

**LEONIR BITTENCOURT EIZENDEHER**

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS POR CAMADA DELGADA  
E LÍQUIDA COM *KITS* IMUNOLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINAS  
EM AMENDOIM *IN NATURA* E DOCE DE AMENDOIM**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

**Orientador: Prof. Dr. Renato João  
Sossela de Freitas**

**CURITIBA**

**2005**

## *Dedicatória*

*Aos meus pais Léo e Iolanda (in memoriam),*

*Ao meu filho Dalton Lúcio,*

*Aos meus netos Maria Eduarda e João Guilherme,*

*Ao Carlos Henrique Montanha Vianna por seu amor e carinho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Renato João Sossela de Freitas, pela confiança em mim depositada durante todo o curso, pelo exemplar modelo de integridade e determinação como professor e pesquisador, a quem seguirei admirando sempre.

Aos membros da Banca Examinadora, pelas contribuições sugeridas e comentários positivos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nina Waszczynskij e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Masson, pelo apoio, e dedicação ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná.

À Direção do LACEN/PR, pela possibilidade da realização deste trabalho no Laboratório de Micotoxinas da Divisão de Produtos.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação, com os quais compartilhei experiências e incentivo, e descobri verdadeiros amigos.

Aos colegas de trabalho, pela amizade, incentivo, colaboração e apoio no desenvolvimento dos trabalhos.

À amiga Anaclete Fellini, pelo auxílio na realização das análises de ELISA.

Aos meus amigos, pelo incentivo e pela paciência com as minhas ausências.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 OBJETIVO.....	3
1.1.1 Objetivo Principal.....	3
1.1.2 Objetivos Específicos.....	3
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	4
2.2 AFLATOXINAS.....	5
2.2.1 Características Físicas e Químicas das Aflatoxinas.....	5
2.2.2 Ocorrência Natural das Aflatoxinas.....	8
2.2.3 Biotransformação da AFB <sub>1</sub> .....	9
2.2.4 Toxidez das Aflatoxinas.....	11
2.2.5 Carcinogenicidade da AFB <sub>1</sub> .....	13
2.2.5.1 Estudos em animais de experimentação.....	13
2.2.5.2 Carcinogenicidade para a espécie humana.....	14
2.3 AMENDOIM.....	17
2.3.1 Amostragem.....	20
2.4 METODOLOGIA PARA A DETECÇÃO DE AFLATOXINAS.....	22
2.4.1 Métodos Cromatográficos.....	27
2.4.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	27
2.4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	28
2.4.2 Métodos Imunológicos.....	32
2.4.2.1 Ensaio imunoenzimológico (EIA).....	36
2.4.2.2 Imunoensaios (ELISA).....	36
2.4.2.3 Cromatografia de imunoafinidade (IAC).....	40
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>

