



## DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE AFLATOXINAS EM GRÃOS DE SOJA POR MEIO DE MÉTODO FLUORIMÉTRICO

OSTAPECHEN, C. F.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, M. A.<sup>2</sup>; LEITE, R.S.<sup>2</sup>; LORINI, I.<sup>2</sup>; HENNING, A. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina (UEL). Rodovia Celso Garcia Cid Pr 445 Km 380 CEP 86057-970, Londrina, PR, carolostapechen@hotmail.com; <sup>2</sup> Embrapa Soja.

No processo realizado do cultivo até a comercialização/processamento da soja, os grãos estão expostos à contaminação por fungos, pois esses grãos são fontes alimentares destes microrganismos. Os gêneros mais frequentemente encontrados são *Aspergillus* e *Penicilium*, os chamados fungos de armazenamento (Sweeney; Dobson, 1998). O *A. flavus* pode produzir aflatoxinas, substâncias químicas tóxicas produzidas por fungos oriundas de seu metabolismo secundário (Yu et al., 2005; Bok et al., 2004). Existem vários tipos de aflatoxinas, dentre elas, destacam-se quatro, B1, B2, G1, G2. A biotransformação, dessas aflatoxinas, em diversas espécies animais resulta na produção de micotoxinas M1 e M2 (Oliveira; Germano, 1997), que causam efeitos adversos nos seres humanos, nos animais e na agricultura, resultando em doenças e perdas econômicas.

Em muitos casos, não há um método efetivo para prevenir a contaminação de grãos com micotoxinas e não existe possibilidade de descontaminação. A melhor maneira usada para regular a concentração de micotoxinas consiste na identificação e rejeição de lotes de grãos contaminadas. Sendo assim, será vantajosa a possibilidade de obtenção de resultados com a identificação de aflatoxinas usando o fluorímetro, método rápido e simples para identificação e quantificação.

De acordo com a RDC n° 7, da ANVISA (Brasil, 2011), o limite máximo tolerado (LMT) para aflatoxinas varia de 5 a 20  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (ppb) para diversos produtos agrícolas e alimentos.

O objetivo desse trabalho foi identificar a presença ou ausência das aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) em 31 amostras de grãos de soja utilizando o método fluorimétrico e, posteriormente, relacionar o índice de presença do fungo com os valores de aflatoxinas e com a porcentagem de grãos avariados.

As amostras foram selecionadas dentro de um banco de 815 amostras coletadas na safra 2014/2015, no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais e Bahia, sendo provenientes de municípios pertencentes a várias microrregiões de cada Estado. O critério de seleção foi índice de presença de *A. flavus* (%), sendo selecionadas as 31 amostras que apresentaram os maiores valores. As amostras foram classificadas pelo total de grãos avariados conforme a Instrução Normativa n° 11(2007). As amostras foram realizadas em triplicata e foram calculados os desvios-padrões.

As análises de aflatoxinas foram realizadas pelo método fluorimétrico, utilizando um kit para detecção de Aflatoxina em cereais, composto por: coluna de imunoafinidade com anticorpos de toxina B1, B2, G1, G2 – 300 ng, marca VICAM G1010; filtro de microfibras (1,5 micra 11 cm diâmetro); cubeta de borossilicato para leitura em fluorímetro; colunas de imunoafinidade – Aflatest (Vicam, 2009). Foram pesadas 5g de amostra de soja previamente moída em erlenmeyer de 125 ml, adicionados 20 ml de solução de solução metanol:água destilada (80:20) e 1 g de NaCl, previamente pesado em balança analítica. Os frascos foram submetidos à agitação durante dois minutos em agitador magnético sob baixa velocidade. Após agitação o material foi submetido à filtração com papel qualitativo, coletando-se o filtrado em um béquer, do qual retirou-se uma alíquota de 3 mL que foi diluída com 12 mL de água purificada. Em seguida, procedeu-se uma segunda filtração em papel de



microfibra de vidro de 1,5 micrometro para posterior aplicação na coluna de imunoafinidade. Após a passagem da amostra, a coluna foi lavada com 10 mL de água destilada para limpeza completa e, em seguida foi eluída com 1 mL de metanol 100% de forma lenta (uma gota por segundo) para arraste das aflatoxinas ligadas aos anticorpos monoclonais da coluna de imunoafinidade. Essa amostra eluída (1,0 mL) foi coletada em um microtubo de vidro, onde foi posteriormente adicionado 1 mL do revelador Aflatest® ao eluato e realizada a leitura em fluorímetro calibrado em até 60 segundos.

