

## VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

**Carine Dall Agnol, Mônica Stremel Azevedo, Caroline Mognon, Maria Tereza Friedrich\***

*Laboratório de Cromatografia, Universidade de Passo Fundo.*

\*E-mail: friedrich@upf.br

### RESUMO

O milho é um cereal muito consumido pela população humana e animais, porém está propício a contaminação fúngica desde quando se encontra no campo, durante seu transporte e estocagem. A presença de fungos pode levar a produção de micotoxinas entre elas as aflatoxinas, que quando ingeridas pode provocar sérios problemas de saúde, pela sua característica carcinogênica, teratogênica e mutagênica, além de acarretar problemas econômicos. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece o uso da Instrução Normativa N° 9 de 24 de março de 2000 para a análise de aflatoxinas, entretanto é necessária a verificação da eficiência do método pelo laboratório. O presente trabalho teve como objetivo validar a metodologia estabelecida do MAPA quanto aos parâmetros de repetibilidade, reproduzibilidade, recuperação e limite de detecção para avaliar sua resposta frente à matriz milho. Os resultados das análises mostraram que o método é adequado para ser utilizado qualitativamente e os parâmetros validados demonstram que pode atender os limites estabelecidos pela legislação vigente para consumo animal.

Palavras-chave: milho, legislação, micotoxinas, ccd.

### 1 INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são micotoxinas produzidas por três espécies de fungos do gênero *Aspergillus sp*, *A.flavus*, *A.parasiticus* e *A. nomius*, que produzem, quando em condições adequadas, as toxinas AFB1, AFB2, AFG1, AFG2(Amaral, 2006). Os fungos podem se desenvolver nas mais diferentes matérias primas como milho, amendoim, arroz, trigo, nozes, semente de algodão, entre outros e podem ocorrer nas mais diferentes etapas; desde seu desenvolvimento no campo, colheita, transporte e armazenagem do cereal (Scussel, 1998).

A exposição a micotoxinas é uma questão de saúde, e isto se deve principalmente ao fato do consumo de alimentos contaminados. As micotoxinas são muito conhecidas pelas suas propriedades mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas, que ao serem ingeridas pela população podem levar ao desenvolvimento de câncer hepático (Amaral, 2006). Quando destinadas à alimentação animal, no caso da AFB1, pode ser transformado na micotoxina tipo M1, eliminada através do leite ou da urina animal (Prado, 1999).

As micotoxinas podem ser determinadas através de muitos métodos analíticos. A cromatografia em camada delgada (CCD) é conveniente para o isolamento de pequenas quantidades de frações de misturas, a qual se desenvolve com a fase móvel migrando através da fase estacionária por ação de capilaridade; nesta interação os solutos são arrastados com velocidades diferentes, formando manchas que indicam os componentes presentes na mistura (Aquino Neto).

A resolução-RDC nº274, de 15 de outubro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece os limites máximos admissíveis de concentração de aflatoxinas para alguns produtos de alimentação humana. A Portaria MA/SNAD/SFA Nº 07 de 09/11/88 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece máximo de Aflatoxinas em alimentos para consumo animal englobando matérias primas e rações. A IN nº 9 de 24 de março de 2000 do MAPA oficializa os Métodos Analíticos para determinação de aflatoxinas.

Esse trabalho teve como objetivo validar a metodologia estabelecida pelo MAPA quanto os parâmetros de recuperação, limite de detecção e reprodutibilidade. Foram adicionados na matriz milho não contaminada um padrão misto com a mistura de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, para após realizar a extração e avaliação dos resultados. A validação é muito importante pela necessidade de garantir o resultado analítico a fim de avaliar a qualidade dos alimentos comercializados para consumo humano e animal, evitando problemas econômicos e de saúde para consumidores e produtores.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Material e métodos

**Padrões analíticos:** Os padrões de micotoxinas foram adquiridos da marca Sigma Life Science, lote: 028K9805, validade: 30/09/2011. O preparo das soluções estoque e de uso foi realizado de acordo com a AOAC.

**Verificação da concentração das soluções padrão:** Preparou-se a partir da solução primária de 100 mg L<sup>-1</sup> uma solução de 10 mg L<sup>-1</sup> de cada aflatoxina e uma solução mista de 10 mg L<sup>-1</sup> contendo AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e a partir destas, preparou-se soluções de trabalho de 1 mg L<sup>-1</sup> em benzeno:acetonitrila (98:2). Após confirmou-se as concentrações por espectrofotômetro UV 2100 Spectrophotometer.

**Amostra:** Para fins de validação, foi adquirida em um silo, uma amostra de milho isenta de micotoxinas (matriz branca). A amostra foi moída, homogeneizada e estocada a -20 °C até o momento da análise.

