

## Artigo

## Quantificação da Inativação da Ocratoxina A pela Radiação Gama. Um Exemplo do Potencial da Radiação Ionizante na Descontaminação de Agentes Químicos

Cardozo, M.; Souza, S. P.; França, T. C. C.; Rezende, C. M.; Pinto, A. C.;  
Lima, A. L. S.; Lima, K. S. C.\*

Rev. Virtual Quim., 2014, 6 (3), 779-794. Data de publicação na Web: 25 de março de 2014

<http://www.uff.br/rvq>

### Measurement of the Inactivation of Ochratoxin by Gamma Radiation. An example of the Potential use of Ionizing Radiation in decontamination of chemical agents

**Abstract:** Ochratoxin A (OTA) is a compound produced in foods by molds that may cause harm to humans and animals such as induction of cancer. Therefore, to ensure food security is necessary to reduce the content of OTA in food. Irradiation is a processing technique that consists in the exhibition of products of ionizing radiation action for technological improvements. Ionizing radiation can also act in the inactivation of toxins by promoting degradation of the same by the formation of radiolytic products. The present study aimed to verify the action of doses of 1, 3 and 5 kGy in the inactivation of ochratoxin A (OTA) in model solutions. To quantify the reduction of the content of toxins in the samples tested we used chromatographic techniques and the data obtained were analyzed statistically. We also investigated the possible radiolytic products formed by analyzing for Mass Spectrometry High-resolution electro spray ionization. The results reveal that ionizing radiation has the potential to reduce the toxicity of products contaminated with OTA with considerable inactivation of the same from the lowest applied dose (1 kGy). It was found that the main radiolytic products are obtained by oxidation with formation of products of the breaking of bonds, preferably in the branches. The identification of the main radiolytic products shows that they are less toxic than the original. Thus, the application of ionizing radiation is presented as a viable alternative to chemical decontamination.

**Keywords:** Gamma radiation; ochratoxin A; high efficiency liquid chromatography; mass spectrometry; chemical decontamination.

### Resumo

A ocratoxina A (OTA) é uma toxina produzida por fungos em alimentos que podem provocar danos aos homens e animais como, por exemplo, a indução de câncer. Por isso, é necessário reduzir o conteúdo de OTA nos alimentos. A irradiação é uma técnica de beneficiamento que consiste na exposição de produtos a ação de radiações ionizantes. A radiação ionizante também pode agir na inativação de toxinas, degradando-as pela formação de produtos radiolíticos. O presente estudo teve por objetivo verificar a ação de doses de 1, 3 e 5 kGy na inativação da OTA em soluções modelo. Para quantificar a redução do conteúdo de toxina nas amostras testadas foram utilizadas técnicas cromatográficas e os dados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico. Foram também investigados os possíveis produtos radiolíticos caracterizados por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray. Os resultados revelam que a radiação ionizante tem potencial para reduzir a toxidez de produtos contaminados com OTA com considerável inativação desta toxina a partir da menor dose aplicada (1kGy). Verificou-se que os principais radiólitos são obtidos pela quebra oxidativa de ligações, preferencialmente nas ramificações. A identificação dos principais produtos radiolíticos revela que os mesmos são menos tóxicos que os originais. Sendo assim, a aplicação da radiação ionizante se apresenta como uma alternativa viável para a neutralização de toxinas, com aplicação direta na descontaminação química.

**Palavras-chave:** Radiação gama; ocratoxina A; cromatografia líquida de alta eficiência; espectrometria de massas; descontaminação química.

\* Instituto Militar de Engenharia, Seção de Engenharia Química, Praça General Tibúrcio 80, 22290-270, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

✉ [keila@ime.eb.br](mailto:keila@ime.eb.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20140047](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140047)

## Quantificação da Inativação da Ocratoxina A pela Radiação Gama. Um Exemplo do Potencial da Radiação Ionizante na Descontaminação de Agentes Químicos

Monique Cardozo,<sup>a</sup> Stefânia Priscila de Souza,<sup>a</sup> Tanos C. C. França,<sup>a</sup>  
Claudia M. Rezende,<sup>b</sup> Angelo C. Pinto,<sup>b</sup> Antônio L. dos Santos Lima,<sup>a</sup> Keila  
dos S. Cople Lima<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Militar de Engenharia, Seção de Engenharia Química – Praça General Tibúrcio, 80, 22290-270, Praia Vermelha, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Avenida Athos da Silveira Ramos, 149, Centro de Tecnologia Bloco A, 6º andar - Sala 626<sup>A</sup>, CEP: 21941-909, Cidade Universitária - Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Telefone: +55-21-2562-7370.

<sup>c</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Avenida Athos da Silveira Ramos, 149, Centro de Tecnologia, Bloco A, Cidade Universitária, CEP 21941-909, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

\* [keila@ime.eb.br](mailto:keila@ime.eb.br)

*Recebido em 25 de março de 2014. Aceito para publicação em 25 de março de 2014*

### 1. Introdução

1.1. Ocratoxinas e a ocratoxina A

1.2. A irradiação de alimentos

### 2. Material e métodos

### 3. Resultados e discussão

3.1. Inativação da OTA em soluções metanólicas irradiadas

3.2. Inativação da OTA em soluções aquosas irradiadas

3.3. Investigação dos produtos radiolíticos formados

### 4. Conclusões

## 1. Introdução

No atual panorama mundial, a segurança química tem permanecido como uma necessidade humana básica. Nesse contexto

garantir a segurança alimentar contra agentes tanto químicos quanto biológicos tem sido foco de ações nacionais e internacionais nos últimos anos. Na fronteira entre esses dois grupos estão as toxinas, compostos químicos oriundos das atividades metabólicas de seres vivos. Classificadas ao

mesmo tempo como agentes de guerra química e biológica as toxinas também se caracterizam como uma das principais causas de doenças de origem alimentar.<sup>1</sup> Fato que torna as toxinas potenciais agentes de contaminação de estoques de alimentos, suprimentos de água e até mesmo de ração animal, em eventuais ataques terroristas.

