

Determinação de Aflatoxinas em Milho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência - CLAE/DF

*Izabela Miranda de Castro¹
Marianna Ramos dos Anjos²*

Introdução

O milho é um cereal relevante tanto para alimentação animal quanto humana. A importância sócio-econômica do milho como ingrediente essencial da dieta evidencia-se pela participação em mais de 500 produtos alimentícios. O milho sobressai em relação a outros cereais pela sua maior diversidade de aplicações, que vai desde planta forrageira/ração a alimento humano. Adicionalmente, a distribuição global, baixo custo, elevado número de cultivares e as suas propriedades biológicas e industriais geram centenas de derivados. Cerca de 70% da produção mundial se destina à alimentação humana e animal. Do milho produzido no Brasil, entre 70% a 80% se destina às indústrias de ração, enquanto que o consumo humano absorve apenas 1,6% do total produzido. Enfim, o consumo industrial, excetuando o setor de rações animais, mantém um consumo anual médio ao redor de 4,5 milhões de toneladas (BRUM; LUFT, 2008).

O Brasil foi, em 2007, o terceiro produtor mundial de milho, com um total de cerca de 51 milhões de

toneladas, seguindo os Estados Unidos e a China (IBGE, 2008). Devido às condições climáticas e ao atual cenário econômico favorável, a cultura do milho está em expansão nas principais regiões produtoras, sul, sudeste e centro-oeste do Brasil. No entanto, o milho é um dos cultivos mais predispostos à contaminação por fungos produtores de micotoxinas, que pode ocorrer no campo, antes e após a colheita, e também durante o transporte e armazenamento do produto. As micotoxinas são metabólitos fúngicos secundários altamente tóxicos e carcinogênicos, que provocam grandes perdas econômicas na cadeia produtiva agrícola, representando, atualmente, risco potencial para o agronegócio brasileiro e para a saúde humana e animal. A crescente preocupação com a inocuidade e a qualidade dos produtos agrícolas tem levado os países importadores a serem mais exigentes quanto à segurança dos alimentos. A presença desses contaminantes representa, atualmente, um dos principais entraves técnicos à comercialização dos produtos agrícolas no mercado internacional.

As aflatoxinas foram descobertas há mais de 30 anos e têm sido tema de muitas pesquisas. Em condições

¹ Química, Ph.D. em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, imcastro@ctaa.embrapa.br

² Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, marianna@ctaa.embrapa.br

apropriadas, *Aspergillus flavus* ou *A. parasiticus* podem se desenvolver no milho, amendoim, castanha-do-brasil e muitos outros produtos de base, podendo produzir as micotoxinas. Essas são metabólitos de elevado potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico, que interferem no funcionamento do sistema de imunidade. Elas ocorrem e exercem seus efeitos tóxicos em quantidades extremamente pequenas nos alimentos. Por isso, a identificação e avaliação quantitativa geralmente requerem amostragem específica, além de métodos de extração e detecção sensíveis e eficientes.

O método aqui proposto, implantado para a matriz milho, envolve a extração das aflatoxinas (AFs) – B1, G1, B2 e G2 - com solvente orgânico seguida de purificação através de colunas de purificação Mycosep® e derivatização com ácido trifluoroacético (WILSON; ROMER, 1991). A quantificação é feita por padronização externa em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência - CLAE/DF.

Metodologia Desenvolvida

Análise das aflatoxinas

PREPARO DA AMOSTRA

As amostras foram trituradas em processador de alimentos até homogeneização completa do produto.

EXTRAÇÃO

Foram pesadas cerca de 25g da amostra em recipiente de vidraria própria do homogeneizador/dispersor de alta rotação Omni Mixer®, onde se adicionou 100mL da mistura acetonitrila (grau HPLC): água 84:16 (v/v). A mistura foi agitada por 3 minutos a 800rpm e depois filtrada em papel quantitativo de filtração rápida.

PURIFICAÇÃO

Foram transferidos 8mL do filtrado para o tubo de vidro próprio da coluna Mycosep®. A coluna foi introduzida no tubo com a solução. Foram retirados 4mL do eluato e evaporados à secura, sob atmosfera de nitrogênio, em banho-maria a 40°C. A seguir, ressuspendeu-se com 0,6mL de acetonitrila e transferiu-se para frasco onde foram adicionados 1,2mL do agente derivatizante.

