

## A IMPORTÂNCIA DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM ANÁLISES DE MULTIMICOTOXINAS EM BEBIDAS VEGETAIS

### AUTORES

**Igor Ribão RIBEIRO**

Discente do curso de Engenharia de Alimentos UNILAGO

**Mirian Elisa Rodrigues GUERRA**

Docente do curso de Engenharia de Alimentos UNILAGO

### RESUMO

Este trabalho baseou-se na importância da cromatografia líquida de alta eficiência e UHPLC a ser capaz de realizar a determinação de multomicotoxinas em bebidas vegetais presentes na alimentação cotidiana das pessoas. A quantificação foi realizada através da técnica de cromatografia líquida de ultra performance acoplada a um espectrômetro de massas diante do preparo de amostras para uma avaliação comparativa de contaminantes através do método analítico desenvolvido. A partir desse trabalho entende-se que o desenvolvimento de metodologias analíticas fundamentadas em práticas mais dinâmicas e modernas, associados a um preparo de amostra e amostragem adequada, podem conferir vantagens operacionais de grande valor e grande eficiência a análise, o que, no ambiente de amostras de controle de qualidade de alimentos, reflete em maior qualidade dos produtos oferecidos ao consumidor e competitividade aos produtores nacionais de alimentos, resultando no fortalecimento da segurança alimentar e na segurança do alimento.

### PALAVRAS - CHAVE

Multimicotoxinas, Cromatografia Líquida, Controle de Qualidade.

## 1. INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida é uma técnica de separação da amostra preparada entre duas fases. Essa técnica utiliza duas fases distintas chamada de fase móvel, sendo líquida, e a fase estacionária, sendo sólida, como colunas analíticas de C18, C8, por exemplo. O desenvolvimento da tecnologia UHPLC é o avanço recente mais importante na técnica de separação por cromatografia líquida. Os sistemas que operam esta tecnologia trabalham com fase móvel a altas pressões, associado a colunas cromatográfica com partículas de tamanho reduzido, inferiores a 2  $\mu\text{m}$ , e conseguem atingir uma performance de separação superior a aqueles possíveis com tecnologias anteriores (DONG, 2019).

Os avanços recentes da técnica de cromatografia líquida tem colaborado para a sua consolidação como uma das principais técnicas analíticas no controle de segurança e qualidade de alimentos. Tornando mais simples e eficiente a determinação dos mais diversos contaminantes (QUINTON e KENNEDY, 2001).

Esse trabalho tem como objetivo demonstrar a eficiência da cromatografia líquida e o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de multomicotoxinas em bebidas vegetais. A utilização da técnica adere a quantificação e o controle de qualidade de bebidas vegetais presentes no cotidiano da população brasileira para segurança alimentar.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Multimicotoxinas

Micotoxinas são compostos produzidos pelo metabolismo secundário de fungos filamentosos (PITT, 2000) e podem ocorrer naturalmente em alimentos infestados por fungos. Estes compostos apresentam grande diversidade, sendo atualmente estimado o número de micotoxinas isoladas e caracterizadas superior a 1000, número que tem crescido com o avanço de técnicas analíticas e da variedade de fungos estudados (BRASE et al., 2013).

Dentre os fungos capazes de produzir micotoxinas, as principais classes são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (BRASE, et al., 2013). A ação dos *Fusarium* sobre as plantações é agressiva, acometendo principalmente o plantio de cereais, podendo produzir micotoxinas antes, durante e após a colheita. Já a ocorrência de *Aspergillus*, que pode se dar de forma destrutiva, levando a perdas de produtividade na lavoura acometida ou de forma branda, com sua infestação não trazendo atraso ao desenvolvimento vegetal, ocorre antes e também após a colheita, como um fungo de estocagem, enquanto que a contaminação por *Penicillium* se dá, majoritariamente, durante a estocagem de alimentos (IARC, 2012). A produção de micotoxinas em alimentos contaminados por fungos está intimamente relacionada às condições ambientais às que estão submetidos, como temperatura e umidade, assim como de fatores de manejo, em pré e pós colheita, como condições de armazenamento, de transporte, ataque de insetos, entre outros (MILANI, 2013).

Sendo assim, nem todas as micotoxinas são afetadas diretamente aos alimentos e ao consumidor devido aos seus níveis de concentração e sua toxicidade. Todavia, as micotoxinas aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, desoxinivalenol e zearalenona são as que mais causam risco e dano à saúde.