Como potenciais riscos a segurança alimentar, se destacam entre os diversos tipos de toxinas, as produzidas por micro-organismos como fungos e bactérias. Os alimentos são frequentemente sujeitos a contaminação por micro-organismos e suas toxinas em todas as fases de seu processamento. Mesmo atentando para os conceitos de segurança alimentar já difundidos atualmente como o uso de boas práticas e a avaliação e controle de riscos é muito difícil impedir completamente a contaminação.<sup>2</sup> Esse problema compromete o consumo, já que a ingestão de alimento impróprio pode causar um grande número de doenças, que vão desde simples alergias até a morte.<sup>3</sup> Devido a essa constante preocupação, alimentos contaminados acima dos níveis aceitáveis para consumo humano e de animais são considerados impróprios e por isso são descartados levando a significativas perdas econômicas. Além disso, esse desperdício contribui para o aumento do problema da fome, já que, com a disponibilidade menor, o alimento se torna menos acessível à população em um panorama mundial.

Para minimizar as perdas é necessário o uso de métodos de conservação de alimentos. Os métodos convencionais fazem uso do calor, do frio e do controle de umidade, proporcionando uma inativação enzimática e microbiológica e prolongando consideravelmente a vida útil dos produtos.<sup>4</sup> Entretanto, apesar de diminuir ou retardarem a contaminação por micro-organismos, esses métodos não são efetivos na diminuição do conteúdo de toxinas presentes nos alimentos. Dentre as novas tecnologias de beneficiamento de alimentos

que possuem potencial na descontaminação de toxinas, destaca-se a irradiação. O processo de irradiação consiste na exposição do produto tratado a uma radiação ionizante oriunda de uma fonte específica. Em sua aplicação em alimentos, são alcançados diversos objetivos como a eliminação de micro-organismos patogênicos, insetos e larvas, a inibição do brotamento de tubérculos, o retardamento da maturação de frutas e o aumento da vida de prateleira dos produtos.<sup>5</sup> Para o controle e diminuição do conteúdo de toxinas nos alimentos, o processo de irradiação pode agir basicamente de duas formas: na eliminação dos micro-organismos produtores, o que previne uma recontaminação, e na inativação das toxinas, através da promoção de transformações químicas.

O presente trabalho apresenta um estudo do processo de inativação da micotoxina ocratoxina A com o uso da irradiação gama, através da análise de sistemas-modelo artificialmente contaminados. Foi avaliada a influência da dose aplicada na redução percentual da toxina e feita a caracterização dos produtos radiolíticos formados com o uso de diferentes técnicas espectroscópicas.

### 1.1. Ocratoxinas e a ocratoxina A

Ocratoxinas são micotoxinas produzidas pelos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Quimicamente, são descritas como ácidos orgânicos fracos derivados da di-hidrometil-isocumarina unida por uma ligação peptídica a L- fenilalanina.<sup>6</sup> Há três principais tipos de ocratoxinas geralmente conhecidas como A, B e C (Figura1). Apesar de serem estruturalmente semelhantes elas possuem diferenças importantes que interferem diretamente na sua toxidez. A ocratoxina A (OTA) é clorada, e é cerca de até dez vezes mais tóxica que a ocratoxina B (OTB), segunda na toxicidade, seguida pela ocratoxina C (OTC), ou OTA etílica, com pouco potencial tóxico.<sup>7</sup>

