



4º Simpósio de
Segurança Alimentar

Retorno às origens

29 a 31 de maio de 2012

FAURGS | Gramado - RS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO E CONSTRUÇÃO DE CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DE AFLATOXINAS EM AMENDOIM POR UPLC-ESI-QTOF-MS

J.S. Barrabin¹, R.G. Borguini², J.S. Rosa², D.F.Schulz³, R.L.O. Godoy²

1-Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, CEP: 23890-000. Seropédica, RJ, Brasil. e-mail: (jbarrabin@terra.com.br)

2- Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501 - Guaratiba. Rio de Janeiro, RJ - Brasil - CEP 23020-470. Fone: (21) 3622-9600 - Fax: (21) 3622-9713 – e-mail: (renata@ctaa.embrapa.br)

3 – Departamento de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos, 149 bloco A – 7º andar, Cidade Universitária, RJ, Brasil. CEP 21941-909.

RESUMO - As aflatoxinas são micotoxinas encontradas em diversos produtos vegetais, como milho, amendoim, castanhas e frutas secas e causam hepatotoxicidade, tendo sido relacionadas inclusive ao câncer de fígado. O objetivo deste trabalho foi o de construir uma curva de calibração a ser usada em um método de análise de aflatoxinas por UPLC-ESI-qTOF-MS. O qTOF trabalha com massa exata, apresenta maior especificidade em relação a outras técnicas de menor resolução e evita que se obtenha uma resposta falso-positiva. Além disso, possui a capacidade de exibir outros compostos que não somente os compostos alvo como no caso dos triplo-quadrupólos, tais como produtos de degradação ou outros contaminantes, apresentando mais informação em uma única análise e permitindo uma avaliação mais completa da qualidade do alimento.

ABSTRACT – Aflatoxins are mycotoxins found in many plant products such as corn, peanuts, nuts and dried fruits and cause hepatotoxicity, having been linked inclusive to liver cancer. The objective of this study was to build a calibration curve to be used on UPLC-ESI-MS-qTOF aflatoxins analysis. The q-TOF is a high resolution instrument that presents accurate mass data, has higher specificity in comparison to other low resolution techniques and avoids false-positive responses. Furthermore, it has the ability to display other compounds which not only the target compounds as in the case of triple quadrupoles, such as degradation products and other contaminants. It displays more information in a single analysis which allows better evaluation of food quality.

PALAVRAS-CHAVE: aflatoxinas, amendoim, espectrometria de massas, Q-TOF

KEYWORDS: aflatoxins, peanuts, mass spectrometry, Q-TOF

1. INTRODUÇÃO

Uma das principais ameaças à segurança dos alimentos é a presença de contaminantes naturais como as micotoxinas, metabólitos tóxicos secundários produzidos por fungos. As micotoxinas mais estudadas atualmente são as aflatoxinas, produzidas por algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. São classificadas pela Organização Mundial da Saúde como carcinogênicas para humanos e a ingestão de



