

## Emprego de casca de arroz como adsorvente para execução de técnica de MSPD para determinar aflatoxinas em cebolas

### Use of rice husk as an adsorbent for performing MSPS technique for determining the aflatoxins occurrence in onion

RIALA6/1514

Ana Paula Moura Guimarães CARVALHO, Helen Cristina dos Santos HACKBART, Michele Moraes de SOUZA, Eliana BADIALE-FURLONG\*

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos EQA, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475, Campus Cidade, Rio Grande, RS, Brasil, CEP: 96201-900. E-mail: dqmebf@furg.br

Recebido: 08.12.2011 – Aceito para publicação: 28.12.2012

#### RESUMO

Foi estudada a extração simultânea de aflatoxinas (AFLAs) B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em cebolas por meio de técnica de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), utilizando-se a casca de arroz como adsorvente. A identificação e quantificação das aflatoxinas foram realizadas empregando-se cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência (CLAE-FL). O melhor adsorvente foi constituído de mistura de casca de arroz: terra diatomácea (1:1) (p/p), empregado na proporção de 1:1 (p/p) com a massa de amostra e a mistura clorofórmio:metanol (5:25) (v/v) como eluente. A metodologia mostrou limites de detecção que variaram de 0,05 a 1 µg.kg<sup>-1</sup>, de exatidão entre 78 e 93%, e coeficientes de variação compreendidos entre 11 e 14%. Após a validação, a metodologia foi testada quanto à sua aplicabilidade para determinar a ocorrência das aflatoxinas em amostras de cebola, as quais foram classificadas segundo a norma do MAPA. A contaminação com aflatoxina foi verificada em 43% das amostras analisadas com teor máximo de 90µg.kg<sup>-1</sup> de AFLAB<sub>2</sub>.

**Palavras-chave.** MSPD, CLAE-FL, CCDAE

#### ABSTRACT

The simultaneous determination of aflatoxins (AFLA) B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> was investigated in onions by means of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction methodology, and using rice husk as adsorbent element. The AFLA identification and quantification were carried out by using high efficiency thin layer chromatography (HPTLC) and high efficiency liquid chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC-FD). The best adsorbent was the compound constituted by the rice husk:celite mixture (1:1) in a 1:1 ratio with the mass of the sample, and employing the mixture chloroform:methanol (5:25) as eluent. The methodology showed the limit of detection ranging from 0.05 to 1 µg.kg<sup>-1</sup>, and of the accuracy from 78 to 93%; and variation coefficients ranged from 11 to 14%. After being validated, the methodology was tested on its applicability in determining the aflatoxins occurrence in onion samples, which were classified according to the standard MAPA. Aflatoxin contamination was found in 43% of analyzed samples with a maximum content of 90 µg.kg<sup>-1</sup> of AFLAB<sub>2</sub>.

**Keywords.** MSPD, HPLC-FD, HPTLC.

## INTRODUÇÃO

Métodos acessíveis e exequíveis são ferramentas estratégicas e eficientes para garantir a segurança alimentar, pois tornam possível monitorar a contaminação por metais, pesticidas ou compostos tóxicos produzidos por micro-organismos, como as micotoxinas, em amostras alimentares e ambientais<sup>1-5</sup>.

Os métodos envolvendo extração em fase sólida vêm se mostrando promissores para extração de analitos traços, em materiais complexos ou com elevada atividade de água, além de atender a demanda atual por métodos que gerem o mínimo de resíduo para descarte<sup>1,6-8</sup>. O limite para aplicação do método está no custo dos adsorventes, em geral derivados de sílica (C8 e C18) que são pouco eficientes durante a reutilização<sup>7</sup>.

Um substituto para os adsorventes convencionais poderia ser a casca de arroz, abundante no Rio Grande do Sul, cujo emprego em determinações analíticas seria uma importante alternativa para a sustentabilidade da cadeia produtiva do arroz<sup>9</sup>. O seu potencial como adsorvente decorre de sua superfície de contato e constituição química caracterizada por 35% de celulose, 12% de lignina, 25% hemicelulose, 14% de óxidos de silício, além de outros óxidos como os de magnésio e cálcio<sup>10-13</sup>. Cabe salientar que os óxidos de silício associados à celulose podem adsorver moléculas apolares ou moderadamente polares, como as aflatoxinas, ocratoxina A, deoxinivalenol, dentre outros contaminantes presentes como traços em matrizes alimentares<sup>10</sup>.

O emprego de métodos analíticos simples e confiáveis com possibilidade de empregar resíduos da agroindústria, como a casca do arroz, de forma diferenciada contribui duplamente para a preservação do meio ambiente; uma disponibilizando nova alternativa para emprego de resíduos com valor agregado, e outra diminuindo o custo das análises e a geração de descartes analíticos.