Todos os valores de aflatoxinas nas amostras de grãos de soja das diferentes microrregiões dos Estados do Brasil foram baixos. As médias ficaram entre 0,00 e 2,80 ppb. O desvio padrão das amostras, com exceção das amostras 235, 833, 979, ficou baixo, o que é bom, pois quanto menor o desvio padrão menor a variância e a dispersão dos dados obtidos (Tabela 1).

Oliveira et al. (2010) avaliaram os valores de aflatoxinas em grãos de soja na recepção e na expedição de uma unidade armazenadora na safra 2008/2009 e encontraram valores variando de 0,00 a 1,00ppb, sendo que das 8 amostras analisadas apenas 2 apresentaram valores de 1,00 ppb. As demais ficaram abaixo do nível de detecção que foi de 1 ppb. Cabe destacar que a metodologia utilizada no trabalho publicado por esses autores foi a cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por espectrometria de massas (CLAE MS/MS), apresentando valores semelhantes de aflatoxinas nos grãos de soja quando comparado com a metodologia do fluorímetro.

Em seguida, as amostras foram classificadas do maior para o menor índice de presença de *A. flavus* (%), com intuito de verificar se existe relação entre a presença do fungo e o valor de aflatoxinas nos grãos de soja. Não foi possível verificar uma relação entre índice de presença de *A. flavus* (%) e os valores de aflatoxina. Também foi possível verificar uma flutuação aleatória da porcentagem de grãos avariados, em função do índice de presença de *A. flavus* (%) (Figura 1).

O tegumento ou casca da soja consiste em uma barreira natural, dificultando a colonização de fungos e conseqüentemente a produção de micotoxinas. Assim, em derivados de soja como, por exemplo, o farelo, onde não existe essa barreira natural, os níveis de contaminação com micotoxinas podem ser superiores. Dessa forma, os valores de aflatoxinas encontrados nos grãos desse trabalho foram baixos como os relatados por Oliveira et al. (2010) e Calori-Domingues et al. (2014). Nenhuma das amostras desse experimento apresentou limite superior ao da legislação vigente.

## Referências

BOK, J. W.; KELLER N. P.; LAE, A. A regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. **Euk Cell**, p 527-535, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n. 11, de 15 de maio de 2007**. Estabelece o Regulamento Técnico da Soja, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade intrínseca e extrínseca, a amostragem e a marcação ou rotulagem. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 93, p. 13-15, 16 maio 2007a. Seção 1. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17751>. Acesso em: 16 mai. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde, Resolução RDC nº 7, de 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução ANVISA. **Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília DF, 09 de março de 2011, pag. 66-67.

CALORI-DOMINGUES, M. A. ; RODRIGUES, P. M. ; HERCOTON, G. P. ; GLÓRIA, E. M.; DIAS, C. T. S. Ocorrência e distribuição de aflatoxina B1 e zearalenona em soja.



In: CONFERÊNCIA BRASILEIRA DE PÓS-COLHEITA, 6., 2014, Maringá. **Anais...** Londrina: ABRAPÓS, 2014. p. 451-457.

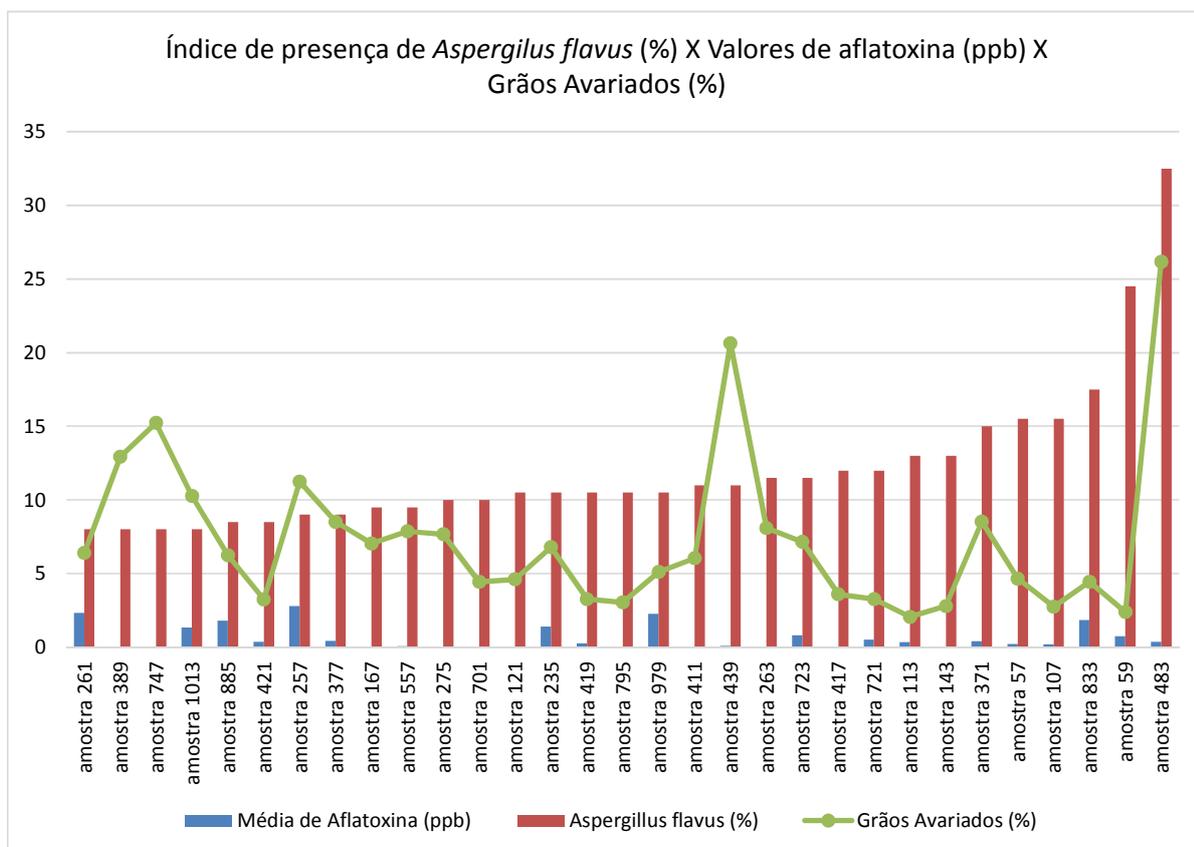
OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, 1997.