4º Simpósio de Segurança Alimentar

Retorno às origens

29 a 31 de maio de 2012

FAURGS | Gramado - RS

alimentos com elas contaminados causa diversos danos à saúde, variando de toxicidades agudas com lesões de fígado ao carcinoma hepatocelular. Esta preocupação levou muitos países a estabelecerem na legislação limites máximos aceitáveis de aflatoxinas em diferentes classes de alimentos. A legislação da União Européia é a mais rígida entre todos os países, preconizando um limite máximo de $2\mu\text{g}/\text{kg}$ para aflatoxina B_1 e de $4\mu\text{g}/\text{kg}$ para a soma das 4 principais aflatoxinas encontradas nos vegetais – B_1 , B_2 , G_1 e G_2 . No Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o limite máximo estabelecido para a soma destas 4 aflatoxinas em amendoim é de $20\mu\text{g}/\text{kg}$. A via de contaminação dos fungos produtores de aflatoxinas é pelo solo e o amendoim, por ser um cultivo rasteiro, é o alimento no qual mais frequentemente são encontradas contaminações por aflatoxinas. A incidência de contaminação do amendoim brasileiro é alta e fica evidente quando levamos em consideração o número de alertas rápidos que o Brasil vem sofrendo pela União Europeia em relação a este produto. No ano de 2009 foram 29 notificações devido à presença de aflatoxinas e no ano de 2010 foram 21, inserindo o Brasil na lista de países sujeitos à controle especial (RASFF, 2010). Para que se possa controlar o desenvolvimento destas toxinas é preciso que hajam metodologias seguras para analisar sua presença e quantificá-las. Métodos usuais como CCD – Cromatografia de Camada Delgada e CLAE-DF – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência requerem etapas de extração, purificação e derivatização da amostra previamente à análise, consumindo muito tempo e submetendo o analista a uma maior exposição a solventes tóxicos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma curva de calibração para quantificação de aflatoxinas em amendoim por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência e detecção por Espectrometria de Massas, que devido às já conhecidas vantagens de alta seletividade e sensibilidade possibilitam a redução das etapas de pré-tratamento da amostra, representando ganho de tempo e eficiência. O qTOF trabalha com massa exata, apresenta maior especificidade em relação a outras técnicas de menor resolução e evita que se obtenha uma resposta falso-positiva (Williamson e Bartlett, 2007). Além disso, possui a capacidade de exibir outros compostos que não somente os compostos alvo como no caso dos triplo-quadrupólos, tais como produtos de degradação ou outros contaminantes, apresentando mais informação em uma única análise e permitindo uma avaliação qualitativa mais completa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A separação cromatográfica foi desenvolvida em um cromatógrafo líquido de ultra eficiência e utilizou-se uma coluna C18, 2.1 x 50mm, $1.7\mu\text{m}$ a 40°C . Foi utilizada fase móvel a um fluxo de $0,45\mu\text{L}/\text{min}$ em modo de eluição gradiente constituída de acetonitrila 0,1% ácido fórmico 0,5mM formiato de amônio (A) e água 0,1% ácido fórmico 0,5mM formiato de amônio (B). O gradiente começa com 5% de A atingindo 95% aos 4 minutos.

Para detecção espectrométrica utilizou-se ionização por eletrospray no modo positivo, analisador em modo V, faixa de aquisição do TOF de 50 a 600m/z com scanning a cada 0,1s. Utilizou-se o gás de dessolvatação a temperatura de 500°C e fluxo 750L/h, o gás do cone a fluxo 50L/h, a temperatura da fonte a 150°C , a voltagem do cone 38, a voltagem de capilar 3kV, a voltagem do cone de extração 7.0 e a energia de colisão do trap 6.0. Utilizou-se uma função MS com energia de colisão do transfer a 4,0 para promover maior sensibilidade na obtenção do sinal das aflatoxinas ionizadas positivamente (m/z 313, 315, 329, 331) que foram utilizadas para quantificação e montagem da curva. A esta função MS, foi alternada uma outra função MS de alta energia de colisão (MS^E) utilizando transfer a 20, 25 e 30 para fragmentação e confirmação da identidade dos compostos. A voltagem de operação do detector MCP foi de 1650.

Foram construídas 2 curvas de calibração para cada aflatoxina, sendo uma com padrão em solvente e outra com padrão em matriz amendoim, para verificar a influência da matriz na quantificação dos compostos. Cada ponto de concentração foi feito em triplicata, nas faixas de concentração de 2 a $14\mu\text{g}/\text{kg}$ para as aflatoxinas B_1 e G_1 e 0,495 a 4,465 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para as aflatoxinas B_2 e G_2 .



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tempos de retenção das aflatoxinas G₂, G₁, B₂ e B₁ foram de 2,64, 2,81, 2,82 e 2,99 minutos, respectivamente. Observou-se a coeluição das aflatoxinas B₂ e G₁, contudo o qTOF apresenta recurso para que se extraíam cromatogramas referentes especificamente à razão m/z das substâncias de interesse, sendo altamente seletivo mesmo sem a completa separação cromatográfica.

