

OCRATOXINA "A" EM FEIJÃO COMERCIALIZADO NO ESTADO DE SÃO PAULO E SUA ESTABILIDADE NO COZIMENTO*

Thais Valéria MILANEZ**
Myrna SABINO**

RIALA6/669

MILANEZ, T.V. & SABINO, M. - Ocratoxina A em feijão comercializado no Estado de São Paulo e sua estabilidade no cozimento. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49 (2):131-135, 1989.

RESUMO: Para verificar a presença de ocratoxina A em feijão consumido no Estado de São Paulo, foram analisadas 60 amostras colhidas em diferentes regiões. As determinações foram feitas por cromatografia em camada delgada pelo método descrito por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, ligeiramente modificado, e cujo limite de determinação foi de 30 µg/kg. Os resultados dos testes de recuperação, efetuados em vários níveis de concentração da micotoxina, variaram de 108 a 159%. Em nenhuma das amostras analisadas foi detectada presença da ocratoxina A. O estudo da estabilidade da micotoxina, com cozimento úmido e sob pressão, demonstrou uma diminuição de 20,1 a 76,7% de seu teor.

DESCRIPTORIOS: ocratoxina A, determinação em feijão; feijão, determinação de ocratoxina A; estabilidade da ocratoxina A; cromatografia em camada delgada.

INTRODUÇÃO

A ocratoxina A, micotoxina produzida por espécies de fungos *Aspergillus ochraceus* Whillhelm e *Penicilium viridicatum* Westling^{5,7,16}, é a mais tóxica de seus vários tipos. Estudos mostraram que ela é nefrotóxica para animais^{8, 16}, porém a sua carcinogenicidade ainda não foi devidamente comprovada^{8,10,16}.

A ocratoxina A poderá entrar na cadeia alimentar do homem e afetar a sua saúde, através da ingestão de alimentos com fungos ou de animais de abate que foram tratados com ração contaminada. Essas micotoxinas têm sido encontradas como contaminantes naturais em alimentos tais como cevada, trigo, milho, feijão, café e farinha de mandioca crua, e em ração animal^{13,14}.

A ocratoxina A é relativamente estável ao calor úmido⁹, porém foi observada a sua inativação

total em grãos de café submetidos à torrefação¹⁶. Em trabalhos experimentais, envolvendo enlatamento de feijão, foi verificada perda de 10 a 21% da toxina, no tratamento térmico^{2,4,10}.

Sendo o feijão alimento básico da população brasileira e devido a sua susceptibilidade à contaminação por ocratoxina A, foi proposto estudo para verificar os níveis da toxina no produto consumido no Estado de São Paulo, bem como sua estabilidade durante o processo usual de cozimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 60 amostras de feijão provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo, para determinação da ocratoxina A. Algumas delas foram adquiridas em pontos-de-venda na cidade de São Paulo, e outras obtidas a partir de remessas efetuadas ao IAL, para análise (tabela 1).

* Realizado na Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

O método empregado foi descrito por SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA¹², com modificações impostas pela disponibilidade de equipamentos e materiais.

De cada amostra de feijão foi separada uma alíquota de 30g de grãos, que foi triturada em multiprocessador. A micotoxina foi extraída com 180ml de metanol e 20 ml de solução de cloreto de sódio a 4%, em agitador mecânico, por uma hora. Em seguida, o material foi filtrado em papel Whatmann nº 1. A 100ml do filtrado foram adicionados 100ml de solução de sulfato de cobre a 10% e celite em quantidade suficiente para ocupar um bquer de 30ml. O material resultante foi agitado e filtrado; 100ml do filtrado foram transferidos para funil de separação contendo 100ml de água destilada. A ocratoxina A foi extraída com duas porções de 20ml de clorofórmio. Alíquotas de 10ml de cada extração foram reunidas em Erlenmeyer de 30ml e evaporadas em banho-maria. O resíduo foi dissolvido em 200µl de metanol e cromatografado em camada delgada usando placa de sílica.

O cromatograma foi desenvolvido em mistura de tolueno, acetato de etila e ácido fórmico (50+40+10). A placa foi examinada sob luz ultravioleta e a micotoxina foi quantificada por comparação visual da fluorescência da amostra com a do padrão de ocratoxina A.

