

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MICOTOXINAS EM MILHO E RAÇÃO NO BRASIL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS.

MARIA DE LOURDES MENDES DE SOUZA^{1, 2, 3*}; MICHAEL SULYOK²; SÔNIA SOARES COSTA³; RUDOLF KRSKA²; RAINER SCHUHMACHER²

¹ Lab. de Micotoxina, EMBRAPA, Av. das Américas, 29501, CEP: 23020-470, Rio de Janeiro, Brasil

² Center for Analytical Chemistry, Department for Agrobiotechnology, IFA-Tulln, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Konrad-Lorenz-Str. 20, A-3430 Tulln, Austria

³ Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, UFRJ, 21941-902, Rio de Janeiro, Brasil

ABSTRACT: SOUZA, M.L.M.; SULYOK, M.; COSTA, S.S.; KRSKA, R., SCHUHMACHER, R. Simultaneous determination of mycotoxin in maize and feeds from Brazil by Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometric A total of 38 maize samples and 36 feed samples from a poultry factory in Brazil were investigated for the presence of 100 mycotoxins by High Performance Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry detection (HPLC-MS/MS). Sixteen mycotoxins were detected and quantified: aflatoxins B1, G2, fumonisins B1, B2 and B3, hydrolysed fumonisin B1, zearalenone, agroclavin, deoxynivalenol, nivalenol, enniatins A, A1, B, beauvericin and moniliformin. All samples presented contamination for FB1, FB2 and FB3. Most of sample presented contamination with 15ADON and beauvericin (89.5%). The objective of this study was to evaluate the occurrence of mycotoxins in maize and broiler feed. This is the first study dealing with agroclavine, enniatin A, A1, B, B1 and beauvericin, contamination of maize and poultry feeds from Brazil.

Key words: Mycotoxin; HPLC-MS/MS Liquid chromatography; Multi-target analysis.

INTRODUÇÃO

Embora 300 a 400 metabólitos fúngicos sejam reconhecidos como micotoxinas, e a ocorrência delas seja frequentemente relatada, a grande maioria dos métodos analíticos descritos abrange somente uma pequena fração desses metabólitos. Entretanto, com o recente desenvolvimento dos métodos multi-micotoxinas baseados em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tornou-se possível a análise simultânea dessas toxinas (SULYOK et al., 2007). O milho é o principal produto freqüentemente exposto ao risco de contaminação por estas micotoxinas. Estudos sobre a incidência de micotoxinas no Brasil, nos últimos 10 anos, revelam que a contaminação por aflatoxinas em milho é pequena e ocasional. Entretanto, é alta a contaminação por fumonisinas em milho e produtos a base de milho. Contaminações com outras micotoxinas, tais como zearalenona, ocratoxina A, ácido ciclopiazônico, esterigmatocistina, moniliformina, desoxinivalenol e toxina T-2 não são relevantes no milho brasileiro (RODRÍGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002; SALAY; MERCADANTE, 2002; MILANEZ et al., 2006). Este trabalho tem como objetivo a avaliação da contaminação por micotoxinas em milho e na cadeia de produção de ração para frango.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de milho (38) e de ração (36) foram coletadas em uma fábrica no Paraná/BR, em 2005 e 2006, foram moídas em moinho de faca/martelo TREU, homogeneizadas por

15 min, embaladas sob vácuo e armazenadas em freezer. Cada amostra (5 g) foi extraída com 20 mL de ACN/H₂O/AcOH (79:20:1, v/v/v) sob agitação por 90 min. Um volume de 350 µL extrato foi diluído (1:2) com ACN/H₂O/AcOH (20:79:1, v/v/v); 5 µL foram injetados no sistema LC-MS/MS. A recuperação foi calculada utilizando a média de três amostras de milho e ração em duplicata. Para cálculo da recuperação de fumonisinas foram utilizadas amostras com menor nível de contaminação. Utilizou-se um sistema CLAE Agilent, série 1100, acoplado ao Qtrap 4000 (Applied Biosystems) com fonte de ionização electrospray TurbolonSpray (ESI). A separação cromatográfica foi realizada a 25 °C em uma coluna C18 Gemini®, 150x4.6mmx5micra, pré-coluna C18 4x3-mm-i.d; fase móvel - metanol/água/ácido acético 10:89:1 (v/v/v; eluente A) ou 97:2:1 (eluente B), com 5 mM de AcNH₄; fluxo 1 mL.min⁻¹. O ESI-MS/MS efetuado em modo positivo e negativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A alta seletividade oferecida pelo espectrômetro de massas triplo quadrupolo permite a inequívoca identificação de analitos em matrizes complexas, sendo, por isso, a principal ferramenta analítica para a análise e confirmação de micotoxinas em alimentos. O método validado para a determinação de 87 micotoxinas em trigo e milho (SULYOK et al., 2007), permite a análise simultânea utilizando um único passo de extração seguido por LC-ESI-MS/MS sem a necessidade de purificação da amostra. A Tabela 1 resume os resultados obtidos. Todas as amostras de milho e ração apresentaram contaminação por FB1, FB2 e FB3. Grande parte das amostras apresentou contaminação com 15ADON e bovericina, o milho com percentual de 94,7% e 89,5% respectivamente, enquanto a ração de 91,7% para ambas. A apenas uma amostra de milho apresentou contaminação por AFG2, DON, EA e Agroclavina e duas por AFB1, porém em níveis muito baixos. Uma única amostra de ração apresentou contaminação por MON e DON, e 5 por AFB1. As demais toxinas incluídas no método de análise não foram detectadas. As toxinas hexadepsipeptídeos cíclicos bovericina e eniatinas e alcalóides de ergot como a agroclavina nunca foram antes investigadas em produtos de origem brasileira.