As aflatoxinas são produzidas por fungos, sendo que a aflatoxina B<sub>1</sub> é a mais tóxica das aflatoxinas, causando uma variedade de efeitos adversos e, em alguns casos podem ser letais, em diferentes espécies animais e humanos. Foi considerada pelo IARC (1993) como pertencente à classe 1, composto carcinógeno para humanos. O fígado é o principal órgão atingido uma ingestão aguda por aflatoxinas, sendo as mesmas

encontradas também em outros tecidos animais e produtos. As aflatoxinas M1 e M2 são metabólitos hidroxilados das aflatoxinas b1 e B2 e podem estar presentes no leite e produtos derivados obtidos de animais que ingeriram ração contaminada com estas aflatoxinas. De acordo com a Organização Mundial da saúde as principais fontes de aflatoxinas na ração animal são o milho, caroço de algodão e torta de amendoim (WHO, 2002).

As fumonisinas têm sido as micotoxinas mais pesquisadas nos últimos anos devido a sua recente descoberta, em 1988. Produzidas principalmente por *Fusarium moniliforme* e *Fusarium proliferatum* freqüentemente isolados de milho 11 (JECFA, 2001; WEIDENBOERNER, 2001). A distribuição dos fungos é similar, embora *Fusarium proliferatum* seja isolado mais frequentemente de sorgo que de milho. Segundo Bacon & Nelson (1994), um ou ambos os fungos podem ter uma frequência de ocorrência de 90% ou mais em milho e 90% dos *Fusarium moniliforme* isolados produzem fumonisinas. Neste grupo de micotoxinas, as fumonisina B1, B2 e B3 são as mais comuns A fumonisina B1 é considerada a mais importante devido a sua maior toxicidade e por geralmente representar até 70% do total de fumonisinas produzidas em culturas de laboratório ou em milho naturalmente contaminado (CAWOOD et al., 1991). Foi demonstrado que a fumonisina B1 é um hepatocarcinógeno não genotóxico para ratos, além de ter efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos e imunossupressor nestes animais (GELDERBLUM et al., 1991). A fumonisina B1 pode causar leucoencefalomalácia (LEME) em cavalos (KELLERMAN et al., 1990; ROSS et al., 1990; THIEL et al., 1991) e edema pulmonar em suínos (EPS) (HARRISON et al., 1990; COLVIN & HARRISON, 1992). Embora não exista evidência definitiva de carcinogenicidade em humanos, já foi reportado que há frequência maior de câncer de esôfago em regiões onde o milho é a base da dieta e os níveis de contaminação por *Fusarium* e/ou fumonisinas são altos (THIEL et al., 1992; JECFA, 2001).

A ocratoxina A é o composto mais tóxico do grupo das 7 ocratoxinas existentes (BUSBY JR & WOGAN, 1981; OMS, 1983). É principalmente produzida pelo *Aspergillus alutaceus* (*Aspergillus ochraceus*) (KOZAKIEWICZ, 1989, citado por MARQUARDT & FROHLISH, 1992), embora também a produzam *Aspergillus melleus*, *Aspergillus sulphureus*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium commune*, *Penicillium purpurecens*, *Penicillium palitans*, *Penicillium verrucosum*, entre outros (MOSS, 1996). A ocratoxina A é predominantemente produzida pelo *Penicillium viridicatum* em climas frios e *Aspergillus alutaceus* em climas quentes (STEYN, 1984) A ocratoxina A pode ser encontrada como contaminante principalmente nos cereais (cevada, arroz, milho, trigo, sorgo) e derivados, mas também tem sido relatada em café, uvas, cerveja, vinho, chocolate, carne, leite e derivados e especiarias (BENFORD et al., 2001). No Brasil, a ocratoxina A tem mostrado uma baixa frequência (RODRIGUEZ-AMAYA & SABINO, 2002).

A desoxinivalenol é uma micotoxinas do grupo dos tricotecenos, composto por mais de 180 substâncias produzidas por fungos das classes *Fusarium* e *Stachybotrys*. Foi isolado na 7 década de 1970 a partir de colônias de *Fusarium graminearum* e sua ocorrência se dá em culturas de inverso, majoritariamente trigo e cevada. Em virtude do quadro de vomito que causa após sua ingestão é conhecida como Vomitoxin e, segundo a Organização Mundial da Saúde (2002), a substância é considerada uma neurotoxina com características imunossupressoras e teratogênicas (MACHADO et al., 2017).