3.1 MATERIAL.....	43
3.1.1 Amostras .....	43
3.1.2 Equipamentos.....	43
3.1.3 Reagentes, Solventes, Padrões e <i>Kits</i> .....	44
3.2 MÉTODOS.....	46
3.2.1 Preparo das Amostras.....	46
3.2.2 Preparo de Soluções Padrões de Aflatoxinas.....	46
3.2.3 Determinação de AFLs por CLAE.....	49
3.2.3.1 Princípio do método .....	49
3.2.3.2 Extração.....	50
3.2.3.3 Procedimento analítico.....	51
3.2.4 Determinação de AFLs por CCD.....	52
3.2.4.1 Princípio do método.....	52
3.2.4.2 Procedimento analítico.....	53
3.2.4.3 Cálculo para medidas visuais .....	54
3.2.5 Determinação de AFLs Utilizando <i>kits</i> .....	55
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>62</b>
4.1 DETERMINAÇÕES POR CLAE E CCD.....	62
4.1.1 CLAE.....	62
4.1.2 CCD.....	67
4.2 DETERMINAÇÕES POR <i>KITS</i> .....	76
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>6. SUGESTÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	-	Características físico-químicas das principais aflatoxinas.....	7
TABELA 2	-	Valores da dose média para a produção de tumores (DT <sub>50</sub> ) após ingestão prolongada de AFB <sub>1</sub> na dieta, para diversos animais.....	14
TABELA 3	-	Relação entre a ingestão de AFB <sub>1</sub> , excluídas outras causas, e a incidência de CHC, em países da África e Ásia.....	15
TABELA 4	-	Produção brasileira de amendoim .....	19
TABELA 5	-	Valores usados para cálculo das concentrações de AFLs.....	48
TABELA 6	-	Volume de filtrado da amostra X faixa de quantificação para coluna de imunoafinidade AFLASCAN®.....	56
TABELA 7	-	Avaliação da recuperação de AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub> por CLAE.....	62
TABELA 8	-	Limites de detecção em placa e de quantificação de AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> e AFL total por análise visual.....	67
TABELA 9	-	Resultados das médias (n=3) de AFB <sub>1</sub> obtidos por CLAE e CCD.....	68
TABELA 10	-	Resultados das médias (n=3) de AFB <sub>2</sub> obtidos por CLAE e CCD.....	69
TABELA 11	-	Resultados das médias (n=3) de AFG <sub>1</sub> obtidos por CCD e CLAE.....	70
TABELA 12	-	Resultados das médias (n=3) de AFG <sub>2</sub> obtidos por CLAE e CCD.....	72
TABELA 13	-	Resultados das médias de AFLs totais (AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub> ) obtidos por CLAE e CCD.....	73
TABELA 14	-	Resultados de aflatoxinas nas amostras analisadas por CLAE, CCD, AFLASCAN®, AFLACARD® e ELISA.....	77

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Estrutura química das principais aflatoxinas.....	6
FIGURA 2	- Principais vias de biotransformação da AFB <sub>1</sub> .....	11
FIGURA 3	- Espectro de fluorescência das aflatoxinas sem derivatização da AFB <sub>1</sub> e AFG <sub>1</sub> .....	29
FIGURA 4	- Reação de derivatização das aflatoxinas utilizando brometo de potássio.....	30
FIGURA 5	- Cromatograma de pool de padrões sem KOBRA <sup>®</sup> Cell.....	31
FIGURA 6	- Cromatograma de pool de padrões com KOBRA <sup>®</sup> Cell.....	32
FIGURA 7	- Esquema de produção de anticorpos monoclonais.....	34
FIGURA 8	- Procedimento de sensibilização da placa de <i>ELISA</i> .....	37
FIGURA 9	- Representação esquemática de um método imunoenzimático ( <i>ELISA</i> ).....	38
FIGURA 10	- Princípio das colunas de imunoafinidade	42
FIGURA 11	- Diagrama de conexões da célula eletroquímica KOBRA <sup>®</sup> Cell....	50
FIGURA 12	- Fluxograma da metodologia para determinação de AFLs por CLAE utilizando colunas de imunoafinidade AFLAPREP <sup>®</sup> .....	51
FIGURA 13	- Fluxograma da metodologia para determinação de AFLs por CCD.....	54
FIGURA 14	- Interpretação dos resultados com o cartão AFLACARD <sup>®</sup> .....	58
FIGURA 15	- Procedimento simplificado do teste <i>ELISA</i> com <i>kit</i> Agri-Screen <sup>®</sup>	60
FIGURA 16	- Interpretação dos resultados de AFLs por comparação visual do teste <i>ELISA</i> com <i>kit</i> Agri-Screen <sup>®</sup> .....	61
FIGURA 17	- Curva de calibração de padrão de AFB <sub>1</sub> .....	63
FIGURA 18	- Curva de calibração de padrão de AFB <sub>2</sub> .....	64
FIGURA 19	- Curva de calibração de padrão de AFG <sub>1</sub> .....	64
FIGURA 20	- Curva de calibração de padrão de AFG <sub>2</sub> .....	65
FIGURA 21	- Perfil cromatográfico indicando AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> e AFG <sub>1</sub> na amostra 1818.....	65
FIGURA 22	- Perfil cromatográfico indicando AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub> na amostra 1820.....	66

