

EFEITO DA GRANULOMETRIA NA EXTRAÇÃO DA OCRATOXINA A E CITRININA EM ARROZ

**Fernanda Arnhold Pagnussatt^a, Helen Hackbart^a, Clarice Leite^a, Ednei Gilberto Primel^b,
Eliana Badiale-Furlong^{a*}**

*^aLaboratório de Micotoxinas, ^bLaboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais, Escola de
Química e Alimentos Universidade Federal do Rio Grande*

**Email: dqmebf@furg.br*

RESUMO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, que podem em quantidade traços, contaminar alimentos e rações. A ocorrência dos fungos e a produção de micotoxinas são aleatórias e em vista da toxicidade diferencial das micotoxinas é necessário determiná-las separadamente. Uma variedade de métodos analíticos vem sendo utilizada para extrair, identificar e quantificar esses compostos e as recomendações de órgãos oficiais enfatiza o emprego de multimétodos. Um ponto crítico na performance destes é a etapa de preparação da amostra onde trituração e homogeneização são fundamentais. Neste trabalho o objetivo foi comparar diferentes granulometrias, na performance da extração de ocratoxina A e citrinina, em amostras de arroz. A cromatografia líquida de alta eficiência empregando detectores de arranjo de diodo foi utilizada para identificar e quantificar simultaneamente as duas micotoxinas. As condições de separação utilizadas foram coluna Synergi Fusion-RP 80A (250×4,6 mm, 4 μ), vazão da fase móvel (1,0 mL/min) modo isocrático, o tempo necessário para separar as duas micotoxinas (20 minutos). Os resultados demonstram que em relação à concentração de padrão e sinal a correlação foi igual a $r^2 = 0,99$, o limite de detecção e quantificação foram 0,5 ppm e 1,5 ppm para ambas. Os resultados demonstram que as diferentes granulometrias, testadas em amostra de arroz, afetam a recuperação na extração das micotoxinas estudadas, sendo as mais afetadas as de menores tiler, isto é, de menor superfície de contato. As melhores recuperações foram de 118% (tiler 35) e 131,6% (tiler 42) para ocratoxina A e citrinina, respectivamente.

Palavras-chave: ocratoxina A, citrinina, granulometria.

1 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- β -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, denominadas 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 et al., 2002; MEISTER et al., 2004). Sua ingestão pode, em longo prazo, causar problemas hepáticos e renais (LESZKOVIEZ et al., 2007; 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 (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 o efeito da superfície de contato no processo de extração, estudando sete diferentes granulomentrias, em amostra de arroz, através de cromatografia líquida de alta eficiência empregando detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

Foi realizada uma amostragem de arroz branco comercial, adquirido em supermercado local, considerando as regras de amostragem da ABNT para conferir representatividade à esta.

As amostras foram trituradas em moinho de facas, peneiradas até obter-se 100 g nas granulometrias: 14, 24, 28, 32, 35, 42 e >42 tiler. A avaliação do efeito da granulometria na concentração micotoxicológica nas amostras foi realizado via contaminação artificial com 400 ppb e 600 ppb para citrinina e ocratoxina A, respectivamente, os experimentos foram realizados em duplicata.

O método de extração utilizado foi o QuEChERS (ANASTASSIADES et al., 2003) com modificação para quantificação micotoxicologica (HACKBART et al., 2009). A detecção e quantificação das micotoxinas estudadas foi realizada por cromatografia líquida utilizando HPLC Waters 2996, Photodiode Array Detector, 600 Controller[®], coluna Synergi Fusion-RP 80 Å, phenomenex[®] (250 x 4,60 mm, 4 µ) com sistema de aquisição de dado Empower Software. As condições cromatográficas utilizadas identificação simultânea da Ocratoxina A e Citrinina, foram: coluna analítica Synergi Fusion-RP 80 Å, phenomenex[®] (250 x 4,60 mm, 4µ), fase móvel, Água Ultra Pura (Milli Q); Acetonitrila, ambas acidificadas a pH 3,0 com ácido fosfórico 50:50 v/v, modo isocrático com vazão da fase móvel de 1,0 mL min⁻¹, detector de arranjo de diodo, 254 nm, alça de injeção de 20 µL.

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 0,5 a 7,5 ppm, num total de seis pontos e o registro do sinal resposta foi traçado com o auxílio do sistema de aquisição de dados Empower Software, que fornece o coeficiente de determinação (r^2) e equação da curva. Cada ponto foi injetado três vezes.

2.2 Resultados e Discussão

Os limites de detecção e quantificação foram de 0,5 ppm e 1,5 ppm respectivamente, a curva analítica mostrou-se linear nos intervalos de 1,5 a 7,5 ppm com coeficiente de determinação de 0,99, para as duas micotoxinas, ilustrada na Figura 1.