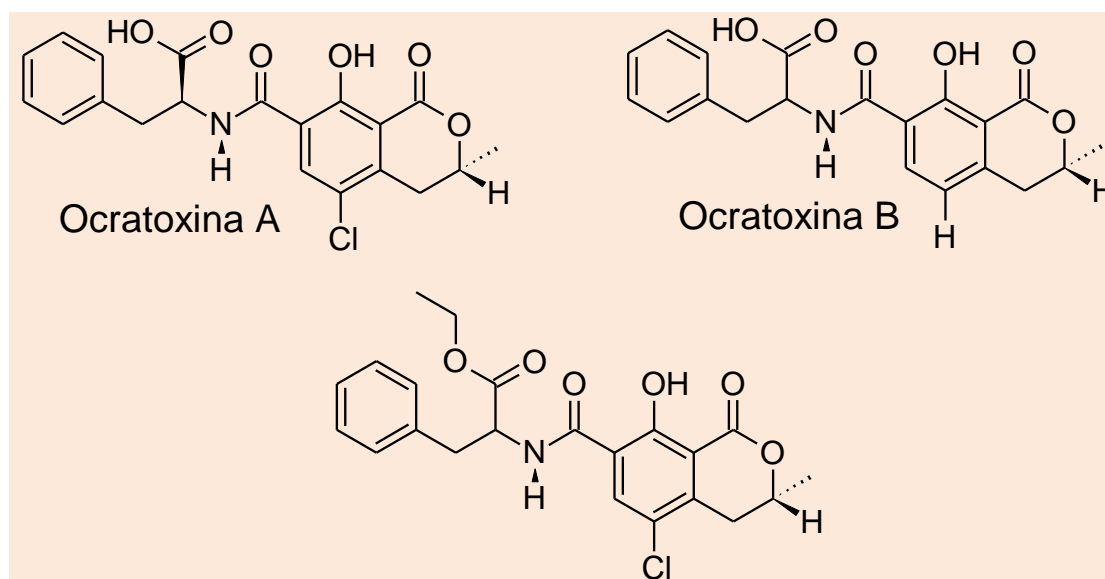


Figura 1. Estruturas das ocratoxinas A, B e C

Um grande número de espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* são produtoras de ocratoxinas. As espécies *Penicillium* são predominantes em regiões temperadas enquanto que as espécies de *Aspergillus* atuam mais significativamente em regiões quentes. As espécies também variam de acordo com a cultura, *P. verrucosum*, por exemplo, é o principal produtor de ocratoxinas em cereais europeus, enquanto *A. carbonarius* é o principal produtor em uvas e *A. ochraceus* é o micro-organismo mais frequentemente encontrado em café.<sup>8</sup>

Por ser a mais tóxica e também presente em maior quantidade como contaminante de alimentos, a OTA tem especial importância. Ela foi primeiramente isolada na África do Sul em 1965, mas só recentemente o interesse por ela tem crescido à medida que aumentam os indícios de que se trata de uma substância cancerígena. Esse fato levou a comunidade europeia a estabelecer a partir do ano de 2001 limites para esta micotoxina.<sup>9</sup> A ocorrência de OTA como contaminante natural de diversos produtos tem sido reportada em todo o mundo. Entre os produtos de origem vegetal estão cereais (trigo, cevada, centeio, arroz, milho e aveia), café e cacau, leguminosas, uvas-passa, alcaçuz e especiarias. Além disso, a OTA

também pode ser encontrada em suco de uva, vinho e cerveja.<sup>10</sup> A OTA possui um longo tempo de residência no corpo de animais contaminados, o que implica que animais que consomem rações com OTA a terão em sua carne, leite e derivados.<sup>11</sup> Como a maioria das micotoxinas, a OTA é termicamente estável sendo, portanto, resistente aos tratamentos térmicos. Como contaminante de alimentos a OTA também permanece sem se degradar mesmo durante longos períodos de armazenamento. Apesar de a OTA pura ser foto sensível, o efeito da luz sobre as toxinas aderidas aos alimentos tem pouca importância. Os níveis de contaminação se mostram similares para amostras estocadas no escuro ou no claro. Esses fatores indicam que é muito difícil a remoção de OTA de alimentos pelos meios convencionais.<sup>12</sup>

## 1.2. A irradiação de alimentos

A irradiação de alimentos é um meio alternativo de conservação que consiste na exposição do alimento a uma fonte de radiação ionizante por um determinado tempo, de modo a obter doses controladas.<sup>13</sup> É um processo físico que pode ser aplicado tanto com o alimento embalado quanto a

granel com finalidades sanitária, fitossanitária e/ou tecnológica.<sup>14</sup> Como fontes de radiação ionizante são autorizados o uso de raios gama (utilização radioisótopos de  $\text{Co}^{60}$  ou  $\text{Cs}^{137}$ ), feixes de elétrons acelerados (energias superiores a 10 MeV), ou raios-X (energia superior a 5 MeV) que transmitem uma certa quantidade de energia por unidade de massa de alimento, a chamada dose de irradiação.<sup>13</sup> Após a conclusão de pesquisas lideradas, principalmente, pelo Exército Norte-Americano pode-se verificar que alimentos irradiados mesmo com altas doses eram seguros e adequados nutricionalmente para o consumo humano.<sup>15</sup> Inicialmente a Organização Mundial de Saúde (WHO), a *Food and Agriculture Organization of the*

*United Nations* (FAO) e a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) estabeleceram como limite uma dose média de até 10 kGy nas aplicações da irradiação em alimentos.<sup>16</sup> Contudo, a continuidade das pesquisas, com doses altas (acima de 10 kGy) revelou que a irradiação pode ser aplicada em qualquer dose sem apresentar riscos para os consumidores, desde que o processo seja adequado para atender a um objetivo tecnológico.<sup>15</sup>

O tratamento com radiação ionizante pode ser usado para alcançar diferentes objetivos que dependem diretamente das doses aplicadas. As principais relações entre dose e efeito em diferentes alimentos estão resumidas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Relações entre doses e efeitos na irradiação de alimentos\*

Doses (kGy)		Efeitos
Reduzidas (até 1kGy)	0,05 - 0,15	a) inibir germinação
	0,15 - 0,75	b) eliminar insetos e parasitas
	0,25 - 1,00	c) retardar processos físicos (maturação)
Médias (1 a 10 kGy)	1,00 - 3,00	a) prolongar o tempo de conservação
	1,00 - 5,00	b) eliminação de micro-organismos
	3,00 - 10,0	c) eliminação de esporos de micro-organismos
Elevadas (1 a 100 kGy)	30,0 - 100,0	a) esterilização industrial (combinada com calor)
	10,0 - 50,0	b) descontaminação de certos aditivos alimentares e ingredientes

\*Fonte: (OMS, 1995)

As interações da radiação ionizante com o substrato tratado resultam na formação de elétrons com alta energia distribuídos de forma aleatória em toda matéria, causando a formação de íons e radicais livres. As transformações desses íons e radicais livres em reações com outros compostos, rearranjos ou mesmo dissociações, causam efeitos sobre a matéria tratada que dependem do tipo de radiação utilizada e seu nível de energia, da composição e estado físico do alimento e ainda da temperatura e das condições atmosféricas. As mudanças químicas em questão podem ocorrer através

dos efeitos radiolíticos primários, causados pela absorção de energia pela matéria, ou através de efeitos secundários, resultantes da alta reatividade dos radicais livres e íons originados por efeitos primários. Os produtos químicos estáveis, resultados das transformações finais são detectados e referidos como produtos radiolíticos.<sup>13</sup>