Com a função MS^E conseguiu-se identificar de 3 a 4 fragmentos para cada aflatoxina, que foram posteriormente confirmados por MSMS, conforme mostrado na figura 1. Na análise da aflatoxina B₁ conseguiu-se identificar os seguintes 5 fragmentos: m/z 298, 285, 269, 241 e 213. Na análise da aflatoxina B₂, identificou-se os m/z 287, 259 e 243. Para a G₁, os m/z 311, 283, 243, 227, 215 e 200. Finalmente, para a G₂, os fragmentos m/z 313, 303, 285, 275, 257, 245, e 217. As m/z das moléculas protonadas e dos fragmentos foram adquiridas com erro menor do que 0,02Da, valor muito menor do que o obtido com detectores de massa de menor resolução como triplo-quadrupólos.

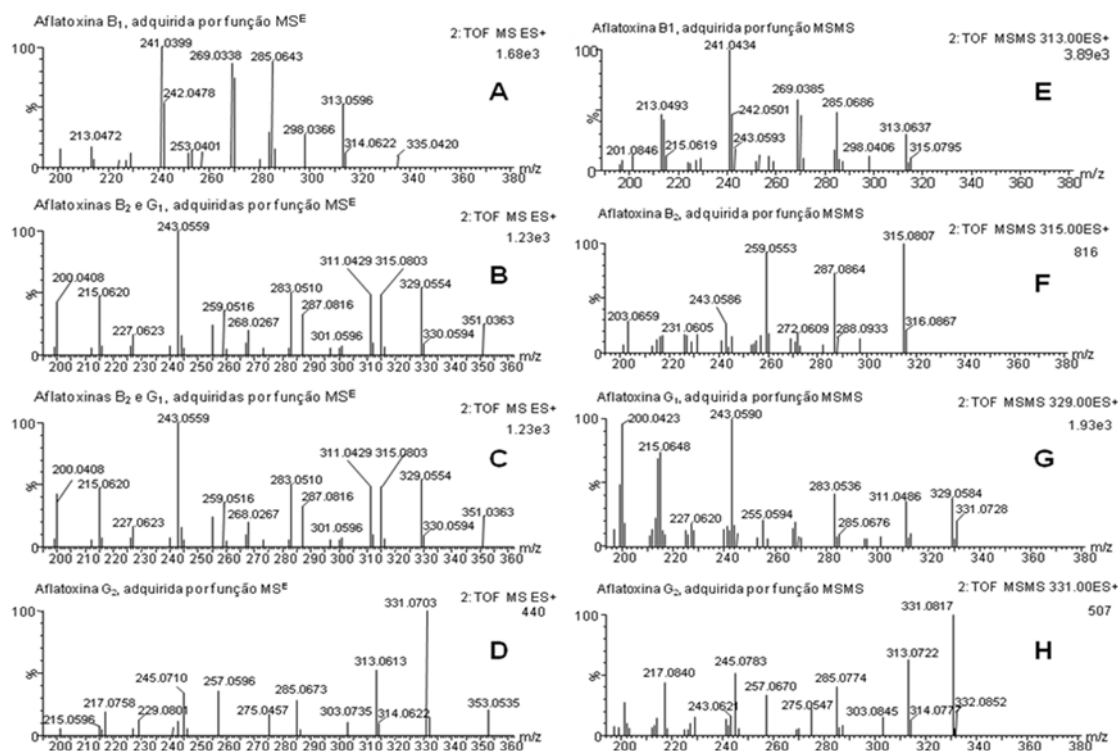


Figura 1 - Espectros MS^E das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (A, B, C e D) - os espectros B e C são iguais e contêm os fragmentos sobrepostos das aflatoxinas B₂ e G₁, que coeluem - e espectros MSMS das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (E, F, G e H respectivamente).

