

113. DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A E CITRININA EM ARROZ POR LC-ESI-MS/MS

Helen Hackbart¹; Carlos Alberto Fagundes²; Ednei Gilberto Primel³; Eliana Badiale-Furlong¹

Palavras-chave: ocratoxina A, citrinina, LC-MS.

INTRODUÇÃO

A ampla produção de arroz irrigado no sul do país, uma região que por suas características climáticas propicia condições para desenvolvimento fúngico é um aspecto motivador do interesse em avaliar o risco de manifestação de toxigenicidade. A combinação umidade elevada e temperaturas variáveis, comuns em determinadas épocas na região, desencadeiam um microambiente estressante para espécies toxigênicas de fungos que contaminam as sementes antes da colheita ou durante o armazenamento (Amato *et. al.*, 2002).

A Ocratoxina A (OTA), 7-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocumarina-7-L-b-fenil-alanina, é um composto toxigênico formado, principalmente, pelos fungos do gênero *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*, que contaminam alimentos e rações. A ingestão desta pode causar patologias, que afetam o fígado e os rins, denominados micotoxicoses (Sylos *et. al.*, 2003; Soriano *et. al.*, 2004).

A Citrinina (CIT), (3-R-trans)-4,6-dihidro-8-hidroxi-3,4,5-trimetil-6-oxo-3H-2-benzopirano-7-ácido carboxílico, é um metabólico fúngico conhecido desde 1931, quando foi isolada da *Penicillium citrinum* e, em seguida, da planta australiana *Crotolaria crispata*. A citrinina foi implicada em casos de nefropatia porcina e foi encontrada como contaminante de milho, arroz, trigo e outros cereais, e no apodrecimento de frutas (Heber *et. al.*, 2001; Shu & Lin, 2002; Meister, 2004). Sua ingestão pode, em longo prazo, causar problemas hepáticos e renais (Knasmuller *et al.*, 2004).

Estes compostos para serem quantificados e identificados necessitam de métodos que possuem sistemas de detecção capazes de quantificar traços, e neste caso métodos cromatográficos acoplados a detectores sensíveis a sinais de pequena magnitude (Caccianami *et. al.*, 2007, Furlong *et. al.*, 2003). Um ponto crítico na performance dos métodos, utilizados para identificar e quantificar estes compostos, é a etapa de preparação da amostra que consta de quarteamento, trituração e homogeneização, seguida de extração, identificação e quantificação.

Este trabalho teve como objetivo identificar a ocorrência de ocratoxina A e citrinina em amostras de arroz providas de campos experimentais da unidade de Cachoeirinha no sul do Rio Grande do Sul através de cromatografia líquida de alta eficiência empregando detector de espectrometria de massas.

MATERIAL E MÉTODOS

O arroz (*Oryza sativa*, L.) e seus derivados destinados ao consumo humano foram coletados em campos experimentais do IRGA unidade Cachoeirinha, cultivados em campos tratados e não tratados com fungicida. Após a colheita os grãos foram beneficiados separando em arroz com casca parboilizado tratado (triplicata) e não tratado (triplicata), arroz branco natural polido tratado (triplicata) e não tratado (triplicata), arroz com casca natural tratado (triplicata) e não tratado (triplicata), arroz polido parboilizado tratado (triplicata) e não tratado (triplicata), farelo parboilizado tratado (triplicata) e não tratado (triplicata), farelo branco natural polido tratado (triplicata) e não tratado (triplicata) num total de 36 amostras, as triplicatas das amostras variam de acordo com o local do campo de cultivo em relação à fonte de água. Também foram analisadas amostras de arroz armazenadas em silos durante o período de dezoito meses, arroz com casca (1) e farelo (1), totalizando 38 amostras.

¹Laboratório de Micotoxinas, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande CP 474, 96021-900 Rio Grande – RS, Brasil.

²Instituto Rio Grandense do Arroz, Unidade Cachoeirinha – RS.

³Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais, Universidade Federal do Rio Grande – RS.
dqmebf@furg.br

As amostras foram trituradas em moinho de facas, peneiradas na granulometria 32 tyler, o método de extração utilizado foi o QuEChERS adaptado para quantificação micotoxicológica (Hackbart & Badiale-Furlong, 2009). A detecção e quantificação das micotoxinas estudadas foram realizadas por cromatografia líquida utilizando Cromatógrafo Líquido *Alliance Separations Module 2695* (Waters, Milford, MA, USA) equipado com: Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de desgaseificação; Detector MS, Micromass[®] Quatro Micro[™] API (Waters, Inglaterra) com fonte API, utilizando o modo de ionização por *Electrospray*; atuando no modo MRM; Sistema de aquisição de dados através do *software* MassLynx e QuanLynx 4.1 (Waters, Inglaterra); Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments Ltda., Escócia).

As condições cromatográficas utilizadas para identificação simultânea da ocratoxina A e citrinina foram: coluna analítica coluna X Terra[®] MS C18 (3 × 50 mm de d.i.; 3,5 μ) (Milford, MA, Irland), fase móvel, Água Ultra Pura (Milli Q); Acetonitrila, 40:60 v/v, modo isocrático com vazão da fase móvel de 0,4 mL min⁻¹, detector de espectrometria de massas, alça de injeção de 10 μ L.

O limite de detecção (LOD) foi determinado pela menor concentração detectada de ambas micotoxinas em estudo, mas não necessariamente quantificada, e o limite de quantificação (LOQ) foi determinada através da equação utilizada por Ribani *et. al.*, 2004, onde LOQ = 3,33 x LOD. A curva analítica foi realizada na faixa de 5 a 500 μ g L⁻¹, num total de seis pontos e o registro do sinal resposta foi traçado com o auxílio do sistema de aquisição de dados, que fornece o coeficiente de determinação (r²) e equação da curva. Cada ponto foi injetado três vezes.

RESULTADO E DISCUSSÃO

O limite de detecção e quantificação foram de 2 e 7 μ g Kg⁻¹ para citrinina e 20 e 70 ng Kg⁻¹ para ocratoxina A, a curva analítica mostrou-se linear nos intervalos de 5 a 500 μ g L⁻¹ com coeficiente de determinação de 0,99, para as duas micotoxinas. As condições cromatográficas estabelecidos pelo detector de massas foram: voltagem do capilar 4,0 KV; voltagem do cone 30 KV; temperatura da fonte 120 °C; dessolvatação 350 °C; pressão do gás de colisão (argônio) 3,5 10³ bar; ionização negativa pra citrinina e positiva para ocratoxina A. Os parâmetros para cada micotoxina estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros estabelecidos para as duas micotoxinas em estudo.

<i>Parâmetros</i>	<i>LC-ESI-MS/MS</i>
Energia de Colisão (Ev)	12 (Citrinina) e 15 (Ocratoxina A)
Íon precursor	249 (Citrinina) e 404 (Ocratoxina A)
Íon produto	205 (Citrinina) e 239 (Ocratoxina A)

Os tempos de retenção encontrados foram: 5 e 2,5 minutos para OTA e CIT, respectivamente e tempo total de corrida, 7 minutos. As recuperações das micotoxinas em estudo ficaram em torno de 100% e RSD% (desvio padrão relativo) menores que 6%, mostrando-se dentro da faixa recomendada pela ANVISA 2003 de recuperação entre 70-120% e desvio padrão relativo menores que 20%.

Os resultados encontrados para análise de ocratoxina A e citrinina nas amostras de arroz em LC-MS encontram-se ilustradas na Tabela 2.

Tabela 2 – contaminação por OTA e CIT determinados por LC-MS.