OLIVEIRA, M. A.; LORINI, I.; MALLMANN, C. A. As micotoxinas e a segurança alimentar na soja armazenada. **Brazilian Journal of Food Technology** (Online), III SSA p.87-91, 2010. Disponível em: <[http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/especiais/2010/artigos\\_bjb\\_v70ne/15\\_bjft\\_v13ne\\_13e0113.pdf](http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/especiais/2010/artigos_bjb_v70ne/15_bjft_v13ne_13e0113.pdf)>. Acesso em 4 abr. 2018.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.43, p141-158, 1998.

VICAM. Cultivating success through science. **Manual de procedimentos AflaTest®**. Watertown, 2009. p. 34-35.

YU J.; CLEVELAND, T. E.; NIERMAN, W. C.; BENNETT J. W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 22, p. 194-202, 2005.



**Figura 1.** Índice de presença de *Aspergillus flavus* (%), valores de aflatoxinas e a porcentagem de grãos avariados nas 31 amostras coletadas na safra 2014/2015.



**Tabela 1.** Valores de aflatoxinas nas 31 amostras da safra 2014/2015 realizadas no fluorímetro em triplicata (ppb), com as respectivas médias e seus desvios padrões de cada amostra.

AMOSTRAS	Repetições			Média (ppb)	Desvio padrão
	A	B	C		
57	0,00	0,00	0,66	0,22	0,381051178
59	0,00	1,10	1,10	0,73	0,635085296
107	0,00	0,20	0,42	0,21	0,21007935
113	0,00	1,00	0,00	0,33	0,577350269
121	0,00	0,00	0,00	0,00	0
143	0,00	0,00	0,00	0,00	0
167	0,00	0,00	0,00	0,00	0
235	0,00	0,00	4,20	1,40	2,424871131
257	2,60	4,00	1,80	2,80	1,113552873
261	2,10	2,90	2,00	2,33	0,493288286
263	0,00	0,00	0,00	0,00	0
275	0,00	0,00	0,00	0,00	0
371	1,20	0,00	0,00	0,40	0,692820323
377	0,22	1,10	0,00	0,44	0,582065288
389	0,00	0,00	0,00	0,00	0
411	0,00	0,00	0,00	0,00	0
417	0,00	0,00	0,00	0,00	0,001443376
419	0,79	0,00	0,00	0,26	0,456106713
421	0,44	0,41	0,23	0,36	0,113578167
439	0,05	0,28	0,00	0,11	0,150360677
483	0,82	0,00	0,26	0,36	0,419046537
557	0,24	0,00	0,00	0,08	0,138564065
701	0,00	0,00	0,00	0,00	0
721	0,00	0,74	0,82	0,52	0,452106182
723	0,55	0,60	1,30	0,82	0,419324854
747	0,00	0,00	0,02	0,01	0,009814955
795	0,00	0,16	0,00	0,05	0,092376043
833	0,00	5,00	0,56	1,85	2,739440332
885	0,73	2,40	2,30	1,81	0,936642942
979	0,92	1,10	4,80	2,27	2,19000761
1013	0,81	1,50	1,70	1,34	0,466940396