

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Degradação de Níveis de Aflatoxina B1 por Ação da Peroxidase em Solução Modelo

Karen Vanessa Marimón Sibaja¹, Ana Carla Penteado Feltrin¹ e Jaqueline Garda Buffon¹

¹Universidade Federal de Rio Grande – Escola de Química e Alimentos
Caixa Postal 474 - 96.201-900 Rio Grande– RS - E-mail: karenmarimon@hotmail.com

RESUMO

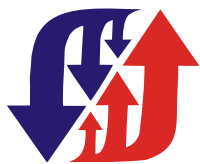
*Aflatoxinas (AF) são metabólitos secundários tóxicos, produzidos principalmente dos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, potentes mutagênicos e carcinogênicos de alimentos. As aflatoxinas (AFLAS) são tanto aguda como cronicamente tóxicas para animais e seres humanos e tem propriedades imunossupressoras, mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da enzima peroxidase (PO) na redução dos níveis de aflatoxina AFB1, em solução modelo (Tampão Fosfato 0,05 mM pH 5,5), alcançando-se uma redução de até 67 % após 60 min de interação PO + AFLA B1.*

Palavras-chave: Peroxidase, Aflatoxina B1, QuEChERS, descontaminação.

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas (AFLAS) constituem uma importante classe de micotoxinas produzidas principalmente por espécies *Aspergillus*, incluindo *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*. Estas toxinas estão em grande parte relacionadas com produtos alimentares produzidos nos trópicos úmidos e subtropicais, como os cereais (milho, sorgo, arroz e trigo), oleaginosas (amendoim, soja, girassol e algodão), especiarias (pimenta, açafrão, coentro e gengibre), frutos de casca rija (amêndoas, castanha do Brasil, pistache, nozes, e coco), e o leite. Entre as AFLAS (B1, B2, G1 e G2), a AFB1 é a mais comumente encontrada em alimentos além de ser considerada o agente cancerígeno de maior potencial tóxico por sua associação com o carcinoma hepatocelular (câncer de fígado) (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2015). Com base nestas informações, estudos sobre a avaliação de métodos de descontaminação micotoxicológicos têm sido enfatizados, em que a utilização de enzimas oferece uma alternativa atrativa para o controle ou eliminação de aflatoxinas em alimentos, resguardando sua qualidade e segurança quando comparado aos métodos físicos e químicos de descontaminação empregados.

Numerosas enzimas podem degradar tóxicos (KARLOVSKY, 2011), entre estas a peroxidase uma oxidoreductase produzida por certo número de micro-organismos e plantas (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009). A peroxidase pode ser utilizada na degradação de uma grande variedade de tóxicos, incluindo compostos aromáticos policíclicos, fenóis policlorados e na descontaminação biológica das AFLAS alcançando bons resultados de descontaminação (SMITH, 1987). Desta forma, o objetivo do presente trabalho é a redução enzimática dos níveis de AFB1 aplicando PO comercial, visando seu uso na indústria alimentaria.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

Padrões e Reagentes

A enzima peroxidase comercial PO, padrão de micotoxina AFB1, assim como todos os reagentes e solventes necessários, foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company (E.U.A.).

Condições HPLC

As análises para separação e quantificação da AFB1 foram feitas em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector por fluorescência (HPLC-FL), nas condições ótimas de quantificação de AFB1 segundo Silva (2016). Coluna cromatográfica Kromasil C18 com tamanho de partícula de 5 µm e 250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, fase móvel contendo mistura de solventes, água:acetonitrila:metanol (60:25:15), temperatura de 40 °C, vazão de 1 mL min⁻¹, e um volume de injeção de 20 µL. A avaliação da separação foi realizada em padrão diluído através do tempo de retenção (tR), fator de separação (α) e fator de retenção (k) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

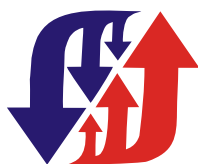
Os parâmetros de qualidade analítica como a faixa de linearidade, curva analítica, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), exatidão (recuperação) foram determinados para a validação do método instrumental.

Extração de Aflatoxina B1 – Método QuEChERS

A verificação do percentual de recuperação do método se realizou fortificando amostras contendo solução Tampão Fosfato 0,05 mM pH 5,5 com solução padrão de AFB1. Foi utilizado um nível de fortificação, com base no limite legislado pelos órgãos reguladores para AFB1 em leite (0,5 µg/kg, MERCOSUL), e considerando o LQm estimado. A extração foi feita pelo método de *QuEChERS* (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe) (Rodríguez, et al. 2015), onde alíquotas do padrão transferiram-se para frascos âmbar de 10 mL, após evaporação do solvente contendo os padrões, 5 mL de acetonitrila foi adicionado a 1 ml de amostra (solução tampão fosfato) e vigorosamente agitou-se durante 30 s antes da adição de 0,4 g de MgSO₄ anidro e 0,1 g de NaCl. A mistura foi agitada em vórtex durante 30 s e sonicada durante 3 min antes de ser centrifugada durante 3 min a 3500 rpm. Finalmente, o sobrenadante foi recolhido e evaporou-se até *secura* sob uma corrente de nitrogênio suave, ressuspendendo os extratos secos em 1 mL da mistura que compunha a fase móvel do sistema cromatográfico para posterior quantificação por CLAE-FL. O percentual de recuperação foi estimado relacionando a concentração das AFLA B1 encontrada com a concentração esperada, conforme indicado na Equação 1.