Contudo, estudos dos efeitos da irradiação gama na qualidade de alimentos indicam pequena redução nutricional, sendo as alterações, em geral, similares às alterações e perdas nutricionais envolvidas em outros tipos de beneficiamento. Além

disso, os benefícios do processo de irradiação como a redução no uso de aditivos, conservantes e inseticidas, prevenção de intoxicações alimentares e maior aproveitamento de alimentos, minimizam as perdas. Os benefícios do processo incentivaram o consumo, a produção e a comercialização de alimentos irradiados em muitos países. Atualmente, mais de 55 países permitem e aprovam a irradiação em cerca de 60 diferentes tipos de alimentos, incluindo condimentos, grãos, frutas, vegetais e carnes desossadas de aves, bovinos e peixes. No Brasil, a ANVISA aprovou a resolução RDC nº 21 de 26 de janeiro de 2001, "Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos", que permite a irradiação de qualquer alimento com a condição de que a dose máxima absorvida seja inferior àquela que comprometa as propriedades funcionais e/ou os atributos sensoriais do alimento e que a dose mínima absorvida seja suficiente para alcançar o objetivo pretendido.<sup>14</sup> Na aplicação da radiação ionizante na redução do conteúdo de micotoxinas em alimentos já foram relatados casos de completa inativação para irradiações com doses entre 15 e 20 kGy.<sup>17</sup> Também foram registrados casos de destruição parcial, porém significativa de micotoxinas. Temcharoen e Thilly<sup>18</sup> relataram que, após o tratamento com doses de 50 a 100 kGy de radiação gama, as aflatoxinas, em farelo de amendoim contaminado perdiam suas propriedades tóxicas e mutagênicas. Doses de irradiação de 1 a 10 kGy removiam de 75 a 100% da toxicidade, mas não a mutagenicidade. Quando soluções padrão contendo aflatoxinas B1 e G1 em concentrações de 25 ng/10 mL e B2 e G2 em 7,5 ng/10 mL, foram irradiadas a 5 kGy, a destruição foi: 95,3% para B1; 90,2% para G1; 23,3% para G2 e 10,3% para B2.<sup>19</sup> Em doses de 10 kGy, Hooshmande Klopfenstein,<sup>20</sup> apontaram uma significativa redução para DON em grãos de soja (33%), zearalenona em milho (25%) e toxina T-2 em trigo (16%). Em contraste com estes estudos, não há relatos de inativação.

Hooshmande Klopfenstein<sup>20</sup> não encontraram redução significativa no

conteúdo de aflatoxina B1 em trigo, milho e soja mesmo com uso de doses superiores a 20 kGy. A conclusão de alguns autores indica que a dose necessária para eliminar totalmente as micotoxinas de determinados alimentos seria tão alta que poderia causar alteração das propriedades organolépticas do produto irradiado a ponto de comprometer significativamente sua qualidade.<sup>21</sup>

As reações químicas que ocorrem durante a irradiação de alimentos contaminados com micotoxinas são afetadas por uma série de parâmetros, entre os quais estão o teor de contaminação e a dose de irradiação. Outro fator de influência são as diferenças entre as matrizes das amostras. Fatores como o teor de água, por exemplo, são significativos já que substratos orgânicos complexos, como as toxinas, são pouco atacados diretamente pelos raios gama. Em vez disso, ocorre um efeito indireto, em que os radicais livres produzidos na radiólise da água reagem com as toxinas.<sup>22</sup> Por esse motivo, o estudo de sistemas modelo aquosos, ou com solventes de comportamento similar a água, frente a ação da radiação ionizante podem auxiliar a elucidar a inativação de toxinas quando sofrerem irradiação em alimentos.

## 2. Material e métodos

Para a preparação dos sistemas modelo usou-se um padrão analítico certificado para análise ambiental de OTA produzida pelo *Aspergillus ochraceus*, com pureza de 99,5%, da marca FLUKA, que foi conservado à -20 °C. As soluções de OTA foram preparadas pela diluição de 1 mg do padrão em 10 mL de água e em 10 mL de metanol. As soluções modelo obtidas foram divididas em *vials* âmbar pequenos (2 mL) identificados para realização de irradiação. Os *vials* foram separados em 4 grupos: controle, 1 kGy, 3 kGy e 5 kGy. O armazenamento das soluções foi feito em refrigeração até a realização dos experimentos. O transporte para o local de irradiação e para os locais de análise foi feito



em caixas térmicas com gelo. No processo de irradiação foi utilizado um Irradiador Gama próprio para pesquisas com fonte de Cs<sup>137</sup> localizado no Centro Tecnológico do Exército (CTEx), em Guaratiba, RJ. O irradiador é do tipo “cavidade blindada” que possui volume útil da ordem de 100 L. A fonte é composta de 28 pastilhas de cloreto de cério 137 com atividade atual de cerca de  $4,5 \times 10^4$  Ci. A taxa de dose produzida é de 1,8 kGy/h com boa uniformidade sendo a razão entre dose máxima e mínima inferior a 20 %.<sup>23</sup> O tempo de exposição foi calculado usando um programa computacional desenvolvido especialmente para o irradiador, com base em um mapeamento dosimétrico.<sup>24</sup> A irradiação das amostras ocorreu a temperatura ambiente e sob ação de ar atmosférico.

