

Área: Engenharia de Alimentos

ESTUDO ANALÍTICO DA DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS NO FARELO DE ARROZ

**Paola Moraes*, Luciana Prietto, Helen Hackbart, Carolina Graça, Anelise Ribeiro,
Eliana Badiale Furlong**

*Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Escola de Química e
Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS*

**E-mail: psmeafurg@hotmail.com*

RESUMO – As aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) são compostos produzidos pelo metabolismo secundário de fungos do genero *Aspergillus*, que quando ingeridas podem causar danos a saúde, incluindo a carcinogenicidade. Um dos maiores problemas na avaliação desses compostos esta no uso de métodos complexos, demorados, envolvendo equipamentos sofisticados, não podendo assim ser realizado na maioria dos laboratórios de análise de alimentos. Neste trabalho foi avaliada a eficiência de dois métodos de extração de aflatoxinas do farelo de arroz, a fim de propor uma metodologia que diminua consumo de solventes, volume de resíduos e exposição do analista. Os métodos diferiram quanto ao solvente extrator (metanol e acetonitrila) e etapas de limpeza (sulfado de amonio e sulfato de magnésio). Os extratos foram cromatografados em placas DC-Fertigfolien Alugram Xtra Sil G, e a intensidade de fluorescencia determinada com auxilio do programa ImageJ. A recuperação das micotoxinas foi dada como resposta da eficiência do método de extração. O método que usou acetonitrila em duas extrações consecutivas, e limpeza com sulfato de magnésio, apresentou a maior percentual de recuperação, variando de 95 a 104% para G₁ e B₁, e limite de quantificação de 3 (AFB₁), 1(AFB₂), 2(AFG₁) e 1,5(AFG₂) µg/kg.

Palavras-chave: Micotoxinas, Metodologia, Cromatografia camada delgada, Image J..

1 INTRODUÇÃO

O farelo de arroz é um subproduto resultante do beneficiamento do arroz. Representa de 5 a 8% do peso do grão e é considerado fonte de nutrientes, proteínas e fibras (WALTER, MARCHEZAN e AVILA, 2008). O arroz pode ser contaminado por diferentes espécies fúngicas, tanto no campo, quanto durante o armazenameno, entre essas por espécies produtoras de micotoxinas. As infestações por micro-organismos se inicia pelas porções mais externas do grão, sendo a casca e o farelo as porções de maior risco de contaminação (HEIDTMANN-BENVENUTI et al., 2012).

Em geral as micotoxinas são compostos tóxicos, estáveis que atuam em baixas concentrações. Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas representam a principal classe, seus efeitos tóxicos incluem atividade imunossupressora, mutagênica, teratogênica e hepatocarcinogênica, sendo produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. A aflatoxina AFB₁ foi classificada pela “International Agency of Research on Cancer” no grupo 1 como provável carcinógeno, e é o mais potente hepatocarcinógeno descrito em mamíferos (IARC, 1993).

Dada a importância do conhecimento das concentrações de cada micotoxina para avaliação de risco de dano à saúde, e da possibilidade de ocorrência simultânea, são necessários métodos confiáveis e capazes de detectar quantidades na ordem de ppb. Dessa forma, o monitoramento de aflatoxinas requer método simples, confiáveis e executáveis em laboratórios com infraestrutura básica.

Nesse trabalho foi avaliados dois procedimentos de extração de aflatoxinas, a fim de otimizar uma metodologia que além de minimizar o volume de solventes gastos na extração, minimize a quantidade de resíduos, o tempo de exposição dos analistas e propicie a detecção confiável usando cromatografia de camada delgada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS

As amostras de farelo de arroz foram cedidas por empresa beneficiadora localizada na região sul do RS. As amostras foram peneiradas (32 mesh), acondicionadas em sacos plásticos sob refrigeração.

PREPARO DOS PADRÕES

Foi preparada uma solução estoque contendo a mistura das Aflatoxinas na concentração de 5 µg/mL (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) em benzeno: acetonitrila (98:2 v/v). A concentração exata foi determinada em espectrofotômetro Varian Cary/100 UV-Visible (El 98033579). Duas soluções padrão de trabalho foram preparadas, uma na concentração de 1,8 ng/mL, utilizada para preparo da curva padrão, e outra de 0,2 µg/mL utilizada na fortificação das amostras de farelo.

EXTRAÇÃO DAS AFLATOXINAS

A extração das Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foi realizada de acordo com metodologia descrito por Romero-Gonzalez et al (2011) (Procedimento 1) e por Soares e Rodriguez – Amaya (1989) (Procedimento 2), as duas metodologias foram modificadas, minimizando o gasto com solventes de extração e massa de amostra. O procedimento 1 também foi realizado empregando duas extrações consecutivas (procedimento 3).