O método de extração por MSPD ainda é pouco usual para extração de micotoxinas de amostras com elevado teor de umidade, mas, considerando-se o seu fundamento, pode ser promissora para tal. Nela, o adsorvente promove uma melhor interação dos solventes extratores com o contaminante, uma vez que, durante a homogeneização da dispersão, ocorre a quebra das paredes celulares. Dessa forma, é possível a redução dos volumes de solvente para a recuperação do analito de interesse e a diminuição das quantidades iniciais de

amostras, além da eliminação de etapas de concentração dos extratos<sup>14-18</sup>.

A cebola (*Allium cepa* L.), por sua atividade de água elevada, condição de cultivo, armazenamento e distribuição, está entre os alimentos com risco de veicular contaminantes produzidos por fungos, que encontram condições de infectar e até produzir metabolitos secundários em circunstâncias adversas, como nesse tecido subterrâneo<sup>19</sup>. A importância econômica da cebola decorre de suas propriedades condimentares, antioxidantes e outros benefícios funcionais que conferem a essa hortaliça o terceiro lugar, depois do tomate e da batata, em consumo mundial<sup>2</sup>.

As diferentes espécies de fungos do gênero *Aspergillus* vêm sendo relacionadas com os defeitos em cebolas, porém, são poucas as informações sobre identificação das espécies contaminantes ou a ocorrência de micotoxinas nelas, especificamente as aflatoxinas, que são as mais prováveis de serem produzidas por espécies desse gênero fúngico nas condições de umidade, contaminação elevada e acidez do meio<sup>4,20</sup>.

As aflatoxinas são responsáveis por uma série de danos crônicos em animais e humanos, tais como a diminuição da velocidade de crescimento, depressão do sistema imunológico e efeito carcinogênico demonstrado<sup>21</sup>. Outro aspecto que justifica a necessidade de dispor de método rápido e confiável para determinar essas micotoxinas em cebolas é o seu emprego frequente em diversas formulações alimentícias domésticas e industriais<sup>2,19</sup>.

Avaliar a ocorrência de aflatoxinas em variedades de cebolas e relacionar sua ocorrência com variáveis bióticas e abióticas é um subsídio importante para o estabelecimento de estratégias de manejo adequado desse vegetal, visando torná-lo competitivo no mercado nacional e internacional, dispor de critérios classificatórios baseados em qualidade micotoxicológica, bem como garantir a segurança alimentar dos consumidores.

Neste trabalho foi estudada a extração simultânea das aflatoxinas (AFLA) B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> de cebolas empregando o método de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), tendo casca de arroz como adsorvente. A identificação e quantificação das micotoxinas foram realizadas empregando cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência (CLAE-FL).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Padrões de Micotoxinas

Os padrões das AFLA B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> foram adquiridos da Sigma Aldrich, Brasil. As soluções estoque foram preparadas dissolvendo 5 mg em 100 mL de uma mistura de benzeno:acetoneitrila p.a. (98:2). A partir dessas soluções estoque foram diluídas as soluções de trabalho contendo 1,5 µg.mL<sup>-1</sup>; 1,5 µg.mL<sup>-1</sup>; 7,4 µg.mL<sup>-1</sup> e 5,6 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente para AFLA B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e AFLA G<sub>2</sub>, confirmadas espectrofotometricamente, considerando suas respectivas absorvidades molar<sup>22</sup>.

### Preparo do Adsorvente

A casca de arroz, fornecida por uma empresa beneficiadora do grão localizada na região sul do Rio Grande do Sul, foi moída em moinho de facas, seguindo-se da separação das frações granulométricas. A fração de 0,5 mm foi lavada 3 vezes com hexano (proporção massa:solvente 1:4) sob agitação orbital em mesa agitadora a 160 rpm durante 30 min, a 25 °C. A mistura foi filtrada e o resíduo sólido foi novamente submetido a 3 lavagens consecutivas com metanol nas mesmas condições operacionais. O material lavado foi seco em estufa com circulação de ar a 105 °C até peso constante. A eficiência do tratamento foi avaliada pela limpeza do cromatograma resultante da eluição do extrato de casca com clorofórmio:metanol (3:27). A casca de arroz tratada foi caracterizada quanto aos seus teores de umidade, nitrogênio total, extrato etéreo, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido clorídrico<sup>22</sup>.