Para a quantificação da redução do teor de micotoxinas nos sistemas estudados foi usado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) do Laboratório de Cromatografia Líquida da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos. O CLAE é da marca Waters® composto por módulo de separação (Alliance® 2695) e detector de fluorescência (2475 Waters®), controlado por microcomputador através de software de controle e processamento de dados (Empower®). Nas análises realizadas utilizou-se coluna Waters Nova-Pak C18® (150 x 3,9 mm; 4 µm).

As soluções aquosas e metanólicas irradiadas nas diferentes doses foram injetadas de forma direta sem nenhum tratamento prévio. A fase móvel utilizada foi composta por água ultrapura (60%), acetonitrila (40%) e ácido fosfórico (1%), em um sistema isocrático. Foi injetado 1 µL de amostra com fluxo de 0,6 mL/min. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram respectivamente,  $\lambda_{ex} = 335$  nm e  $\lambda_{em} = 440$  nm.

Para a identificação dos produtos radiolíticos as soluções modelo de OTA foram analisadas por espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (EMARIES) utilizando-se o espectrômetro de Massas Waters® 303 Micromass® Q-Tof

Micro do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O equipamento operou com ionização em modo negativo com adição de base e foi controlado pelo software Masslynx®. As análises de EMARIES foram feitas por injeção direta, usando seringa, com bomba na vazão de 5 µL/min. O gás de nebulização foi ajustado para fluxo de 500 L/h, a 140 °C. O gás do cone teve fluxo de 50 L/h. A temperatura da fonte foi fixada em 100 °C. A voltagem do capilar e a voltagem do cone foram respectivamente 4000 V e entre 15 e 30 V. A taxa de aquisição dos analisadores de massa (Q-Tof) foi fixada em 1,0 s, com 0,4 s de atraso entre as varreduras. Os analitos foram adquiridos usando spray fixo para garantir precisão de massa.

Os produtos radiolíticos das soluções metanólicas e aquosas de OTA são fruto das reações impostas pela radiação ionizante em sua ação tanto nos solventes quanto na toxina. Para a caracterização dos produtos formados foi levada em consideração a massa exata dos compostos obtida na análise de EMARIES aliada as informações da literatura quanto aos produtos de degradação em outros processos de inativação envolvendo trocas energéticas.<sup>25</sup>

Os dados cromatográficos obtidos para cada dose foram submetidos à análise de variância e de Médias (ANOVA/MANOVA) para nível de confiança de 95%. Uma vez calculadas as médias e desvios padrão para os dados obtidos relativos a cada dose aplicada, os valores foram submetidos a comparações para verificar as alterações obtidas frente às doses aplicadas. Além disso, para o cálculo das curvas de calibração usou-se previsão interna de valores também de 95%. Os valores e gráficos foram calculados com ajuda dos softwares STATISTICA® e Microsoft Excel®.

### 3. Resultados e discussão

Para quantificação das amostras de OTA foi feita uma curva de calibração com injeção de 4 diluições de padrão de OTA em metanol

(10, 20, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ), com duplicata para os pontos 100  $\mu\text{g/mL}$  e 20  $\mu\text{g/mL}$  e mais o ponto zero, obtendo-se uma boa linearidade ( $r^2$  próximo de 1) conforme o exposto na Figura 2.