AGRADECIMENTOS

A Embrapa pelo financiamento da bolsa de estudos e despesas de viagem; a BioPure pelos padrões certificados e ao Projeto Mycotox que cedeu as amostras do projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SULYOK, M.; KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples – **Anal. Bioanal. Chem.** Heidelberg, v. 389, p. 1505 – 1523, nov. 2007.
- RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxin research Brazil: The last decade in review - **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p.1-11, jan. 2002.
- SALAY, E.; MERCADANTE, A.Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination - **Food Control**, Ljubljana, v. 13, p. 87–92, mar. 2002.
- MILANEZ, T.V.; VALENTE-SOARES, L.M.; BAPTISTA, G.G. Occurrence of trichothecene mycotoxins in Brazilian corn-based food products - **Food Control**, Ljubljana, v.17, p. 293-298, abr. 2006.

TABELA 2: Resultados das análises de contaminação de micotoxinas em amostras de milho e ração: Faixa de contaminação, Média e desvio padrão e número de amostras positiva (percentual entre parênteses).

Toxina	MILHO			RAÇÃO		
	Faixa (? g/kg) ^a	Média e desvio padrão (? g/kg) ^b	Número de amostras positivas (%)	Faixa (? g/kg) ^a	Média e desvio padrão (? g/kg) ^b	Número de amostras positivas (%)
Fumonisinias						
Fumonisinina B ₁ (FB ₁)	31.8 – 6018.0	1156 ± 1127	38 (100)	49.8 – 1117.2	285.2 ± 291.4	36 (100)
Fumonisinina B ₂ (FB ₂)	8.9 – 2458.8	513.5 ± 525.8	38 (100)	13.4 – 427.2	101.9 ± 129.5	36 (100)
Fumonisinina B ₃ (FB ₃)	7.0 – 821.9	161.0 ± 152.3	38 (100)	4.5 – 141.7	36.8 ± 35.6	36 (100)
Fumonisinina total (FB ₁ +FB ₂)	35.3 - 2000	1669.1 ± 1649.8	26 (68.4)	57.7 – 1578.1	387.1 ± 42.5	36 (100)
	2001 – 8777.5		12 (31.6)			
Fumonisinina hidrolisada B ₁ (HBF ₁)	nd – 168.9	16.8 ± 31.0	4 (10.5)	nd	nd	nd
Aflatoxinas						
Aflatoxina B ₁ (AFL B ₁)	nd – 2.31	0.52 ± 0.38	4 (10.5)			
Aflatoxina G ₂ (AFL G ₂)	nd – 1.83	1.16 ± 1.01	1 (2.6)	nd – 1.43	0.61 ± 0.28	5 (13.9)
Tricotecenos						
Desoxinivalenol (DON)	nd – 30.2	10.5 ± 3.3	1 (2.6)	nd – 20.5	10.3 ± 1.75	1 (2.8)
15-Acetildesoxinivalenol (15ADON)	nd – 562.0			nd – 301.1		
		204.7 ± 95.3	36 (94.7)		151.5 ± 79.0	33 (91.7)
Nivalenol (NIV)	nd – 116.3	30.4 ± 16.8	4 (10.5)	nd – 67.43	31.7 ± 14.11	6 (16.7)
Moniliformina (MON)	nd – 171.5	54.2 ± 34.1	6 (15.8)	nd – 119.4	42.7 ± 13.2	1 (2.8)
Zearalenona						
Zearalenona (ZON)	nd – 9,83	1,42 ± 2,68	9 (23.7)	nd – 6.49	0.95 ± 1.41	13 (36.1)
Hexadepsipeptídeos						
Bovericina (BEA)	nd -157.8	22.3 ± 29.1	34 (89.5)	nd – 16.7	4.55 ± 3.52	33 (91.7)
Enniatina A (EA)	nd – 0.13	0.05 ± 0.01	1 (2.6)	nd – 0.72	0.12 ± 0.14	6 (16.7)
Enniatina A ₁ (EA ₁)	nd - 0.23	0,09 ± 0.04	6 (15.8)	nd	nd	nd
Enniatina B (EB)	nd - 4,95	0.62 ± 1.01	12 (31.6)	nd – 4.66	0.60 ± 1.15	8 (22.2)
Alcaloides Ergot						
Agroclavina	nd – 7.24	1.16 ± 1.01	1 (2.6)	nd	nd	nd

a) nd = não detectado. b) as médias foram calculadas assumindo que as amostras nd continham metade do LOD.