### Amostras

Cebolas da variedade crioula, com e sem defeitos, foram coletadas no município de São José do Norte, no Rio Grande do Sul, em março de 2009, pelos técnicos da EMATER-RS, que realizaram a classificação segundo Regulamento Técnico de Qualidade da Cebola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)<sup>23</sup>. Outras amostras foram coletadas em feiras e mercados da região sul do Rio Grande do Sul, empregando amostragem aleatória simples para tomada de 1 kg de cebola roxa nacional; roxa importada, branca nacional, branca importada, branca cultivar orgânico e amarela importada. No laboratório, as amostras foram classificadas conforme o regulamento técnico<sup>23</sup>, formando 11 grupos para análise: roxa nacional, calibres 2 e 3; roxa importada, calibres 2 e 4; branca nacional e

importada, calibres 2 e 4; roxa cultivar orgânico nacional, calibre 2; branca cultivar orgânico nacional, calibre 2; e amarela importada, calibres 2 e 4. As cebolas de cada grupo foram descascadas e homogeneizadas em moinho de facas, constituindo as amostras analíticas.

### Testes Preliminares da Extração MSPD

Aproximadamente 500 g de cebolas, calibre 2, sem defeito, foram descascadas e homogeneizadas em moinho de facas. Foram tomadas massas conhecidas do homogeneizado, colocadas em béquer de vidro e fortificadas com 100 µL de solução de AFLA G<sub>2</sub>, de forma a resultar em um nível de contaminação da ordem 10 µg.kg<sup>-1</sup>. As amostras fortificadas foram transferidas para um graal de porcelana e maceradas com o adsorvente, empregando pistilo até a total dispersão da matriz no adsorvente. A mistura homogeneizada foi transferida para uma coluna de vidro (12 cm de altura e 1 cm de diâmetro interno), compactada com auxílio de um bastão de vidro até preencher a marca de 10 mL na coluna.

Os efeitos das variáveis testadas para adequação da extração por MSPD foram:

- adsorventes: C18; alumina neutra; casca de arroz:alumina (1:1);
- proporção de amostra e adsorvente (p/p): 1:1; 1:3; 3:1;
- tempo de interação entre adsorvente e amostra: 1, 2, 3 h;
- eluentes: metanol; acetoneitrila; clorofórmio; clorofórmio:metanol (27:3) e (25:5)<sup>14,18</sup>;
- volumes do eluente: 25, 30, 35 mL.

Os eluatos foram coletados em frascos âmbar e o solvente evaporado sob nitrogênio. Para aplicação em placas cromatográficas, os resíduos secos foram ressuspensos em 500 µL de benzeno e homogeneizados em banho de ultrassom. Foram usadas cromatoplaças de nanosílica (ADAMANT, marca Macherey-Nagel, Alemanha, partículas médias 2-10 µm distribuídas em camada de 0,1 mm de espessura), em que foram aplicadas soluções padrão AFLA G<sub>2</sub>, de forma que em cada ponto correspondessem a 3, 5, 8, 10 ng da micotoxina. Os extratos ressuspensos em 500 µL de benzeno também foram aplicados.

O eluente da separação cromatográfica foi uma mistura de tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (3:2:1)<sup>24</sup> que percorreu 10 cm no caminho cromatográfico. Em

seguida, as cromatoplasmas foram secas à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). A fluorescência dos padrões e amostras foi visualizada em câmara escura sob luz ultravioleta (326 nm). A estimativa dos valores de *R<sub>f</sub>* (distância percorrida pelo eluato/distância percorrida pelo soluto) e da intensidade de fluorescência comparada das amostras e padrões foi avaliada por três analistas treinados.

A eficiência das condições de extração aplicadas à determinação simultânea das AFLAs B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> foi indicada pela recuperação obtida a partir de uma amostra de cebola fortificada nos níveis 24, 20, 16 e 20 ng.kg<sup>-1</sup>, respectivamente, de cada micotoxina.

Após o estabelecimento das melhores condições de extração pelo método de MSPD, as AFLAs foram determinadas em CCDAE e em cromatógrafo líquido, marca Shimadzu, composto por bomba LC-AT, desgaseificador DGU, controlador CBM-20A, detector SPD-20A, injetor manual 7725i com alça de 20 µL, detector FL-10AXL e *software* LC Solution-Shimadzu (CLAE-FL). Acoplado estava uma coluna Ascentis Supelco C18 (15 cm x 4,6 mm e 3 µm). Para eluição foi empregada acetonitrila e metanol, grau cromatográfico, da marca J.T. Baker (Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, EUA), e a água ultrapura, adquirida do sistema Direct-Q UV3<sup>®</sup> (resistividade 18,2 MΩ cm, Millipore, EUA), foi acidificada com ácido acético (99:1). Os solventes, água ultrapura, metanol e acetonitrila foram eluídos na proporção de 60:28:12 (v/v/v) com vazão de 9 mL.min<sup>-1</sup><sup>25</sup>.

