

DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM AVEIA E TRIGO POR HPLC-DAD

**Fernanda Arnhold Pagnussatt^a, Helen Hackbart^b, Jaqueline Garda-Bufferon^a, Ednei
Gilberto Primel^b, Eliana Badiale-Furlong^{a*}**

^aPrograma de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, ^bPrograma de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande

**Email: dqmebf@furg.br*

RESUMO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos quando submetidos a condições ambientais desfavoráveis, estresse e desbalanço de nutrientes, podendo ocorrer no campo, colheita, transporte, processamento e armazenamento de aveia e trigo. O método de QuEchERS modificado foi adaptado no Laboratório de Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande para permitir uma extração rápida e eficiente das micotoxinas presentes em cereais e derivados. Uma variedade de métodos analíticos vem sendo utilizada e a cromatografia líquida de alta eficiência permite identificar e quantificar esses compostos tóxicos, separando-os de possíveis interferentes. O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar simultaneamente a ocorrência de micotoxinas em trigo e aveia através de HPLC empregando detector de arranjo de diodo (DAD). As amostras de aveia e trigo foram moídas e a extração das micotoxinas realizada pelo método de QuEchERS modificado para a identificação, separação e determinação das concentrações das micotoxinas. A aflatoxina B₂ (0,150 a 0,409 ppm), deoxinivalenol (0,030 a 0,159 ppm) e zearalenona (0,027 a 1,008 ppm) foram encontradas em todas as amostras de trigo analisadas. As amostras de aveia apresentaram contaminação natural por DON (0,459 a 2,769 ppm) e citrinina (0,078 a 0,153 ppm), indicando possíveis falhas tanto na etapa de pré como pós-colheita. A micotoxina deoxinivalenol, detectada em maior quantidade e frequência nas amostras de aveia do que nas de trigo, indica a necessidade de uma regulamentação na legislação e consequente controle pelos órgãos de inspeção sanitária.

Palavras-chave: cereais, compostos tóxicos, cromatografia líquida.

1 INTRODUÇÃO

O consumo de aveia e seus subprodutos aumentou nos últimos anos, impulsionado principalmente pelo melhor conhecimento sobre suas propriedades nutricionais e pelos benefícios que este cereal propicia à saúde (GUTKOSKI; PEDÓ, 2000). O trigo representa o maior mercado de farinhas para uso alimentar, necessitando de informações sobre colheita, secagem e armazenamento para a manutenção da qualidade do grão (ABITRIGO, 2009).

A contaminação dos cereais por fungos pode ocorrer no campo, durante e após a colheita, transporte, processamento e armazenamento do produto (CALDAS, SILVA OLIVEIRA, 2002). O estresse, desbalanço de nutrientes e condições ambientais desfavoráveis propiciam o desenvolvimento de micotoxinas por espécies toxigênicas. Elas são metabólitos secundários produzidos por esses microrganismos em alguma etapa do desenvolvimento fúngico, podendo ser tóxico ao homem (SWEENEY; DOBSON e, 1996) pelo fato de apresentarem efeitos carcinogênicos, neurotóxicos e teratogênicos (ATROSHI et al, 2002). Boas práticas de armazenagem, aplicação correta de fungicidas e processamento adequado são alternativas bastante discutidas para minimizar a presença destes contaminantes (SCHRÖDTER, 2004).

As espécies de *Fusarium* são patógenos de plantas, podendo produzir micotoxinas antes da colheita ou imediatamente após ela. Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* são mais comumente encontrados como contaminantes de produtos durante a secagem e o armazenamento, por isso denominados fungos de armazenamento (SWEENEY; DOBSON, 1998).

