



## Avaliação por Cromatografia Líquida da incidência de aflatoxinas em especiarias comercializadas no Estado de São Paulo

M. L. Rodrigues<sup>1</sup>, R. C. Briganti<sup>1</sup>, M. H. Iha<sup>1</sup>

1- Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas – Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional VI Ribeirão Preto – CEP: 14085410 – Ribeirão Preto – SP – Brasil, Telefone: (16) 3625-5046 – e-mail: (matheus.leandro.rodrigues@alumni.usp.br)

**RESUMO** – Foi investigada a incidência de aflatoxinas em especiarias adquiridas no Estado de São Paulo. Um total de 180 amostras das especiarias pimenta do reino, colorífico, gengibre, noz-moscada, páprica e cúrcuma foram analisados utilizando coluna de imunoafinidade (IAC) para limpeza e a cromatografia líquida com detector por fluorescência para separação e quantificação. Os métodos para as aflatoxinas (AFs) B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> foram aperfeiçoados para cada especiaria. Verificou-se que a maioria das especiarias contém AFs, e os níveis médios das toxinas nas amostras de pimenta do reino, colorífico e cúrcuma foram menores que 2 ng/g. Vinte e uma amostras de gengibre (84%) continham AFs 0,10 - 9,55 ng/g. Vinte e nove amostras de noz-moscada (100%) continham AFs 2,71 - 48,67 ng/g. Vinte e duas (73%) amostras de páprica apresentaram AFs, 0,11 - 14,92 ng/g. AFs em noz-moscada e páprica podem representar uma questão de Saúde Pública no Brasil.

**ABSTRACT** – The incidence of aflatoxins and ochratoxin A in spices purchased from São Paulo State, Brazil was investigated. A total of 180 black pepper, colorífico, ginger, nutmeg and turmeric were analyzed using immunoaffinity column (IAC) for clean-up and liquid chromatography/fluorescence detector (LC/FLD) for separation and quantitation. The AFs methods were optimized for each spice, focusing mainly on the extraction solutions. Most spices were found to contain AFs. The average levels of the toxins in black pepper, colorífico and turmeric samples were less than 2 ng/g. Twenty-one ginger samples (84%) contained AFs 0.10 - 9.55 ng/g. Twenty-nine nutmeg samples (100%) contained AFs 2.71 - 48.67 ng/g. Twenty-two paprika samples (73%) contained AFs, 0.11 - 14.92 ng/g. AFs in nutmeg and paprika could represent a food safety issue in Brazil.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aflatoxinas, cromatografia líquida, especiarias, nível de incidência.

**KEYWORDS:** Aflatoxins, liquid chromatography, spices, incidence.

### 1. Introdução

Especiarias são usadas para proporcionar sabor, aroma e cor para os alimentos e apresentam diversas propriedades medicinais, além do uso como conservantes. Tais propriedades singulares têm criado uma grande demanda para as especiarias e motivado uma vasta quantidade de pesquisas com relação ao seu uso e potenciais benefícios econômicos (De la Torre et al., 2017), incluindo em aplicações médicas (Ganjre et al., 2015; Piarau et



al., 2012), em cosméticos (Nabavi et al., 2015) e como nutracêuticos (Piaru et al., 2012), aumentando o interesse nestes alimentos por parte dos consumidores.

Durante a secagem, as especiarias geralmente permanecerem em locais próximos ao solo e podem ser alvos de contaminação por fungos, podendo culminar na produção de micotoxinas. Entre as principais micotoxinas, as aflatoxinas (AFs) são uma das mais importantes porque são tóxicas para humanos e animais, produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. As AFs são hepatotóxicas em animais, sendo a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) a mais abundante e a mais tóxica. A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC, 1993) classificou a AFB<sub>1</sub> como um carcinogênico humano do Grupo 1, em 2002, a IARC (IARC, 2002) reafirmou como Grupo 1 a classificação desta micotoxina. Há inúmeros relatos sobre a presença de AFs em especiarias (Iha & Trucksess, 2019; Omotayo et al. 2019, Pesavento et al. 2016, Jeswal e Kumar, 2015). Existem poucos relatórios sobre a incidência destas toxinas em especiarias comercializadas no Brasil (Shundo, et al. 2009).