Procedimento 1

Foram pesadas 5,0000g de amostra e adicionados em 3mL de água e 12mL de acetonitrila. A mistura foi agitada em vórtex por 2 min e em banho ultrassônico por 30min, com sequente adição de 2g de sulfato de

magnésio e 0,2g de celite. Após foi agitado manualmente por 1 min e centrifugado por 10min a 2280 G. Por fim foram recolhidos 3mL da do sobrenadante que foi seco em banho-maria a 60°C para posterior quantificação.

Procedimento 2

Foram pesadas 7,0000g de amostra em tubo de centrifuga com sequente adição de 4mL de cloreto de potássio 4% e 36mL de metanol. Em seguida agitado em vortex por 2 min e em banho ultrassônico por 30min. Após filtração, foram recolhidos 20mL do filtrado com posterior adição de 20mL de sulfato de amônio 30% e 3g de celite. A mistura foi agitada manualmente por 1 min, deixada em repouso por 5 min, filtrada. Da mistura foram transferidos 20mL para funil de separação com adição de 20mL de H₂O. Foram feitas três partições com 10mL de clorofórmio, sendo o extrato seco em rotaevaporador.

Os resíduos obtidos foram ressuspensos em 200µL de benzeno e aplicados em placa cromatográfica.

CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

As aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) foram separadas e identificadas por cromatografia de camada delgada. Foi utilizado placas cromatográficas DC- Fertigfolien Alugram Xtra Sil G, 20 x 20 cm. A aflatoxinas foram eluídas em cuba cromatográfica com uma mistura de tolueno, acetato de etila e ácido fórmico na proporção de 3:2:1. Após a placa foi seca em estufa a 105°C por 10 min e examinada a intensidade de fluorescência em câmara sob luz UV a 365nm. A quantificação das aflatoxinas foi realizada com o auxílio do programa computacional Image J.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO MÉTODO

Linearidade

A linearidade foi avaliada dentro da faixa de 0,1 e 20 ng das AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente. A partir da intensidade de fluorescência medida pelo ImageJ, foi plotado curvas de calibrações, onde o eixo das abscissas representa a massa de micotoxinas e o eixo das ordenadas a intensidade de fluorescência. Foi utilizado o coeficiente de correlação linear (R²) como indicador da reta (RIBANI, 2004).

Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

O LOD e o LOQ das placas foram estimados através da curva analítica por detecção visual. O LOD foi considerado o ponto em que as toxinas podiam ser visualizadas de forma inequívoca por dois analistas treinados. O LOQ foi considerado o LOD x 3 (RIBANI, 2004). Foram também estimados os LOD e LOQ do método.

Exatidão

A exatidão dos procedimentos foi avaliada pela determinação da recuperação das aflatoxinas, após a fortificação das amostras com concentrações de padrão de micotoxinas 4 vezes superior ao limite de quantificação. (RIBANI, 2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a curva padrão de aflatoxinas em JPEG, utilizando cromatografia de camada delgada (CCD).

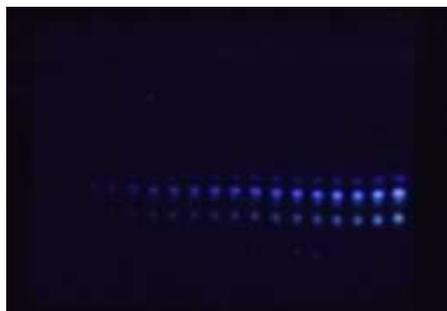


Figura 1. Curva padrão de aflatoxinas em cromatografia de camada delgada.

A partir de detecção visual, foram determinados os limites de detecção e quantificação e foram estimados os Rf (fator de retenção) para as Aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) que estão com, O LOD e o LOQ das micotoxinas na Tabela 1

Tabela 1. Propriedades cromatográficas das aflatoxinas em placas sob luz UV

Parâmetros	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
LD* (ng)	0,9	0,3	0,6	0,45
LQ** (ng)	3	1	2	1,5
Rf***	0,42	0,38	0,34	0,27

*LD: Limite de detecção; **LQ:Limite de quantificação; ***Rf: Fator de retenção

Com auxílio do programa ImageJ foi possível medir a intensidade de fluorescência gerada por cada uma das aflatoxinas em suas diferentes concentrações. A linearidade apresentada por cada aflatoxina pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2. Linearidade da relação concentração de aflatoxinas e fluorescência detectada pelo ImageJ

Micotoxinas	Curva analítica (ng)	Coefficientes de correlação (R ²)
Aflatoxina B ₁	$y = 2,0671x + 25,441$	0,9902
Aflatoxina B ₂	$y = 11,577x + 34,945$	0,9924
Aflatoxina G ₁	$y = 3,2764x + 28,503$	0,9918
Aflatoxina G ₂	$y = 6,5846x + 22,309$	0,9929

Na Figura 2 esta representado os percentuais de recuperação das aflatoxinas nos diferentes procedimentos de extração testados.

