

Perito do mês...



Dr. Alexandros Yiannikouris, PhD-
Alltech

Micotoxinas e a história

Não deveria ser uma surpresa o fato de que as micotoxinas se tornaram uma preocupação importante a partir de os anos 60 com a descoberta das aflatoxinas, mas exemplos do impacto delas ao longo da história humana têm demonstrado que elas constituem uma ameaça desde os primórdios da produção agrícola organizada [1]. Algumas referências ao ergotismo no Velho Testamento [2], por exemplo, sugerem que toxinas de fungos do gênero *Fusarium*, como toxina T-2 e zearalenona podem ter sido responsáveis pelo declínio da civilização Etrusca [3] e pela crise em Atenas, no século V A.C. [4].

Controle de micotoxinas

Para aumentar a conscientização e com base no crescente número de trabalhos enfocando estratégias para o controle de micotoxinas nos diferentes níveis das cadeias de produção de alimento para animais e humanos, é importante saber que as micotoxinas representam um risco inevitável. Nós precisamos de ferramentas analíticas que possam funcionar como um “radar de vigilância” seletivo e estabelecer se o material sob risco precisa ser removido. Determinar se uma matéria-prima contém micotoxinas é o primeiro passo para que métodos adequados de proteção possam ser criados, e para isso, é necessário ter melhores métodos de amostragem e de mensuração de micotoxinas.

Devido aos efeitos deletérios produzidos pelas micotoxinas em grãos usados como alimento para animais e humanos, o nível de algumas micotoxinas nas matérias-primas é rigorosamente regulamentado, variando de $\mu\text{g}/\text{kg}$ a mg/kg para a maioria delas. O principal desafio para o desenvolvimento de procedimentos analíticos é a diversidade de moléculas de micotoxinas – cerca de 500 já foram identificadas; além disso, cada uma delas apresenta toxicidade e impacto econômico diferentes. A contaminação com micotoxinas depende da presença de condições ambientais que favoreçam o crescimento de bolores e que desencadeiem a síntese de micotoxinas. Por esses motivos, é necessário usar técnicas adequadas para permitir a análise de micotoxinas de múltiplas matrizes, que podem por sua vez interferir com a extração das toxinas, já que algumas delas podem ficar mascaradas [5,6].

A alta diversidade química dos metabólitos fúngicos pode resultar em uma enorme variedade de estruturas químicas em um extrato de uma amostra, o que torna sua pesquisa mais difícil e sujeita a erros.

Testes para micotoxinas

A primeira ferramenta para avaliação de alimentos e rações seria a observação de sinais que poderiam indicar a contaminação por bolores através de uma inspeção visual ou análise de contagem de fungos. No entanto, essas avaliações têm uma correlação muito baixa com a presença de micotoxinas; ou seja, a análise de micotoxinas (quimiotaxonomia) baseada na identificação de bolores acaba sendo a única ferramenta de alta produção para a triagem. Ainda assim, a complexidade dessa abordagem constitui um desafio devido à variação nos padrões de síntese de micotoxinas no ambiente. Existem técnicas mais complexas para identificação de metabólitos voláteis que podem ser usadas para indiretamente determinar cepas toxigênicas e atoxigênicas de fungos. Isso costuma ser feito usando cromatografia gasosa combinada com a detecção por espectrometria de massa [7] ou mais recentemente com o nariz eletrônico [8].

A avaliação dos níveis de micotoxinas está diretamente relacionada com a correta seleção de amostras representativas, que devem ser grandes em termos de tamanho ou número. Estima-se que o tamanho correto da amostra estaria entre 1,25 e 10,0 kg dependendo da matriz da ração, e que seriam necessárias 50 a 100 amostras para uma homogeneização seguida da divisão em sub-amostras de 62,5 a 500 g.



O tamanho das diferentes amostras deveria ser homogêneo com uma variação de peso não superior a $\pm 5\%$ [9]. É inevitável que uma parte dos lotes bons seja posteriormente rejeitada e que uma parte dos lotes ruins seja aprovada pelo plano de amostragem (risco do vendedor/comprador ou falsos negativos). A magnitude desses riscos está diretamente relacionada à variabilidade associada ao procedimento usado no teste para detecção de micotoxinas. Essa abordagem se torna ainda mais complexa quando consideramos as diferenças na regulamentação comercial entre os países. Os erros associados à amostragem podem chegar a 80% com 10% para sub-amostragem e menos de 10% para erros durante a análise de preparação da amostra [10].

