



SEPARAÇÃO DE INTERFERENTES NA ANÁLISE DE PATULINA POR CLAE/UV-DAD

M.R. ANJOS¹, A.S. TEIXEIRA¹, P. D. ANDRADE², L. F. FERREIRA³, M.L.M. SOUZA¹, I.M. CASTRO¹

¹Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas 29501, Rio de Janeiro, RJ, Brasil – CEP: 23020-470; ²Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário da UFLA, Caixa Postal; 13037 CEP: 37200-000, Lavras, MG, ³ Bolsista CNPq na Embrapa Agroindústria de Alimentos. marianna@ctaa.embrapa.br

RESUMO

A presença de contaminantes em alimentos além de representar um risco à saúde humana e animal, atualmente, é um dos principais entraves técnicos à comercialização dos produtos agrícolas no mercado internacional. A patulina é uma micotoxina (metabólito secundário fúngico) produzida principalmente por fungos do gênero *Penicillium*, que embora não seja carcinogênica, é mutagênica e neurotóxica. Pode estar presente em frutas como maçã e uva, e alguns cereais, ela é estável quando presente em suco de maçã, que em muitas vezes destina-se à alimentação infantil. Este trabalho apresenta a determinação de patulina em suco de maçã comercial através do método de análise ISO 8128-1, utilizando como ferramenta a CLAE/UV-DAD. Pelo fato de ter sido detectada a presença do interferente HMF (5-hidroxi-metil-furfural), foi necessária a separação cromatográfica deste da patulina. Foi avaliada a recuperação de patulina em amostra de suco de maçã comercial em seis replicatas e dois níveis de contaminação. A média da recuperação de patulina na concentração de 16 µg/kg foi de 67% com 21% de desvio padrão relativo (RSD) e, para a concentração de 50 µg/kg, obteve-se média de 73% com RSD de 21%. O coeficiente de correlação (R^2) obtido para a curva de patulina na faixa de 0,025 a 3,0 µg/mL foi de 0,9905.

Palavras-chave: patulina, suco de maçã, recuperação.

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. A presença de contaminantes representa, atualmente, um dos principais entraves técnicos à comercialização dos produtos agrícolas no mercado internacional.



As micotoxinas são metabólitos fúngicos secundários altamente tóxicos e carcinogênicos, representando, atualmente, risco potencial para o agronegócio brasileiro e saúde humana e animal.

A patulina é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochylamys*, que podem crescer em vários alimentos, sendo o produtor mais importante o *Penicillium expansum* (CAST, 2003). Foi identificada em maçãs podres contaminadas por fungos e em cidra comercial em níveis até 45 mg/L. A patulina também foi identificada em determinados produtos agrícolas, tais como: frutas, hortaliças, cereais e rações animais mofadas; é estável em maçã e sucos de uva e em milho seco. A patulina é considerada mutagênica, imunossupressora e neurotóxica, embora não seja carcinogênica.

O objetivo deste trabalho foi realizar a separação cromatográfica da patulina e de seus interferentes, principalmente o HMF (5-hidroxi-metil-furfural) em extratos de suco de maçã comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo da amostra: a amostra de suco de maçã comercial foi filtrada em papel de filtro de filtração rápida.

A extração (ISO 8128-1,1993) foi feita com 5 mL do filtrado e 5 mL de acetato etila, homogeneizados em vórtex durante 1 minuto, sendo recolhida a fase orgânica. O procedimento foi repetido por 2 vezes. Ao tubo contendo as três fases orgânicas extraídas, foram acrescentados 2mL de solução de carbonato de sódio 1,4% (p/v) e homogeneizados 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 acrescentados 5 gotas de ácido acético glacial. Após homogeneização, o extrato foi evaporado à vácuo, até o volume de 1 a 2 mL. Em seguida foi transferido quantitativamente para frasco de 5mL, 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 do CLAE.

Preparo da Curva Padrão: 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 0,025 a 3,0 µg/mL.

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).

Sistema CLAE/PDA: UFLC Shimadzu Prominence: controlador CBM 20A, bomba LC 20AT, degasser DGU 20A₅, detector SPD M20A, forno CTO 20A, injetor manual.

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

Recuperação do método: foram conduzidos seis ensaios de recuperação em dois níveis: 16 e 50 µg/kg, através de fortificação da amostra de suco isenta de patulina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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 1. Pode-se observar que o mesmo apresenta uma ótima resolução cromatográfica com as condições cromatográficas aplicadas. Sendo possível distinguir os dois analitos, assim como outros interferentes.

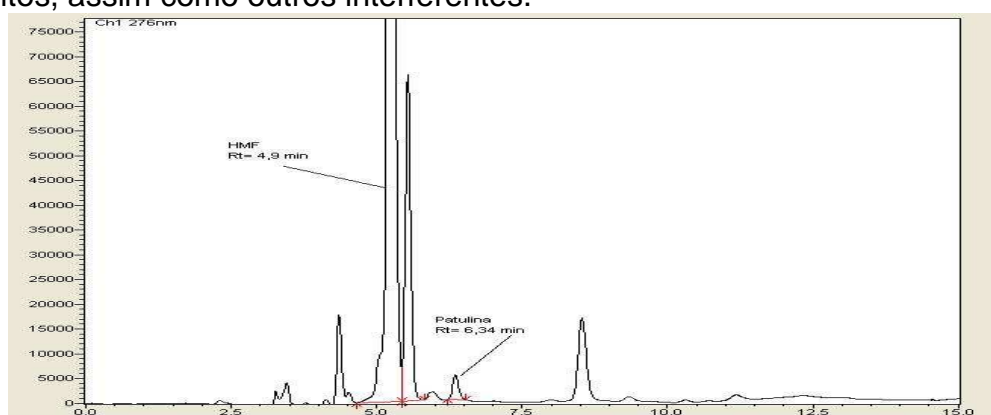


Figura 1. Cromatograma obtido para a solução padrão de Patulina contendo o HMF na matriz de suco de maçã.

A linearidade do método, avaliada para uma determinada faixa de trabalho, corresponde ao intervalo de concentrações do analito usadas na composição da curva de calibração e deve, obrigatoriamente, apresentar coeficiente de correlação (R^2) adequado. 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 0,9905, o que demonstra que o método é linear para este analito na faixa de 0,025 a 3,0 µg/mL.

Um 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. 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.

Recuperação Patulina	Nível 1*	Nível 2*
Média	67%	73%
RSD	21%	20%

*os valores apresentados representam a média de 6 replicatas



Os valores obtidos estão de acordo com o recomendado pelo Regulamento Técnico proposto pela ANVISA (2009): 50 a 120% e RSD \leq 30 para concentrações abaixo de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 70 a 105% e RSD \leq 20 para concentrações entre 20 e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

CONCLUSÃO

O método demonstrou ser adequado para a matriz suco de maçã, pois os níveis de recuperação obtidos foram satisfatórios e também permitiu a obtenção de cromatogramas onde a presença do interferente não prejudicou a quantificação da patulina na amostra.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Consulta Pública nº 100 de 21 de dezembro de 2009. Proposta de Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/>. Acesso em 4 mar 2010.

CAST. Mycotoxins: Risk in Plant, Animal, and Human Systems. **Council for agricultural Science and Technology**. Ames, Iowa, USA. 2003.199p.

ISO 8128-1:1993 Apple juice, apple juice concentrates and drinks containing apple juice-Determination of patulin content. Part I: method using high-performance liquid chromatography.