



COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS EM AMENDOIM

M.R. Anjos¹, I.M. Castro¹, R.G. Borguini¹, R.L.O. Godoy¹, J.S. Barrabin², A.S. Teixeira³, L.F. Ferreira⁴, P.M.S. Cabral⁵, P.D. Andrade⁶, S. Pacheco¹, J.S. Rosa¹

¹Embrapa 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)

²Faculdade de Farmácia/Habilitação em Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina – Rodovia Admar Gonzaga, 1346 – Itacorubi. Florianópolis, SC – Brasil – CEP: 88034-001. Fone: (48) 3721-9707 – Fax: (48) 3721-6515.

³Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, CEP: 23890-000. Seropédica, RJ, Brasil.

⁴Instituto de Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ. Rua Senador Furtado, 121, Maracanã – Rio de Janeiro, RJ, CEP: 20270-021, Telefone: (21) 3978-5902

⁵Bolsista CNPq na 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

⁶Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras – UFLA - Campus Universitário Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras – MG. Fone (35) 3829-1122

RESUMO – O objetivo do trabalho foi comparar dois métodos de extração e purificação das aflatoxinas B₁, G₁, B₂ e G₂ em amendoim. O primeiro método envolveu a extração das aflatoxinas com acetonitrila seguida de purificação através de colunas de separação por fase sólida e o segundo consistiu de extração em metanol e purificação em colunas de imunoafinidade. Foram realizados ensaios de recuperação com amostras fortificadas em dois diferentes níveis: 6,13 µg/kg e 12,25 µg/kg de aflatoxinas totais. O primeiro método apresentou valores de recuperação dentro da faixa aceitável para ambos os níveis de contaminação. O segundo método apresentou elevadas percentagens de recuperação para o nível mais baixo de contaminação, exceto para a aflatoxina G₂. Entretanto, no nível mais alto de contaminação, a recuperação ficou abaixo da faixa aceitável. Desse modo, o primeiro método revelou-se mais eficiente para a análise de aflatoxinas em amendoim por cromatografia líquida e detecção por fluorescência.

ABSTRACT – The aim of this work was the comparison between two methods of extraction and cleanup of aflatoxins B₁, G₁, B₂ and G₂ in peanut. The first method involved the extraction of aflatoxins with acetonitrile followed by cleanup through solid phase separation columns and the second consisted on extraction with methanol and cleanup through immunoaffinity columns. Recovery assays was carried on with spiked samples in two different levels: 6,13µg/Kg and 12,25µg/Kg of total aflatoxins. The first method presented acceptable recovery values for both contamination levels. The second method presented high recovery percentages in the lowest contamination level, except for G₂ aflatoxin. However, in the highest contamination level, the recovery was under the acceptable range. Therefore, the first method revealed better performance for peanut aflatoxin analysis for the liquid chromatography and fluorescence detection.

PALAVRAS-CHAVE: aflatoxinas, amendoim, extração, colunas de purificação, CLAE-DF.

KEYWORDS: aflatoxins, peanuts, extraction, cleanup column, HPLC-FLD.



1. INTRODUÇÃO

O amendoim é um grão relevante para alimentação humana, tanto no consumo *in natura*, quanto em alimentos processados. No entanto, é um dos cultivos predispostos à contaminação por aflatoxinas, que pode ocorrer no campo e também durante o transporte e armazenamento do produto (BARRETO et al., 2006). As aflatoxinas são metabólitos fúngicos secundários, que provocam grandes perdas econômicas na cadeia produtiva agrícola, representando, atualmente, risco potencial para o agronegócio brasileiro e para 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 destes contaminantes representa, atualmente, um dos principais entraves técnicos à comercialização dos produtos agrícolas no mercado internacional. Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas recebem maior atenção, devido à sua propriedade marcadamente hepatocarcinogênica e altamente toxigênica, quando comparada a outros compostos (SCUSSEL, 1998). Por isso, a sua identificação e avaliação quantitativa requerem amostragem específica, métodos de extração, purificação e detecção sensíveis e eficientes.