Os princípios de garantia da qualidade devem ser seguidos para aumentar a eficiência e evitar erros na detecção de micotoxinas. Isso significa que a análise deve ser feita considerando um certo grau de incerteza. Determinadas técnicas, se conduzidas de maneira inadequada, interferem com a amostragem e podem conduzir a erros importantes na análise final. Sendo assim, o treinamento do pessoal técnico é essencial para prevenir os efeitos adversos relacionados às técnicas de amostragem e sub-amostragem disponíveis para as matérias-primas (cereais/grãos). A etapa de pré-tratamento das amostras também ajuda a prevenir imprecisões através do uso adequado de instrumentos e ferramentas. Finalmente, o procedimento analítico deve ser realizado por um técnico bem treinado. É importante que os testes sejam feitos com o uso de materiais de referência certificados juntamente com um método de análise validado para garantir resultados finais de boa qualidade [11].

Por um lado, a detecção rápida e sensível com provas de triagem possui um bom custo benefício; elas são fáceis de usar e estão disponíveis para qualquer um no campo. O problema é a falta de seletividade, a reatividade-cruzada [12] e a flutuação na resposta de acordo com as variações nas condições ambientais quando usada a situações de campo (pH, temperatura, efeitos matriciais e competição, etc) [13]. Além disso, é necessária confirmação com um método mais sofisticado capaz de mostrar precisamente a espécie e quantificar as micotoxinas.

Sensores e Biosensores

Usados para triagem, os métodos baseados em imunoensaio usam anticorpos produzidos especificamente para a detecção de micotoxinas. Essa alta especificidade está relacionada com a homologia entre o sítio-ativo dos anticorpos (o epítopo) para um determinado substrato (a micotoxina). O problema dessa abordagem é a reatividade cruzada mencionada anteriormente e que pode ocorrer devido à presença de análogos na matriz. Essas provas quantitativas ou semi-quantitativas podem ter naturezas diferentes: radioativa no caso dos radioimunoensaios (RIA), ou cromogênica no caso dos imunoenaios enzimáticos (EIA, ELISA).

O ELISA costuma ser usado como parte do plano de controle de micotoxinas devido à rapidez e ao número significativo de amostras que podem ser analisadas, permitindo uma semi-quantificação ou uma resposta positiva/negativa para determinados níveis ou faixas de concentração de toxinas. Outras estratégias são a utilização de dispositivos de fluxo lateral com anticorpos imobilizados em sua superfície, como fitas immunostrips, immunodipsticks ou imunofiltração. Existem também sensores e biosensores que usam anticorpos, enzimas, bactérias, receptores, DNA ou que transduzem sinais identificáveis óptica ou eletroquimicamente (usando ressonância plasmônica superficial ou espectrometria infravermelha). Essas técnicas são capazes de avaliar os grãos rapidamente para os principais grupos de micotoxinas regulamentadas dentro dos limites razoáveis de detecção na faixa de 0,5 a 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mas precisam ser usadas com cuidado devido ao risco de reatividade cruzada e de falsos positivos.

Como ferramenta de triagem, a cromatografia em camada fina (TLC) pode ser usada da mesma maneira que o ELISA. A TLC tem uma repetibilidade melhor e menos reatividade cruzada, mas a amostra precisa ser mais purificada e isso aumenta o tempo necessário para obter uma proporção mais precisa. Novas abordagens emergentes estão enfocando na utilização da genômica e na transcriptogenômica como ferramentas para a análise de micotoxinas. Essas técnicas se baseiam na capacidade que as células vivas possuem de responder à presença de substâncias químicas alterando a expressão gênica de acordo com o estímulo. Elas podem se tornar novas ferramentas para triagem; os microchips de DNA poderão avaliar o perfil de expressão gênica de determinadas células quando elas são expostas a micotoxinas extraídas dos grãos ou ração [14].

HPLC

Em um segundo plano, e para lidar com a ampla gama de estruturas químicas, a maioria dos métodos se baseia na cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC- High-performance liquid chromatography). Essa técnica, também chamada de cromatografia líquida de alta pressão, é usada para separar, identificar e quantificar compostos de acordo com suas propriedades químicas. A HPLC usa uma coluna que contém o material para cromatografia (fase estacionária), uma bomba que movimenta a(s) fase(s) móvel(is) através da coluna e um detector que mostra o tempo de retenção das moléculas. Este varia dependendo da interação entre a fase estacionária, as moléculas sendo analisadas e o(s) solvente(s) utilizado. As análises de HPLC continuam sendo o "padrão ouro" para a detecção de micotoxinas por causa de sua confiabilidade e dos baixos limites de detecção e quantificação que podem ser obtidos. No entanto, embora definitivos, esses métodos requerem ajustes complicados e trabalhosos para extração e purificação, o que acaba elevando seu custo.