#### *Indicativos de Eficiência do Método*

O método adaptado foi avaliado quanto aos limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ), expressos em µg.kg<sup>-1</sup>, exatidão através dos ensaios de recuperação e precisão pelos coeficientes de variação estimados a partir do resultado de seis determinações para cada sistema cromatográfico<sup>26</sup>, ou seja, CCDAE e CLAE-FL nas condições previamente estabelecidas.

O efeito matriz foi avaliado para a técnica de CLAE-FL, comparando o sinal gerado pela injeção da solução padrão diluída no extrato da matriz e a área do sinal gerado pela injeção do padrão no eluente<sup>7</sup>.

#### *Aplicabilidade do Método*

O método validado foi empregado para determinar a ocorrência das AFLAs em 14 amostras de cebola, separadas pela variedade e classe (regulamento técnico), coletadas no comércio ou local de produção,

conforme descrito. As cebolas foram descascadas, cortadas e homogeneizadas em moinho de facas. As amostras analíticas foram pesadas em balança analítica (marca Gilbertini), 3,0 g de amostra e 3,0 g de adsorvente (casca de arroz:terra diatomácea; 1:1), seguindo-se de homogeneização em graal com auxílio de pistilo durante 5 min. A mistura foi transferida para uma coluna de vidro (1 cm de diâmetro interno e 12 cm de comprimento) e compactada de forma a preencher um volume de 10 mL (calibração da coluna), usando um êmbolo de vidro. As micotoxinas foram eluídas por gravidade à temperatura de 25 °C com 35 mL da mistura de clorofórmio:metanol (25:5). O eluato foi evaporado sob nitrogênio e o resíduo redissolvido com 500 µL de benzeno para determinação em CCDAE e 1 mL de acetonitrila para determinação em CLAE-FL, nas condições descritas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição percentual média e os coeficientes de variação de cada fração centesimal da casca de arroz empregada neste trabalho foram: umidade 12,1 (0,9); nitrogênio total 0,1 (0,01); extrato etéreo 1,0 (0,07); cinzas totais 19,3 (1,3); e cinzas insolúveis em HCl 9,4 (0,7).

O percentual de cinzas insolúveis em ácido indica a presença de óxidos de silício<sup>11-13</sup>, o que sugere que a casca é promissora para ser empregada como adsorvente na extração das aflatoxinas<sup>24,27,28</sup>. Os carboidratos (hemicelulose, celulose) e a lignina, estimados por diferença em 76%, correspondem aproximadamente aos valores mencionados por Graminha et al.<sup>12</sup>.

Estas características da casca de arroz, aliadas a sua abundância no Rio Grande do Sul, nortearam o interesse em aplicá-la para fins analíticos como adsorvente em métodos de extração tipo MSPD, beneficiando o meio ambiente, barateando o custo e a eficiência analítica para determinação de traços em amostras com elevado teor de umidade. No caso específico da determinação de micotoxinas, a extração por partição convencional gera um volume elevado de resíduos de solvente para descarte, além da necessidade de evaporação destes nas etapas de concentração, justificando a importância de um procedimento de extração que evite esses volumes<sup>17-18</sup>.

### Testes Preliminares

Nesta etapa de avaliação do potencial de emprego da casca de arroz tratada como adsorvente foi escolhida a

AFLA G<sub>2</sub> como modelo para estudo, determinando a sua recuperação, a cada tratamento, através de CCDAE. Essa técnica cromatográfica tem mostrado bons resultados na rotina de laboratório<sup>25</sup>, além de ser sensível, econômica, permitir determinação simultânea de várias amostras e gerar menores volumes de resíduos de solventes para descarte, uma das ênfases neste trabalho<sup>3,4</sup>. A AFLA G<sub>2</sub> é a micotoxina que apresenta os maiores limites de detecção no grupo e também a menos tóxica para manuseio pelos analistas<sup>3</sup>.

Para evitar a compactação do adsorvente durante a eluição, a casca de arroz foi homogeneizada com terra diatomácea na proporção 1:1 (p/p)<sup>27</sup>. Os valores da recuperação da AFLA G<sub>2</sub> sob o efeito dos adsorventes e eluentes e suas proporções nos testes preliminares estão na Tabela 1.

**Tabela 1.** Recuperação de AFLA G<sub>2</sub> nos testes preliminares de extração

Adsorvente (2 g)	Solvente (25 mL)	AFG <sub>2</sub> (%)
*CAT/celite (1/1)	Metanol	60
*CAT/celite (1/1)	Clorofórmio	70
*CAT/celite (1/1)	Acetonitrila	50
Alumina neutra	Metanol	30
Alumina neutra	Clorofórmio	40
Alumina neutra	Acetonitrila	-
C18	Metanol	50
C18	Clorofórmio	40

\*CAT: casca de arroz tratada.