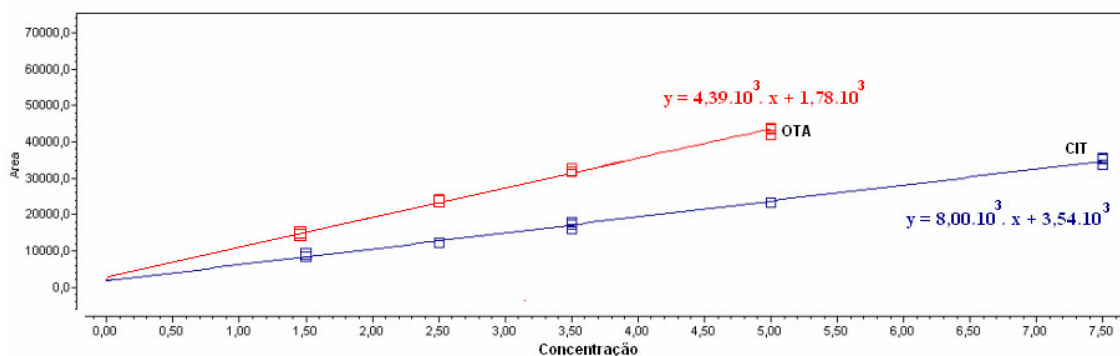


Figura 1. Curva analítica das micotoxinas estudadas e suas equações.

Os tempos de retenção encontrados foram: 14,085 e 11,251 minutos para OTA e CIT, respectivamente e tempo total de corrida, 20 minutos. As recuperações das micotoxinas em estudo extraídas com diferentes granulometrias estão na Tabela 1, ficando em torno de 100% e RSD% (desvio padrão relativo) menor que 6%, mostrando-se dentro da faixa recomendada pelo INMETRO e ANVISA 2003 de recuperação entre 70-120% e desvio padrão relativo menores que 20%.

Tabela 1. Resultados da granulometria expressos em recuperação e desvio padrão relativo.

Granulometria	Recuperação OTA (%)	RSD _{OTA} (%)	Recuperação CIT (%)	RSD _{CIT} (%)
14	97,75 ^d	0,84	83,5 ^e	2,83
24	96,75 ^f	2,27	97,5 ^d	4,68
28	103,75 ^c	0,12	106,1 ^c	2,04
32	110,25 ^b	0,02	115,5 ^b	1,12
35	118 ^a	1,8	96,75 ^d	5,56
42	111,75 ^b	0,69	131,6 ^a	0,61
> 42	77,5 ^e	0,98	76,87 ^f	4,00

O tiler 42 obteve na extração um extrato escuro devido a quantidade de interferentes também extraídos como açúcares e lipídios presentes no grão, levando a uma recuperação superior a 100% o que não é recomendável por gerar possibilidade de detectar falsos positivos para ambas micotoxinas.

Para citrinina a distribuição amostral foi considerada normal e homocedástica e para a ocratoxina A normal e heterocedástica demonstrando variabilidade igual para as granulometrias 24 e 32, assim de acordo com a utilização da ANOVA (Box 1953) onde $p > 0,05$ não houve diferença significativa entre esses resultados.

3 CONCLUSÃO

A granulometria das amostras afeta a recuperação das micotoxinas estudadas, sendo as mais afetadas as de menores tiler, isto é, de menor superfície de contato. A melhor recuperação da ocratoxina foi em tiler 35 e citrinina em tiler 42, com valores de 118% e 131,6%.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA A.; ALABURDA J.; RUVIERI V.; SABINO M.; **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 65(3): 171-175, 2006.

ANASTASSIADES M., LEHOTAY S. J., STAJNBAHER D., SCHENCK F. J.; **J. AOAC Int.** 86: 412, 2003.

ANVISA, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. 2003.

BADIALE-FURLONG, E. Manejo operacional para micotoxinas em arroz. In: ELIAS, M. C.; LORINI, I. Qualidade de arroz na pós-colheita. Anais do II Simpósio Sul – Brasileiro de qualidade de arroz. Pelotas: Abrapós/UFPeL, 2005, p 660.

BOX, G. E. P. Non-normality and pasto n very once. **Biometrika** 40:318-335. 1953.

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.; **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.

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.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2003

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.

LESZKOWIEZ A. P.; NGUYEN M. TTRAN T. L.; **Food Chemistry**, 105: 42-47, 2007.

LEHOTAY S. J., KOK A., HIEMSTRA M., BODEGRAVEN P.; **J. AOAC Int.** 88(2): 595, 2005.

MEISTER U.; “New method of citrinin determination by HPLC after polyamide column clean-up”; **Eur Food Res Technol**, 218: 394-399, 2004.

RIBANI, M. et al. 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.