As principais micotoxinas relatadas como incidentes em alimentos ou co-produtos são aflatoxinas, tricotecenos, zearalenona e ocratoxinas. As aflatoxinas constituem um grupo de toxinas produzidas pelo fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e são identificadas como B₁, B₂, G₁ e G₂, sendo que a aflatoxina B₁ é considerada a mais tóxica (ATROSHI et al, 2002). Os tricotecenos são produzidos por espécies de *Fusarium* e ocorrem frequentemente em trigo, milho, cevada e aveia, sendo seus maiores representantes o deoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV) (HAZEL e PATEL, 2004). A zearalenona (ZEA) é uma toxina produzida especialmente pela espécie *Fusarium graminearum* enquanto que a ocratoxina A (OTA) é produzida por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* durante o armazenamento, sendo considerada nefrotóxica, hepatotóxica e teratogênica (ATROSHI et al, 2002).

Rodriguez-Amaya e Sabino (2002) relataram a ocorrência de micotoxinas por pesquisadores brasileiros no período entre 1991 e 2000 que permitiu verificar a elevada contaminação de grãos oleaginosos por aflatoxinas. A incidência de fumosinas em produtos derivados de milho também é um problema sério. As contaminações com ZEA, ocratoxinas e tricotecenos foram baixas. Em aveia não foram encontradas publicações referentes à contaminação de aveia produzida no Brasil, enquanto que em trigo foram detectados tricotecenos, ZEA e OTA. Badiale-Furlong et al. (1995), detectaram OTA em trigo (40 ppb) comercializado na zona sul do Rio Grande do Sul.

A determinação de micotoxinas envolve uma ou mais etapas de preparo da amostra utilizando técnicas de extração e concentração que visam isolar e concentrar os analitos de interesse a serem determinados. Essa é a etapa mais complexa do trabalho e torna-se um desafio para a obtenção de métodos rápidos, que utilizem menores quantidades de solventes orgânicos e com maior detectabilidade (MALDANER, 2007). Dentro desse contexto, o método de QuEChERS modificado (ANASTASSIADES et al, 2003) foi adaptado por Hackbart (2009) para permitir uma extração rápida e eficiente das micotoxinas presentes em arroz e derivados.

Uma variedade de métodos analíticos vem sendo utilizada e as recomendações de métodos oficiais enfatizam o emprego de multimétodos. A cromatografia líquida de alta eficiência permite identificar e quantificar esses compostos tóxicos, separando-os de possíveis interferentes (MAROCHI; VALENTE-SOARES; FURLANI, 1996), conseguindo enormes ganhos em eficiência na separação de compostos, nos limites de detecção e na redução do tempo de análise. Os detectores com comprimento de onda múltiplo, conhecido como arranjo de diodos (DAD), possibilitam a escolha de qualquer comprimento de onda dentro de sua faixa de operação (VALENTE-SOARES, 2006) e propiciam a confirmação da presença das micotoxinas através da observação do seu espectro.

O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar simultaneamente a ocorrência de micotoxinas em amostras de trigo e aveia extraídas pelo método QuEChERS por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) empregando detector de arranjo de diodo (DAD).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

Amostras de grãos de aveia (*Avena sativa* L.), cultivares UPFA Pampa, UPFA 20 Teixeirainha e UPF Temprana e de grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.), cultivares Ônix, Pampeano e Safira, safra 2008, foram utilizadas para a detecção e quantificação de micotoxinas nos laboratórios de Ciência de Alimentos e de Análise de Compostos Orgânicos e de Metais da Universidade Federal do Rio Grande.

As amostras foram moídas em moinho de facas e peneiradas à granulometria de 32 mesh. Para a homogeneidade da amostra analítica, utilizaram-se 7 g da farinha de 32 mesh e 3 g da farinha de granulometria maior, totalizando 10 g.

A extração das micotoxinas foi realizada em duplicata pelo método QuEChERS modificado, utilizando acetonitrila, sulfato de magnésio e celite sob agitação. Após, o extrato foi centrifugado e 3 mL do sobrenadante foi seco em nitrogênio e armazenado a temperatura de 5°C. O extrato foi resuspenso em metanol para identificação, separação e determinação das concentrações das micotoxinas em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) (Waters® 2996 bomba 600, sistema de aquisição de dados Empower Software).