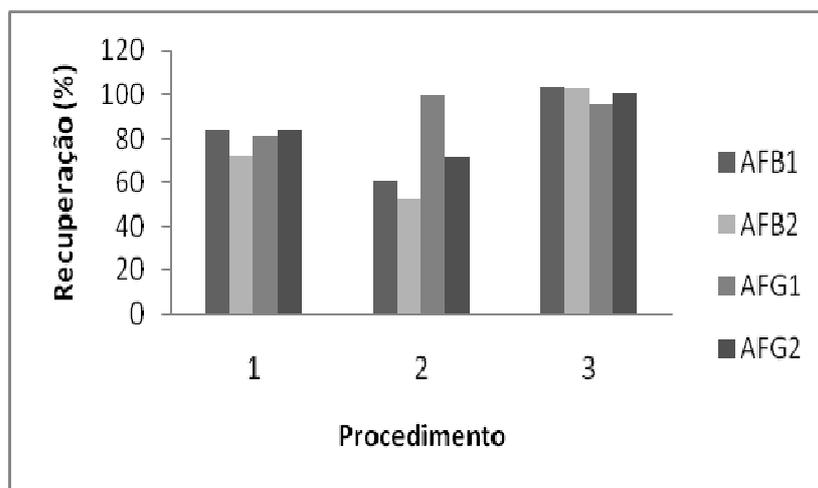


Figura 2. Recuperação (%) de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ por diferentes procedimentos de extração

Entre os procedimentos testados, a extração em duas etapas com acetonitrila (procedimento3) apresentou maior percentual de recuperação para as aflatoxinas, variando de 95 a 104% para AFG₁ e AFB₁, respectivamente. De acordo com Ribani et al. (2004) recuperações entre 70 e 120% são aceitáveis para determinação de traços em métodos cromatográficos. Os limites de quantificação foram de 3(AFB₁), 1(AFB₂), 2(AFG₁) e 1,5 (AFG₂) µg/kg, todos abaixo de 5µg/kg, valor estabelecido pela legislação brasileira (ANVISA, 2011).

O procedimento 3, mostrou-se eficiente para extração de aflatoxinas do farelo de arroz, empregando menores volumes de solventes e gerando menores resíduos, quando comparado a métodos convencionais descritos na literatura. Além disso, a técnica de cromatografia de camada delgada empregada para detecção e quantificação tornou o método mais econômico, podendo ser aplicado em laboratórios com infra-estrutura simples, a fim de avaliar a qualidade de alimentos produzidos em diferentes regiões do país.

4 CONCLUSÃO

Entre os procedimentos avaliados para extração de aflatoxinas, o maior percentual de recuperação foi obtido pela utilização da combinação dos solventes de extração água e acetonitrila. Os percentuais de recuperação foram de 104, 103, 95 e 101 % para as AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, respectivamente, empregando detecção por cromatografia de camada delgada.

6 REFERÊNCIAS

ANVISA (2011) – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 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.

FURLONG, E. B.; SOARES, L. A.; VIEIRA, A. P.; DADALT, G. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.58, n.2, p.105-111, 1999.

HACKBART, H.C.S.; PRIETTO, L.; PRIMEL, E.G.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Simultaneous extraction and detection of ochratoxin A and Citrinin in rice. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.23, n.1, 2012.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando quechers e hplc/uv-fl. **Química Nova**, v. XY, p. 1-6, 2012.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins, Vol. 56, p. 245, 1993.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; MOREIRA, A. P. A.; LIMA, A. S.; SOUZA, R. A. E ALVES, M. C. Determinação de aflatoxina B1 em pimenta (*Piper nigrum* L.) e Orégano (*Origanum vulgare* L.) por cromatografia em camada delgada e densitometria. **Química Nova**, V. 31, N. 3, 514-517, 2008.

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.

ROMERO-GONZALEZ, R.; FREICH A. G.; VIDAL, J. L. M.; CPRESTES, O. D.; GRIO. Simultaneous determination of pesticides biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction and ultra high performase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, 1477-1485, 2011.

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. **J Assoc Off Anal Chem**, 72:22-6, 1989.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.1184-1192, 2008.