

PRESENÇA DE AFLATOXINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) EM CEREAIS MATINAIS ADQUIRIDOS NO COMÉRCIO DO MUNICÍPIO DE SANTA MARIA - RS¹

THE PRESENCE OF AFLATOXIN THROUGH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) IN BREAKFAST CEREALS PURCHASED IN THE MARQUET OF SANTA MARIA, RS

Roberta Pinheiro² e Eliza Beti de Cassia Stefanon³

RESUMO

As aflatoxinas são consideradas um dos mais perigosos contaminantes de alimentos e rações animais, e por produzirem metabólitos tóxicos, apresentam grande risco à saúde humana. Utilizou-se a metodologia de extração preconizada por Mallmann et al., (2000). As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando coluna cromatográfica de fase reversa C₁₈ e fase móvel água: ácido acético 1%, acetonitrila e metanol (39:39:10:12) a um fluxo de 2.2 ml/min. O volume de injeção utilizado foi 50 µl. Avaliou-se 15 amostras de cereais matinais adquiridos aleatoriamente na cidade de Santa Maria - RS, no período de março a maio de 2011. Das 15 amostras analisadas, nenhuma apresentou valores superiores aos estabelecidos pela ANVISA. A não detecção de aflatoxinas nessas amostras pode ser devido a uma maior conscientização dos produtores e da indústria alimentícia na adoção de medidas tecnológicas que reduzem a exposição desses alimentos a essas toxinas.

Palavras-chave: alimentos, micotoxinas, contaminantes.

ABSTRACT

Aflatoxins are considered one of the most dangerous contaminants of food and animal feed, and since they produce toxic metabolites, they present a great risk to human health. It is used the methodology of extraction proposed by Mallmann et al, (2000). Some analyses were performed by high performance liquid chromatography (HPLC) using chromatography column with reverse phase C18 and water mobile phase: acetic acid 1%, acetonitrile and methanol (39:39:10:12) at a flow rate of 2.2 ml/min. The injection volume used was 50 µl. 15 samples of breakfast cereals purchased randomly in the city of Santa Maria, RS, have been assessed from March to May, 2011. None of the 15 samples had values higher than those established by ANVISA. The failure to detect aflatoxin in these samples may be due to the greater awareness of producers and the food industry in the adoption of technological measures that reduce the exposure of food to these toxins.

Keywords: food, mycotoxins, contaminant.

¹ Trabalho Final de Graduação - TFG.

² Acadêmica do Curso de Farmácia - UNIFRA. E-mail: roberta.dp@hotmail.com

³ Orientadora - UNIFRA. E-mail: elizastefa@gmail.com

INTRODUÇÃO

As micotoxinas representam um risco de contaminação, acarretando sérios prejuízos à saúde humana (BANDO et al., 2007). Dentre as micotoxinas, ressalta-se as aflatoxinas que são substâncias tóxicas provenientes do metabolismo secundário dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. O *A. flavus* produz apenas aflatoxinas do grupo B, e o *A. parasiticus* produz grupo B e G (ABADIA et al., 1997; OLIVEIRA; GERMANO, 1997; AMARAL; MACHINSLEI JUNIOR, 2006; FREIRE et al., 2007; MALLMANN et al., 2007; PRADO et al., 2008; ROCHA et al., 2008).

Diversos compostos são conhecidos como aflatoxinas, porém, somente as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 possuem importância toxigênica conhecida. São compostos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. As aflatoxinas, no entanto, apresentam diferentes graus de atividade biológica, sendo a aflatoxina B1 considerada como a mais tóxica e com maior poder carcinogênico dentre as micotoxinas, além de ser a mais frequentemente encontrada em alimentos (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; ROSMANINHO et al., 2001; FREIRE et al., 2007).