<i>Amostra</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>Micotoxinas (μg Kg⁻¹)</i>	
		<i>OTA</i>	<i>CIT</i>
Arroz com casca parboilizado tratado 1	14,70	4	-
Arroz com casca parboilizado tratado 2	4,36	3	-
Arroz com casca parboilizado não tratado	0,88	3	-
Farelo parboilizado não tratado	6,17	-	129
Farelo de arroz branco armazenado em silo	3,49	-	12
Arroz natural com casca armazenado em silo	3,07	560	-

Do total das 38 amostras, quatro delas apresentaram contaminação com ocratoxina A, sendo que três estavam com níveis abaixo do limite estabelecido pela União Européia (5 μ g Kg⁻¹). Em uma única amostra o nível alcançou 560 μ g Kg⁻¹, estando 112 vezes acima do LMT estabelecido. Ainda, duas

delas apresentaram contaminação por citrinina nos níveis de 12 e 129 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e nenhuma amostra apresentou contaminação simultânea com ambas as micotoxinas.

CONCLUSÃO

A ocorrência de ocratoxina A e citrinina foi verificada em 16 % das amostras estando os teores detectados entre 3 e 560 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Destas amostras 8% apresentaram níveis de contaminação inferiores ao limite máximo aceitável pela Comunidade Européia. O nível máximo encontrado foi de 560 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para ocratoxina A encontrado em amostra de arroz natural com casca armazenado em silo e 129 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para citrinina na amostra de farelo arroz branco parboilizado não tratado, com fungicida, mostrando a necessidade de verificação de ocorrência destas micotoxinas em alimentos destinados ao consumo humano e animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATO, G. W.; CARVALHO, J. L. V.; SILVEIRA FILHO, S., *Arroz Parboilizado: Tecnologia Limpa, produto nobre. Ricardo Lenz Editor*, Porto Alegre-RS, 240 p., 2002.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.
- CACCIAMANI J. M., PERES G. L., GARDA-BUFFON J., BADIALE-FURLONG E. *Efeito dos tratamentos térmicos seco e úmido nos níveis de aflatoxina B₁ e ocratoxina A presentes em farelo e farinhas cereais*. **B. CEPPA**, 25(1):157-164, 2007.
- FURLONG, E. B.; NUNES, I. L.; MAGAGNI, G.; “Arroz comercializado na região sul do Brasil: Aspectos Micotoxicológicos e Microscópicos”; **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 23 (2): 190-194, 2003.
- HACKBART H.; BADIALE-FURLONG E. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, 2009.
- HEBER, D., LEMBERTAS, A., LU, Q. Y., BOWERMAN, S., & GO, V. L. W. *An analysis of nine proprietary Chinese red yeast rice dietary supplements: implications of variability in chemical profile and contents*. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, 7(2):133-139, 2001.
- KNASMULLER S.; CAVIN C.; CHAKRABORTY A.; DARROUDI F.; MAJER B.; HUBER W.; EHRLICH V.; “Structurally Related Mycotoxins Ochratoxin A, Ochratoxin B, and Citrinin Differ in Their Genotoxic Activities and in Their Mode of Action in Human-Derived Liver (Hep G2) Cells: Implications for Risk Assessment”; **Nutrition and Cancer**, 50(2): 190-197, 2004.
- MEISTER U.; “New method of citrinin determination by HPLC after polyamide column clean-up”; **Eur Food Res Technol**, 218: 394-399, 2004.
- RIBANI M., BOTTOLI C. B. G., COLLINS C. H., JARDIM I. C. S. F., MELO L. F. C., *Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos*. **Química Nova** 27(5):771-780, 2004
- SHU, P. Y., & LIN, C. H. *Simple and sensitive determination of citrinin in monascus by GC-selected ion monitoring mass spectrometry*. **Analytical Sciences**, 18(3):283-287, 2002.
- SORIANO J. M.; BLESÁ J.; BERRADA H.; MOLTÓ J. C.; MAÑES J.; “Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography”, **Journal of Chromatography A**, 1046: 127-131, 2004.
- SYLOS, C. M.; SIMIONATO, E. M. R. S.; ASTRAY, R. M.; “Occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in rice”; **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 62(2): 123-130, 2003.