

ESTRATÉGIA PARA MONITORAMENTO DE AFLATOXINAS EM ARROZ E SUAS FRAÇÕES DE BENEFICIAMENTO

Luciana Prietto¹, Paola Moraes², Rosana Basso Kraus³, Claudia Fetter⁴, Eliana Badiale-Furlong⁵

Palavras chave: procedimento, padronização, contaminantes.

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas (AFLAs) englobam um conjunto de compostos, de toxicidade decrescente da AFLAB₁, AFLAB₂, AFLAG₁ e AFLAG₂, produzidos por espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus*. Estes compostos ocorrem naturalmente em cereais, oleaginosas e especiarias, previamente contaminados por fungos que as produzem principalmente durante o armazenamento ou processamento. São associados a toxicose em humanos e animais de criação, cujos sintomas se caracterizam por vômitos, diarreia, perda de peso e câncer (ROCHA et al. 2014; SHEIBANI; ZAIN, 2011). Vários trabalhos têm relatado a presença dessas micotoxinas no arroz, embora seja em baixas concentrações, têm causado preocupações devido ao fato deste cereal ser um alimento de consumo diário para grande parte da população mundial (DORS, BIERHALS; BADIALE-FURLONG, 2011; MAJEED et al. 2013; ZHU et al. 2013). Para avaliar a contaminação por aflatoxinas na dieta dados confiáveis são necessários, desencadeando uma constante busca por métodos exequíveis e confiáveis que permitam a quantificação simultânea de aflatoxinas em alimentos de consumo diário. Para isso, se faz necessário a padronização dos métodos antes do uso de rotina, o que propicia o cumprimento das leis que estabelecem níveis aceitáveis para o consumo e garantem a inocuidade aos consumidores (ANVISA, 2003, 2011, INMETRO, 2003; RIBANI et al. 2004).

Neste trabalho o objetivo foi padronizar um método para extração e quantificação de aflatoxinas em arroz, farelo e casca, com geração mínima de resíduos e confiável para monitoramento de aflatoxinas, conforme a recomendação da RDC 7/11

MATERIAL E MÉTODOS

Extração das aflatoxinas pelo método de Soares; Rodrigues – Amaya (1989) modificado

Foram pesados 10 g de amostra e adicionados 60 mL de solução de metanol: cloreto de potássio 4% na proporção de 9:1. A mistura foi agitada em blender por 2 min e posteriormente filtrada. Foram transferidos 30 mL do filtrado para um erlenmeyer, onde foram adicionados 30 mL de sulfato de amônio 30%. Na mistura foram adicionados 1 cm³ de celite, agitado levemente e deixado em repouso por 5 min. Após filtração, 30 mL do extrato foram transferidos para um funil de separação, adicionados de 30 mL de água destilada e particionados 3 vezes com 10 mL de clorofórmio. Cada 10 mL da fração clorofórmica foram acondicionados em frascos âmbar com tampa de rosca e o conteúdo seco em banho-maria a 80 °C por 25 min (SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

Condições cromatográficas

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector de fluorescência (HPLC-FL) da marca Shimadzu (Quioto, Japão), constituído por um sistema de bombas (modelo LC-AT), forno, desgaseificador da fase móvel (modelo DGU), controlador

¹Engenheira de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Campus Carreiros – Avenida Itália, Km 08 – Caixa Postal 474 – 96.201-900 Rio Grande – RS – Brasil, lucianaprietto@gmail.com.

²Engenheira de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.

³Estudante de graduação Engenharia Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande

⁴Estudante de graduação Engenharia Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande

⁵Prof. Dr. Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande

(modelo CBM-20A), injetor manual com alça de amostragem de 20 µL (modelo 7725i) e detector de fluorescência (modelo FL – 10AXL). A coluna cromatográfica empregada era Nucleosil, C18 (10 cm x 4,6 mm, 3 µm, Bellefonte, PA, USA). Os solventes empregados na fase móvel foram: água ultrapura acidificada com ácido acético glacial 1%, acetonitrila e metanol na proporção 60:8:32 (v/v/v) desgaseificado em banho ultrassônico. A vazão da fase móvel foi de 0,4 mL/min e a temperatura da coluna de 45°C. Para quantificação das aflatoxinas o resíduo seco resultante da extração foi ressuspenso em 1 mL de fase móvel e injetado manualmente no cromatógrafo. Para controle do equipamento e tratamento dos resultados foi utilizado o software LC Solution (HACKBART, 2013).

Curva analítica e linearidade

Para construção da curva no HPLC-FL soluções padrões de aflatoxinas foram preparadas em triplicata nas concentrações de 0,3; 2,5; 5,0; 8,0; 10,5 ng/mL para as AFLAB₂ e AFLAG₂ e 1,0; 6,0; 12,0; 16,0; e 20,0 ng/mL para as AFLAB₁ e AFLAG₁.

Limite de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)

Foram determinados o LOD e o LOQ do HPLC-FL através da injeção de soluções padrão em ordem decrescente de concentração, considerando o LOD a concentração correspondente ao pico que representava 3 vezes o sinal/ruído da linha de base do equipamento. O LOQ foi estimado a partir da concentração que geraria pico com relação 10 vezes o sinal/ruído.