As micotoxinas são capazes de se desenvolver numa extensa variedade de alimentos, como no leite de vaca, milho, amendoim, arroz, algodão, castanha, nozes, cereais, sementes, pistache, figo, cacau, frutas secas, temperos e óleos vegetais entre outros. Este desenvolvimento depende dos fatores geográficos, sazonais e estocagem do produto. As áreas tropicais e subtropicais são mais sujeitas a contaminação do que áreas temperadas, pois os melhores locais de produção para aflatoxinas são temperatura e umidade elevadas (MIDIO; MARTINS, 2000; CIB, 2004; EMBRAPA, 2007; PRADO et al., 2008; ROCHA et al., 2008; MALLMANN et al., 2010).

A contaminação de alimentos por micotoxinas tem sido relatada no mundo todo, principalmente em alimentos susceptíveis ao crescimento fúngico, como grãos e cereais. O monitoramento de micotoxinas em alimentos é de extrema importância para a saúde pública, visando adoção de medidas tecnológicas a fim de reduzir a exposição a alimentos considerados de risco para essas micotoxinas (MAZIERO; BERSOT, 2010).

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e biotransformadas primariamente no fígado, por um misto de oxidases. Estas enzimas, pertencentes a superfamília das enzimas do sistema citocromo P-450, são responsáveis pelo metabolismo oxidativo de um grande número de xenobióticos. Existe um consenso atual entre um grande número de especialistas, de que a AFB1 é um pró-carcinógeno, que requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (MALLMANN et al., 1994; OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

Essas toxinas apresentam efeitos tóxicos bem definidos, causando sérios riscos à saúde humana. Devido a isso, a maioria dos países adotou valores limites permitidos (LMP), no Brasil, o Ministério da Saúde estabeleceu que o limite máximo permitido, para alimentos destinados ao consumo humano é de 20 µg/kg, somadas as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Mesmo assim não oferecem segurança total

a saúde o que só aconteceria mediante a ausência de tais toxinas.

Torna-se importante a realização constante de análises de alimentos propensos a estas contaminações (MIDIO; MARTINS, 2000; CIB, 2004; MALLMANN; DILKIN, 2007; PRADO et al., 2008).

MATERIAL E MÉTODO

Foram analisadas quinze amostras de cereais matinais a base de aveia, gergelim, germe de trigo, uva passas, mel de abelha, melado de cana, fibra de trigo, açúcar mascavo, linhaça, flocos de milho, flocos de arroz, flocos de cereais, malte de cereais, óleo de arroz, óleo de milho, óleo de soja, castanha do Pará, castanha de caju e glúten, adquiridas no comércio do município de Santa Maria - RS, no período de março a maio de 2011.

As amostras foram trituradas em moinho de facas, homogeneizadas em sacos plásticos, pesadas separadamente (50 g) em copos com auxílio de balança semi-analítica. Após pesagem, foram adicionados 100 mL de solução acetonitrila:água (84:16, v/v) sendo deixada sob agitação por três minutos. Após a agitação, as amostras foram filtradas e uma alíquota foi retirada e evaporada sob fluxo de nitrogênio a 65°C. O extrato seco foi dissolvido em 1 mL de solução acetonitrila: água (84:16, v/v) 5% ácido acético, sendo então conduzido ao sistema automatizado de purificação em fase sólida. Após a purificação, uma alíquota do extrato foi derivatizada com ácido trifluoroacético por dez minutos a 65°C. Finalizada esta etapa, as amostras foram conduzidas a análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência.

As aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foram determinadas segundo o método desenvolvido e validado por Mallmann et al. (2000). Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência composto por degaseificador, bomba quaternária, injetor automático, compartimento de coluna termostaticada e detector de fluorescência modelo 1100 marca Agilent Technologies. Na fase estacionária, utilizou-se coluna cromatográfica de fase reversa C₁₈, mantida a temperatura de 50°C. A fase móvel (FM) utilizada, foi composta de água:ácido acético 1%, acetonitrila e metanol (39:39:10:12) a um fluxo de 2.2 ml/min. O volume de injeção utilizado foi 50 µl. O comprimento de onda Excitação (Ex) foi de 365, Emissão (Em): 450.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizou-se um padrão de Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, conforme mostra na figura 1, para comparação cromatográfica com as amostras analisadas.

