

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 µm, 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 multimicotoxinas 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 à condições ambientais à 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 as 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 a saúde.

As aflatoxinas são produzidas por fungos, sendo que a aflatoxinas b1 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⁻¹ 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⁻¹. 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

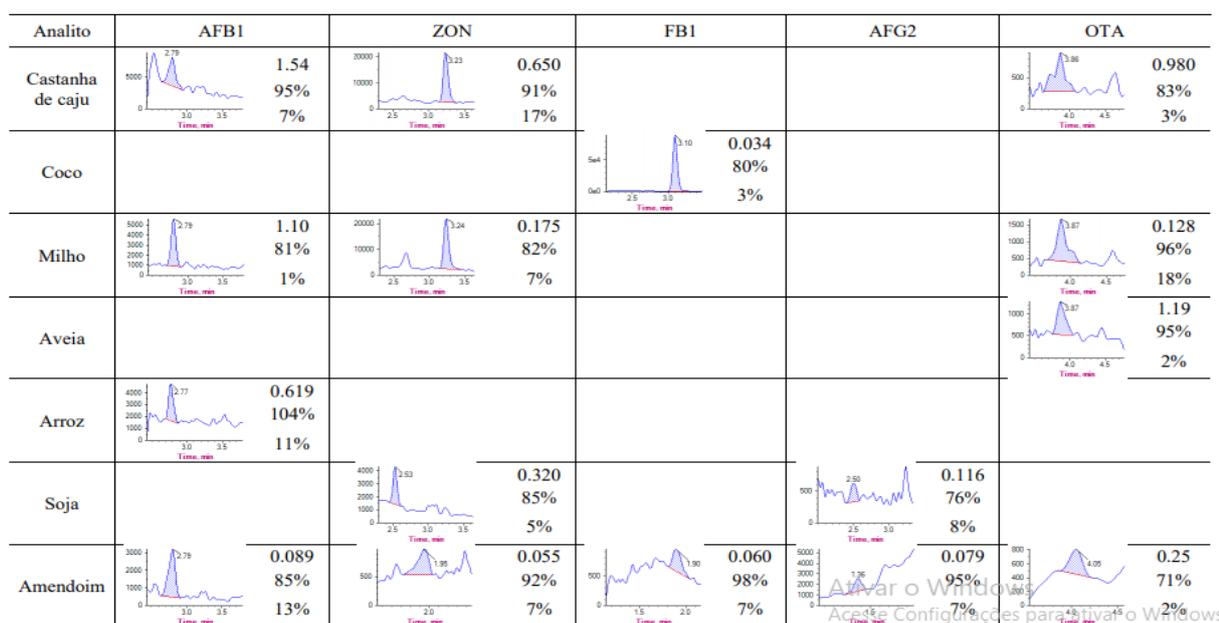
Amostras de bebidas vegetais a base de aveia, amendoim, arroz, castanha de caju, milho, soja e coco foram compradas em supermercados de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As amostras, após abertura das embalagens originais, foram mantidas sob refrigeração ($-8 \pm 2^\circ \text{C}$) até o momento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

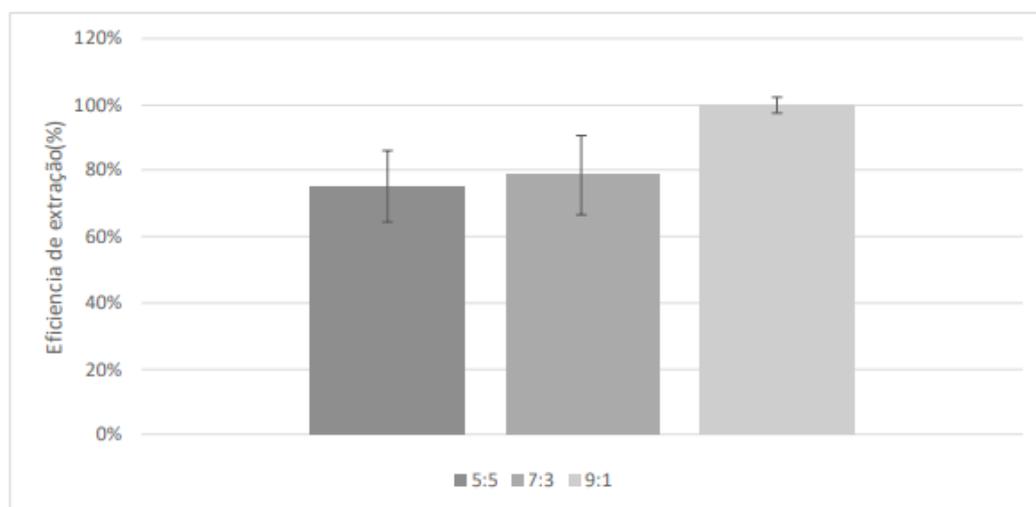


Os valores mostrados ao lado do cromatograma são concentrações em $\mu\text{g L}^{-1}$, recuperações e desvios padrão relativos.

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.; VLEGGAR, 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.; GELDERBLOM, 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.