O objetivo deste estudo foi: modificar e validar métodos para a análise de AFs em seis especiarias e usar o método validado para avaliar a incidência de AFs nas amostras de pimenta do reino (*Piper nigrum* L.), colorífico (mistura de amido de milho com urucum *Bixa orellana*), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), noz-moscada (*Myristica fragrans*), páprica (*Capsicum annuum* L.) e cúrcuma (*Curcuma longa*) coletados do estado de São Paulo, e verificar se estão de acordo com a legislação Brasileira (Brasil, 2011).

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Amostras

Foram analisadas 180 amostras de seis especiarias, coletadas por fiscais da Vigilância Sanitária ou adquiridos em estabelecimentos comerciais em 35 municípios do Estado de São Paulo. A distribuição de amostras ocorreu da seguinte maneira: 30 amostras de pimenta do reino, 33 de colorífico, 25 de gengibre 29 de noz moscada, 30 de páprica, e 33 de cúrcuma. As amostras foram analisadas em duplicata.

### 2.2. Reagentes

Os reagentes empregados neste estudo foram: Padrão de AFs (A6636, A9887, A0138, A0263, Sigma Chemical Company), tampão fosfato-salino (PBS, P4417, Sigma Chemical Company), metanol e acetonitrila (Grau cromatografia, Merck), coluna de imunoafinidade (IAC, AflaTest, Vicam). Os padrões primários de estoque para cada micotoxina foram preparados por diluição em acetonitrila, e as respectivas concentrações foram determinadas pelo método da AOAC International Official Method 971.22 (Trucksess 2012). As soluções padrões intermediárias foram preparadas contendo as aflatoxinas, 400 ng/mL, (AFB<sub>1</sub>, 200 ng/mL; AFB<sub>2</sub>, 50 ng/mL; AFG<sub>1</sub>, 100 ng/mL; e AFG<sub>2</sub>, 50 ng/mL) em acetonitrila. Porções adequadas da solução padrão de estoque das micotoxinas foram diluídas na fase móvel para preparar soluções padrões diárias, nas seguintes concentrações para AFB<sub>1</sub>, 0,4, 1,0, 2,0, 4,0, 10 ng/mL; para AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub>, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 ng/mL; e para AFG<sub>1</sub>, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 ng/mL.

### 2.3. Condições Cromatográficas e Quantificação

O equipamento usado foi o sistema LC (Shimadzu Instruments,) com detector por fluorescência, injetor Rheodyne L.P. com 50,0  $\mu$ L de loop (Rheodyne, Cotati), coluna cromatográfica YMC Pack ODS-AQ, 150 x 4.6 mm, 3  $\mu$ m, 12 nm (YMC Co., Ltd.); sistema de derivatização pós coluna para AFs: PHRED cell (célula fotoquímica para derivatização pós coluna; AURA Industries).

Condições Cromatográficas: Fase móvel, água-acetonitrila-metanol (54 + 25 + 17, v/v), fluxo de 0,6 mL/min. Comprimento de onda de 362 nm para excitação, e em 440 nm para emissão, o volume de injeção na coluna foi de 50,0  $\mu$ L. As micotoxinas eluem na seguinte ordem: AFG<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, e AFB<sub>1</sub>. Após passar através da célula PHRED, as aflatoxinas AFG<sub>1</sub> e AFB<sub>1</sub> sofrem reação de derivatização para formarem AFG<sub>2a</sub> (derivado de G<sub>1</sub>) e AFB<sub>2a</sub> (derivado de AFB<sub>1</sub>), respectivamente.