Os eluentes metanol e clorofórmio, separadamente, mostraram boa capacidade para desorver a AFLA G<sub>2</sub> da casca de arroz, atingindo níveis de recuperação entre 60 e 70%, respectivamente. Nos demais adsorventes testados, as recuperações obtidas para a micotoxina, empregando os mesmos solventes, foi inferior a 50%, o que motivou também o emprego desse adsorvente.

Na sequência, foi testada a eficiência da mistura casca de arroz:terra diatomácea para determinação simultânea das quatro AFLAs, tendo como eluente a mistura clorofórmio e metanol nas proporções recomendadas por Soares e Rodriguez-Amaya<sup>23</sup>, que obtiveram recuperações superiores a 80% durante a determinação dessas micotoxinas de matrizes complexas.

Os valores de recuperação média das quatro micotoxinas foram 67% (CV:5) para a AFLAB<sub>1</sub>; 80% (CV:7) para a AFLAB<sub>2</sub> e G<sub>1</sub>; 76% (CV:10) para a AFLAG<sub>2</sub>, com variabilidade média de 7%. A mistura

de clorofórmio:metanol (5:25) elevou a recuperação da AFLA B<sub>1</sub> para a faixa de 75% e das demais para 85%. O tempo de interação amostra-adsorvente não afetou os níveis das micotoxinas extraídas por dispersão da matriz em fase sólida antes da eluição, conforme já relatado por outros autores<sup>14</sup>.

Os cromatogramas obtidos em CCDAE eram limpos, sem a presença de manchas que dificultassem a visualização das micotoxinas nos seus respectivos *R<sub>f</sub>*, onde os pontos não apresentavam sinais de efeito Langmuir ou anti-Langmuir. Fatos que demonstram que a extração pelo método de MSPD, tendo casca de arroz:terra diatomácea (1:1) como adsorvente e clorofórmio:metanol (5:25) como eluente, pode ser adotado para determinação dos contaminantes por CCDAE e também em CLAE-FL. Os efeitos das condições testadas foram avaliados em termos de percentuais de recuperação comparados entre as condições testadas. O aumento do volume de eluente de 25 para 30 mL promoveu um aumento médio de 10% na recuperação das AFLAs, porém o aumento de 30 para 35 mL promoveu aumento de apenas 1,2%. Foi adotado o volume de 35 mL para eluição das micotoxinas do adsorvente para garantir a eluição completa dos analitos.

### Indicativos de Mérito do Método Adaptado para Extração de AFLAs em MSPD

Estabelecidas as condições de extração em MSPD e as cromatográficas para separação e detecção das micotoxinas, o método desenvolvido foi validado através dos indicativos de eficiência recomendados por Ribani et al.<sup>26</sup> e pela RE n° 889 da ANVISA<sup>29</sup> para a identificação e quantificação das AFLAs nos extratos por CCDAE e CLAE-FL. Cabe salientar que as condições cromatográficas para separação das micotoxinas foram previamente estabelecidas empregando misturas de padrões para serem separadas em CCDAE-UV e CLAE-FL. Na Tabela 2, estão os dados referentes à eficiência do método proposto empregando determinação das AFLAs pelas diferentes técnicas cromatográficas.

Os indicativos de eficiência encontrados para CCDAE mostram que o método de extração por MSPD com adsorvente casca de arroz propicia condições para determinação simultânea de AFLAs de forma confiável e dentro de limites aceitáveis, mesmo empregando cromatografia planar. Os limites detectados das micotoxinas neste método possibilitam monitorá-las

**Tabela 2.** Indicativos de eficiência do método padronizado

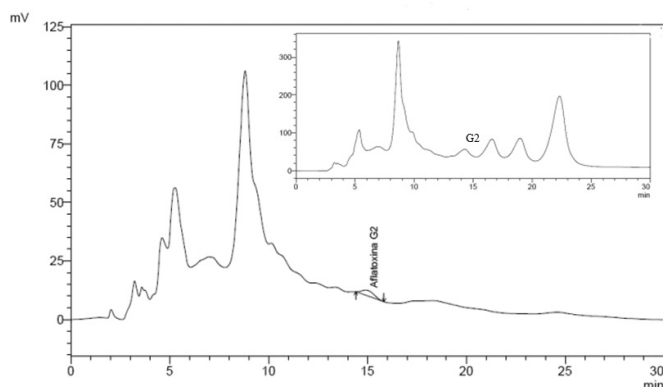
Micotoxina/propriedades	AFLA B <sub>1</sub>		AFLA B <sub>2</sub>		AFLA G <sub>1</sub>		AFLA G <sub>2</sub>	
	HPTLC	HPLC	HPTLC	HPLC	HPTLC	HPLC	HPTLC	HPLC
Rf e T. retenção (min)	0,3	17,1	0,25	13,40	0,22	11,25	0,18	8,9
L. Detecção (µg.kg <sup>-1</sup> )	1,0	0,08	3,30	0,1	1	0,08	3	0,05
L. Quantificação (µg.kg <sup>-1</sup> )	3,0	0,26	9	0,3	3	0,3	9	0,2
Recuperação média (%)	78,0	78,0	88,3	93,0	88,5	88,0	88,7	81,0
CV (%)	11,8	13,5	12,3	12,0	12,5	14,0	11,0	12,5