A zearalenona é uma micotoxina produzida por fungos da classe *Fusarium*, em particular *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* e *F. crookwellense* (BERTHILLER et al., 2016). A presença dos fungos capazes de produzir zearalenona é ampla, atingindo quase todos os continentes, infestando as culturas de cereais, principalmente trigo, centeio, arroz, milho, entre outras, nas fases de pré e pós colheita. A capacidade de resistências destas toxinas a muitas etapas de processamento, como a moagem e cocção de alimentos, permite que sua presença seja identificada em diversos produtos alimentícios processados (HERRERO LATORRE et al.,

2015). Por sua característica singular é uma micotoxinas altamente estrogênica, pode acusar doenças relacionadas a disfunção hormonal, tais como câncer de próstata, de ovário ou cervical (ROGOWSKA et al., 2019; ZINEDINE et al., 2007).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cromatografia Líquida

Sendo sistema UHPLC-MS/MS, as análises cromatográficas foram realizadas em um sistema da série LC Agilent 1290 Infinity (Santa Clara, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas QTRAP 6500 da Sciex 23 (Toronto, Canadá) com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) operando em modo positivo. Os softwares Analyst versão 1.6.3 e MultiQuant versão 3.0.2 (Sciex) foram utilizados para aquisição e processamento de dados. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna C18 Hypersil GOLD (50 x 2,1 mm, tamanho de partícula de 1,9 µm) da Thermo Scientific (Waltham, EUA) usando uma pré-coluna Acquity UHPLC BEH C18 (2,1 x 5 mm) da Waters (Milford, EUA), operando à temperatura de 30 °C e um volume de injeção de 5 µL. Utilizou-se um gradiente de eluição com solvente A (solução tampão: 0,1% v/v de ácido fórmico e 5 mmol L<sup>-1</sup> de formato de amônio) e solvente B (metanol acidificado com 0,1% v/v de ácido fórmico) como se segue: de 0 a 1 min a percentagem de solvente B foi mantida a 5%; de 1 a 5 min aumentou linearmente para 100% do solvente B e foi mantido constante até 5,75 min; de 5,75 a 6 min diminuiu linearmente para 5%, o que foi mantido até 7 min. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 350 µL min<sup>-1</sup>. Os parâmetros da fonte foram: Ion Spray Voltage em 4500 V, temperatura a 550°C, gás nebulizador (Gás 1) a 45 PSI, gás de dessolvatação (Gás 2) a 45 PSI e gás de cortina a 40 PSI.

Para iniciar as análises, as amostras foram feitas todas extrações sólido-líquido de acordo com as IO's. O Quadro 1 mostra as extrações das amostras analisadas.

Quadro 1: Amostras utilizadas e os principais tipos de contaminantes analisados.

AMOSTRA	TIPO DE CONTAMINANTE ANALISADO
Amendoim	Todos os Contaminantes
Coco	Todos os Contaminantes
Milho	Fumonisina B1 e B2; Ocratoxina A; Zearalenona
Soja	Ocratoxina A; Zearalenona
Arroz	Zearalenona
Café Torrado	Ocratoxina A
Cereais	Todos os Contaminantes

Fonte: DA SILVA et. al, 2021.

Transfere-se 2 mL da amostra de bebida vegetal para um tubo Falcon com capacidade para 15 mL, adiciona-se 2 mL de acetonitrila acidificada a 2% v/v de ácido acético, segue agitação manual e posterior adição 0,5 g de sulfato de magnésio, e em seguida adição de 0,4 g de cloreto de sódio. A mistura é então agitada em vortex por 1 min. Segue centrifugação a 4000 rpm por 10 min e recolhimento da fase superior do sobrenadante e injeção no sistema UHPLC-MS/MS.