As condições cromatográficas utilizadas foram coluna Synergi Fusion-RP 80 A, 250 x 4,6 mm 4 µ; fase móvel acetonitrila: água pH 3,0 (50:50 v/v), vazão fase móvel 1 mL min⁻¹; T_R 20 minutos, eluição em modo isocrático, com alça de injeção de 20 µL.

Os limites de detecção e linearidade da concentração versus área relativa de pico foram determinadas pela injeção de soluções padrões. O limite de detecção (LD) foi estabelecido pela injeção de concentrações de padrões que gerassem um sinal no detector três vezes superior ao sinal do ruído do equipamento. O limite de quantificação (LQ) foi determinado através da equação descrita por Ribani et al. (2004), onde LQ = 3x LD.

2.2 Resultados e Discussão

Para garantir uma amostragem que representasse o todo, utilizou-se uma proporção da amostra que passou em peneira de 32 mesh e da amostra que ficou retida porque a quantidade e representatividade são fatores importantes para uma correta interpretação dos resultados. De

acordo com Hackbart (2009), a granulometria das amostras pode influenciar na extração de interferentes, como açúcares e lipídios presentes no grão.

A partir da construção das curvas analíticas de micotoxinas foram obtidas as equações da reta e os coeficientes de correlação para cada uma delas em estudo. Os resultados estão apresentados na Tabela 1 e mostraram que todos os coeficientes de correlação são superiores a 0,9, portanto adequados para estimativa da concentração das micotoxinas nas amostras. Os limites de detecção não foram tão baixos quanto por camada delgada, mas tornam a estimativa mais precisa.

Tabela 1 Indicativos de performance HPLC-DAD: calibração da curva, equação da curva, coeficiente de determinação (R^2), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Micotoxinas	Calibração (ppm)	Equação	R^2	LD (ppm)	LQ (ppm)
Aflatoxina B ₁	0,75 a 4,0	$y = 7,56 \cdot 10^3 x + 4,75 \cdot 10^3$	0,996	0,25	0,75
Aflatoxina B ₂	0,375 a 1,8	$y = 1,57 \cdot 10^4 x + 2,08 \cdot 10^3$	0,992	0,125	0,375
Aflatoxina G ₁	0,75 a 1,8	$y = 1,57 \cdot 10^4 x + 2,08 \cdot 10^3$	0,992	0,25	0,75
Aflatoxina G ₂	0,375 a 1,8	$y = 9,91 \cdot 10^3 x + 2,21 \cdot 10^3$	0,995	0,125	0,375
Citrinina	1,5 a 7,5	$y = 8,00 \cdot 10^3 x + 3,54 \cdot 10^3$	0,994	0,5	1,5
Ocratoxina A	1,5 a 5	$y = 4,67 \cdot 10^4 x + 3,78 \cdot 10^3$	0,995	0,5	1,5
Zearalenona	0,18 a 0,9	$y = 4,67 \cdot 10^4 x + 3,78 \cdot 10^3$	0,996	0,06	0,18

A Tabela 2 apresenta os níveis e as frequências de incidência de micotoxinas nas amostras analisadas, com média das triplicatas.

A umidade e a temperatura são dois fatores críticos para o crescimento de fungos e conseqüente produção de micotoxinas. Fatores geográficos e condições inadequadas de armazenamento também interferem na produção destes metabólitos secundários (BULLERMAN, SCHOEREDER e PARK, 1984). Neste caso foram detectadas e quantificadas micotoxinas produzidas tanto por fungos de campo, como deoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA) quanto de armazenamento, como aflatoxina B₁, B₂ e G₁, ocratoxina A (OTA) e citrinina. O perfil micotoxicológico pode estar relacionado a região de cultivo das amostras, que, nos últimos anos, vem apresentando oscilações climáticas intensas,

ocasionando com isso situações estressantes para a micota, levando a ocorrência de compostos tóxicos produzidos por fungos específicos.