No caso de feijão cozido, o método utilizado não proporcionou a limpeza necessária para que fosse feita a quantificação final com clareza; desta forma, foi acrescentada à técnica já descrita uma etapa extra de purificação que consistiu na percolação da amostra numa minicoluna de sílica, o cartucho "SEP PAK Si"⁶. O resíduo obtido da evaporação do extrato clorofórmico da amostra foi redissolvido com duas alíquotas de 0,5ml de tolueno e transferido quantitativamente para o cartucho, previamente tratado com 10ml de tolueno. Após lavagem da amostra com 10ml de tolueno, a ocratoxina A foi eluída com 10ml da mistura de tolueno e ácido acético (9+1) e evaporada até resíduo em banho-maria, sob corrente de nitrogênio⁶. Em seguida foi desenvolvida a cromatografia em camada delgada, descrita anteriormente.

TABELA 1

Procedência das amostras de feijão, classificação e relação dos resultados falsos positivos

Amostras analisadas	Procedência	Classificação (*)	Resultados falsos positivos
01	Araçatuba	Grupo I, classe cores	01
01	Campinas	Grupo I, classe cores	-
01	Guarujá	Grupo I, classe cores	-
02	Ibitina	Grupo I, classe cores	-
02	Ibitina	Grupo II, classe cores	01
01	Itariri	Grupo I, classe cores	-
10	Juquiá	Grupo I, classe cores	-
01	Mairinque	Grupo I, classe cores	-
01	Mirandópolis	Grupo I, classe cores	-
02	Registro	Grupo I, classe cores	-
01	S.J. Rio Preto	Grupo I, classe cores	-
01	São Paulo	Grupo I, classe branco	-
06	Idem	Grupo I, classe preto	01
03	Idem	Grupo I, classe cores	-
20	Idem	Grupo I, classe cores	04
01	Idem	Grupo I, classe cores	-
01	Idem	Grupo II, classe cores	-
01	Idem	Grupo II, classe cores	-
02	Sorocaba	Grupo I, classe cores	-
01	Suzano	Grupo I, classe preto	01
01	Tatuí	Grupo I, classe cores	-
60			08

* Classificação segundo a Portaria nº 161 de 24/7/87 do Ministério da Agricultura, Brasil¹

O cozimento do feijão foi feito em autoclave, a 121°C por 20 minutos, simulando-se o processo da panela de pressão. Após esfriamento, a amostra foi triturada em liquidificador e uma alíquota de 30g foi retirada para análise.

Para confirmação da presença de ocratoxina A, a placa foi exposta a vapores de amônia, que têm a propriedade de mudar a cor da fluorescência verde-azulada para azul intensa^{9,11,15}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando-se a tabela 1, verifica-se a existência de resultados falsos positivos. São assim considerados porque não foram confirmados na exposição da placa aos vapores de amônia. Este método não é considerado por muitos como decisivo para confirmação da presença de ocratoxina A, porém é válido para indicar a ausência desta micotoxina^{11,15}.

A técnica utilizada para essas análises foi testada em diversos níveis de recuperação e os dados obtidos constam da tabela 2.

Foi experimentada a recuperação da ocratoxina A na concentração de 50 µg/kg, pois é o valor que consta da proposta de limite de tolerância da ocratoxina A para a legislação brasileira (Recomendação do IV Encontro Nacional de Micotoxina, São Paulo, 1986).

Embora o limite de detecção de ocratoxina A pelo método proposto seja de 5,7 ng, considera-

se como limite de determinação 30 µg/kg, que é o valor onde há segurança razoável para quantificação da intensidade da fluorescência desenvolvida pela amostra.

O procedimento usual de análise não se mostrou adequado para a quantificação de ocratoxina A no feijão cozido. Após o cozimento, surgem várias manchas, inclusive fluorescentes no cromatograma com diferentes Rf, mascarando a visualização da ocratoxina A. Para contornar este problema, há necessidade de uma limpeza maior do cromatograma final. Assim, acrescentou-se uma etapa extra de limpeza, que consistiu no uso de uma minicolumna de sílica, no caso o cartucho SEP-PAK Si. Vários sistemas de solventes foram testados, porém o mais eficiente foi o tolueno + ácido acético (9+1), que já havia sido utilizado por HOWELL & TAYLOR⁶.

