

# COMPARAÇÃO ENTRE COLUNAS CROMATOGRÁFICAS DE DIFERENTES TAMANHOS DE PARTÍCULA NA ANÁLISE DE AFLATOXINAS EM AMENDOIM

## COMPARISON OF CROMATOGRAPHIC COLUMNS OF DIFFERENT PARTICLE SIZES IN AFLATOXINS ANALYSIS IN PEANUTS

Renata Galhardo Borguini<sup>1</sup>, Ronoel Luiz de Oliveira Godoy<sup>1</sup>, Sidney Pacheco<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pesquisador – Embrapa Agroindústria de Alimentos.

<sup>2</sup> Analista - Embrapa Agroindústria de Alimentos.

### Introdução

O amendoim é um grão importante 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. Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas recebem maior atenção, devido à sua propriedade marcadamente hepatocarcinogênica e altamente toxigênica, quando comparada a outros contaminantes (SCUSSEL, 1998).

A demanda por análise de micotoxinas em alimentos é crescente, uma vez que a maioria dos países estabeleceu limites legais com o objetivo de restringir a ingestão dessas toxinas. Entretanto, o monitoramento de micotoxinas nos produtos agropecuários depende da disponibilidade de métodos analíticos sensíveis, eficientes e rápidos. A detecção de baixos níveis de micotoxinas em produtos agrícolas torna-se cada vez mais importante.

Vários métodos têm sido publicados com relação à quantificação das micotoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Estes variam, principalmente, quanto aos tipos de solventes utilizados para extração e na fase móvel, colunas para a separação e detectores, dependendo do tipo de amostra e toxina a ser analisada (SCUSSEL, 1998). O objetivo deste trabalho foi comparar o desempenho de duas colunas cromatográficas de diferentes tamanhos de partícula da fase estacionária na detecção de aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> em amendoim. Tais colunas apresentavam diferentes tamanhos e especificidade de uso, sendo uma própria para uso em *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e outra para duas técnicas: HPLC e *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC).

### Material e métodos

Amostras de 25g de amendoim *in natura* naturalmente contaminadas por aflatoxinas (conforme análise prévia realizada no Laboratório de Micotoxinas da ESALQ/USP, que disponibilizou a amostra) foram extraídas com 100 mL de acetonitrila:água (84:16 v/v) em *shaker* Marconi<sup>®</sup> por 30 minutos. Após filtração, os extratos foram purificados em coluna Mycosep<sup>®</sup>. A detecção foi realizada em HPLC acoplado ao detector de fluorescência em comprimento de onda 364 nm de excitação e 440 nm de emissão, com derivatização pós-coluna utilizando-se uma célula eletroquímica denominada Kobra cell<sup>®</sup>. A quantificação foi realizada por padronização externa, com base em curva de calibração de 8 pontos. As seguintes colunas cromatográficas foram utilizadas para a separação das aflatoxinas: Coluna A: C<sub>18</sub>, 250 mm x 4,6 mm; partícula de 5,0 μ (XBridge<sup>®</sup> da marca Waters). Coluna B: C<sub>18</sub>, 100 mm x 4,6 mm; partícula de 2,4 μ (BDS Hypersil da marca Thermo Scientific).

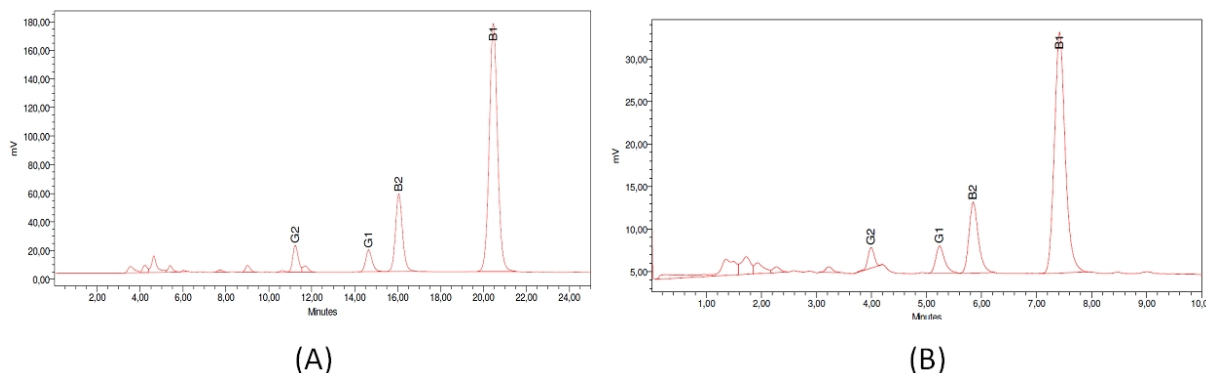
As condições cromatográficas comuns para ambas as colunas testadas foram: fase móvel composta de acetonitrila, metanol e água ultra-pura 15:20:65 (v/v/v) eluindo em modo isocrático. As colunas foram mantidas em forno a 40°C. Os parâmetros que variaram para as duas colunas foram:

a) coluna A: fluxo de 0,8 mL/minutos, volume de injeção 40 μL e tempo de corrida de 25 minutos;

b) coluna B: fluxo de 1,1 mL/minutos, volume de injeção 5 µL e tempo de corrida de 10 minutos.

### Resultados e discussão

Com base na comparação dos cromatogramas (Figura 1) obtidos a partir das análises pelas colunas A e B, pode-se observar que o tempo de retenção dos 4 picos diminuiu 10 minutos, em média. A diminuição do tempo de corrida, de 25 minutos na coluna A para 10 minutos na coluna B, resultou na redução de 55% do volume de fase móvel utilizada para cada corrida. Pode-se verificar ainda a qualidade cromatográfica compatível obtida por meio de ambas as colunas.



**Figura 1.** Cromatogramas de análise de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em amendoim por CLAE em diferentes colunas (A = 5,0 µ e B = 2,4 µ).

Considerando-se a quantificação das aflatoxinas por meio da análise das amostras de amendoim naturalmente contaminadas, os níveis de aflatoxinas totais foram muito próximos, de 16,74 e 16,42 µg/kg obtidas pelas colunas A e B, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Níveis de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (expressos em µg/kg) em amostra de amendoim analisado nas colunas A e B.

Aflatoxinas	Resultados coluna A (µg/kg)*	Resultados coluna B (µg/kg)*
<b>B1</b>	12,70	12,29
<b>B2</b>	1,86	1,88
<b>G1</b>	1,14	1,30
<b>G2</b>	1,03	0,95
<b>TOTAIS</b>	16,74	16,42

\*média das duplicatas.

A transição da técnica de HPLC para UPLC é uma tendência na área analítica. Conforme os resultados obtidos nesse trabalho, o uso de colunas de partículas menores 3 µ, destinadas a ambas as técnicas, resultou em economia de tempo e de reagentes, o que significa otimização do trabalho do analista e redução de custos e de uso de recursos ambientais para a produção de insumos, além de diminuir o descarte de resíduos gerados na análise.

### Referências Bibliográficas

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.

SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.

Autor a ser contactado: Renata Galhardo Borguini, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro/RJ – e-mail: [renata@ctaa.embrapa.br](mailto:renata@ctaa.embrapa.br)