

Foto: Renata Silva

COMUNICADO
TÉCNICO

232

Rio de Janeiro, RJ
Dezembro, 2018



Método Multianálito para Análise Simultânea de Treze Micotoxinas na Matriz Milho

Marianna Ramos dos Anjos¹
Alessandra Teixeira da Silva²
Izabela Miranda de Castro³

Método Multianalito para Análise Simultânea de Treze Micotoxinas na Matriz Milho¹

¹ Licenciada em Química, M. Sc. em Ciência de Alimentos, Analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

² Engenheira de Alimentos, M.Sc. em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Técnica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

³ Bacharel em Química, Ph.D. em Geoquímica Orgânica Molecular, Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Introdução

O milho é um dos mais importantes cereais cultivados no Brasil. Este produto é um dos componentes principais das rações animais e também constitui um item importante da dieta da população brasileira, de norte a sul do país. Igurias como o bolo de fubá, canjica, curau, mungunzá, pamonha e pipoca são alguns exemplos de pratos típicos muito consumidos tanto nos lares como em festas em todo o país, nos quais o ingrediente indispensável é o milho. As últimas estimativas das safras do grão, divulgadas em maio pelo IBGE, totalizaram 84,5 milhões de toneladas (IBGE, 2018).

O amplo consumo de milho implica na necessidade de se produzir um alimento seguro. O maior problema enfrentado

por esta cultura é a presença de toxinas fúngicas, o que reduz severamente a sua qualidade. As micotoxinas são metabólitos fúngicos produzidos principalmente por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria*, e sua ocorrência está associada a problemas de saúde em humanos e outros animais, que são causados pela ingestão de alimentos contaminados (Andrade *et al.*, 2017). Estas micotoxinas têm uma distribuição mundial, o que indica a necessidade de um controle severo sobre sua presença nos alimentos.

Os limites destes metabólitos tóxicos em alimentos e rações são regulamentados pelas diferentes legislações. Segundo o “Sistema de Alerta Rápido para Alimentos e Rações (RASFF, *Rapid Alert System for Food*

and Feed)” da União Europeia, as micotoxinas integram a categoria de perigo com o maior número de notificações na alimentação (RASFF, 2018). Os produtos agrícolas brasileiros vêm enfrentando barreiras técnicas no exterior por apresentarem toxinas acima dos limites estabelecidos. Para sanar esta situação, deve-se começar por um controle da qualidade adequado e eficaz. Este controle demanda análises do tipo multianalito para quantificar os principais metabólitos fúngicos do milho.

O desenvolvimento e o aperfeiçoamento de métodos analíticos para a determinação de micotoxinas em alimentos devem ser constantes, a fim de adequá-los às exigências das análises de rotina, e principalmente para atender aos restritivos limites máximos tolerados (LMT) nas regulamentações para controle destas toxinas (Sartori, 2015).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método multianalito para a determinação simultânea de treze micotoxinas (Figura 1): aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂), fumonisinas B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂), ocratoxina A (OTA), nivalenol (NIV), desoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA), toxina T-2 (T-2), toxina HT-2 (HT-2) e esterigmatocistina (STC) em milho, por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM).

Análise multimicotoxinas (13 analitos)

Preparo das Amostras: as amostras de grãos de milho, provenientes dos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, foram moídas em moinhos de facas (em quantidade mínima de aproximadamente de 200 g) até obtenção de um material homogêneo. Após a moagem foram armazenadas em frascos de vidro no freezer a -23 °C até o momento da análise.

Extração das micotoxinas: foram pesados 5 g da amostra de milho, finamente moída, em tubo de centrífuga de 50 mL e adicionados 20 mL da solução de extração (acetonitrila: água (84:16 v/v)). Em seguida, agitou-se em vórtex por 30 s e em agitador mecânico por 1 h. Centrifugou-se a 5000 rpm por 5 min à temperatura ambiente (25 °C). Foi transferido 1 mL do sobrenadante para frasco de vidro âmbar e evaporado sob nitrogênio. Adicionou-se em seguida 1 mL da fase móvel A, agitou-se em vórtex por 30 s, filtrou-se em membrana PTFE 0,22 µm e transferiu-se para o vial do sistema Acquity UPLC®.