### 2.4. Preparo de amostra e extração

Cada especiaria foi homogeneizada manualmente por 10 minutos antes da análise. Foi pesado 5g da especiaria em um tubo de centrífuga de 50mL, adicionado 0,4 g de NaCl e 25 mL da solução extratora (ver Tabela 1). A mistura foi agitada durante 30 min e centrifugada por 10 min em 2000 rpm. Após a passagem da amostra, a coluna foi lavada duas vezes com porção de 10 mL de água ultra pura e as aflatoxinas foram eluídas duas vezes com 0,7 mL de metanol. A solução eluída foi coletada em um frasco volumétrico de 2 mL e o volume foi completado com água ultra pura, imediatamente antes da análise cromatográfica. Para as outras especiarias, alíquotas de 5 g foram pesadas em tubos de centrífuga de 50 mL. Após a adição de 1 g de NaCl e 25 mL da solução de extração (Tabela 1), a solução foi agitada durante 3 min no vortex e centrifugada por 10 min em 2000 rpm. O sobrenadante foi diluído (Tabela 1), misturado e filtrado em filtro de microfibras de vidro. O filtrado foi adicionado à coluna Aflatest IAC. O restante do preparo foi feito de acordo com o descrito para a páprica anteriormente neste item.

Tabela 1. Composição da solução de extração, volume extraído e volumes da solução de diluição e do extrato diluído adicionado na Aflatest IAC.

Especiaria	Composição da solução de extração	Volume extraído, mL	Volume, mL	
			Solução de diluição	Extrato diluído adicionado na IAC
Pimenta do reino	ACN + água (8:2)	6	54	50
Colorífico	ACN + água (8:2)	6	54	50
Gengibre	MeOH + água (7:3)	7	28	25
Noz moscada	ACN + água (8:2)	6	54	50
Páprica	ACN + água (8:2)	6	54	50
Cúrcuma	MeOH + água (9:1)	7	28	25

## 2.5. Recuperação

Foram pesadas 5 g de amostras que foram contaminadas com soluções padrões das micotoxinas, em 3 níveis de concentração e em 4 replicatas. O nível de concentração na recuperação foi o mesmo em todas as especiarias, as concentrações para a AFB<sub>1</sub> foram de 4, 8 e 16 ng/g, para AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> 1,2 e 4 ng/g e AFG<sub>1</sub> 2,4 e 8 ng/g. Após 2h as amostras foram analisadas de acordo com a metodologia descrita no item anterior 2.4.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Análise do desempenho do método analítico

O cromatograma, Figura 1, mostrou boa resolução para as quatro aflatoxinas e não houveram picos interferentes. Os tempos de retenção do AFG<sub>2</sub>, AFG<sub>2a</sub> (derivado de AFG<sub>1</sub>), AFB<sub>2</sub> e AFB<sub>2a</sub> (derivado de AFB<sub>1</sub>) estavam entre cerca de 11 e 16 min. O limite de detecção (LOD) foi determinado através da média de três reagentes em branco acrescido 2 do desvio padrão. O limite de detecção para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> foi 0,04, 0,01, 0,02, 0,01 ng/g, respectivamente, e o limite de quantificação (LOQ) foi de 0,15, 0,04, 0,07 e 0,04 ng/g, respectivamente. As recuperações de AFs foram maiores que 70%, exceto para AFG<sub>2</sub>. Desde a monografia da IARC (2002) indica que há evidência inadequada em animais para a carcinogenicidade do AFG<sub>2</sub>, portanto, a baixa recuperação dessa toxina nas amostras não diminui o desempenho do nosso método.

