

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) EM AMOSTRAS DE CASTANHA-DO-BRASIL

ALESSANDRA DA SILVA TEIXEIRA^{1*}; OTNIEL FREITAS-SILVA²; RONOEL LUIZ DE OLIVEIRA GODÓY², EUGÊNIA AZEVEDO VARGAS³, ALESSANDRA MARTINS⁴.

1. Bolsista CAPES, Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos – Instituto de Tecnologia, UFRRJ. ales_teixeira@yahoo.com.br

2. Pesquisador Embrapa Agroindústria de Alimentos

3. Lactosa/ Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento – Pedro Leopoldo/ MG

4. Discente do curso de Biologia da Universidade Estácio de Sá – Rio de Janeiro/ RJ

ABSTRACT: TEIXEIRA, A.S.; FREITAS-SILVA; GODÓY, R.L.O; VARGAS, E.A.; MARTINS, A. Methods of Extration and Quantification for Aflatoxins in Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) In Samples of brazil nuts. It was evaluated two extractions methods and two chromatography techniques on the determination of aflatoxins AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ in artificially contaminated samples of Brazil nuts. The thin layer Chromatography (TLC) and High performance Liquid Chromatography (HPLC) were compared. The samples were contaminated with 5.3 µg/ kg of AFG₁, 6.9µg/ kg of AFB₁, 4.8µg/ kg of AFG₂ and 5,0µg/ kg of AFB₂. The results were performed by variance analysis with Tukey 95% trust. It was tested and compared in the four methods and calculated all the recovery values. The recovery values were 101.89, 100.25, 86.63 and 93.42%, respectively, for AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂. The new extraction method tested was based on the modified method advocated by RODRIGUEZ AMAYA and VALENTE SOARES (1989), followed by HPLC quantification showed better results for recovery and was statistically superior than the other tested method.

Keywords: Chromatography, Aflatoxins, Brazil nut.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são um grupo de micotoxinas estruturalmente semelhantes, altamente mutagênicas, que contaminam produtos agrícolas e se desenvolvem principalmente em ambientes com temperatura e umidade elevadas. São produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, sobretudo por *A. flavus* e *A. parasiticus* (KAWASHIMA, 2004). As técnicas mais usadas para a quantificação de micotoxinas são as cromatográficas, incluindo Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/MS). A mais simples é a CCD, porém os outros métodos têm maior sensibilidade e precisão (www.micotoxinas.com.br, 2006). Para o controle e monitoramento eficientes dos alimentos susceptíveis à contaminação são necessárias técnicas analíticas com sensibilidade, especificidade, rapidez, facilidade de uso, exatidão e precisão. Desta forma, foram objetivos deste trabalho: 1) comparar técnicas de quantificação de aflatoxinas por CCD com quantificação visual e CLAE, em amostras de castanha-do-brasil artificialmente contaminadas, com base na recuperação para cada um dos métodos; 2) avaliar duas metodologias de extração das aflatoxinas em castanha-do-brasil, a metodologia de extração preconizada por Rodriguez Amaya e Valente Soares (1989) e uma segunda modificada.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: Provenientes de Tomé-açu, Pará (safra de 2007). Foram trituradas 1kg de castanhas sem casca adicionadas de 800mL de água destilada segundo metodologias preconizadas por Franca *et al* (2006) e Banks *et al* (2007). **Curva de Calibração:** O POOL) que deu origem aos 6 pontos da curva de calibração, foi preparada com os padrões individuais da Sigma-Aldrich, segundo AOAC (2000). A concentração dos padrões da curva de calibração variou de 0,002µg/mL à 0,16µg/mL aproximadamente. **Extração das Aflatoxinas:** Para a CCD utilizou-se o método de Soares E Rodriguez-Amaya (1989). Para a Metodologia modificada, pesou-se 25g de amostra, a mesma foi extraída com 7,5 mL de solução de KCl 4% e 67,5mL de metanol, misturando-se no blender em velocidade 4, por 5 minutos, adicionou-se 75 mL de CuSO₄ 10% e 7,5g de Celite. Após filtração foi retirada uma alíquota de 50mL, este extrato foi levado para um funil de separação, previamente adicionado de 50mL de água destilada, onde foi particionado duas vezes com 10mL de diclorometano. O extrato foi levado à secura em banho-maria a 40°C sob N₂. **Derivatização das Amostras:** Re-suspendeu-se a amostra com 600µL de acetonitrila e adicionou-se 1,2mL do agente derivatizante (35mL de Água Milli-Q: 5mL de Ácido Acético Glacial : 10mL Ácido trifluorácético), segundo AOAC (2005). O meio reacional foi mantido à 65°C por 9 min. **Derivatização dos Padrões:** Adicionou-se 300µL de cada pool da curva de calibração dos padrões de aflatoxinas a um frasco de derivatização e adicionou-se 600µL do agente derivatizante. A metodologia foi a mesma utilizada para as amostras. **Análise cromatográfica:** Utilizando o sistema CLAE-DFL, foram injetados 10uL tanto dos padrões quanto das amostras. A análise cromatográfica ocorreu no modo isocrático, tendo como fase Móvel: 1,5 metanol:1,5 acetonitrila:6,0 água Milli-Q, coluna: X-Terra da Waters, 150x4,6mm, partículas de 5µm –RP18, Detetor: Waters W2475 – Fluorescência Excitação: 360nm, Emissão: 440nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) entre as diferentes metodologias propostas, tanto para a extração como para a quantificação. Os resultados mostraram que a metodologia constituída por extração no método modificado seguida de quantificação por CLAE, foi aquela que mostrou melhores resultados. O fator que influenciou mais positivamente o resultado foi a forma de quantificação, uma vez que quando se compara somente a forma de extração e mantém-se a forma de quantificação (CLAE), os resultados encontrados são estatisticamente equivalentes para cada uma das metodologias de extração e quantificação de aflatoxinas (Tabela 1), com o respectivo desvio padrão. Os valores de recuperação encontrados também foram mais adequados para a metodologia constituída por extração pelo método modificado seguida de quantificação por CLAE. Mallmann *et al* (1998) em um trabalho que preconiza uma purificação automatizada e quantificação por CLAE para aflatoxinas em nozes, castanhas e frutos secos encontrou valores de recuperação de 101,2; 93,2; 58,9 e 63,2%, respectivamente para, AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂. A metodologia oficial da AOAC (AOAC 994.08) para quantificação de aflatoxinas em castanha-do-brasil, que é determinada por extração em fase sólida e quantificação por CLAE, indica valores de recuperação de 82,0; 117,0; 125,0 e 90,5%, respectivamente para, AFG₁, AFB₁, AFG₂ e AFB₂.