FIGURA 23 - Perfil cromatográfico indicando AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub> na amostra 1851.....	66
FIGURA 24 - Média (n=3) de AFB <sub>1</sub> obtidas por CLAE e CCD.....	68
FIGURA 25 - Média (n=3) de AFB <sub>2</sub> obtidas por CLAE e CCD.....	69
FIGURA 26 - Média (n=3) de AFG <sub>1</sub> Obtidas por CLAE e CCD.....	71
FIGURA 27 - Média (n=3) de AFG <sub>2</sub> obtidas por CLAE e CCD.....	72
FIGURA 28 - Médias de AFLs totais (AFB <sub>1</sub> + AFB <sub>2</sub> + AFG <sub>1</sub> + AFG <sub>2</sub> ) obtidas por CLAE e CCD.....	74



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}/\text{kg}$	Micrograma por quilograma
$\mu\text{g}/\text{mL}$	Micrograma por mililitro
$\text{AFB}_1$	Aflatoxina B <sub>1</sub>
$\text{AFB}_2$	Aflatoxina B <sub>2</sub>
$\text{AFG}_1$	Aflatoxina G <sub>1</sub>
$\text{AFG}_2$	Aflatoxina G <sub>2</sub>
$\text{AFL}(\text{s})$	Aflatoxina (s)
$\text{AFM}_1$	Aflatoxina M <sub>1</sub>
$\text{AFP}_1$	Aflatoxina P <sub>1</sub>
$\text{AFQ}_1$	Aflatoxina Q <sub>1</sub>
AOAC	Association of Official Analytical Chemist's
CCD	Cromatografia em camada delgada
CHC	Carcinoma hepatocelular
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
$\text{DL}_{50}$	Dose letal média
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
g	Grama
kg	Quilograma
IAC	Immunoaffinity chromatography
IARC	International Agency of Research on Cancer
m	Média
$\text{mg}/\text{kg}$	Miligrama por quilograma
mL	Mililitro
$\text{N}_2$	Nitrogênio
nd	Não detectado
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OPAS	Organización Panamericana de la Salud

p.c.	Peso corpóreo
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
Rf	Coeficiente de partição
RIA	Radio-imuno-assay
RNA	Ácido ribonucléico
TFA	Ácido trifluoroacético
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
>	Maior
<	Menor
+	Mais
=	Igual
$\lambda$	Comprimento de onda
®	Marca registrada

## RESUMO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos e quando ingeridos causam alterações biológicas prejudiciais aos humanos e animais. Aflatoxinas são micotoxinas produzidas por espécies de fungos *Aspergillus* e merecem especial atenção por parte das indústrias de alimentos, por serem altamente tóxicas e carcinogênicas. Este fato levou, nos últimos anos, a uma intensa investigação no sentido de detectá-las, utilizando diversos métodos analíticos. Este estudo avaliou a eficiência de três kits imunológicos para detecção de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> em amostras de amendoim *in natura* e doce de amendoim, comparando com metodologias de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em camada delgada (CCD). O método CLAE utilizou colunas de imunoafinidade AFLAPREP<sup>®</sup> para purificação das amostras e a quantificação foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de fluorescência e derivatização pós-coluna com célula eletroquímica KOBRA<sup>®</sup> CELL. Para a análise por CCD foi utilizado o método referido por SOARES e RODRIGUES-AMAYA (1989). Já para a metodologia por kits optou-se por marcas comercializadas no mercado nacional: (a) AFLASCAN<sup>®</sup> - Análise semiquantitativa de aflatoxina total, (b) AFLACARD<sup>®</sup> - Teste para investigação qualitativa de AFB<sub>1</sub> e total e (c) Agri-Screen<sup>®</sup> (Aflatoxin Screening Test) - Competitive Direct ELISA. De um total de 20 amostras de amendoim *in natura* e doces de amendoim analisadas, em triplicata, por CLAE, CCD e pelos kits AFLASCAN<sup>®</sup> e AFLACARD<sup>®</sup> e ELISA, em 11 não foram detectadas aflatoxinas pelos cinco métodos, demonstrando que não houve resultado falso positivo nas determinações realizadas pelos kits. Uma amostra de doce de amendoim mostrou resultado falso negativo na determinação pelo kit Agri-Screen<sup>®</sup> - ELISA, sendo que apresentou discrepância também entre os métodos de CLAE e CCD cujos valores foram de 21,62 e 47,51 µg/kg, respectivamente. As determinações por CLAE mostraram que em 9 (45%) foram detectadas AFLs totais com níveis variando de 0,90 a 70,30 µg/kg. Nas determinações por CCD, 6 (30%) das amostras foram detectadas AFLs totais com níveis variando de 16,72 a 100,83 µg/kg. Os kits imunológicos avaliados mostraram-se simples, rápido e com menor uso de solventes orgânicos, porém a possibilidade de resultados presuntivos, positivo ou negativo, reafirma a necessidade de confirmação dos resultados utilizando diferentes metodologias tais como CLAE e CCD para a confirmação da identidade das aflatoxinas pesquisadas.