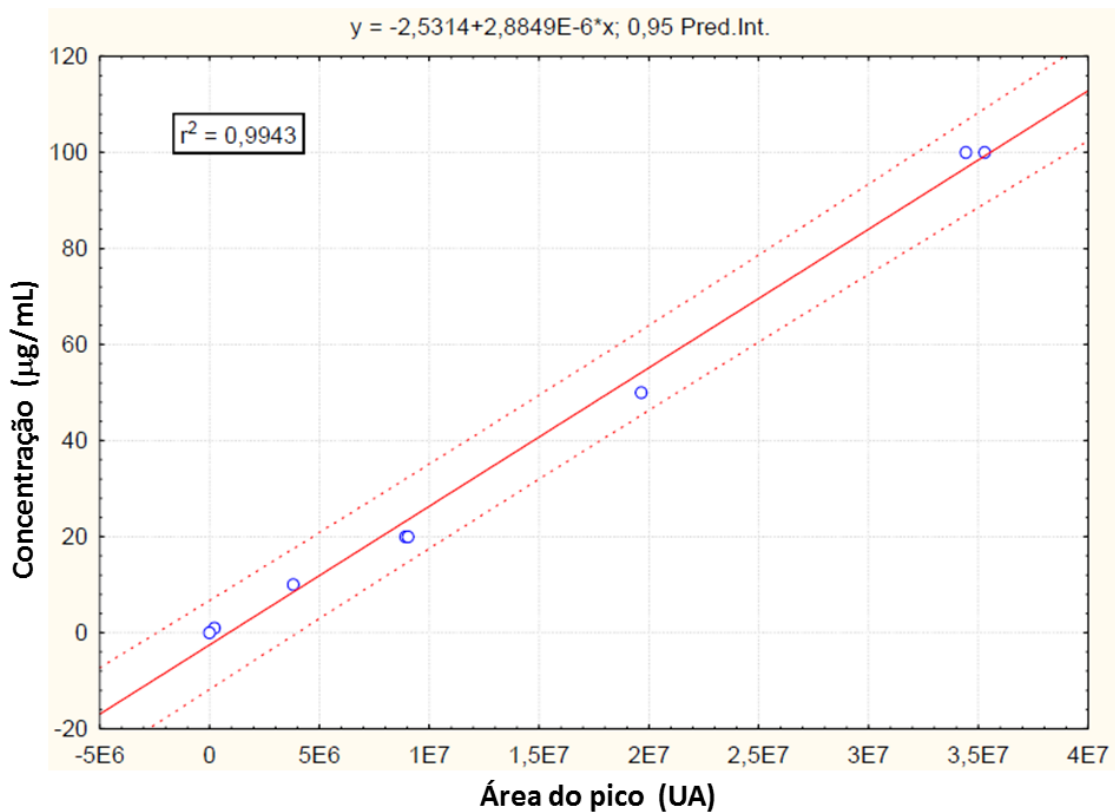


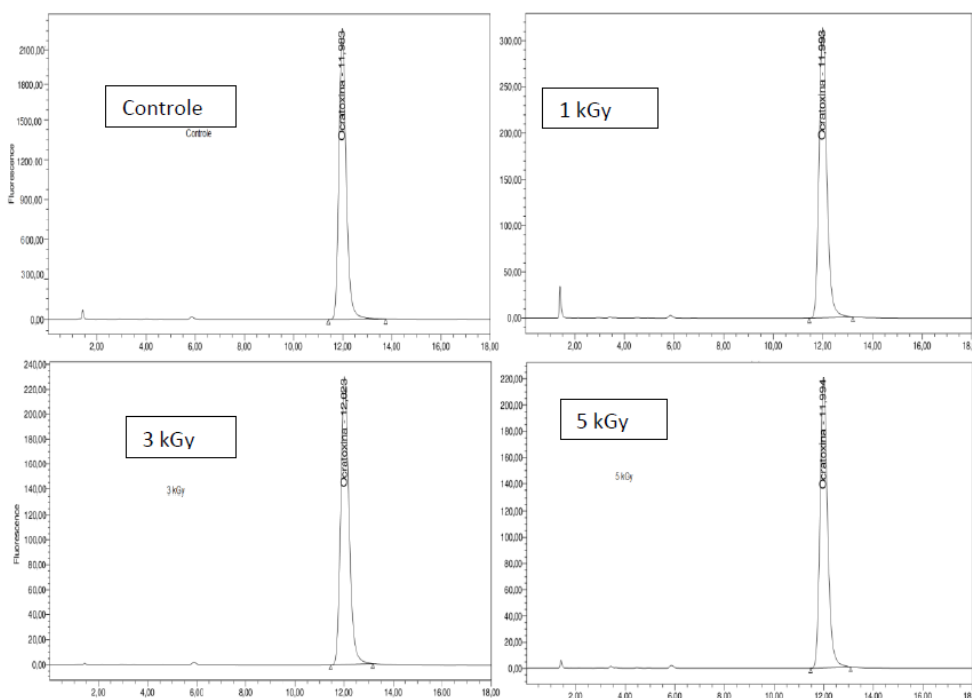
Figura 2. Curva de calibração para a OTA

#### 3.1. Inativação da OTA em soluções metanólicas irradiadas

As soluções controle de OTA em metanol (sem aplicação de radiação ionizante), irradiadas a 1 kGy, 3 kGy e 5 KGy foram analisadas por CLAE com detector de fluorescência para a verificação da redução do conteúdo de OTA frente à aplicação de irradiação. Os diferentes cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 3.

Devido à especificidade do detector somente os compostos fluorescentes na região da análise podem ser detectados. Pode-se observar que em todas as análises obteve-se um cromatograma bem limpo, onde foi relevante apenas o pico da OTA. As análises foram feitas em duplicata e as áreas dos picos cromatográficos no tempo de retenção da OTA obtidas. As médias das áreas de OTA para cada dose de irradiação estão relacionadas na Tabela 2.





**Figura 3.** Cromatogramas das soluções controle de OTA em metanol irradiadas a 1 kGy, 3 kGy e 5 kGy

**Tabela 2.** Área média da OTA nos cromatogramas referentes às diferentes doses aplicadas em soluções metanólicas

	t <sub>r</sub>	Área média do pico cromatográfico (UA)			
		Padrão	1 kGy	3 kGy	5 kGy
OTA	12,01	41323080	10829455	6353730	4687670

De posse das áreas encontradas e utilizando-se a curva de calibração pode-se quantificar a concentração de OTA presente nas soluções controle e irradiadas. A Figura 4 mostra a relação entre as concentrações das soluções e a dose aplicada usando 0,95 de intervalo de confiança.

Percebe-se que a dose de 1 kGy já é efetiva para garantir uma redução

significativa do conteúdo de OTA em soluções metanólicas. Doses de 3 e 5 kGy tem inativação similar, dado que existe intercessão nos intervalos das concentrações possíveis para as mesmas, contudo essas doses promovem maior inativação que a de 1 kGy.