**Tratamento das amostras:** Em uma alíquota de 50g de amostra de milho, a temperatura ambiente, foram adicionados 30 mL de cloreto de potássio 4% e agitado manualmente, após foi adicionado 270 mL de metanol e mantido sob agitação em um liquidificador por 5 min. A mistura foi filtrada em papel filtro qualitativo em seguida, 150 mL do filtrado foram transferidos para um bêquer e adicionados 150 mL de sulfato de amônio 30%, mantido em repouso até precipitação, acrescentados 10 g de celite sob agitação constante com bastão de vidro e, após precipitação, a solução foi filtrada em papel filtro qualitativo, onde recolheu-se 150 mL e transferiu-se para um funil de separação. No funil de separação adicionou-se 50 mL de hexano, e agitou-se por 1 minuto, aguardou-se a separação das fases e descartou-se a camada superior; foram adicionados 10 mL de clorofórmio, agitou-se vigorosamente por 2 minutos, coletou-se a camada de clorofórmio em um tubo de ensaio; extraiu-se novamente com 10 mL de clorofórmio adicionado ao funil de separação, agitou-se vigorosamente por 2 minutos, coletou-se a camada de clorofórmio no mesmo tubo de ensaio. Esta solução foi homogeneizada em agitador de tubos tipo vortex e filtrada em sulfato de sódio anidro, retirada uma alíquota de 10 mL, a qual foi evaporada em nitrogênio. Os resíduos obtidos foram

ressuspendidos com 200 µL benzeno: acetonitrila (98:2) e homogeneizados. As soluções padrão e as amostras foram aplicadas sobre uma placa de Sílica gel 60-Merck (cromatofolha de alumínio 20 x 20 cm, sílica gel 60). Antes da aplicação a placa foi deixada em estufa a 105 °C por uma hora. As soluções padrão e as amostras foram eluidas utilizando fase móvel de tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (60:30:10), sendo que a cuba foi saturada por uma hora antes da eluição da placa. A leitura da placa foi feita em cabine UV com comprimento de onda de 366 nm.

**Validação do método analítico:** A repetitibilidade foi avaliada através dos ensaios que realizados dez vezes pelo mesmo analista. A reprodutibilidade foi avaliada através de ensaios realizados dez vezes por dois analistas diferentes, nas mesmas condições de análise. A recuperação foi avaliada a partir da contaminação da matriz branca com uma solução de concentração conhecida e o limite de detecção foi avaliado através da análise da visualização da intensidade da fluorescência emitida pelas soluções utilizadas.

## 2.2 Resultados e discussão

**Padrões Analíticos:** Os padrões foram preparados em metanol conforme procedimento da AOAC, porém no momento da aplicação observou-se que quando se utiliza metanol como solvente, no preparo da solução padrão, quando a solução é aplicada sobre a placa esta se espalha rapidamente, possivelmente, pelo fato do metanol ter polaridade semelhante a da placa, não ficando adequado para análise. Utilizou-se então como solvente a mistura de benzeno/acetonitrila (98:2) a qual para aplicação da solução na placa se apresentou mais eficiente. Observou-se ainda que mesmo quando se utiliza como solvente benzeno/acetonitrila, não é possível deixar soluções estocadas, mesmo sobre congelamento, sendo necessário evaporar o solvente das soluções contendo os padrões a cada utilização e no momento da aplicação resuspendê-los com o volume de solvente necessário para a obtenção da concentração inicial, a fim de evitar a degradação e concentração da solução. Foi realizada confirmação da concentração das soluções padrão individuais em espectrofotômetro, no comprimento de onda 360 nm para B1 e 362 nm para B2, G1, G2, conforme metodologia da AOAC, estando de acordo com a concentração preparada.

**Tratamento das Amostras:** As amostras foram tratadas de acordo com a IN nº9 do MAPA, com a modificação as seguintes modificações: adicionou-se 10 g de celite, o solvente utilizado na purificação foi hexano, realizou-se a extração com clorofórmio e após o extrato foi filtrado em sulfato de sódio anidrido para a retirada da água. A fase móvel para eluição das amostras através da placa, indicada pelo MAPA, consiste na mistura de éter/metanol/água (96/3/1), entretanto esta fase móvel apresentou baixa resolução, não sendo possível verificar os Rf, além de ser uma solução muito instável. Utilizou-se então o recomendado pelo método da AOAC onde elui-se as placas com tolueno/acetato de etila/ ácido fórmico (60/30/10). Esta mistura de solventes se mostrou mais estável e com uma boa separação dos analitos. A aplicação na placa se deu a 4 cm da base com uma distância de 2 cm entre as amostras e fez-se uma eluição de 13 cm. A visualização da presença das aflatoxinas foi realizada em cabine UV no comprimento de onda 366 nm.