### 3.2 Bebidas Vegetais

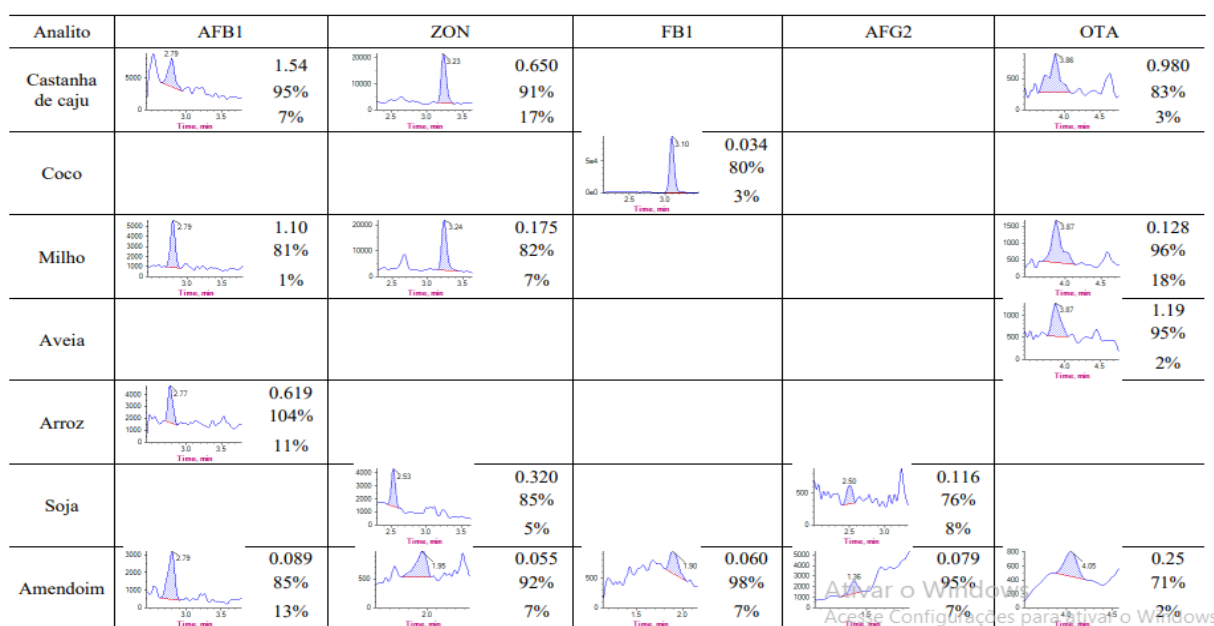
Amostras de bebidas vegetais a base de aveia, amendoim, arroz, castanha de caju, milho, soja e coco foram compradas em supermercados de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As amostras, após abertura das embalagens originais, foram mantidas sob refrigeração ( $-8 \pm 2^\circ \text{C}$ ) até o momento da análise.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Diante da análise feita pelo cromatógrafo, a extração de micotoxinas a partir da bebida vegetal de amendoim foi realizada. A melhor condição de extração foi selecionada pela avaliação da área normalizada, ou seja, razão percentual entre a área do analito em cada experimento e a área mais alta desse analito. A acidificação foi indispensável para a extração da fumonisina. No entanto, o experimento 8 foi mais favorável para a extração de aflatoxina e esses analitos apresentaram menor LMT. As médias das áreas normalizadas de todas as micotoxinas foram tratadas estatisticamente pelo Software Design Expert. A função de desejabilidade indicou que a extração com 2 mL de acetonitrila acidificada com 2% v/v de ácido acético e partição de fases com 0,5 g de sulfato de magnésio anidro e 0,4 g de cloreto de sódio foi a melhor condição e, portanto, selecionada. Comparando o presente método com o descrito por Miró-Abella et al. (2017) e Lahouar et al., (2017) observou-se que menor quantidade de amostras, solventes e sais foram necessários, bem como a ausência das etapas de evaporação e filtração da extração. Quanto aos analitos não comuns, Miró-Abella et al. apresentaram toxinas desoxinivalenol, T2 e HT2, enquanto, neste trabalho, FB1, FB2 e CTV foram analisados; Hamed et al. estudaram as toxinas HT2 e T2, desoxinivalenol e fusarenon-X, enquanto, no presente método, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA e CTV foram determinados. Quanto aos tipos de bebidas vegetais analisadas, o presente trabalho inseriu pela primeira vez produtos à base de amendoim, castanha de caju, milho e coco, entretanto, a bebida vegetal produzida a partir de semente de aveia não foi analisada.

A Figura 1 mostra o resultados da ocorrência de contaminação em sete bebidas vegetais analisadas.

