

ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) EM AMOSTRAS DE CASTANHA-DO-BRASIL

ALESSANDRA DA SILVA TEIXEIRA¹; OTNIEL FREITAS-SILVA²; RONOEL LUIZ DE OLIVEIRA GODÓY², EUGÊNIA AZEVEDO VARGAS³, ALESSANDRA MARTINS⁴.

1. Bolsista CAPES, Discente de Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos – Instituto de Tecnologia, UFRRJ. ales_teixeira@yahoo.com.br

2. Pesquisador Embrapa Agroindústria de Alimentos

3. Lacaqa/ Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento – Pedro Leopoldo/ MG

4. Discente do curso de Biologia da Universidade Estácio de Sá – Rio de Janeiro/ RJ

ABSTRACT: TEIXEIRA, A.S.; FREITAS-SILVA; GODÓY, R.L.O; VARGAS, E.A.; MARTINS, A. Analysis and quantification of Aflatoxins by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in samples of brazil nuts. It was developed analytical methodology that consists of an extraction based on the method advocated by RODRIGUEZ AMAYA; VALENTE SOARES (1989), followed by quantification of HPLC, to determine the aflatoxins AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ in samples of brazil nuts artificially contaminated. The samples were contaminated with 5.3 µg/ kg of AFG₁, 6.9µg/ kg of AFB₁, 4.8µg/ kg of AFG₂ and 5,0µg/ kg of AFB₂. The following parameters were determined to found validation for the method developed: Seletividade, Recovery, linearity of calibration curve, limit of detection, limit of quantification, Effect of Matrix, Ruggedness and Accuracy, through Standard Deviation Relating (RSDr).

Keywords: Liquid Chromatography, aflatoxins, Brazil nut.

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus*. São passíveis de causarem efeitos tóxicos em humanos e animais. Quatro aflatoxinas possuem importância toxicológica reconhecida: AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ (MALLMANN et al., 2006). A maioria dos problemas com os métodos analíticos para detecção e quantificação de aflatoxinas está relacionado aos interferentes presentes no extrato da amostra, requerendo extrações múltiplas e etapas de purificação. Vários métodos químicos para purificação dos extratos têm sido validados, incluindo a utilização de colunas de extração em fase sólida e colunas de imunoafinidade. Os procedimentos analíticos diferem nas etapas de extração, purificação, determinação e quantificação, e a escolha do método depende da disponibilidade de equipamentos e requisitos analíticos, tais como sensibilidade e tempo de análise. As técnicas atualmente mais usadas para a quantificação de micotoxinas são as cromatográficas, incluindo Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/MS). A mais simples é a CCD, porém os outros métodos têm maior sensibilidade e precisão (www.micotoxinas.com.br, 2006). O controle de micotoxinas é atualmente realizado através dos processos de controle de qualidade de alimentos e procedimentos reguladores. Mais de 50 países já estabeleceram níveis máximos de contaminação para aflatoxinas em alimentos e rações animais. A União Européia, por exemplo, introduziu um regulamento (EC, N^o1525/98), que fixa os níveis máximos permitidos de aflatoxinas em nozes, frutas secas, cereais e leite. Para a castanha-do-brasil, a União Européia fixou o nível máximo

de aflatoxinas de 4 µg/kg. Desta forma, foram objetivos deste trabalho: 1) Desenvolver uma metodologia para extração e quantificação de aflatoxinas em castanha-do-brasil através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e 2) Apresentar os seguintes parâmetros de validação encontrados para o método desenvolvido: Seletividade, Recuperação, Linearidade da Curva de Calibração, Limite de detecção, Limite de Quantificação, Efeito de Matriz, Robustez e Precisão, através do Desvio Padrão Relativo (RSDr).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: Provenientes de Tomé-açu, Pará (safra de 2007). Foram trituradas 1kg de castanhas sem casca adicionadas de 800mL de água destilada segundo metodologias preconizadas por Franca et al. (2006) e Banks et al. (2007). **Curva de Calibração:** O POOL) que deu origem aos 6 pontos da curva de calibração, foi preparada com os padrões individuais da Sigma-Aldrich, segundo AOAC (2000). A concentração dos padrões da curva de calibração variou de 0,002µg/mL à 0,16µg/mL aproximadamente. **Extração das Aflatoxinas:** Para a CCD utilizou-se o método de Soares e Rodriguez-Amaya (1989). Para a Metodologia modificada, pesou-se 25g de amostra, a mesma foi extraída com 7,5 mL de solução de KCl 4% e 67,5mL de metanol, misturando-se no blender em velocidade 4, por 5 minutos, adicionou-se 75 mL de CuSO₄ 10% e 7,5g de Celite. Após filtração foi retirada uma alíquota de 50mL, este extrato foi levado para um funil de separação, previamente adicionado de 50mL de água destilada, onde foi particionado duas vezes com 10mL de diclorometano. O extrato foi levado à secura em banho-maria a 40°C sob N₂. **Derivatização das Amostras:** Re-suspendeu-se a amostra com 600µL de acetonitrila e adicionou-se 1,2mL do agente derivatizante (35mL de Água Milli-Q: 5mL de Ácido Acético Glacial : 10mL Ácido trifluoracético), segundo AOAC (2005). O meio reacional foi mantido à 65°C por 9 min. **Derivatização dos Padrões:** Adicionou-se 300µL de cada pool da curva de calibração dos padrões de aflatoxinas a um frasco de derivatização e adicionou-se 600µL do agente derivatizante. A metodologia foi a mesma utilizada para as amostras. **Análise cromatográfica:** Utilizando o sistema CLAE-DFL, foram injetados 10µL tanto dos padrões quanto das amostras. A análise cromatográfica ocorreu no modo isocrático, tendo como fase Móvel: 1,5 metanol:1,5 acetonitrila:6,0 água Milli-Q, coluna: X-Terra da Waters, 150x4,6mm, partículas de 5µm –RP18, Detetor: Waters W2475 – Fluorescência Excitação: 360nm, Emissão: 440nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eluição das aflatoxinas AFG1, AFB1, AFG2 e AFB2 ocorre aos 4,3; 5,4, 7,5 e 10,2 minutos, com limites de detecção de 0,263; 0,345; 0,242 e 0,254 µg/kg de amostra, limites de quantificação de 0,790; 1,036; 0,725 e 0,763 µg/kg de amostra, coeficientes de recuperação de 107,89; 100,25; 86,63 e 93,42% e precisão (RSDr) de 9,0; 15,0; 12,0 e 15,0% , respectivamente. A curva de calibração apresentou coeficientes de correlação variando entre 0,9936 e 0,9997. As curvas da matriz adicionada do padrão (amostras contaminadas) apresentaram coeficientes de correlação variando entre 0,9829 e 0,9991 e através dos Testes F e T-Student, foi confirmado que as curvas são homogêneas e que a metodologia não sofre efeito de matriz. Mallmann et al. (1998) em um trabalho que preconiza uma purificação automatizada e quantificação por CLAE