Tabela1- Valores médios de extração e quantificação de aflatoxinas em amostras de castanha-do-brasil, artificialmente contaminadas.

Metodologia	Concentração de Aflatoxinas (mg/mL) ^a			
	AFG ₁	AFB ₁	AFG ₂	AFB ₂
Extração / Quantificação				
Metodologia 1 / CCD	3,073 ± 0,209 ^A	3,804 ± 0,522 ^C	1,423 ± 0,231 ^E	1,145 ± 0,176 ^G
Metodologia 2 / CCD	4,881 ± 1,902 ^A	3,607 ± 0,991 ^C	1,607 ± 1,136 ^E	1,352 ± 0,874 ^G
Metodologia 1 / CLAE	5,400 ± 1,105 ^B	6,917 ± 0,567 ^D	4,023 ± 0,795 ^F	4,671 ± 0,444 ^H
Metodologia 2 / CLAE	3,348 ± 0,125 ^A	6,707 ± 0,620 ^D	4,158 ± 0,409 ^F	4,248 ± 0,544 ^H

1: Metodologia simplificada

2: Metodologia preconizada por Rodriguez Amaya e Valente Soares (1989)

a_ média de quadruplicata ± desvio padrão

Letras diferentes indicam resultados estatisticamente diferentes entre si com um nível de confiança de 95%, segundo teste de Tukey.

Tabela 2- Valores médios de recuperação de aflatoxinas em amostras de castanha-do-brasil, artificialmente contaminadas.

Metodologia	Recuperação Média (%)			
	AFG ₁	AFB ₁	AFG ₂	AFB ₂
Extração / Quantificação				
Metodologia 1 / CCD	57,98	55,13	29,65	22,90
Metodologia 2 / CCD	63,17	52,28	33,48	27,04
Metodologia 1 / CLAE	101,89	100,25	86,63	93,42
Metodologia 2 / CLAE	92,09	97,20	83,81	84,96

1: Metodologia simplificada

2: Metodologia preconizada por Rodriguez Amaya e Valente Soares (1989)

A metodologia de extração modificada (Tabela 2), apresentou resultados recuperação médios semelhantes a preconizada por Rodriguez Amaya e Valente Soares (1989). Entretanto, o seu emprego pode ser justificado por ser menos dispendioso, mais rápido e sujeito a menor perda de massa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. **Official Methods of Analysis**. 971.22 - Natural Toxins, 2000. Chapter 49, p.2-5.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. 994.08 – Derivatization of Standards for aflatoxins, 2005. Chapter 49, p.25.

BANKS, J.; HASNIP, S.; ANDERSON, S.; et al. Rapid Immunoassays for aflatoxins in Brazil nuts. **XIIth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**. May 21-25, 2007.

FRANCA, R. C. A. ; SANTOS, E. A. ; CASTRO, L. ; VARGAS, E. A. . PREPARATION OF BRAZIL NUT REFERENCE MATERIALS. In: **Mycoglobe**, 2006, Villa Carlos Paz. Myco-globe, 2006.

KAWASHIMA, L.M. **Micotoxinas em Alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 110p. 2004. Legislação sobre micotoxinas. Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br>. Acesso em: 5 Abr. 2006.

MALLMANN, C.A.; HICKMANN, J.L.; ALMEIDA, C.A.A.; DILKIN, P. Técnica automatizada de purificação e quantificação de Aflatoxinas. **XIII Jornada Acadêmica Integrada**. Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul. 1998.

RODRIGUEZ AMAYA, D.B.; VALENTE SOARES, L.M. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin some Brazilian foods, utilizing a mult-toxin thin layer chromatographic method. **J. Assoc. Of Anal. Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.