T: tempo; CV: coeficiente de variação; L: limite.

dentro dos níveis da legislação vigente, mesmo não sendo esta específica para cebolas<sup>29</sup>.

A cromatografia CLAE-FL é a técnica atualmente mais empregada para quantificar micotoxinas simultaneamente, e em especial no caso das AFLAs, pelas suas propriedades características em separação cromatográfica com emprego de colunas de fase reversa, que propiciam os melhores coeficientes de separação para essas micotoxinas<sup>28,30</sup>.

A eficiência dos procedimentos completos confirmaram a eficiência da extração de AFLAs de amostras de cebolas empregando o método de MSPD proposto, pois indicam que os extratos estavam adequados para separação e quantificação em qualquer sistema cromatográfico com detector de fluorescência (Figura 1)<sup>14,17,28,30,31</sup>.



**Figura 1.** Cromatograma de amostra de cebola contaminada e padrão de micotoxinas

O efeito de matriz para o método MSPD, com casca de arroz, estimado para as concentrações médias dos padrões de AFLAs foi maior para a AFLA G<sub>2</sub> (Tabela 3), pois as áreas detectadas no solvente e no extrato da matriz apresentaram a maior diferença entre si, porém, ainda assim, confiável para a determinação desta<sup>7</sup>.

Alguns autores empregaram esse método de extração tendo alumina neutra como adsorvente,

acetoneitrila como eluente de extratos de produtos agrícolas contaminados com AFLAs, com alto teor de pigmentos, como a pimenta em pó, feijão verde e gergelim, que resultaram em recuperações variando entre 88 e 95%, desvio padrão inferior a 6%, limites de detecção 0,25 e 0,1 µg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente, para as AFLAs B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub><sup>16</sup>. As AFLAs em cereais, frutas secas, ervas, especiarias, legumes, amendoim e nozes extraídas por MSPD, tendo C18 como adsorvente, resultaram em recuperações entre 78 e 86%, coeficiente de variação entre 4% e 7% e limites de quantificação variando entre 0,125 a 2,5 µg.kg<sup>-1</sup><sup>14,15</sup>. Apesar desses resultados promissores verificados com diferentes adsorventes, o método de MSPD não vem sendo aplicado para amostras com elevado teor de umidade, como a cebola.

**Tabela 3.** Efeito de Matriz nas determinações de aflatoxinas extraídas em MSPD

Micotoxinas	Conc. Média µg.mL <sup>-1</sup>	Área na Matriz	Área no Solvente	Efeito de matriz (%)
AFLA B <sub>1</sub>	0,024	276.851	308.769	90
AFLA B <sub>2</sub>	0,014	39.777	43.589	93
AFLA G <sub>1</sub>	0,024	224.346	221.140	101
AFLA G <sub>2</sub>	0,04	51.477	64.053	80

Também não foram encontrados relatos sobre emprego de casca de arroz como adsorvente para o método de MSPD aplicado para determinação de micotoxinas, porém, os indicativos de mérito do método adaptado neste trabalho foram semelhantes aos encontrados com os adsorventes convencionais empregados para outras matrizes e teores de umidade inferiores aos das cebolas.

### Aplicabilidade do Método

O método validado foi adotado para determinar a ocorrência de AFLAs em amostras de cebola nacional e importada, classificadas conforme a portaria 529 do MAPA<sup>23</sup>.

Embora danos ocasionados por contaminação fúngica sejam frequentes em cebolas<sup>19</sup>, não foram

encontrados dados sobre a ocorrência das micotoxinas em cebolas no Brasil. Condições de umidade relativa superior a 80% favorecem a brotação e o desenvolvimento de podridão ocasionada por fungos do gênero *Aspergillus*<sup>23</sup>. A irrigação e armazenamento inadequados também são fatores desencadeadores de brotamento e podridão fúngica<sup>2,23</sup>, portanto, o risco de ocorrência de AFLAs é provável em regiões úmidas ou com temperaturas médias superiores a 25 °C, visto que outras espécies fúngicas podem hospedar-se no material. Este é o caso das condições de cultivo e armazenamento das amostras deste trabalho, em que a ocorrência de espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus* é provável<sup>21</sup>.