para aflatoxinas em nozes, castanhas e frutos secos encontraram tempos de eluição para as aflatoxinas AFG1, AFB1, AFG2 e AFB2 de 5, 7, 12 e 17 minutos, além de limites de quantificação de 0,7; 0,4 ; 1,3 e 0,4 µg/kg de amostra e valores de recuperação de 101,2; 93,2; 58,9 e 63,2%, respectivamente. Mallmann et al. (1998) também obtiveram uma curva de calibração com coeficientes de correlação variando entre 0,9940 e 0,9991. A metodologia oficial da AOAC (AOAC 994.08) para quantificação de aflatoxinas em castanha-do-brasil, que é determinada por extração em fase sólida e quantificação por CLAE, indica valores de recuperação de 82,0; 117,0; 125,0 e 90,5% e precisão (RSDr) de 13,0; 9,0; 16,0 e 10%, respectivamente para, AFG1, AFB1, AFG2 e AFB2. As curvas de calibração foram submetidas ao teste de Cochran para avaliar o desvio bilateral das variâncias encontradas entre a concentração do padrão de aflatoxinas adicionado e a concentração determinada pelo método a um nível de significância de 5%. Este teste destina-se a avaliar a homogeneidade das variâncias, o que permite utilizar a curva de calibração obtida com um limite de confiança aceitável. Dessa forma, pôde-se afirmar que a curva de calibração tem comportamento homocedástico. Para avaliação da robustez do método foram realizadas alterações nos seguintes parâmetros: massa de amostra, velocidade de rotação do blender, volume de metanol e sulfato de cobre adicionados na extração, tempo de agitação no blender, volume de diclorometano e tempo de agitação utilizados na partição. Foram avaliados a média dos 8 resultados obtidos e o desvio padrão, que teve valor máximo de 1,8% entre estes resultados, concluindo-se que o método é robusto para as variações que foi submetido. Dessa forma, pode-se afirmar que a metodologia desenvolvida oferece resultados satisfatórios tanto na etapa de extração quanto na etapa de quantificação de aflatoxinas em castanha-do-brasil, uma vez que os parâmetros de validação levantados mostraram-se adequados quando comparados aos resultados das literaturas citadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. **Official Methods of Analysis**. 971.22 - Natural Toxins, 2000. Chapter 49, p.2-5.
- AOAC. **Off. Meth. Analysis**. 994.08 – Derivatization of Standards for aflatoxins, 2005. Chapter 49, p.25.
- BANKS, J.; HASNIP, S.; ANDERSON, S.; LUEBBE, W.; RECK, B. Rapid Immunoassays for aflatoxins in Brazil nuts. **XIIth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**. 2007.
- FRANCA, R. C. A.; SANTOS, E. A. ; CASTRO, L. ; VARGAS, E. A. . PREPARATION OF BRAZIL NUT REFERENCE MATERIALS. In: **Mycoglobe**, 2006, Villa Carlos Paz. Myco-globe, 2006.
- Legislação sobre micotoxinas. Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br>. Acesso em: 5 Abr. 2006.
- MALLMANN, C.A.; MURMANN, L.; KOWALSKI, C.H. ; et al. **Aflatoxinas em nozes e frutas secas comercializadas no Brasil**. Laboratório de Análises Micotoxicológicas – LAMIC, Universidade Federal de Santa Maria, RS. 2000.
- MALLMANN, C.A.; HICKMANN, J.L.; ALMEIDA, C. A. A.; DILKIN, P. Técnica automatizada de purificação e quantificação de Aflatoxinas. **XIII Jornada Acadêmica Integrada**. Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul. 1998.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; VALENTE SOARES, L.M. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin some Brazilian foods, utilizing a mult-toxin thin layer chromatographic method. **J. Assoc. Of Anal. Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.