Os dados que constam na tabela 2 referentes à recuperação e reprodutibilidade da técnica mais etapa extra de limpeza são bem variáveis, porém aceitáveis estatisticamente (teste de Dixon). Acredita-se que essa variação foi gerada pela própria etapa extra-adicionada. O uso do cartucho de sílica SEP-PAK Si já sugeriu este tipo de observação por parte de outros autores⁶. Provavelmente este seja um dos fatores de variação dos resultados do experimento com feijão contaminado e cozido, onde se verificou uma destruição de 20,1 a 76,7% da ocratoxina A (tabela 3).

HARWIG et alii⁴ observaram perdas de 21 e 10% de ocratoxina A em feijão que ficou de molho e naquele que sofreu branqueamento, respectivamente. Feijões enlatados antes do aquecimento ainda continham 64% do total de ocratoxina A adicionada e 53%, após uma hora de aquecimento. EL BANNA & SCOTT³ verificaram médias de destruição de ocratoxina A em feijão fava, por ocasião de seu cozimento, de 15,5% a 100°C por

TABELA 2

Recuperação e reprodutividade em feijão adicionado de ocratoxina A, usando técnica adaptada de SOARES & RODRIGUES AMAYA¹²

Nível de ocratoxina A (µg/kg)	% de recup. (*)	cv	dp
10	159,6	7,1	11,4
30	103,7	10,8	11,2
50	108,8	13,4	14,5
200	108,7	8,5	9,3
200**	122,1	15,9	19,4

* média de cinco determinações
 cv = coeficiente de variação
 dp = desvio padrão
 ** com etapa extra de limpeza

TABELA 3

Quantidade de ocratoxina A recuperada após o cozimento do feijão contaminado artificialmente com 200 µg/kg da toxina

Experimento n°	Recuperação %
1	44,4
2	35,5
3	79,9
4	23,3
5	36,7

% média de recuperação: 44,0
 Desvio padrão: 9,6
 Coeficiente de variação: 21,8

6h e de 19,6% a 115,5°C por 2h. TRENK et alii apud EL BANNA & SCOTT³ obtiveram, em rações contendo aveia e arroz, após autoclavagem por 3 horas sem adição de água, perdas de 87,5 e 86% de ocratoxina A, respectivamente, e de 74 e 68,5%, sob as mesmas condições, porém na presença de água (50% volume/peso).

Para cada um dos níveis de recuperação, foram feitas cinco determinações e os resultados passaram pelo teste estatístico de Dixon. Os dados obtidos para 10µg/kg foram os únicos não adequados para uma aceitação de 95%. Considerou-se o limite de 30 µg/kg como seguro para quantificação da ocratoxina A pelo método de comparação visual por cromatografia em camada delgada, conforme a técnica de SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA¹², com as adaptações incorporadas.

Apesar deste levantamento não detectar a presença de ocratoxina A nas amostras examinadas, isto não significa a inexistência do problema dos fungos produtores desta micotoxina no nosso meio ambiente. Principalmente, à vista de

uma amostra, isenta de micotoxinas, armazenada em condições de laboratório, ter apresentado, posteriormente, ocratoxina A. Dos feijões mofados foram isoladas duas diferentes cepas de *Aspergillus* spp., uma delas de coloração ocrácea em meio de cultura.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1. O método do cozimento do feijão não destrói totalmente a ocratoxina A no material artificialmente contaminado.

2. Estudos mais complexos tornam-se necessários, envolvendo análise de um número maior de amostras e dos efeitos de parâmetros mais específicos na produção de ocratoxina A, como temperatura, umidade do substrato e tipo de armazenagem, à vista de ausência, na legislação brasileira, de limites de tolerância para esta micotoxina em alimentos.

RIALA6/669

MILANEZ, T.V. & SABINO, M. — Ochratoxin A in beans and its stability after cooking. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 49(2):131-135, 1989.