Vários métodos têm sido publicados com relação à quantificação das micotoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Estes variam, principalmente, quanto aos sistemas de solventes utilizados, colunas para a separação e detectores, dependendo do tipo de amostra e toxina a ser analisada (SCUSSEL, 1998). Devido à diversidade de métodos existentes, o objetivo deste trabalho foi comparar dois métodos de extração e purificação das aflatoxinas (AFs) B₁, G₁, B₂ e G₂ em amendoim. Tais métodos apresentam diferentes combinações de solventes para extração e de colunas para a purificação da amostra.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de amendoim cru, sem casca, com pele, de aproximadamente 2Kg, foi adquirida no mercado varejista do Estado do Rio de Janeiro. A totalidade da amostra foi triturada em processador de alimentos até homogeneização completa da mesma.

Extração e purificação

Método I: 25g de amostra foram extraídos com 100mL de acetonitrila:água 84:16 (v/v) em um homogeneizador Omni Mixer[®] por 3 minutos a 800rpm. Após filtração em papel de filtro, 8mL do filtrado foram purificados em coluna Mycosep[®], específica para a extração e purificação de micotoxinas; 4mL do eluato foram evaporados sob nitrogênio e ressuspensos com 0,6mL de acetonitrila.

Método II: 25 g de amostra foram extraídas com 125 mL de metanol:água (70:30 v/v) e 5g de NaCl por 2 minutos a 800rpm em homogeneizador OMNI Mixer[®]; a solução foi filtrada em papel de filtro e 15mL do filtrado foram diluídos com 30mL de água destilada; após nova filtração desta solução em membrana Whatman 934-AH, 15mL do extrato foram transferidos para a coluna de imunoafinidade Aflatest[®]; após lavagem com 10mL de água destilada, as aflatoxinas foram eluídas com 1mL de MeOH, secas sob nitrogênio e ressuspensas em 1,0mL de acetonitrila (AOAC, 2005).

Derivatização das aflatoxinas (métodos I e II)

A solução para análise foi obtida adicionando-se ao extrato purificado a solução derivatizante - água:ácido trifluoracético:ácido acético 70:20:10 (v/v) – em banho-maria a 65°C por 8,5min (Wilson e Romer, 1991). As soluções resultantes foram aplicadas e quantificadas no sistema CLAE/DF.

Sistema CLAE/DF

Utilizou-se um sistema cromatográfico modular Waters, composto de injetor automático W717+, bomba quaternária W600, *in-line degasser*, forno de colunas ajustado a 40°C e detector de fluorescência Waters 2475. Coluna cromatográfica X Terra[®] RP 18 (4,6 x 150mm; 5µm). Fase móvel - acetonitrila, metanol e água ultra-pura; fluxo de 1,2mL/minutos eluindo em modo gradiente, iniciando a composição em 10:10:80 (v/v/v) e atingindo 15:25:60 (v/v/v) em 3 minutos, retornando a composição original em 8,1 minutos. Detector de fluorescência: λ ex- 364 nm e λ em- 440 nm. Volume de injeção 10µL. O tempo de corrida foi de 15 minutos. A quantificação das aflatoxinas foi efetuada por padronização externa.



Soluções padrão de aflatoxinas

Foi usado um pool de padrões de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ da Rohmer Labs /Biopure contendo 2 µg/mL AFB₁ e AFG₁ e 0,5 µg/mL AFB₂ e AFG₂.