Mesmo que procedimentos prévios de purificação e concentração permitam uma redução nos limites de detecção, ainda permanece a limitação da extração específica, dos procedimentos de detecção e das condições de análise que costumam estar relacionadas a uma determinada micotoxina (como DON ou toxina T-2) ou, a uma família de micotoxinas (como aflatoxinas, por exemplo). A capacidade de detecção de múltiplas micotoxinas é então bastante limitada e acaba levando a um viés, pois é necessário assumir algumas premissas para determinar quais as micotoxinas que serão analisadas. Dependendo do número de toxinas pesquisadas e do limite de detecção desejado, pode não ser realista querer resultados rápidos. É importante observar também que um resultado não detectável não significa necessariamente não mensurável, apesar de que esses resultados normalmente são baseados nos limites específicos determinados pela regulamentação da região (se disponíveis) onde foi observada a incidência não patológica da toxina (Nível sem efeito toxicológico observável ou No-Observable Effect Level/ Nível mais baixo de efeito toxicológico observável ou Lowest-Observable Effect Level - NOEL/LOEL).

O que temos pela frente?

A detecção analítica de micotoxinas pode ser abordada por ângulos diferentes usando diferentes métodos de separação tais como cromatografia líquida ou gasosa; eletroforese. Novas tecnologias estão agora propondo extração ultra-rápida das substâncias analisadas através de um sistema baseado em capilares, diminuindo o tempo que leva para correr uma análise com HPLC. Depois, um grande número de detectores conectivos pode ser selecionado para determinar as micotoxinas. Os métodos de detecção fluorimétrica ou por conjunto de diodos são os mais conhecidos e são considerados referência segundo a literatura disponível no banco de dados oficial da AOAC. Alguns pontos que devem ser considerados com esses métodos são: acessibilidade ao equipamento; alta produção para análises quantitativas; e baixa interação com a matriz. A principal limitação desses métodos é a necessidade de condições específicas para a separação cromatográfica em relação à substância pesquisada, e isso desde que a molécula fluoresça, caso contrário é necessário fazer uma derivatização da amostra. Outros desafios estão nos níveis de recuperação, na estabilidade dos derivados e na sobreposição dos compostos extraídos. Sendo assim, é necessária uma abordagem incluindo vários componentes para a detecção rápida das diversas substâncias que podem estar presentes nas diferentes matrizes.

A espectrometria de massa (MS) em 2-dimensões associada à cromatografia separativa está se tornando o novo método de referência para a análise de micotoxinas. Essa abordagem permite a especificação através da massa atômica de todos os elementos presentes na amostra e uma determinação mais clara das micotoxinas após experimentos de padrões específicos de fragmentação. Enquanto muitos componentes têm o mesmo valor de massa intacta, o acréscimo de outra dimensão usando os fragmentos (espectrometria de massa seqüencial) permite a identificação específica de cada composto analisado. A quantificação é feita através do monitoramento dos fragmentos de íons ao longo do tempo de extração cromatográfica. Em última instância, a sensibilidade e a precisão dos métodos de análise estão aumentando [17]. A inclusão da etapa de cromatografia permite a extração tempo-dependente de todas as espécies, melhorando a detecção de múltiplos componentes de micotoxinas em uma amostra.

Os fatores limitantes estão na supressão da eficácia de ionização devido à matriz e à enorme diversidade de micotoxinas existentes, além da falta de qualquer substância para calibração. Estudos recentes possibilitaram a detecção e des-replicação de quase 500 metabólitos fúngicos, apesar de fornecerem apenas resultados qualitativos [18]. Outro aspecto interessante da abordagem LC-MS (cromatografia líquida – espectrometria de massa) é a possibilidade de se trabalhar diretamente com extratos brutos, geralmente obtidos após a extração da amostra com solvente e filtração básica, que permite uma redução no tempo necessário para análise.

Existem outras tecnologias disponíveis, mais elas provavelmente são menos usadas do que as técnicas apresentadas anteriormente. A eletroforese capilar associada a detectores de fluorescência e ultravioleta podem ser usados da mesma maneira que o HPLC. Espectrometria de mobilidade iônica e espectrometria de mobilidade iônica RF-DC – espectrometria de massa são outros métodos disponíveis para análise de resíduos de micotoxinas [15].