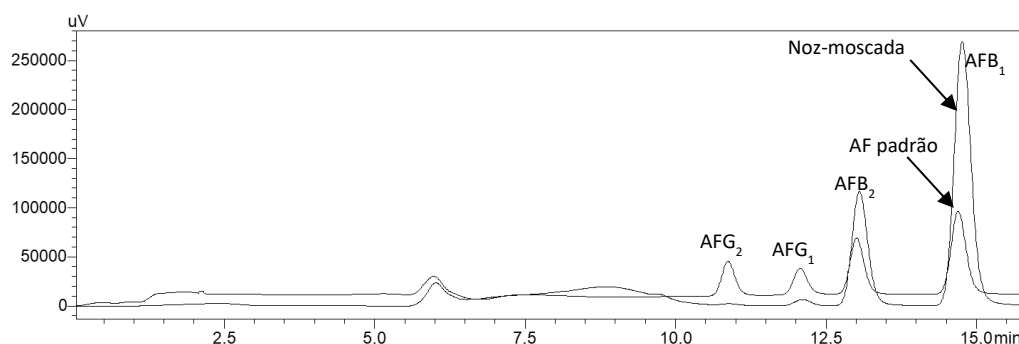


Figura 1. Cromatograma, padrão de aflatoxinas: 2 ng/mL AFG<sub>2</sub>; 4 ng/mL AFG<sub>1</sub> 2 ng/mL AFB<sub>2</sub>; 8 ng/mL AFB<sub>1</sub> e amostra de noz-moscada: 0,1 ng/g AFG<sub>2</sub>, 1, 5 ng/g AFG<sub>1</sub> 5,7 ng/g AFB<sub>2</sub>; 38,7 ng/g AFB<sub>1</sub>.

### 3.2. Resultados da pesquisa de incidência de aflatoxinas em especiarias comercializadas

Os resultados das análises estão na Tabela 2. Pimenta do reino, colorífico e cúrcuma apresentaram baixos níveis de aflatoxinas. Vinte e uma amostras de gengibre (84%) estavam contaminadas com AFs na faixa de 0,10 - 9,55 ng/g. Amostras de páprica e noz-moscada apresentaram maior contaminação por micotoxina. Vinte e duas amostras de colorífico (73%) estavam contaminadas com AFs, 0,11 - 14,92 ng/g. Vinte e nove amostras de noz-moscada (100%) contêm AFs variando de 2,71 a 48,67 ng/g, onde 11 amostras excedem os níveis máximos

de contaminação permitidos pela legislação brasileira, sendo o limite permitido para a soma de AFs menor que 20 ng/g (Brasil, 2011).

Tabela 2: Níveis das somas das aflatoxinas nas especiarias de acordo com a faixa de concentração em ng/g.

Especiaria	Quantidade de amostras analisadas	Número de amostras na faixa de concentração (ng/g)				
		<1	1,1-5	5,1-10	10,1-20	>20
Pimenta do reino	30	28	2	0	0	0
Colorífico	33	33	0	0	0	0
Gengibre	25	19	5	1	0	0
Noz moscada	29	0	8	6	4	11
Páprica	30	24	5	0	1	0
Cúrcuma	33	29	4	0	0	0

Pesavento et al. (2016) analisaram 52 amostras de noz-moscada (12 amostras inteiras e 40 amostras em pó; 22 tratados termicamente e 30 não tratados) para AFs, coletados na Itália. As amostras tratadas termicamente foram menos contaminadas do que as não tratadas. Especiarias em pó (pimenta e noz-moscada) apresentaram níveis mais altos de contaminação quando comparadas com especiarias inteiras. A contaminação por aflatoxina foi detectada em 72,5% das amostras de noz-moscada em pó, com um intervalo de 0-17,2 ng/g.

Jeswal e Kumar (2015), realizaram um estudo em 42 amostras de pimenta do reino, 35 cúrcumas e 36 gengibres. Os resultados para AFs foram  $185,0 \pm 22,0$  ng/g,  $163,8 \pm 25,7$  ng/g e  $183,6 \pm 25,0$  ng/g para pimenta do reino, cúrcuma e gengibre, respectivamente. Eles concluíram que pimenta do reino e gengibre seco são substratos adequados para o crescimento de fungos e subsequentes produções de micotoxinas. Shundo et al. (2009) analisaram 70 amostras de colorífico compradas na cidade de São Paulo, Brasil; 58 amostras (82,9%) foram contaminadas com AFs, em níveis variando de 0,09 a 7,3 ng/g.