Condições Cromatográficas e Parâmetros do Espectrômetro de Massas: a fase móvel A foi composta de solução aquosa de ácido fórmico 0,1 % e a fase B de acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico. Utilizou-se a vazão de 0,4 mL.min⁻¹ em modo gradiente: 0 - 3 min (10 % B); 3 - 10 min (70 % B); 10,1 - 12 min (90 % B); 12,1 - 15 min (10 % B). Foi utilizada a coluna Waters Acquity BEH® C18 (100 mm x 2.1 D.I., 1,7 µm),

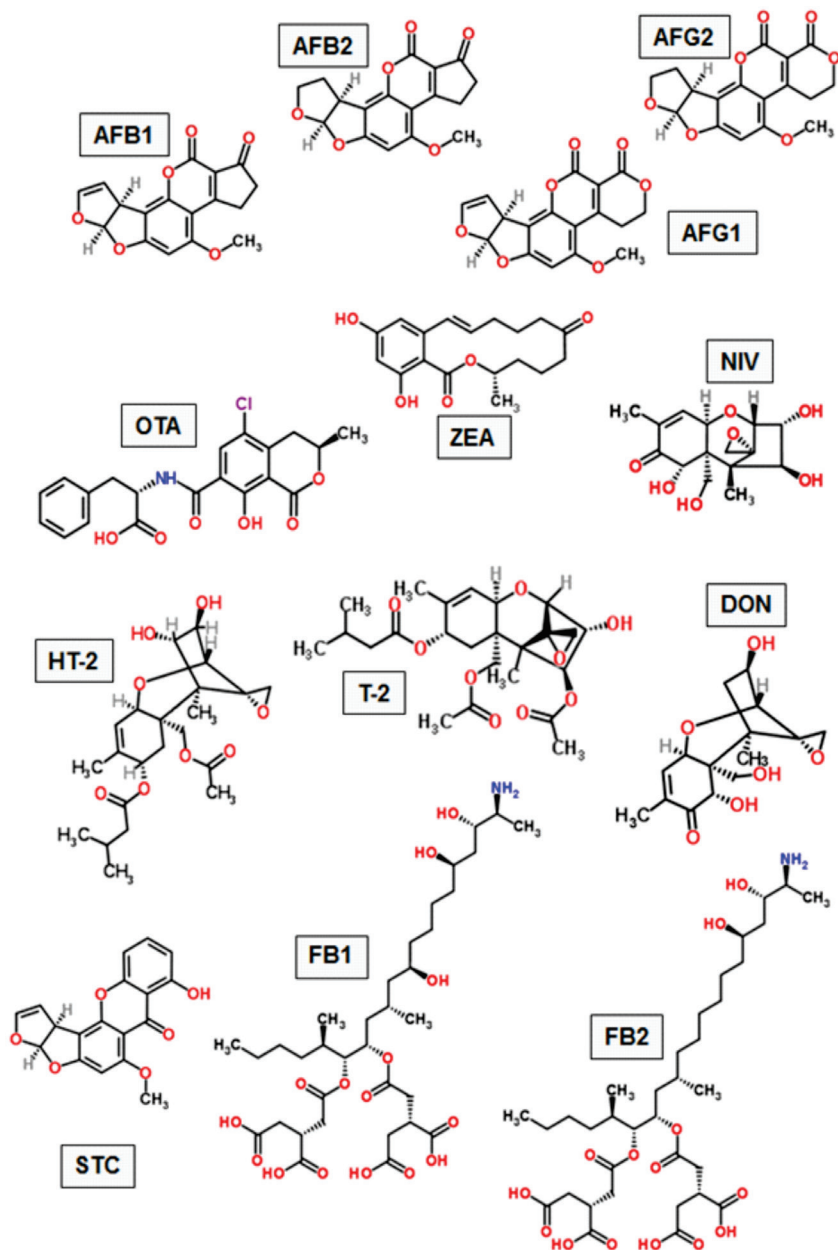


Figura 1. Estruturas químicas das 13 micotoxinas avaliadas neste estudo: aflatoxinas: B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂), fumonisinas B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂), ocratoxina A (OTA), nivalenol (NIV), desoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA), toxina T-2 (T-2), toxina HT-2 (HT-2) e esterigmatocistina (STC).

com temperatura do forno de 35 °C. O espectrômetro de massas Quattro Premier XE® (Waters Corp., Ma, USA) foi operado com fonte de ionização por eletronebulização (ESI) em modo positivo. Através da infusão das soluções de trabalho das treze micotoxinas com concentração aproximada de 1 µg.mL⁻¹ foram estabelecidas as transições de quantificação e confirmação.