O limite de quantificação/coeficiente de recuperação durante a utilização do método para aflatoxinas, foram 1µg/kg/94,5% AFB1 (aflatoxina B1); 1µg/kg/80,0% AFB2 (aflatoxina B2); 1µg/kg/88,5% AFG1(aflatoxina G1); 1µg/kg/88,1% AFG2 (aflatoxina G2).

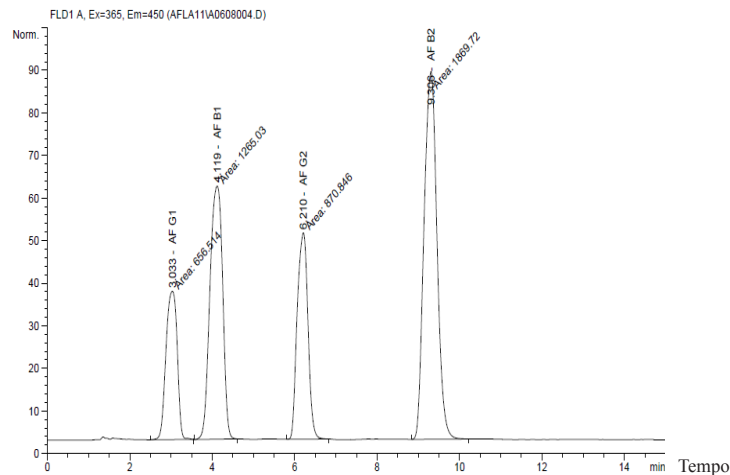


Figura 1 - Cromatograma de padrão de Aflatoxinas, comprimento de onda

Ex: 365, Em: 450, FM: A:B:C:D (39:39:10:12), vazão: 2.2 ml/min, pressão = 100, temperatura: 50 °C

Das quinze amostras adquiridas aleatoriamente em estabelecimentos comerciais na cidade de Santa Maria - RS, nenhuma apresentou contaminação de aflatoxinas, como mostra-se na figura 2.

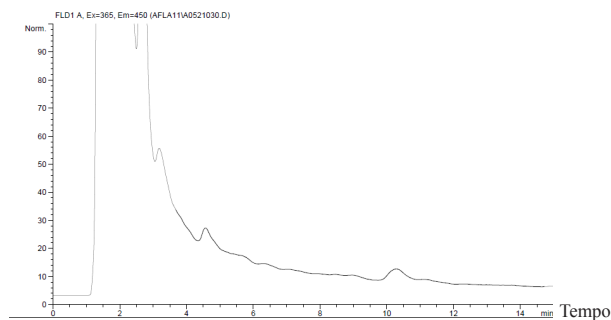


Figura 2 – Cromatograma de amostra de aflatoxinas analisadas

A RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011 da ANVISA, dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, sendo que para cereais e produtos de cereais o valor é de 10 µg/Kg (BRASIL, 2011).

Diversos autores realizaram, em diferentes regiões do Brasil, análises para detectar aflatoxinas nos variados tipo de alimentos e não encontraram resultados significativos.

Em estudo realizados por Kawashima e Soares (2006), analisaram 74 amostras de produtos a base de milho e apenas 5 amostras apresentaram positivo para aflatoxina B1, 3 amostras para B2, as aflatoxinas G1 e G2 não foram detectadas em nenhuma amostra analisada.

Prado et al., (2008) analisaram 30 amostras de pimenta e 20 de orégano nenhuma amostra apresentou contaminação com aflatoxinas.

Rupollo et al. (2006) realizaram um estudo com armazenamentos de grãos de aveia em sistema hermético por 12 meses e após este período não detectaram aflatoxinas B1, B2, G1e G2. Dessa maneira, a importância dos procedimentos, tais como, técnicas de secagem e armazenamentos dos

produtos alimentícios devem ser cuidadosamente controlados, para minimizar o crescimento de fungos e a possível produção de micotoxinas.