De acordo com os resultados obtidos, a noz-moscada e a páprica são especiarias suscetíveis à contaminações por aflatoxinas. As causas da contaminação podem ocorrer em várias fases, da pré-colheita até a pós-colheita. Boas práticas de higiene e separação física são as melhores abordagens para o gerenciamento de micotoxinas e estratégias de descontaminação. É importante que os consumidores saibam e entendam que têm responsabilidade de manter os temperos secos após abri-los. Manter as especiarias seguras da fazenda até a mesa é de responsabilidade de todos (Iha & Trucksess, 2019).

#### 4. Conclusão

Os níveis de micotoxinas em colorífico, cúrcuma e pimenta do reino foram inferiores a 2 ng/g. Entretanto, a concentração de aflatoxinas nas amostras de noz moscada foi superior a 0,75 ng/g, e tal presença pode ser um problema para a saúde pública brasileiro.

#### 5. Agradecimentos

Agradecemos à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.



## 6. Referências bibliográficas

Brasil, Ministério da Saúde. (2011). Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

De La Torre, J. E., Gassara, F., Kouassi, A. P., Brar, S. K., & Belkacemi, K. (2017). Spice use in food: Properties and benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1078–1088.

Ganjre, A., Kathariya, R., Bagul, N., & Pawar, V. (2015). Anti-carcinogenic and Antibacterial Properties of Selected Spices: Implications in Oral Health. *Clinical Nutrition Research*, 4(4), 209–215.

Iha, M. H., & Trucksess, M. W. (2019). Management of mycotoxins in spices. *Journal of AOAC International*, 102(6), 1732–1739

International Agency for Research on Cancer (1993) IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, Monograph, Vol. 56, Lyon, France.

International Agency for Research on Cancer (2002) IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, Monograph, Vol. 82, Lyon, France.

Jeswal, P., & Kumar, D. (2015). Mycobiota and Natural Incidence of Aflatoxins, Ochratoxin A, and Citrinin in Indian Spices Confirmed by LC-MS/MS. *International Journal of Microbiology*, 2015, 1-8.

Nabavi, S. F., Di Lorenzo, A., Izadi, M., Sobarzo-Sánchez, E., Daglia, M., & Nabavi, S. M. (2015). Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Nutrients*, 7(9), 7729–7748.

Omotayo, O. P., Omotayo, A. O., Babalola, O. O., & Mwanza, M. (2019). Comparative study of aflatoxin contamination of winter and summer ginger from the North West Province of South Africa. *Toxicology Reports*, (2018), 489–495.

Pesavento, G., Ostuni, M., Calonico, C., Rossi, S., Capei, R., & Lo Nostro, A. (2016). Mycotic and aflatoxin contamination in *Myristica fragrans* seeds (nutmeg) and *Capsicum annum* (chilli), packaged in Italy and commercialized worldwide. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 57(2), E102–E109.

Piaru, S. P., Mahmud, R., Abdul Majid, A. M. S., & Mahmoud Nassar, Z. D. (2012). Antioxidant and antiangiogenic activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(4), 294–298.

Shundo, L., de Almeida, A. P., Alaburda, J., Lamardo, L. C. A., Navas, S. A., Ruvieri, V., & Sabino, M. (2009). Aflatoxins and ochratoxin A in Brazilian paprika. *Food Control*, 20(12), 1099–1102.

Trucksess, M.W. (2012) in Official Methods of Analysis of AOAC International 18th Ed., W. Horwitz and G.W. Latimer Jr. (Eds). AOAC International, Gaithersburg MD, Cap. 49, pp 1–51.