A abordagem usando espectrometria de massa, juntamente com as interfaces recentemente desenvolvidas e à miniaturização de seus componentes, está se tornando um instrumento de bancada em quase todos os laboratórios de análises. Devido à sua capacidade de múltiplas detecções, qualidade, rapidez, confiabilidade e custo, essa ferramenta também está se tornando mais disponível no campo como parte do arsenal analítico disponível diretamente para produtores de alimentos para animais e humanos. Finalmente, a rápida utilização dessas tecnologias para uma infinidade de outros contaminantes (como agrotóxicos, melamina...) ou análises de componentes essenciais, as torna extremamente versáteis.



Conclusões

É fácil entender a complexidade para a detecção de micotoxinas quando se observa a quantidade de abordagens diferentes usadas para análise e o número de técnicas disponíveis. Essas análises também estão sujeitas a inúmeras armadilhas devido a propriedades inerentes às micotoxinas, sua diversidade química e metabolização em outras espécies moleculares. A complexidade de sua interação com matrizes representa outra limitação. Nesse sentido, as micotoxinas podem ser encontradas como metabólitos conjugados a um ou vários resíduos de glicosídeos ou glicuronídeos, que mascaram sua presença mesmo em procedimentos analíticos. A constante evolução de instrumentos analíticos e de procedimentos de extração ajudará a reduzir os erros e entender, prever e localizar a ocorrência de micotoxinas no campo.

Referências

1. Pittet A, Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an update review, *Rev. Med. Vet.* (1998), 149, 479–492
2. Schoental R, Mycotoxins and the Bible, *Perspect. Biol. Med.* (1984), 28,117–120.
3. Schoental R, Mycotoxins, porphyrias and the decline of the Etruscans, *J. Appl. Toxicol.* (1991), 11, 453–454.
4. Schoental R, Mycotoxins in food and the plague in Athens, *J. Nutr. Med.* (1994), 4, 83–85.
5. Berthiller F, Dall'Asta C, Schumacher R, Lemmens M, Adam G, Krska R, Masked Mycotoxins: Determination of a Deoxynivalenol Glucoside in Artificially and Naturally Contaminated Wheat by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* (2005), 53, 3421-3425.
6. Zhou B, Li Y, Gillespie J, He GQ, Horsley R, Schwarz P, Doehlert matrix design for optimization of the determination of bound deoxynivalenol in barley grain with trifluoroacetic acid (TFA), *J. Agric. Food Chem.* (2007), 55, 10141-10149.
7. Demyttenaere JCR, Morina RM, Sandra P, Monitoring and fast detection of mycotoxin-producing fungi based on headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction of the volatile metabolites. *J. Chromatogr. A* (2003), 985, 127-135.
8. Presicce DS, Forleo A, taurino AM, Zuppa M, Siciliano P, Laddomada B, Logrieco A, Visconti A. Response evaluation of an E-nose towards contaminated wheat by *Fusarium poae* fungi. *Sens. Act. B* (2006), 118, 433-438.
9. Pitchford JB, USDA Grain Inspection Handbook. United States Department of Agriculture Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration Federal Grain Inspection Service Program Handbook - Book1 (1995).
10. Whitaker TB, Johansson AS, Slate AB, Sampling Feeds for Mycotoxin Analysis - Book/Chapter. (2005) pp. 1-23.
11. Brera C, Miraglia M. Quality Assurance in Mycotoxin Analysis. *Microchem. J.* (1996), 54, 465-471
12. Erbs M, Hartmann N, Bucheli TD, Determination of the cross-reactivities for alpha-zearalenol, beta-zearalenol, zearalanone, alpha-zearalanol, and beta-zearalanol on three commercial immunoaffinity columns targeting zearalenone. *J. AOAC Intern.* (2007), 90, 1197–1202.
13. Schneider E, Curtui V, Seidler C, Dietrich R, Usleber E, Märtlbauer E, Rapid methods for deoxynivalenol and other trichothecenes. *Toxicol. Lett.* (2004), 153, 113–121.
14. Nageli H, Transcriptomics as a tool for the determination of trichothecenes. *World Mycotoxin Forum, the 5th Conference – Abstract book* (2008), pp. 60
15. Cigic IK, Prosen H, An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *Int. J. Mol. Sci.* (2009), 10, 62-115.
16. Maier NM, Buttinger G, Welhartzki S, Gavioli E, Lindner W, Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations. *J. Chromatogr. B* (2004), 804, 103-111.
17. Berthiller F, Schumacher R, Buttinger R, Krska R, Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* (2005), 1062, 209-216.
18. Nielsen KF, Smedsgaard J, Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for derplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *J. Chromatog. A* (2003), 1002, 111-136.