Ensaio de recuperação

A amostra de amendoim cru foi analisada quanto à presença de aflatoxinas e se revelou isenta de contaminação. As amostras foram então fortificadas para testes de recuperação em dois diferentes níveis: nível 1, para as aflatoxinas B₁ e G₁ - 2,02µg/Kg e para B₂ e G₂ - 1,02µg/Kg, sendo o total de AFs de 6,13 µg/kg; nível 2, para as aflatoxinas B₁ e G₁ - 4,04µg/Kg e para B₂ e G₂ - 2,04µg/Kg, sendo o total de AFs de 12,25 µg/kg. Os ensaios foram feitos em replicatas para os dois níveis de fortificação e o cálculo da recuperação foi feito relacionando-se a concentração de aflatoxinas medida com a adicionada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

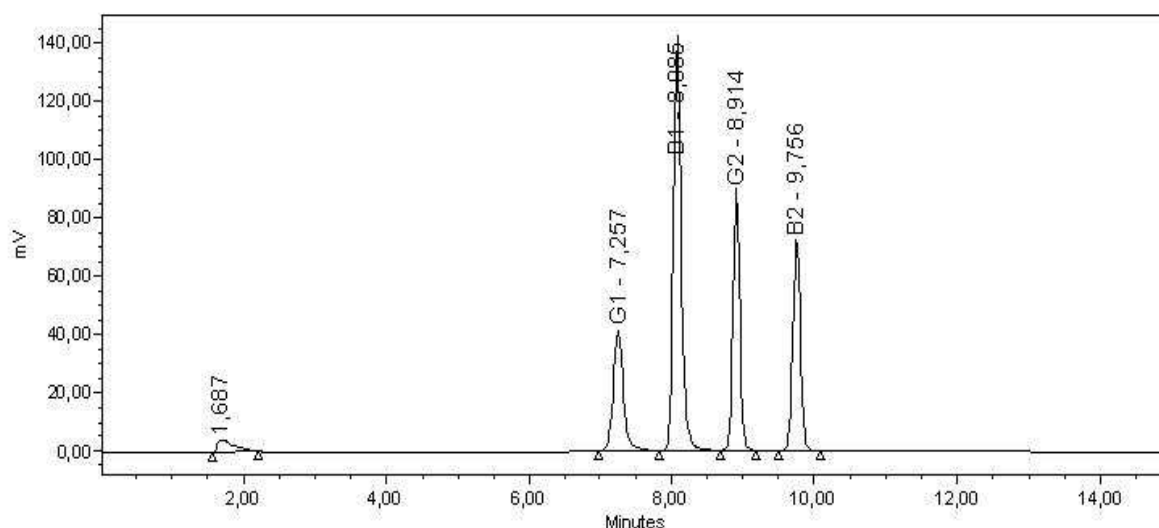


Figura1. Cromatograma da solução padrão de aflatoxinas usando as condições descritas para o sistema CLAE-DF.

Na Tabela 1 estão apresentadas as médias das recuperações obtidas para os dois diferentes métodos avaliados.

Tabela 1. Resultados dos ensaios de recuperação, expressos em percentagem, para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em amendoim.

Aflatoxinas	Recuperação (%)			
	Método I		Método II	
	Nível 1*	Nível 2*	Nível 1**	Nível 2**
B ₁	77±2	82±9	95±6	68±4
B ₂	88±2	102±9	88±4	65±5
G ₁	78±3	80±5	89 ±5	61±1
G ₂	88±2	97±11	59±3	38±1

*média de 7 replicatas ± desvio-padrão. **média de 3 replicatas ± desvio-padrão.

Conforme pode-se observar na Tabela 1, os valores médios de recuperação obtidos no Método I, tanto para o nível 1 quanto para o nível 2 de contaminação, estão dentro da faixa aceitável de recuperação preconizada pelo regulamento (CE) nº 401/2006 da União Européia, entre 70 e 110%, para concentrações entre 1 a 10µg/Kg de aflatoxinas totais. Resultados próximos para a recuperação



de aflatoxinas B₁ (92%), B₂ (88%), G₁ (91%) e G₂ (92%) foram obtidos por FU et al (2008) ao utilizarem o mesmo método de extração e purificação de amostras de amendoim contaminados com 3,9 µg/kg de aflatoxinas totais.