Figura 1: Gráficos cromatográficos das amostras para cada analito.

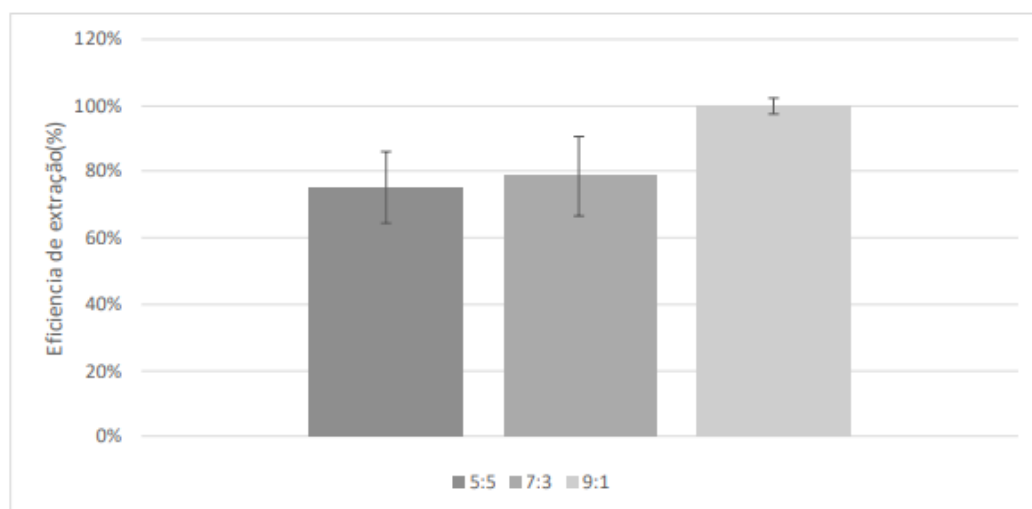


Os valores mostrados ao lado do cromatograma são concentrações em  $\mu\text{g L}^{-1}$ , recuperações e desvios padrão relativos.

Antes de serem analisadas, todas as amostras passaram por um preparo de amostra cauteloso e cuidadoso para que não ocorresse contaminação cruzada e tornando a análise ainda mais eficiente.

Assim, foram feitas análises de multomicotoxinas em amostras de café torrado, aveia, amendoim, arroz, castanha de caju, milho, soja e coco. A Figura 2 mostra, a condição de extração que oferece melhor eficiência de extração que aplica a solução composta por 9:1 (v/v), esta condição ainda apresenta dispersão reduzida de seus resultados, estimados pelo desvio padrão relativo expresso na Figura. Esta condição, portanto, foi escolhida para o método analítico.

Figura 2. Eficiência de extração de micotoxinas de amostra de café torrado



Fonte: THOMPSON et al., 2002

## 5. CONCLUSÃO

Apesar de ser uma análise cara, requer um alto investimento tanto da empresa quanto do cliente para realizá-la, a cromatografia líquida de alta eficiência apresenta uma alta capacidade de determinar as multomicotoxinas de bebidas vegetais e para o controle de qualidade desse tipo de alimento. Percebe-se também a importância do preparo das amostras, responsável por cerca de 90% de toda amostragem e ser o inicial da análise. Com isso, as análises de multomicotoxinas trazem benefícios, quantificando e impondo uma segurança do alimento para todo consumidor de bebidas vegetais, sendo de forma financeira e/ou de saúde.

Além disso, laboratórios por todo mundo realizam análises de multomicotoxinas em bebidas vegetais, desde a área técnica até o setor comercial. Um alto conhecimento químico e também de BPL, sempre será agregado para essas análises, tornando cada vez mais confiável e com maior êxito na quantificação dos analitos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACON, C. W. & NELSON, P. E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 6, p. 514-521, 1994.

BENFORD, D.; BOYLE, C.; DEKANT, W.; FUCHS, R.; GAYLOR, D. W.; HARD, G.; MCGREGOR, D. B.; PITT, J.I.; PLESTINA, R.; SHEPHARD, G.; SOLFRIZZO, M.; VERGER, P. J. P.; WALKER, R. Ochratoxin A. In: WHO Food Additives Series 47 – FAO. **Food and Nutrition paper**, v. 74, p. 281-415, 2001.