Ficou demonstrado que o método desenvolvido permite quantificar AFLAs em cebolas de diferentes tipos e classes, ou seja, é robusto para todas as variedades de cebolas avaliadas. A contaminação foi verificada com pelo menos uma das micotoxinas em 43% das amostras, o que pode ser considerado um valor elevado e sugere a necessidade de estabelecimento de um plano de amostragem para identificar os pontos críticos de risco desse vegetal a contaminação micotoxicológica.

A amostra analítica composta por cebolas da variedade crioula com defeito da mancha negra estavam contaminadas com as AFLAB<sub>2</sub> (90 µg.kg<sup>-1</sup>), G<sub>1</sub> (82 µg.kg<sup>-1</sup>) e G<sub>2</sub> (17 µg.kg<sup>-1</sup>) simultaneamente. Nas amostras de cebolas da variedade roxa, das classes de calibre 2 e 3, foram também detectada a presença de AFLAG<sub>2</sub> (15 e 8,5 µg.kg<sup>-1</sup>), ao passo que na variedade branca nacional, calibre 2, foi detectada contaminação simultânea com AFLAG<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (84 e 16 µg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente). Quanto às amostras importadas, uma da variedade branca, calibre 4, apresentou contaminação com AFLA G<sub>1</sub> (30,5 µg.kg<sup>-1</sup>). À exceção das primeiras, todas apresentavam aparência aceitável e sem defeitos aparentes.

Estes resultados chamam a atenção, pois amostras com características tão distintas estavam contaminadas. No entanto, não foi detectada, dentro dos limites do método, a AFLAB<sub>1</sub> em nenhuma das amostras, nem mesmo naquelas que apresentavam podridão fúngica característica (mancha negra). Esse defeito é atribuído principalmente à presença de *Aspergillus niger*, que não é considerado produtor de aflatoxinas<sup>23</sup>, embora possam ocorrer simultaneamente outras espécies do gênero que podem ser toxigênicas.

A AFLAG<sub>2</sub> foi detectada em cinco amostras em coocorrência, em lotes em que não foram observados defeitos fúngicos aparentes. O maior nível encontrado foi

para a aflatoxina G<sub>1</sub> (84µg.kg<sup>-1</sup>). Se observada a legislação brasileira (RE nº 7/2011)<sup>32</sup> quanto aos limites das AFLAs em outros alimentos, as amostras de cebola contaminadas teriam que ser descartadas por estarem impróprias para comercialização e uso. Mesmo não sendo observados os defeitos previstos como inaceitáveis pela portaria do MAPA<sup>23</sup>, em vigência para definir a qualidade de cebolas.

A contaminação de cebolas, na frequência e níveis detectados, adquire importância quando se considera que, mesmo não sendo um alimento de base nutricional, o consumo estimado per capita é de 7,2 kg.ano<sup>-1</sup>, sempre associado a outros materiais de risco como arroz e trigo<sup>23</sup>, o que pode representar um problema para a saúde humana. A ação farmacológica atribuída às cebolas é outro fator que pode motivar seu consumo acima da estimativa por alguns segmentos da população, na busca de soluções para problemas patológicos crônicos, justamente para quem a contaminação pode representar um impacto ainda maior.

## CONCLUSÃO

O método de MSPD tendo casca de arroz como adsorvente foi eficiente para extrair simultaneamente as aflatoxinas de cebolas, resultando em extratos aplicáveis a CCDAE e CLAE-FL. Os indicativos de eficiência do método atendem as recomendações de órgãos reguladores, sendo as recuperações superiores a 70%, coeficientes de variação inferiores a 15% e limites de quantificação que permitem observar diferentes legislações vigentes atualmente para estas micotoxinas.

A ocorrência de aflatoxinas em cebolas com diferentes características de tamanho, procedência e qualidade mostrou que elas também precisam ser monitoradas, pois, os níveis detectados foram superiores aos aceitáveis para comercialização e consumo com segurança.

## REFERÊNCIAS

1. Pinho PG. Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa. *Quim Nova*. 2009;32:92-8.
2. Rodrigues SA, Caldas SS, Primel EG. A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. *Anal Chim Acta*. 2010;678:82-9.
3. Yoshisawa T. Mycotoxin Analysis for Federative republic of Brazil. Japão: Training Course; 2001. 283p.

4. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(3):497-516.
5. Richard JJ. Some major mycotoxins and their mycotoxicose-Na overview. *Int J Food Microbiol*. 2007;119:3-10.
6. Lanças FM. *Extração em Fase Sólida (SPE)*. São Carlos: RiMa; 2004. 96p.
7. Krueve A, Künnapas A, Herodes K, Leito I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008;1187:58-66.
8. Laganá A, Capriotti AL, Cavaliere P, Gubbiotti RS. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *J Chromatogr A*. 2010;1217:2521-32.
9. Mayer DE, Hoffmann R, Ruppenthal JE. Gestão energética, econômica e ambiental do resíduo casca de arroz em pequenas e médias agroindústrias de arroz. In: *Simpósio de Engenharia de Produção da UNESP, 13, Anais eletrônicos*; Bauru, SP. Bauru: Unesp, 2006. [acesso 2010 nov. 10]. Disponível em: [http://www.simpep.feb.unesp.br/anais/anais\_13/artigos/124.pdf].
10. Foletto EL, Hoffmann R, Hoffmann RS, Portugal Jr. UL, Jahn SL. Aplicabilidade das cinzas da casca de arroz. *Quim Nova*. 2005;28(6):1190-8.
11. Hotza D, Della PV, Oliveira NPA, Junkes AJ. Estudo comparativo entre sílica obtida por lixívia ácida da casca de arroz e sílica obtida por tratamento térmico da cinza de casca de arroz. *Quim Nova*. 2006;29:1175-9.
12. Graminha EBN, Gonçalves AZL, Pirota RDPBP, Balsalobre MAA, da Silva R, Gomesa E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition: a Review. *Anim Feed Sci Technol*. 2008;144:1-22.
13. Rosa GC, Wallau MW, Nunes R. Caracterização de cinzas de cascas de arroz e seu uso como adsorvente de metais pesados. In: *XVII Encontro de Química da Região Sul (17-SBQsul)*; 18-20 nov 2009; Rio Grande, RS. FURG, 2009.
14. Blesa J, Soriano JM, Moltó JC, Marín R, Mañes J. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2003;1011:49-54.
15. Blesa J, Soriano JM, Moltó JC, Marín R, Mañes J. Limited survey for the presence of aflatoxins in foods from local markets and supermarkets in Valencia, Spain. *Food Addit Contam*. 2004;21:165-71.
16. You-Zhao H, Yan-Yun H, Ping Z, Zhao-Xiang Z. Determination of aflatoxins in high-pigment content samples by matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem*. 2006;54:4126-30.
17. Laganá A, Bacaloni A, Cavaliere C, Cucci PF, Samperi R. Determination of aflatoxins in hazelnuts by various sample preparation methods and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008;1179:182-9.
18. Rubert J, Soler C, Mañes J. Optimization of Matrix Solid-Phase Dispersion method for simultaneous extraction of aflatoxins and OTA in cereals and its application to commercial samples. *Talanta*. 2010;82:567-74.
19. Overy DP, Frisvad JC, Steinmeier U, Thrane U. Clarification of the agents causing blue mold storage rot upon various flower and vegetable bulbs: implications for mycotoxin contamination. *Postharv Biol Technol*. 2005;35(2):217-21.
20. CAST. Council of Agricultural Science and Technology. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report, n. 139. EUA: CAST; 2003.
21. Bemvenuti RH, Mendes GL, Scaglioni PT, Furlong EB, Souza-Soares LA. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: a review. *African J Food Sci*. 2012;5:861-9.
22. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of International* [CD-ROM]. 17. ed. 2000.
23. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Sistema de Produção de Cebola (*Allium cepa* L). [acesso 2011 jan 15]. Disponível em: [http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/cebola/autores.htm].
24. Soares LMV, Rodriguez-Amaya D. Survey of Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone, and Sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J Assoc Off Anal Chem*. 1989;72(1):22-6.
25. Dors GC, Pinto RH, Furlong EB. Parboiled rice: occurrence of mycotoxin and chemical composition. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2009;29:121-30.
26. Ribani M, Beatriz C, Bottoli G, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004;27:771-80.
27. Furlong EB, Soares LMV. Tricothecenes in wheat: a gas chromatographic method for quantitation and confirmation in wheat of deoxynivalenol, nivelenol, diacetoxycyperpenol, T2, HT2 toxins, T2 triol and T2 Tetraol. *J AOAC Int*. 1995;78:386-96.
28. Subrahmanyam S, Turner NW, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Anal Chim Acta*. 2009;632:168-80.
29. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE nº 899, 2003. Aprova “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF)*, 29 maio 2003.
30. Jaimez J. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *J Chromatogr A*. 2000;882:1-10.
31. Laganá A, Cavaliere C, Foglia P, Guarino C, Nazzari M, Samperi R. Determination of aflatoxins in olive oil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2007;596:141-8.
32. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE nº 7, 2011. Aprova “Limites Máximos Tolerados para Micotoxinas”. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF)*, 22 jan 2011; Seção 1(37-E):72-3.