-9600 / **Fax:** (21) 3622-9713  
**Home Page:** [www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos](http://www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos)  
**SAC:** [www.embrapa.br/fale-conosco](http://www.embrapa.br/fale-conosco)

**1ª edição**

1ª impressão (2014): tiragem (50 exemplares)

### Comitê de Publicações

**Presidente:** Virgínia Martins da Matta  
**Membros:** Ana Iraidy Santa Brígida, André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda Machado de Araujo, Daniela de Grandi Castro Freitas de Sá, Leda Maria Fortes Gottschalk, Luciana Sampaio de Araújo, Renata Torrezan e Rogério Germani

### Expediente

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