Padrões analíticos utilizados: os padrões certificados Biopure de micotoxinas foram fornecidos pela Romer Labs (Viena, Áustria). Foram preparadas soluções individuais de trabalho para cada uma das treze micotoxinas, com concentração igual a 1 µg.mL⁻¹. A partir destas, foi preparada uma solução (Mix) contendo as treze micotoxinas com concentração variando de 0,1 a 1,6 µg.mL⁻¹ para o preparo da curva analítica.

Validação do método

Para a validação do método foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, efeito de matriz, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade) e os limites de detecção e quantificação. Os cálculos foram feitos pelos softwares Masslynx® e Microsot Excel®.

Comprovação da eficiência do método

A primeira etapa de qualquer análise utilizando a espectrometria de massas é ajustar os parâmetros do EM para cada um dos analitos que será estudado. Na Tabela 1 encontram-se as respectivas transições de quantificação

e confirmação obtidas a partir da infusão das soluções de trabalho com concentração aproximada de 1 µg.mL⁻¹.

Tabela 1. Transições de quantificação e confirmação das treze micotoxinas.

Micotoxina	Transição de quantificação	Transição de confirmação
AFB ₁	313 → 241	313 → 285
AFB ₂	315 → 259	315 → 285
AFG ₁	329 → 243	329 → 283
AFG ₂	331 → 245	331 → 257
FB ₁	722 → 333,5	722 → 352
FB ₂	706 → 335,5	706 → 317,6
NIV	313 → 295	313 → 175
DON	297 → 249	297 → 231
T-2	467 → 305	467 → 245
HT-2	425 → 263	425 → 105
OTA	404 → 239	406 → 241
ZEA	319 → 185	319 → 187
STC	325 → 281	325 → 253

A seletividade foi avaliada pela análise de amostra isenta de contaminação. O método proposto neste estudo demonstrou ser seletivo para as treze micotoxinas na matriz milho, pois não foram encontrados interferentes com mesma relação massa/carga (*m/z*) dos íons de interesse (Tabela 1), nos respectivos tempos de retenção das micotoxinas.

Após a comparação dos resultados de seis replicatas (no nível de concentração do LMT) das treze micotoxinas em fase móvel, com os resultados de seis replicatas em extrato de matriz (no mesmo nível de concentração) não foi observado o efeito de matriz. A comparação se deu através da aplicação do teste F (Fisher-Snedecor) e do teste t de Student. Os valores de F obtidos foram menores que o F crítico para 5 graus de liberdade (n₁=n₂=6) com nível de confiança de 95 % (5,050), enquanto

os valores de t calculados foram menores do que o t crítico (2,2281). Estes valores se encontram na Tabela 2.

As curvas analíticas obtidas para a maioria das micotoxinas tiveram um coeficiente de correlação (R) acima de 0,99, com exceção das fumonisinas e da AFB_1 , que tiveram um valor de R diferente, mas ainda assim acima de 0,90, que é o recomendado pelos guias

de validação (INMETRO, 2010), o que demonstra que a resposta é linear. Os valores de R obtidos se encontram na Tabela 2.

Os limites de detecção e quantificação obtidos foram inferiores aos limites máximos tolerados (LMT) estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2017). Ambos se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Limites máximos tolerados (LMT), coeficientes de correlação (R) das curvas analíticas, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e valores de F e t de Student calculados para o efeito de matriz.

Micotoxina	LMT ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Coef. de correlação (R)	LD ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	F calc.	t calc.
AFB_1	20	0,988058	5,2	10,0	0,363337	0,367014
AFB_2	20	0,999660	5,2	10,0	0,400392	0,110370
AFG_1	20	0,997471	5,2	10,0	0,574795	0,011919
AFG_2	20	0,999828	5,2	10,0	0,000245	0,679443
FB_1	1500	0,974259	160,0	320,0	0,318758	0,007471
FB_2	1500	0,955765	160,0	320,0	0,011091	3,06E-11
NIV	3000	0,997721	56,0	112,0	0,316188	0,0000467
DON	3000	0,999001	56,0	112,0	0,766019	0,673461
T-2	*	0,994366	56,0	110,0	0,343645	0,076105
HT-2	*	0,999002	56,0	110,0	0,299604	0,041791
OTA	20	0,992987	2,5	5,2	4,535E-05	1,480E-05
ZEA	40	0,993260	24,0	50,0	0,031424	2,289E-06
STC	*	0,991793	25,0	50,0	0,316188	4,678E-05