DERIVATIZAÇÃO DAS AFLATOXINAS

As aflatoxinas foram convertidas em seus

hemiacetais pela mistura derivatizante - água: ácido trifluoroacético: ácido acético 7:2:1 (v/v) com aquecimento a 65°C por 8,5min. A seguir esta solução foi analisada no sistema CLAE/DF.

Quantificação usando o sistema CLAE/DF

CURVA PADRÃO

Partindo de uma solução padrão certificada contendo as quatro aflatoxinas, foram preparadas cinco soluções com concentrações diferentes das AFs para os sete pontos da curva. Uma alíquota de 0,3mL da cada solução foi transferida para os frascos de derivatização onde foram acrescentados 0,6mL do agente derivatizante, sendo aquecido a 65°C por 8,5min. As concentrações nas curvas de calibração para B1 e G1 variam na faixa de 0,0004 a 0,0203µg/mL, enquanto que para B2 e G2 situam-se de 0,0002 a 0,0103 µg/mL.

SISTEMA CLAE/DF

Utilizou-se um sistema cromatográfico Waters, composto de amostrador automático WAT717, bomba quaternária WAT600, degasser, forno de colunas a 40°C e detector de fluorescência WAT2475.

PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

Coluna cromatográfica - X Terra® RP 18, (4,6 x 150mm; 5µm);

Fase móvel - fase ternária composta por acetonitrila, metanol e água ultra-pura com fluxo de 1,2mL/min em modo gradiente de acordo com o quadro abaixo:

Tempo (min)	% Acetonitrila	% Metanol	% Água
0	10	10	80
3	25	15	60
8	25	15	60
8,1	10	10	80

Detector de fluorescência: é ex- 360nm e é em- 440nm;

Volume de injeção - 10µL.

ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

Foram conduzidos ensaios de recuperação em três níveis de contaminação com sete replicatas em cada nível. Nestas análises foram usados os procedimentos descritos para o modo de preparo e extração seguidos da quantificação pelo sistema CLAE-DF. Os níveis de contaminação aplicados estão descritos a seguir:

1) nível 1: para as aflatoxinas B1 e G1 - 2,0µg/kg e

para B2 e G2 - 1,0µg/kg;

2) nível 2: para as aflatoxinas B1 e G1 - 4,0µg/kg e para B2 e G2 - 2,0µg/kg;

3) nível 3: para as aflatoxinas B1 e G1 - 8,0µg/kg e para B2 e G2 - 4,0µg/kg;

Em cada análise, a concentração encontrada para cada aflatoxina é comparada à quantidade teórica adicionada em cada nível de fortificação para efeito do cálculo da percentagem de recuperação.

Avaliação do método de análise proposto

O cromatograma obtido para a análise da solução padrão das quatro aflatoxinas está mostrado na Fig. 1. Pode-se observar que os quatro analitos apresentam uma ótima resolução cromatográfica com as condições cromatográficas aplicadas.

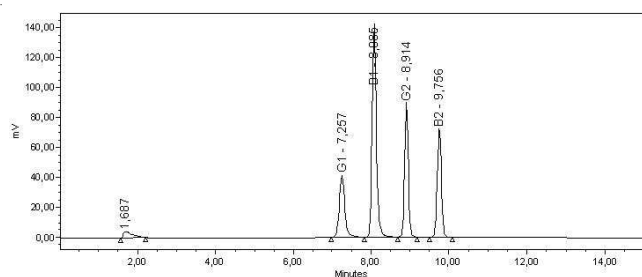


Fig. 1: Cromatograma da solução padrão de aflatoxinas usando as condições descritas para o sistema CLAE-DF

A validação de um procedimento analítico tem como objetivo a comprovação de que o método a ser utilizado é apropriado à finalidade para o qual foi desenvolvido. Os parâmetros considerados neste trabalho incluem a linearidade (coeficiente de correlação), a taxa de recuperação e os limites de quantificação e de detecção.

A linearidade do método, avaliada para uma determinada faixa de trabalho, corresponde ao intervalo de concentrações do analito usadas na composição da curva de calibração e deve, obrigatoriamente, apresentar coeficiente de correlação (R²) adequado. A construção das quatro curvas analíticas para as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 por meio do método de ajuste pelos mínimos quadrados, permite a quantificação de cada aflatoxina e deve, obrigatoriamente, apresentar linearidade. As curvas obtidas, com seus respectivos coeficientes de correlação (R²), encontram-se na Fig. 2.