Palavras-chave: aflatoxina, amendoim, CLAE, CCD, testes de imunoafinidade.

## ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi and, when are ingested, may cause biological changes that are harmful to the human beings and animals. Aflatoxins are mycotoxinas produced by species of fungi *Aspergillus* and deserve special attention on the part of the food industries, for being highly toxic and carcinogenic. In the recent years, this fact has incited an intense inquiry to direction to detect them, using many analytical methods. The present study evaluated the efficiency of 3 (three) immunological *kits* to detect aflatoxins AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub> in samples of peanut's *in nature* and candies of peanut, comparing whit methodologies of high efficiency of liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC). Immunoaffinity columns AFLAPREP<sup>®</sup> were utilized for samples clean-up and the analysis was conducted in a high efficiency of liquid chromatography with a fluorescence detector and derivation post-column with KOBRA<sup>®</sup> CELL electrochemical cell. The TLC techniques utilized the method referred by SOARES and RODRIGUES-AMAYA (1989). For the *kit's* methodology, the option called for 3 (three) marks commercialized in Brazil: (1) AFLASCAN<sup>®</sup> - Semi quantitative total aflatoxin analysis, (2) AFLACARD<sup>®</sup> - Test for qualitative inquiry of AFB<sub>1</sub> and total and (3) Agri-Screen<sup>®</sup> (Aflatoxin Screening Test) - Competitive Direct ELISA. The total of 20 samples of *in nature* peanut's and candies analyzed by triplicates, HPLC, TLC and kits AFLASCAN<sup>®</sup>, AFLACARD<sup>®</sup> and ELISA, 11 samples did not detected aflatoxins through the methods, showing that no had been false positive results in the analysis conducted by the methods. Only one of the peanut candies sample showed a false negative result when analyzed by *kit* Agri-Screen<sup>®</sup> - ELISA. The sample also showed a discrepancy between the HPLC and TLC methods, with values of 21,62 µg/kg and 47,51 µg/kg, respectily. The HPLC analysis showed in 9 samples, 45% of total samples, levels of total AFLs were detected varying between 0,90 µg/kg to 70,30 µg/kg. In TLC analysis, 6 samples, 30% of total samples, were detected AFLs with the levels varying 16,72 µg/kg of 100,83 µg/kg. Immunological *kits* evaluated had revealed simple, fast e with lesser use of solvent organic, however the possibility of presumptive results, positive or negative, reaffirms the necessity of confirmation of the results using different methodologies such as HPLC and TLC for the confirmation of the identity searched aflatoxins.

Key-words: aflatoxin, peanut, HPLC, TLC, immunoaffinity method.