*Limite Máximo Tolerado não estabelecido. (BRASIL, 2017)

Os valores de recuperação para as treze micotoxinas, em três níveis de fortificação (0,5, 1,0 e 2,0 x LMT) ficaram na faixa de 70 a 120 %, e os coeficientes de variação (CV) foram inferiores a 20 %. Logo, encontram-se dentro do recomendado pelos guias de validação (BRASIL, 2011; INMETRO, 2010), com exceção da AFG₂, como pode ser observado na Tabela 3.

O método multianalito para a análise simultânea de treze micotoxinas em milho, de extração rápida e simples, se mostrou seletivo, exato e preciso, dentro da faixa de trabalho avaliada, com limites de detecção e quantificação inferiores ao limite máximo tolerado (LMT) estabelecido para cada micotoxina em milho.

Tabela 3. Valores de recuperação (%) e coeficientes de variação (CV) obtidos para os três níveis de fortificação.

Micotoxina	LMT ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	0,5 x LMT		1,0 x LMT		2,0 x LMT	
		% Rec	CV	% Rec	CV	% Rec	CV
AFB ₁	20	117	8,5	98	2,2	99	19,0
AFB ₂	20	99	11,7	99	9,8	99	14,8
AFG ₁	20	104	11,9	119	0,9	117	5,7
AFG ₂	20	21	15,3	28	16,8	28	25,5
FB ₁	1500	79	8,1	122	8,1	100	3,1
FB ₂	1500	91	17,4	76	17,3	116	11,7
NIV	3000	100	14,2	122	5,5	112	5,9
DON	3000	79	6,9	81	6,9	80	3,7
T-2	*	105	3,8	122	6,1	114	5,8
HT-2	*	120	11,8	102	11,3	90	11,4
OTA	20	115	7,1	101	11,9	84	11,6
ZEA	40	92	11,9	122	4,3	96	9,4
STC	*	114	4,2	106	10,4	122	2,9

*Limite Máximo Tolerado não estabelecido. (BRASIL, 2017)

Referências

ANDRADE, P.D.; DANTAS, R.R.; MOURA-ALVES, T.L.S.; CALDAS, E.D. Determination of multi-mycotoxins in cereals and of total fumonisins in maize products using isotope labeled internal standard and liquid chromatography tandem mass spectrometry with positive ionization. **Journal of Chromatography A**, v. 1490, p. 138-147. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2011. 227 p.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RDC nº 138 de 08 de fevereiro de 2017. Limites máximos tolerados para micotoxinas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo. Brasília, DF, 29 fev. 2017. Seção 1, p.45.

IBGE- Agência IBGE Notícias. [on line]. **Popular nas festas Juninas, milho tem alta produção no país**. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/21483-popular-nas-festas-juninas-milho-tem-alta-producao-no-pais>>. Acesso em 26 jul. 2018.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos analíticos**. rev. 3. Duque de Caxias, RJ: INMETRO, fev. 2010. 20p.

RASFF- Rapid Alert System for Food and Feed. [on line]. **Food and Feed Safety Alerts**. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en. Acesso em: 26 jul. 2018.

SARTORI, A.V. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologias analíticas para determinação de micotoxinas em amendoim, leite, fórmulas infantis e alimentação infantil a base de cereais por cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial**. 2015.168f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de pós-graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470, Rio de Janeiro, RJ
Fone: (0xx21) 3622-9600
Fax: (0xx21) 3622-9713
www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

1ª impressão (2018): 50 exemplares

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Presidente

Virgínia Martins da Matta

Membros

André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda
Machado de Araujo, Daniela De Grandi Castro
Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida Soares,
Janine Passos Lima da Silva, Leda Maria Fortes
Gottschalk, Marcos de Oliveira Moulin, Otniel
Freitas Silva e Rogério Germani

Supervisão editorial

Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá

Revisão de texto

Renata Valeriano Tonon

Normalização bibliográfica

Elizabete Alves de Almeida Soares

Tratamento das ilustrações

André Luis do Nascimento Gomes

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

André Luis do Nascimento Gomes

Foto da capa

Renata Silva

CGPE 14897

Embrapa

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