Recuperação

A recuperação ou exatidão do método, foi determinada através da porcentagem de recuperação do compostos de interesse em amostras fortificadas. Amostras de endosperma, farelo e casca foram fortificadas com três níveis de uma mistura de aflatoxinas. Foram deixadas em repouso por 24 h para completa evaporação do solvente e posteriormente foram submetidas a extração. A fortificação das amostras utilizadas no HPLC-FL foi de 2,5; 5,0 e 10,0 ng/g de AFLAs (B₁, B₂, G₁ e G₂) (ANVISA, 2003; RIBANI et al. 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Condições cromatográficas

Os parâmetros cromatográficos adotados para determinação em HPLC-FL permitiram separação das aflatoxinas, resultando em tempos de retenção de 12,5; 15,0; 18,5 e 22,4 min para AFLAG₂, AFLAG₁, AFLAB₂ e AFLAB₁, respectivamente e tempo total de corrida de 25 min, que não promovia o alargamento das bandas cromatográficas.

As curvas analíticas foram adequadas para quantificação das AFLAs em HPLC-FL, pois de acordo com a ANVISA (2003) e INMETRO (2003) os coeficientes de correlação (r) devem ser igual a 0,99 e superior a 0,90, respectivamente. As equações das curvas, os coeficientes de correlação e a linearidade estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Curvas analíticas, coeficientes de correlação e linearidade para cada aflatoxina em HPLC-FL

Micotoxinas	Curva Analítica (µg/mL)	r	Linearidade (ng/mL)
AFLAB ₁	$y = 1,51 \cdot 10^7 x - 12763,06$	0,9999	1 – 20
AFLAB ₂	$y = 2,06 \cdot 10^9 x - 36163,03$	0,9996	0,3 – 11
AFLAG ₁	$y = 7,39 \cdot 10^6 x - 10857,20$	0,9995	1 – 20
AFLAG ₂	$y = 3,79 \cdot 10^8 x - 24237,35$	0,9943	0,3 – 11

HPLC-FL – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência.

Os limites de detecção e quantificação proporcionado pelo HPLC-FL são adequados para determinação de aflatoxinas em arroz e suas frações, pois permitem a quantificação de cada analito dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira. De acordo com a RDC N.7 de 2011 são permitidos 5 µg/kg para as AFLAs (B₁, B₂, G₁ e G₂) em alimentos para consumo humano. Os valores determinados de LOD e LOQ, podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Limite de detecção e quantificação dos sistemas cromatográfico e do método

Aflatoxinas	Instrumento (ng/mL)		Método (µg/kg)	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
AFLAB ₁	0,4	1,2	0,1	0,3
AFLAB ₂	0,1	0,3	0,02	0,07
AFLAG ₁	0,4	1,2	0,1	0,3
AFLAG ₂	0,1	0,3	0,02	0,07

HPLC-FL – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência; LOD - Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação.

Um dos indicativos de mérito que fornece a qualidade de um método é dado pelos percentuais de recuperação do analito a partir de amostras fortificadas, podendo os resultados serem visualizados na Figura 1 (RIBANI et al. 2004).

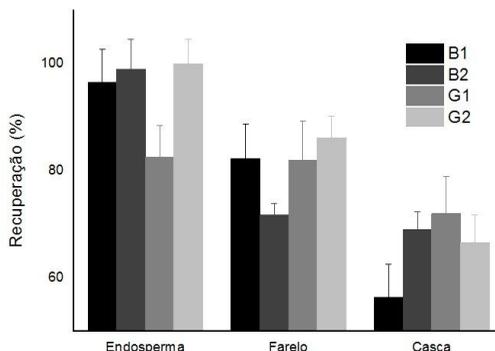


Figura 1 - Média das recuperações das aflatoxinas determinadas em HPLC-FL

Os maiores percentuais de recuperação foram observados para as amostras do endosperma polido, seguido de farelo e casca. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até ± 20%. Porém, devido à complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até ± 15% (RIBANI et al. 2004). Portanto, de acordo com os indicativos de eficiência recomendados pela ANVISA (2003), INMETRO (2003) e Ribani et al. (2004), o método foi adequados para quantificação de aflatoxinas. A menor recuperação observada na casca pode ter sido ocasionada pela complexidade da amostra que em função de sua riqueza em oxido de silício, associada a celulose pode absorver as micotoxinas (CARVALHO et al., 2012).

CONCLUSÃO

O método descrito por Soares e Rodrigues-Amaya (1989) para extração de aflatoxinas miniaturizado mostrou indicativos de mérito analítico adequados para monitoramento do cumprimento da legislação da ANVISA para estas micotoxinas nos derivados de arroz quando associado a quantificação em HPLC-FL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União** – Seção 1, n. 37, ISSN 1677-7042, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução – RDC N° 889, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, 2003.

CARVALHO, A. P. M. G.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E. Emprego de casca de arroz como adsorvente para execução de técnica de MSPD para determinar aflatoxinas em cebolas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n. 4, p. 630-637, 2012.

DORS, G. C.; BIERHALS, V. S.; BADIALE-FURLONG, E. Parboiled rice: chemical composition and the occurrence of mycotoxins. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.31, n.1, p. 172-177, 2011.

HACKBART, H. C. S., MACHADO, A. R., CHRIST-RIBEIRO, A., PRIETTO, L., BADIALE-FURLONG, E. Reduction of Aflatoxins by *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*. **Mycotoxin Research**. 30, 141- 149, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008. Revisão: 01, 2003.

MAJEED, S.; IQBAL, M.; ASI, M. R. IQBAL, S. Z. Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. **Journal of Cereal Science**, v. 58, p. 446 e 450, 2013.

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**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, M. E. B. FREIRE, F. C. O.; MAIA, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, p. 159 e 165, 2014.

SOARES, L. M. V. , RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 72:22-6, 1989.

ZAIN, M. E.; Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, n° 15, p. 129–144, 2011.

ZHU, Z.; LIU, G.; CHEN, Y.; CHENG, J. Assessment of aflatoxins in pigmented rice using a validated immunoaffinity column method with fluorescence HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 31, p. 252–258, 2013.