BERTHILLER, F., MARAGOS, C. M., DALL'ASTA, C. Chapter 1: Introduction to masked mycotoxins. **Issues Toxicol.** Janua, p. 1–13. 2016

BRASE, S., GLASER, F., KRAMER, C. S., LINDNER, S., LINSSENMEIER, A.M., MASTERS, K.-S., MEISTER, A.C., RUFF, B. M., ZHONG, S., The Chemistry of Mycotoxins. **SpringerVerlag**. 2013.

BUSBY JR, W. F. & WOGAN, G. N. Aflatoxins. In: SHANK, R.C. (ed.) **Mycotoxins and N-nitroso compounds: environmental risks**. CRC Press, p.3-27, 1981

CAWOOD, M.E.; GELDERBLOM, W.C.A.; VLEGGAAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Isolation of the fumonisin mycotoxins – a quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 1958-1962, 1991.

DA SILVA, L. P. et al. Desenvolvimento de métodos baseados em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para determinação de micotoxinas e agrotóxicos em alimentos. 2021.

DONG, M.W. **HPLC and UHPLC for practicing scientists**, Second Edi. ed. Wiley. 2019.

EUROPEAN COMMISSION, 2006. Regulamento (CE) no 401/2006 da Comissão, de 23 de Fevereiro de 2006 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. **J. Of. da União Eur.** L70, 12–34.

IARC. **Improving public health through mycotoxin control**. IARC Scientific Publications. 2012.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva: World Health Organization; Fifty-sixth meeting, 2001.

KELLERMAN, T. S.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; GELDERBLOM, W. C. A.; CAWOOD, M. E.; COETZER, J. A. W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. **Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 4, p. 269-275, 1990.

KOZAKIEWICZ, Z. Aspergillus species on stored products. **Mycological paper** n o 161, 1. CAB International Mycological Institute, Kew, 1989.

LAHOUAR, A., MARIN, S., CRESPO-SEMPERE, A., SAÏD, S., SANCHIS, V. International Journal of Food Microbiology In fluence of temperature water activity and incubation time on fungal growth and production of ochratoxin A and zearalenone by toxigenic Aspergillus tubingensis and Fusarium incarnatum isolates in sorghum see. **J. Food Microbiol.** v. 242, p. 53–60. 2017.

MACHADO, L. V., MALLMANN, C. A., MALLMANN, A. O., COELHO, R. D., COPETTI, M. V. **Deoxynivalenol in wheat and wheat products from a harvest affected by fusarium head blight**. v. 37, p. 8–12. 2017.

MARQUARDT, R.R. & FROHLISH, A.A. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3968-3988, 1992.

- MILANI, J. M. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: A review. **Vet. Med. (Praha)** 2013.
- MOSS, O. M. **Mode of formation of ochratoxin A. Food Additives and Contaminants**, 13 (supplement), 5-9, 1996.
- PITT, J.I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **Br. Med. Bull.** v. 56, p. 184–192. 2000.
- QUINTON, L. A., KENNEDY, J.F. **Food Analysis by HPLC**. 2nd ed. Carbohydr. Polym. 2001.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. & SABINO, M. **Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 1-11, 2002.
- ROGOWSKA, A., POMASTOWSKI, P., SAGANDYKOVA, G., BUSZEWSKI, B. **Toxicon Zearalenone and its metabolite: Effect on human health metabolism and neutralisation methods**. v. 162, p. 46–56. 2019.
- ROSS, P. F.; NELSON, P. E.; RICHARD, J. L.; OSWEILLER, G. D.; RICE, L. G.; PLATTNER, R. D.; WILSON, T. M. Production of fumisinins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 10, p.3225-3226, 1990.
- SHEPHARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisin B1 and B2 by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 2077-2087, 1990.
- STEYN, P. S. Ochratoxins and relate dihydroisocoumarins. In: BETINA, V. (ed.), *Mycotoxins: Production, Isolation, Separation and Purification*. **Elsevier Science Publishers**, p. 183-216, 1984.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.
- WORLD AND HEALTH ORGANIZATION (WHO). Evaluation of certain mycotoxins in food. **Technical report series 906**:1–62. 2002.
- ZINEDINE, A., SORIANO, J.M., MAN, J., MOLTO, J.C. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone. **An oestrogenic mycotoxin** v. 45, p. 1–18. 2007.