**Volume e concentração da solução aplicada na placa:** Foram testados os volumes de 10, 20, 30, 40,50 µL das soluções das amostras de nas concentrações de 6, 8,10, 20 µg kg<sup>-1</sup> e 30 µL para as amostras de concentração de 30 e 40 µg kg<sup>-1</sup>. Observou-se que com volume de 40 e 50 µL não foi possível verificar as manchas pela difusão ocorrida. Na aplicação de 30 µL com contaminação de 30 µg kg<sup>-1</sup> foi possível verificar a presença das quatro aflatoxinas e com 20 µL e 30 µL foi possível verificar B2 e G2 contaminadas na concentração de 10 µg kg<sup>-1</sup>.

**Parâmetros da Validação:** No estudo da repetibilidade foram analisadas 10 amostras contaminadas com uma solução padrão mista de aflatoxinas na concentração de 20 µg kg<sup>-1</sup>. Os resultados demonstraram repetitibilidade na avaliação da intensidade de fluorescência das diferentes amostras. Na avaliação da reprodutibilidade as análises foram feitas por dois analistas diferentes, utilizando uma amostra branca para cada batelada para a confirmação de que não houve contaminação durante o processo. Observou-se que a intensidade da fluorescência foi idêntica para as diferentes amostras analisadas por diferentes analistas, entretanto, observou-se também que ocorreu diferença nos valores de Rf o que pode ter ocorrido em função do tempo de saturação da cuba, a temperatura, o tempo da ativação da cromatoplaca, a maneira de aplicação e/ou a quantidade de placas eluidas na mesma fase móvel. Os limites de detecção encontrados foram de 30 µg kg<sup>-1</sup> para B1 e G1 com um volume de aplicação de 30 µL e 10 µg kg<sup>-1</sup> para B2 e G2 com aplicação de um volume de 30 µL. Os limites de detecção foram estabelecidos na menor quantidade da toxina visualizada na

cromatoplaca em um extrato de produto de milho (KAWASHIMA, 2006) com contaminação conhecida e um volume de aplicação de 30 µL.

### 3 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que é necessária aplicação de um maior volume de amostra na placa do que o volume recomendado pela metodologia do MAPA. A fase móvel utilizada na eluição da amostra sugerida pela AOAC apresenta melhores separações das aflatoxinas. Conforme a validação realizada o limite de detecção do método é de 30 µg kg<sup>-1</sup> para B1 e G1 e de 10 µg kg<sup>-1</sup> para B2 e G2. O método apresentou repetitibilidade adequada. Os parâmetros de tempo de saturação da cuba, temperatura, o tempo da ativação da cromatoplaca, a maneira de aplicação e a quantidade de placas eluidas na mesma fase móvel deverão ser objeto de mais estudos para avaliar se influenciam na reproduzibilidade dos resultados. A metodologia é adequada para ser utilizada nas análises de aflatoxinas para fins qualitativos por atender os limites estabelecidos pela legislação vigente quanto o máximo permitido para consumo animal.

### REFERÊNCIAS

AMARAL, K.A.S.; NASCIMENTO, G.B.; SEKIYAMA, B.L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI JUNIOR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2006, v.26, n.2, p.336-342.

AMARAL, K.A. S; MACHINSKI JUNIOR, M. Métodos analíticos para a determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados: uma revisão. **Revista Analytica**, São Paulo, n.24, agosto/setembro 2006.

AOAC (Association Official Analytical Chemists) **Official Methods of Analysis**. Cap.49 p.3-5, 2005.

AQUINO NETO, Francisco Radler de; NUNES, Denise da Silva e Souza. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciênciac, 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento, Instrução Normativa nº 9, de 24 de março de 2000.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 274, de outubro de 2002.

KAWASHIMA, L.M.; VALENTE SOARES, L.M. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina a e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.3, p.516- 521, jul./set. 2006.

OLIVEIRA, M.S.; PRADO, G.; JUNQUEIRA, R.G. Comparação das técnicas de cromatografia em camada delgada e ELISA na quantificação de aflatoxinas em amostras de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, 2000, v.20, n.3, p.369-374.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; SOARES, C.R.; VELOSO, T. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite consumido na cidade de Belo Horizonte-Minas Gerais/Brasil-agosto/98 a abril/99. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 1999, v.19, n.3, p.420- 423.

SCUSSEL, Vildes Maria. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.