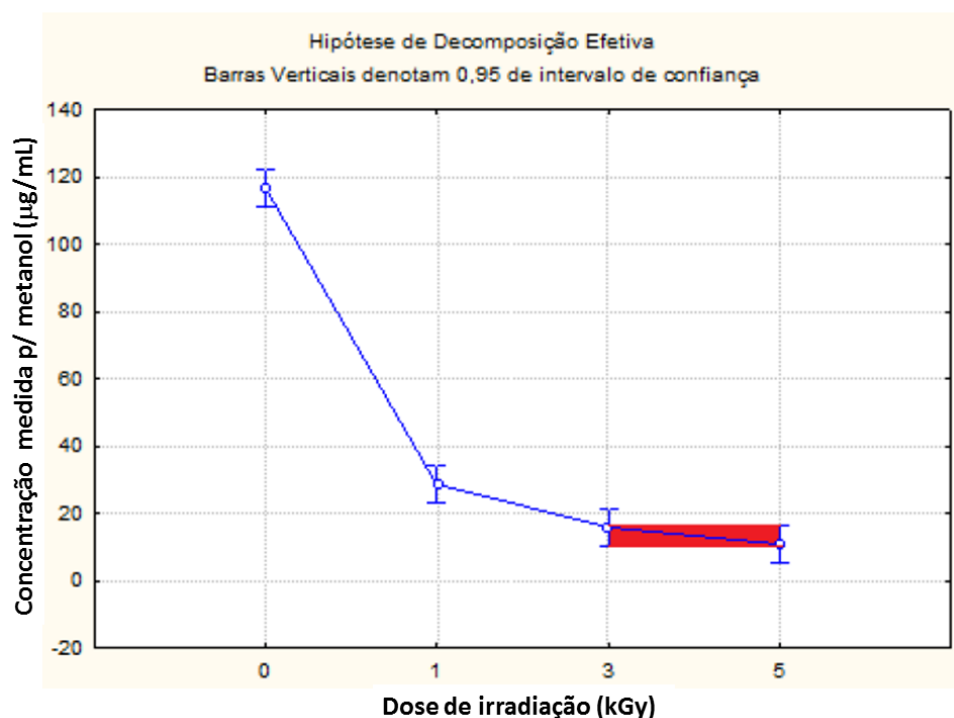


Figura 4. Gráfico da concentração de OTA em metanol *versus* dose de irradiação

### 3.2. Inativação da OTA em soluções aquosas irradiadas

Também foram feitos estudos por CLAE com detector de fluorescência para as soluções aquosas controle e as submetidas à irradiação, obtendo-se os cromatogramas da Figura 5.

Pode-se observar que a inativação da OTA em soluções aquosas é maior do que em soluções metanólicas. Além disso, na solução aquosa alguns dos produtos de degradação obtidos também são fluorescentes nas condições de análise, indicando que as partes cromóforas da molécula original são

mantidas em alguns dos produtos de degradação. Mais uma vez as análises foram feitas em duplicata, sendo calculadas as médias das áreas referentes aos picos de OTA para cada uma das diferentes soluções. O resultado obtido pode ser resumido na Tabela 3.

Com os dados da Tabela 3 e a curva de calibração da Figura 2 pode-se quantificar a concentração de OTA presente nas soluções aquosas submetidas às diferentes doses, chegando-se aos dados da Figura 6 que mostra a relação entre as concentrações das soluções e a dose aplicada usando 0,95 de intervalo de confiança.

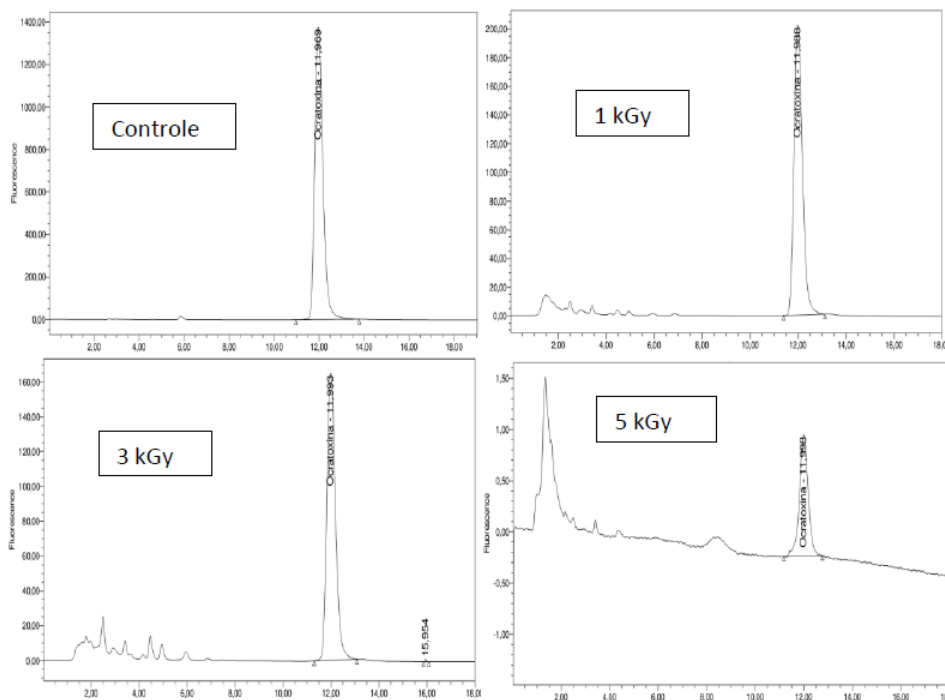


Figura 5. Cromatogramas das soluções controle, 1 kGy, 3 kGy e 5 kGy de OTA em água

Tabela 3. Área média da OTA nos cromatogramas referentes às diferentes doses aplicadas em soluções aquosas

	$t_r$	Área média do pico cromatográfico (UA)			
		Padrão	1 kGy	3 kGy	5 kGy
OTA	11,95	34872808	5976390	4113420	29775