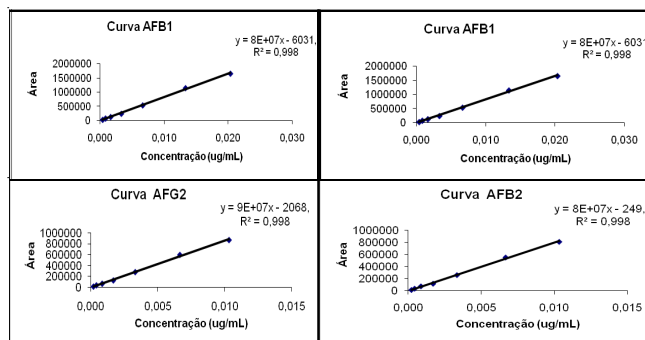


Fig. 2: Curvas de calibração das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 obtidas no sistema CLAE-DF

Os valores obtidos para R² para as quatro aflatoxinas (0,998) demonstram a linearidade das curvas obtidas. Assim, a faixa de trabalho do método, que corresponde ao intervalo de concentrações de cada analito usado na composição da curva de calibração, é linear e pode ser usada para quantificação.

Outro parâmetro importante na validação de um método é a percentagem de recuperação. Este valor corresponde à razão entre a quantidade do analito adicionada à amostra e quantificada pelo método analítico e a quantidade teórica adicionada à matriz antes do procedimento. As médias das recuperações obtidas das sete replicatas para as quatro aflatoxinas analisadas pelo presente método encontram-se na Tabela 1.

Os valores encontrados estão dentro do valor recomendado pelo regulamento (CE) nº 401/2006 da União Européia (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2006): 70 a 110%, para concentrações entre 1 a 10µg/kg.

Tabela 1: Taxas de recuperação das aflatoxinas em milho para três níveis de contaminação.

Aflatoxina	Nível 1 *	Nível 2*	Nível 3 *
B1	84%	98%	96%
B2	99%	80%	109%
G1	91%	98%	105%
G2	100%	83%	77%

* os valores apresentados representam a média de sete replicatas

Neste estudo os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando dados de regressão da curva de calibração calculada pela ferramenta Regressão disponível no software Excel (MS Office).

O erro padrão da curva foi calculado e este valor

usado para o cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), sendo $LD = 3s/b$ e $LQ = 10s/b$, onde s é o desvio (erro padrão) e b é o coeficiente angular da reta. Os valores calculados destes limites estão na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de LD e de LQ das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 para o método em estudo

Aflatoxina	LD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
B1	0,04	0,13
B2	0,02	0,08
G1	0,03	0,10
G2	0,03	0,11

O método proposto para análise de aflatoxinas empregando extração com acetonitrila e posterior análise por CLAE-DF demonstrou ser adequado para a matriz milho, além de ser de execução relativamente simples. O uso de um detector seletivo e sensível como o detector de fluorescência e a aplicação de um gradiente de força da fase móvel permitiu a obtenção de cromatogramas onde a presença de interferentes não prejudicou a quantificação dos analitos nas amostras. Observou-se comportamento linear para as quatro curvas na faixa de trabalho do método e os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos são apropriados e possibilitam a quantificação dessas micotoxinas em baixas concentrações.

Referências

BRUM, A. L.; LUFT, A. Aspectos da cadeia produtiva do milho e as relações comerciais nos estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso (1994/95-2005/06). *Revista Extensão Rural*, v. 15, n. 16, p. 117-143, jul./dez. 2008.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS. Regulamento (CE) nº 401/2006 da Comissão, de 23 de fevereiro de 2006. Estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos

teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, 9 mar. 2006. L 70, p. 12-34.

IBGE. **Tabela 1612: quantidade produzida, valor de produção, área plantada e área colhida da lavoura temporária.** Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=10&i=P>>. Acesso em: 29 out. 2008.

WILSON, T. J.; ROMER, T. R. Use of the Mycosep multifunctional cleanup column for liquid chromatographic determination of aflatoxins in agricultural products. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, v. 74, n. 6, p. 951-956, nov./dec. 1991.

Comunicado Técnico, 158

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 3622-9600
Fax: (0XX21) 2410-1090 / 2410-9713
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2009): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virgínia Martins da Matta*
Membros: *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteado Stephan, Renata Torrezan, Ronoel Luiz de O. Godoy, Nilvanete Reis Lima e André Luis do Nascimento Gomes*

Expediente

Secretária: *Michele Belas Coutinho*
Supervisor editorial: *Comitê de Publicações*
Revisão de texto: *Virgínia Martins da Matta*
Normatização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo*
Editoração eletrônica: *Riane Rodrigues Tovar, Marcos Moulin, André Luis do Nascimento Gomes*