Para o Método II, o nível 1 de contaminação apresentou elevadas percentagens de recuperação, considerando-se a baixa concentração inicial de aflatoxinas adicionadas às amostras (6,13 µg/kg total de aflatoxinas, valor próximo ao estabelecido como limite pela União Européia de 4 µg/kg para o total de aflatoxinas em alimentos) e a dificuldade de recuperação inerente à aflatoxina G₂, quando a purificação ocorre em colunas de imunoafinidade. GONÇALEZ *et al.* (2008) utilizaram o mesmo método analítico (AOAC 991.31) e obtiveram resultados semelhantes para a recuperação de aflatoxinas em amendoim B₁ (83%), B₂ (82%), G₁ (90%) e G₂ (61%) para concentração de 8,12 µg/kg de aflatoxinas totais. Entretanto, quando se considera o nível 2 de contaminação, observa-se que a recuperação foi menor, tanto em relação ao nível 1 do Método II quanto ao nível 2 do Método I, e abaixo da faixa aceitável de recuperação. Tal fato pode indicar uma falha na etapa de purificação da amostra, apesar de seguidas minuciosamente todas as instruções do método (AOAC, 2005). A coluna de imunoafinidade pode ter saturado deixando passar uma parte das aflatoxinas, embora o fabricante afirme que a capacidade da mesma seja entre 0,1 e 300 µg/kg. Existe também a hipótese de problema durante a eluição das aflatoxinas retidas pela coluna.

4. CONCLUSÕES

A análise de aflatoxinas por CLAE/DF pelo método I - extração com acetonitrila e purificação pela coluna Mycosep[®] - demonstrou ser mais eficiente para a matriz amendoim. O método é de execução relativamente simples e rápida, purificando o extrato pela remoção dos interferentes da matriz em uma única etapa. O uso de um detector seletivo e sensível como o detector de fluorescência e a aplicação de um gradiente de polaridade na fase móvel, permitiu a obtenção de cromatogramas com ótima resolução cromatográfica sem a presença de interferentes próximos aos analitos de interesse, facilitando a quantificação dos mesmos nas amostras.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **AOAC official method 991.31:** aflatoxins in corn, raw peanuts and peanut butter: immunoaffinity column (aflatest) method. Washington, DC. 2005, p.49.2.18.
- BARRETO, A. N.; VALE, D. G.; FERREIRA, D. S.; ALBUQUERQUE, F. A.; ALVES I.; SILVA, J. C. A.; OLIVEIRA, J. M. C.; SOUSA, M. F.; SUASSUNA, N. D.; SILVA, O. R. R. F.; PEREIRA, R. M. P. G.; FREIRE, R. M. M.; SANTOS, R. C.; SUASSUNA, T. M. F.; GONDIM, T. M. S.; CARTAXO, W. V.; COUTINHO, W. M. **Cultivo do Amendoim.** Sistemas de Produção n° 7. Embrapa Algodão, 2006.
- FU, Z.; HUANG, X.; MIN, S. Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. **Journal of Chromatography A**, n. 1209, p. 271-274, 2008.
- GONÇALEZ, E.; SOUZA, T.N.; ROSSI, M.H.; FELICIO, J.D.; CORRÊA, B. Avaliação da micoflora e ocorrência de micotoxinas em cascas de amendoim em diferentes estágios de maturação da vagem. **Ciência Agrotecnica**, v. 32, n. 5, p. 1380-1386, 2008.
- SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos.** Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.
- UNIÃO EUROPÉIA. Regulamento (CE) n° 401/2006 da Comissão de 23 de fevereiro de 2006. Estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos teores de micotoxinas nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, L 70 de 23 de fevereiro de 2006, p.31.
- UNIÃO EUROPÉIA. Regulamento (CE) n° 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro de 2006. Fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Européia**, L 364 de 20 de dezembro de 2006, p.15.
- WILSON, T.J.; ROMER, T.R. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, v.74, p.951-956, 1991.