ABSTRACT: Sixty samples of beans from different regions of São Paulo State were tested for ochratoxin A. Determinations were made by thin layer chromatography and the method described by SOARES & RODRIGUES AMAYA, slightly modified. It gave a determination limit of 30 µg/kg. Recoveries tested at different levels (10,30,50 and 200 µg/kg) ranged from 108 to 159%. Ochratoxin A was not present in any sample tested. Average destruction of 20.1 to 76.7% of ochratoxin A occurred during cooking. The traditional method of beans cooking does not destroy totally the mycotoxin present in contaminated beans. Because there is no provision in Brazilian laws of tolerance levels of this mycotoxin it is necessary further research to determine the adequate levels of ochratoxin A in foodstuffs.

DESCRIPTORS: ochratoxin A, beans, ochratoxin A stability, thin-layer chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Leis decretos etc. - Portaria n.º 161, de 24 de julho de 1987, do Ministério da Agricultura. *Diário Oficial*, Brasília, 28 de julho de 1987, Seção 1. p. 11.946. Aprova a norma a ser observada na padronização, classificação, embalagem e apresentação do feijão.
2. BULLERMAN, L.B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. *J. Food Prot.*, 42 (1): 65-86, 1979.
3. EL BANNA, A.A. & SCOTT, P.M. Fate of mycotoxins during processing of food stuffs. III. Ochratoxin A during cooking of faba beans (*Vicia faba* L.) and polished wheat. *J. Food Prot.*, 47(3): 189-92, 1984.
4. HARWIG, J.; CHEN, Y.K. & COLLINS-THOMPSON, D.L. Stability of ochratoxin A in beans during canning. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 7(4): 288-9, 1974.
5. HESSELTINE, C.W.; VANDERGRAFT, E.E.; FENNEL, D.I.; SMITH, M.L. & SHOTWELL, O.L. - *Aspergilli* as ochratoxin producers. *Mycologia*, 64: 539-50, 1972.
6. HOWELL, M.V. & TAYLOR, P.W. Mycotoxins: determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone in mixed feeds, with detection by thin layer chromatography or high performance liquid chromatography. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 64 (6): 1.356-63, 1981.
7. MERWE, K.S. van der, STEYN, P.S.; FOURIE, L;

- SCOTT, D.E.B. & THERON, J.J. Ochratoxin A: a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 295: 1.112-3, 1965.
8. MUNRO, I.C.; SCOTT, P.M.; MOODIE, A. & WILLIS, R.F. Ochratoxin A: occurrence and toxicity. *J. am. Vet. med. Assoc.* 163(11): 1.269-73, 1973.
9. NESHEIM, S. The ochratoxins and other related compounds. *Adv. Chem. Ser.*, 149: 276-95, 1976. [Separata]
10. RIBELIN, W.E. - Mycotoxicoses of domestic and laboratory animals, poultry and aquatic invertebrates and vertebrates. In: WILLIE, T.D. & MOREHOUSE, L.G. eds. - *Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses, and encyclopedic handbook*. New York, Marcel Dekker, 1978, v. 2, p. 28-35.
11. SCOTT, P.M. & HAND, T.B. Method for the detection and estimation of ochratoxin A in some cereal products. *J. Assoc. off. anal. Chem.* 50(2): 366-71, 1967.
12. SOARES, L.M.V. - *Micotoxinas: um método para análise simultânea e incidência em alimentos comercializados na região de Campinas*. Campinas, 1987, 129 p. [Tese Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas]
13. SOARES, L.M.V. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Screening and quantification of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 68(6): 1.128-30, 1985.
14. STOLOFF, L. - Mycotoxins as potential environmental carcinogens. In: STICH, H.F. ed. *Carcinogens and mutagens in the environment*. Boca Raton, Fla., CRC Press, 1982, v. 1.
15. TRENK, H.L. & CHU, F.S. Improved detection of ochratoxin A on thin layer plates. *J. Assoc. off. anal. Chem.*, 54(6): 1.307-09, 1971.
16. WHO TASK GROUP ON ENVIRONMENTAL - HEALTH CRITERIA FOR MYCOTOXINS, Geneva 1978. *Mycotoxins*. Geneva, UNEP/WHO, 1979, p. 86-108/Environmental Health Criteria, 11.

Recebido para publicação em 6 de março de 1989.