As curvas obtidas apresentaram boa linearidade, representada pelo quadrado do coeficiente de correlação (R²), tendo sido todos superiores a 0,9, com exceção da curva da aflatoxina B₁ em amendoim. Os R² para B₁, B₂, G₁ e G₂ em solvente foram de 0,987, 0,992, 0,988 e 0,992 respectivamente. Já os R² para B₁, B₂, G₁ e G₂ em amendoim foram de 0,867, 0,990, 0,946 e 0,979 respectivamente. Conforme mostra a figura 2, a comparação entre as curvas obtidas em solvente e em amendoim evidenciaram a presença de efeito matriz de supressão de sinal nas aflatoxinas. Tais resultados estão em concordância com os obtidos por Garcia-Reyes *et al.* (2006), que trabalharam em uma metodologia analítica de herbicidas em azeite utilizando ionização por eletrospray. Componentes da matriz podem competir pela ionização dos compostos,

dificultando assim sua detecção. Os autores destacam ainda que a ocorrência de efeito-matriz em LC-MS já é conhecida.

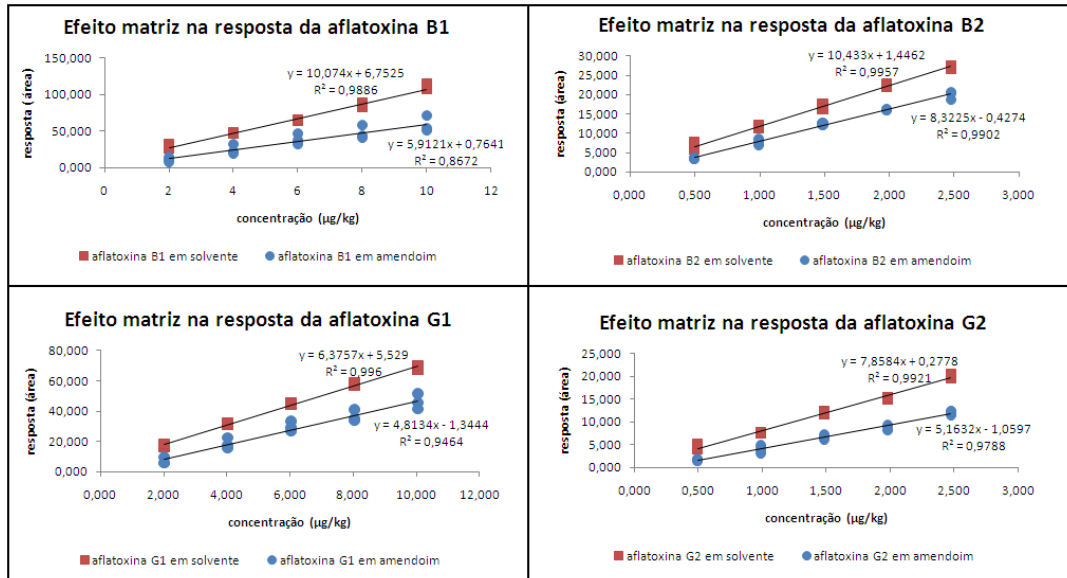


Figura 2 - Comparação entre curvas construídas com padrão de aflatoxinas em solvente e em amendoim.

4. CONCLUSÃO

A obtenção de 3 a 5 fragmentos adquiridos com erro menor do que 0,02Da valor muito menor do que o obtido com detectores de massa de menor resolução como triplo-quadrupólos, permitiu a confirmação inequívoca dos analitos. A análise desenvolvida foi suscetível à variações de efeito matriz, portanto as curvas obtidas com padrão em amendoim se apresentaram mais adequadas para quantificação. Foram obtidas curvas de calibração com boa linearidade para as aflatoxinas B₂, G₁ e G₂, representada pelos quadrados do coeficiente de correlação, superiores a 0,9.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GARCIA-REYES, J. F.; FERRER, C.; THURMAN, E. M.; FERNANDEZ-ALBA, A. R.; FERRER, I. Analysis of herbicides in olive oil by Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* v. 54, p. 6493-6500, 2006.

RASFF. The Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Report, 2010.

WILLIAMSON, L. N.; BARTLETT, M. G. *Biomedical. Chromatography.*, v. 21, p. 567-576. 2007