Tabela 2 Quantificação de micotoxinas nas amostras de trigo e aveia

Micotoxina ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Trigo				Aveia	
	Ônix	Pampeano	Safira	Temprana	Pampa	Teixeirinha
Afla B ₁	-	0,135	0,054	-	0,078	-
Afla B ₂	0,150	0,201	0,429	0,465	0,081	-
Afla G ₂	-	-	-	1,644	-	1,101
DON	0,147	0,030	0,159	2,769	0,459	2,715
ZEA	0,027	0,198	1,008	-	3,588	-
OTA	-	-	-	-	-	2,298
CIT	0,054	-	0,063	0,078	0,153	0,141

Os tricotecenos e a ZEA são produzidos quando o fungo é submetido a condições de estresse ainda durante o desenvolvimento do grão. No Brasil, a ZEA já foi encontrada em cereais e em aveia em flocos (OLIVEIRA et al., 2002). A ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina indicam problemas pós-colheita, sendo necessário um controle mais efetivo de umidade e temperatura nos silos, com práticas de armazenamento adequadas.

Nas amostras de trigo Ônix e Pampeano não foi possível obter os valores de aflatoxina B₁ e citrinina porque ambas encontram-se abaixo do limite de quantificação do HPLC-DAD. A aflatoxina B₂, DON e ZEA foram encontradas em todas as amostras analisadas. A aflatoxina B₁ foi encontrada nos cultivares Pampeano e Safira, enquanto que citrinina nos cultivares Ônix e Safira. Em estudo realizado por Lori et al (2003) em trigo argentino, 48 amostras de um total de 145 estavam contaminadas com DON na quantidade de até 8 ppm ($\mu\text{g g}^{-1}$). A OTA não foi detectada em nenhuma das amostras de trigo.

Todas as amostras de aveia analisadas apresentaram contaminação natural por DON e citrinina. Em levantamento realizado na Alemanha, de 67 amostras de grãos de aveia produzidas, 3 estavam contaminadas com DON, em quantidades entre 0,018 a 0,025 ppm ($\mu\text{g g}^{-1}$) (SCHOLLENBERGER et al, 2005). A aveia UPFA Pampa apresentou co-ocorrência com as micotoxinas aflatoxina B₁ (0,078 ppm) e ZEA (3,588 ppm), enquanto que UPF A 20 Teixeira com OTA (2,298 ppm). Scudamore et al. (1999), examinando grãos de aveia, trigo e cevada detectaram em 21% das amostras a presença de OTA, com maior frequência em

cevada do que em trigo e aveia. Em aveia, ocratoxinas, citrinina, tricotecenos e zearalenona causam os maiores problemas quanto a contaminação natural por micotoxinas (SCUSSEL, 2002).

No Brasil, de acordo com a Resolução RDC nº 274, da ANVISA de 16/10/2002, alimentos para o consumo humano estão sujeitos ao limite máximo para aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) de $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ (ppm). Ao observar a ocorrência das aflatoxinas B_1 e B_2 , notou-se que os valores encontrados estão acima do estabelecido para todas as aflatoxinas, de acordo com legislação vigente. Na Europa, os limites para aflatoxina B_1 e OTA em cereais são de $0,02$ e $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ (ppm), respectivamente, o que inviabiliza a exportação de grãos com este perfil de contaminação (MAPA, 2007).

Embora a legislação brasileira contemple apenas as aflatoxinas, pesquisas confirmando a presença e os níveis de contaminação estão sendo financiadas e discutidas para que ocorra o desenvolvimento de legislação que possibilite uma segurança alimentar e níveis de qualidade de grão para exportação (MAPA, 2007).

3 CONCLUSÃO

O método Quechers modificado por Anastassiades et al (2003) e adaptado por Hackbart et al (2008) para a extração de micotoxinas foi aplicável a amostras de aveia e trigo.