Segundo Pereira et al. (2002) a presença do fungo no alimento não implica, obrigatoriamente, em produção de micotoxina, assim como a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo.

Algumas razões podem ser levantadas para a queda no nível de contaminação ocorrida nos cereais como maior conscientização por parte de produtores, industriais e comerciantes quanto ao problema. Também a divulgação pela mídia, dos dados de contaminação de alimentos por aflatoxinas levando a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a tomar medidas punitivas contra algumas indústrias desses produtos, pode também ter tido um papel importante nos resultados visando a saúde do consumidor (CALDAS et al., 2002).

CONCLUSÃO

Devido a importância da exposição humana à aflatoxinas para a saúde pública e as condições climáticas do Brasil, que favorecem a produção de fungos e produção de micotoxinas, é necessário um constante monitoramento da qualidade dos alimentos oferecidos para os consumidores. Porém, só a continuidade do programa de monitoramento poderá dizer se essa melhora na contaminação por aflatoxinas é permanente.

REFERÊNCIAS

ABADIA, B. et al. Ocorrência natural de aflatoxinas em sorgos híbridos cultivados en la microrregión del Alto Magdalena, Colômbia. **Revista Corpoica**, v. 2, n. 1, p. 22-26, 1997.

AMARAL, K. A. S.; MACHINSKI JUNIOR, M. Métodos analíticos para determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados. **Revista Analytica**, Agosto/setembro, n. 24, p. 60-62, 2006.

BANDO, E. et al. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 3, p. 175-180, 2007.

BRASIL, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 7 de 18/02/2011**. disponível em: <<http://www.diariodasleis.com.br/busca/exibmlink.php?numlink=216390>>. Acesso em: 22 jun. 2011.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CIB (Conselho de Informações sobre biotecnologia). **Ingestão de Aflatoxinas pode causar câncer**. São Paulo, v. 2, n. 5, p. 1-4, 2004. Disponível em: <<http://www.cib.org.br/pdf/biotech09.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2010.

EMBRAPAAGROINDÚSTRIATROPICAL. Agropacto: propostas para a cajucultura. **Agroindústria Tropical**, n. 123, p. 1-10, 2007.

FREIRE, F. G. O. et al. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, v. 1, 1 ed., p. 48, 2007. (Documentos 110).

KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. S. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.

MALLMANN, C.A.; SANTURINO, J. M.; WENTZ, I. Aflatoxinas - Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 635-643, 1994.

MALLMANN, C. A. et al. Incidência de aflatoxinas em farinha de milho e derivados destinados a alimentação humana. **Revista Brasileira de Toxicologia**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 78-132, 2000.

MALLMANN, C. A. et al. Desempenho produtivo de frangos de corte intoxicados com diferentes concentrações de aflatoxinas na dieta. In: **XX CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA**. Porto Alegre, 2007.

MALLMANN, Carlos Augusto; DILKIN, Paulo. **Micotoxinas e micotoxicoses em suínos**. Santa Maria: Editora Sociedade Vicente Palloti, 2007.

MALLMANN, C. A. et al. Fungos e micotoxinas em aves ornamentais. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campinas Grande, v. 12, n. 1, p. 100, 2010.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. dos S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campinas Grande, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p. 62-78, 2000.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 4 p. 417- 424, Agosto, 1997.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **B. Ceppa**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 141-156, 2002.

PRADO, G. et al. Determinação de Aflatoxinas B₁ em pimenta (*Piper nigrum* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) por Cromatografia em Camada Delgada e Densitometria. **Quim. Nova**, Belo Horizonte, v. 31, n. 4, p. 514-517, 2008.

ROCHA, M. D. et al. Incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas - MG, Brasil. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 21, n. 1, p. 15-19, 2008.

ROSMANINHO, J. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; BITTENCOURT, A. B. F. Efeitos das micotoxicoses crônica na produção avícola. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 107-114, 2001.

RUPOLLO, G. et al. Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de micotoxinas em grãos de aveia. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras: v. 30, n. 1, p. 118-125, 2006.