$$\% R = (C1/C2) * 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde % R representa o percentual de recuperação; C1 indica a concentração determinada na amostra fortificada e C2 a concentração do padrão utilizado para a fortificação.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Redução de Aflatoxina em Solução Modelo

Foi avaliado o potencial degradativo da enzima PO sobre a micotoxina AFLA B1. A reação de redução dos níveis de AFLA B1 em solução modelo ocorreu na presença da enzima na concentrações de 1 U/mL de solução modelo meio reacional e AFLA B1 com concentração de 0,5 µg/mL. A reação foi avaliada usando diferentes pH de solução Tampão Fosfato (5,5 e 6,7) sob agitação orbital a 150 rpm a 25 °C.

A avaliação da degradação foi constituída de etapas que envolveram diferentes meios: na presença da micotoxina em meio tamponante; na presença da micotoxina contendo PO e o cofator da atividade enzimática H₂O₂; e na presença do meio tamponante contendo PO e cofator da atividade enzimática H₂O₂. A avaliação da concentração residual após a ação da enzima foi utilizada para estimar a redução da concentração da micotoxina. Todos os ensaios foram conduzidos e analisados em triplicata e o percentual de descontaminação foi determinado utilizando-se a Equação 2 através da razão entre a variação da massa da micotoxina e a massa inicial da mesma.

$$\% \text{ de descontaminação} = \frac{(\Delta MM)}{MM_i} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

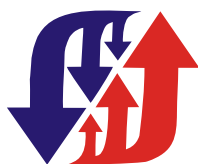
A curva analítica para AFLA B1, assim como seus parâmetros (Tabela 1), mostram que o procedimento era adequado para a quantificação de AFLAB1. Seus indicadores atendem as recomendações de confiabilidade da análise, considerando as recomendações da ANVISA (coeficiente de correlação de 0,99) e do INMETRO (valores acima de 0,9). Além disso, a linearidade da curva mostrou uma ampla gama de aplicações.

Os limites de detecção e de quantificação do método foram estimados por a relação sinal-ruído, o que estabelece a concentração mínima à qual a substância a analisar pode ser detectada facilmente.

Tabela 1. Parâmetros analíticos avaliados em HPLC-FL.

Parâmetro	AFLA B1
Curva	$y = 313566x - 10237$
Linearidade	0,0015-11,9
Coeficiente de Correlação	0,998
Limite de Detecção (µg/L)	0,0015
Limite de Quantificação (µg/L)	0,026

De acordo com a orientação da Comissão Europeia, que faz recomendações específicas de desempenho para ensaios sobre a recuperação de micotoxinas, o valor de recuperação recomendada é de 70-120%. Os resultados obtidos neste estudo (Tabela 2) mostram recuperações que foram mantidos dentro de níveis aceitáveis, por tanto, verificou-se que AFLA B1 pode ser quantificado em condições analíticas confiáveis.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tabela 2. Recuperação de AFLA B1 (0,5 µg/L) em Tampão Fosfato por *QuEChERS*.

pH	Recuperação (%) CV (%)
5,5	119 (5)
6,7	118 (4)

*AFLA B1- Aflatoxina B1, CV% - Coeficiente de variação das análises.

Os resultados encontrados na avaliação dos diferentes pH de solução modelo (Tabela 3), evidenciaram uma redução de 67 % com o emprego de solução modelo Tampão Fosfato pH 5,5, no entanto o aumento do pH para 6,7 influencia negativamente no percentual de redução da AFLA B1 com ação da PO. Estes resultados ressaltam a importância da avaliação das condições do médio na degradação de aflatoxinas mediante o uso da enzima PO, além de avaliar outros parâmetros como o tempo de reação, proporção enzima:substrato, entre outros, que podem resultar em percentuais também maiores de redução dos níveis de DON.

Tabela 3. Degradação de AFLA B1 (0,5 µg/L) em Tampão Fosfato por *QuechErs*.

pH	Degradação (%) CV (%)
5,5	67 (7)
6,7	20 (3)

CONCLUSÕES

Neste trabalho, pode-se concluir que a enzima PO possui ação sobre AFLA B1, levando a uma diminuição dos níveis deste de 67 % após 60 min de interação PO + AFLA B1. Em adição se faz necessário a realização de estudos futuros a cerca desses resultados, com o objeto de investigar o mecanismo de ação de PO sobre AFLA B1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bhatnagar-Mathur P, Sunkara S, Bhatnagar-Panwar M, Waliyar, F.; Sharma K. 2015. Biotechnological advances for combating *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in crops. *Plant Science* 234:119–132.
- Hamid M, Khalil-Ur-Rehman. 2009. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry* 115(4):1177–1186.
- Karlovsky P. 2011. Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91: 491–504.
- Smith J. E. Hamid A. 1987. Degradation of Aflatoxin by *Aspergillus flavus*. *Interactions* 4(108):2023–2029.
- Silva B. 2016. Soja: compostos funcionais e contaminantes fúngicos. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, 2016.
- Rodríguez- Carrasco Y, Fattore M, Albrizio E, Berrada H, Mañes J. 2015. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population. *Food chemistry* 178:149-155.