A utilização de cromatografia líquida de alta eficiência permitiu a identificação e quantificação de todas as micotoxinas testadas.

Os cultivares de trigo apresentaram contaminação com aflatoxina B_2 (0,150 a 0,429 ppm) e os teores detectados foram superiores ao permitido pela legislação (0,02 ppm). Em aveia foi detectada a presença de aflatoxina B_2 em 66% das amostras, com teores entre 0,081 a 0,465 ppm.

Todos os cereais analisados apresentaram contaminação com DON, sendo os valores das amostras de aveia cerca de 18 vezes maiores quando comparados aos trigos. Esses resultados sugerem a necessidade de uma legislação específica para outras micotoxinas, além das aflatoxinas, em estudos que visam a prevenção da ocorrência e inspeção pelos órgãos de vigilância sanitária.

REFERÊNCIAS

ABITRIGO- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO TRIGO. **Catálogo de empresas e dirigentes da indústria brasileira de moagem de trigo**. Disponível em: <<http://www.abitrigo.com.br>>. Acesso em: 29 mar. 2009.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. **Journal AOAC International**, v. 86, p.412, 2003.

ATROSHI, F.; RIZZO, A.; WETERMACK, T.; ALI-VEHMAS, T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, v. 180, p. 151-167, 2002.

BADIALE-FURLONG, E.; VALENTE SOARES, L.; LASCA, C. C.; KOHARA, E. Y. Mycotoxin and fungi in wheat stored in elevators in State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, n. 5, p. 683-688, 1995.

BRASIL. Resolução – RDC nº 274, de 16 de outubro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. 2002. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 25 mar.2009.

BULLERMAN, L. B.; SCHOEREDER, L. L. & PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 8, p. 637-646, 1984.

CALDAS, E.D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n.3, p. 319-323, 2002.

GUTKOSKI, L. C.; PEDO, I. **Aveia: composição química, valor nutricional e processamento**. São Paulo: Varela, 2000. 96 p.

HACKBART, H.; DEMOLINER, A.; SILVEIRA, C.; DORS, G.; PRIMEL, E.G.; BADIALE-FURLONG, E. **Aplicação de HPLC-DAD e LC-ESI/MS na determinação de micotoxinas em arroz**. 12º Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, 2008.

HACKBART, H. **Ocratoxina A e Citrinina em arroz: um estudo de metodologia, ocorrência e relação com variáveis abióticas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, em andamento. 2009.

HAZEL, C.M.; PATEL, S. Influence of processing on trichothecene levels. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 51-59, 2004.

LORI, G.A., SISTERNA, M.N., HAIDUKOWSKI, M., RIZZO, I. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. **Microbiol. Res.**, v. 158, p. 29-35, 2003.

MALDANER, L. **Desenvolvimento e validação de método para determinação de agrotóxicos em grãos de soja**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.

MAROCHI, M.A.; VALENTE-SOARES, L.M.; FURLANI, R.P.Z. Testes confirmatórios para tricotecenos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n.2, p. 17-20, 1996.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroindústria Tropical. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Documento 110, 2007.

OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; VELOSO, T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades de Minas Gerais no período de 1998-2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n. 1, p. 1-6, 2002.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, Campinas, v. 33, p. 1-11, 2002.

SCHOLLENBERGER, B- M., MULLER, H.M., RUFLE, M., SUCHY, S., PLANCK, DROCHNER, W. Survey of Fusarium toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 317– 32, 2005 b.

SCHRÖDTER, R. Influence of harvest and storage conditions on trichothecenes levels in various cereals. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 47-49, 2004.

SCUSSEL, V.M. Fungos em grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. **Armazenagem de grãos**. Campinas: IBG, 2002. Capítulo 9.1, p.675-804.

SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, n. 43, p. 141-158, 1998.

VALENTE-SOARES, L. **Curso Básico de Instrumentação para analistas de alimentos e fármacos**. São Paulo: Editora Manole, v,1, 337 p. 2006.