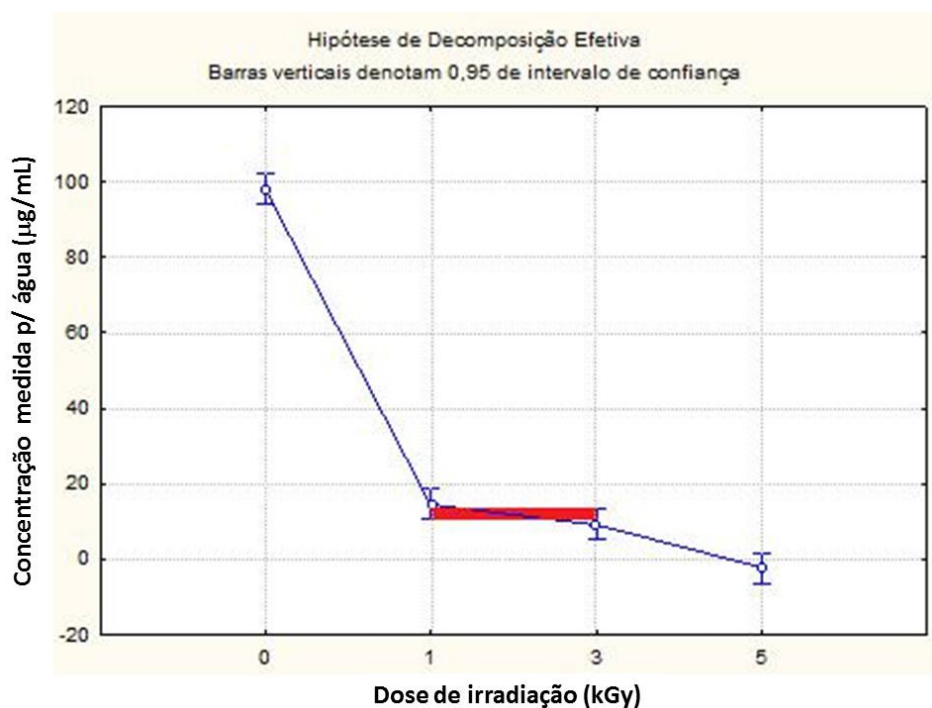
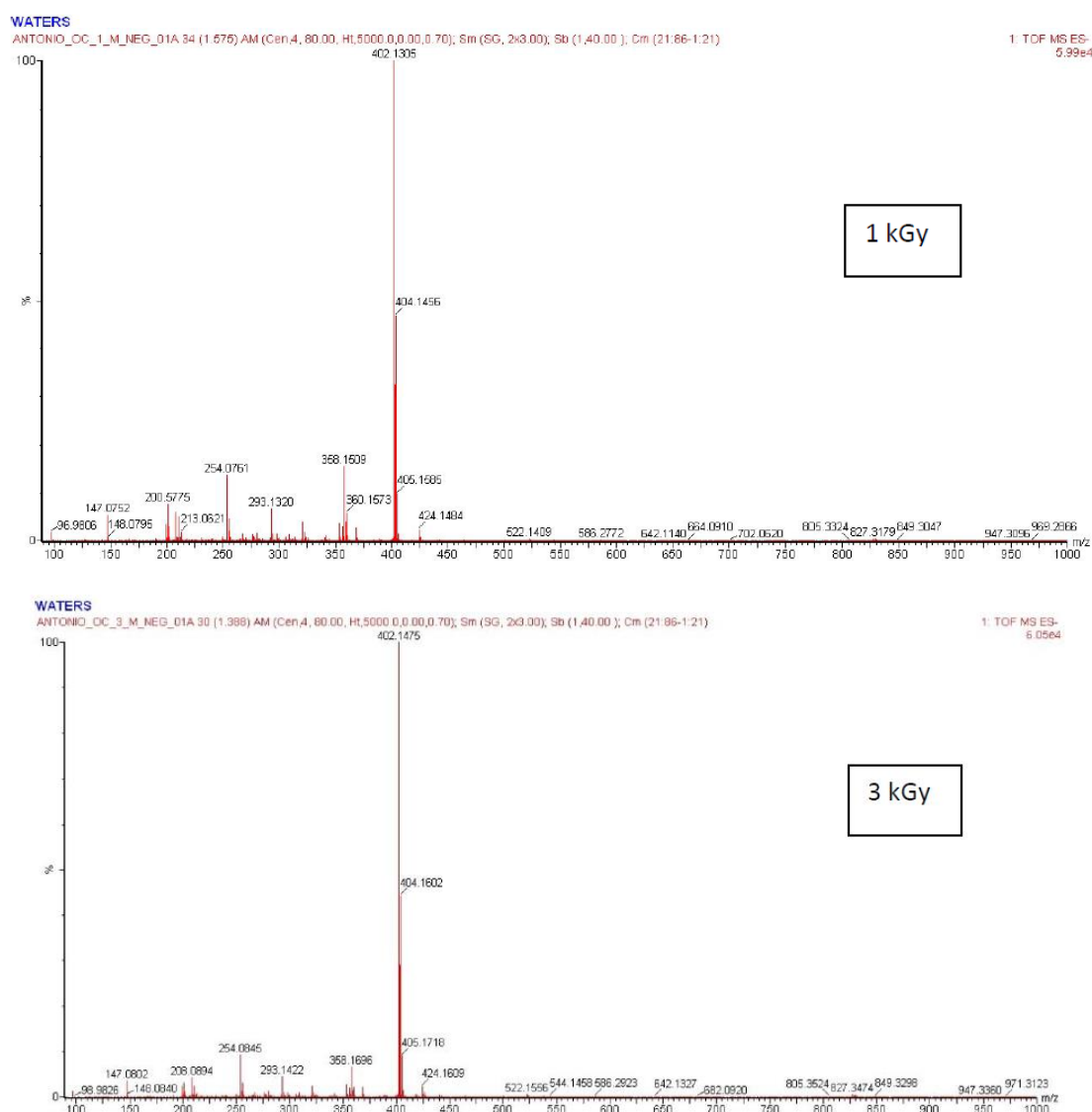


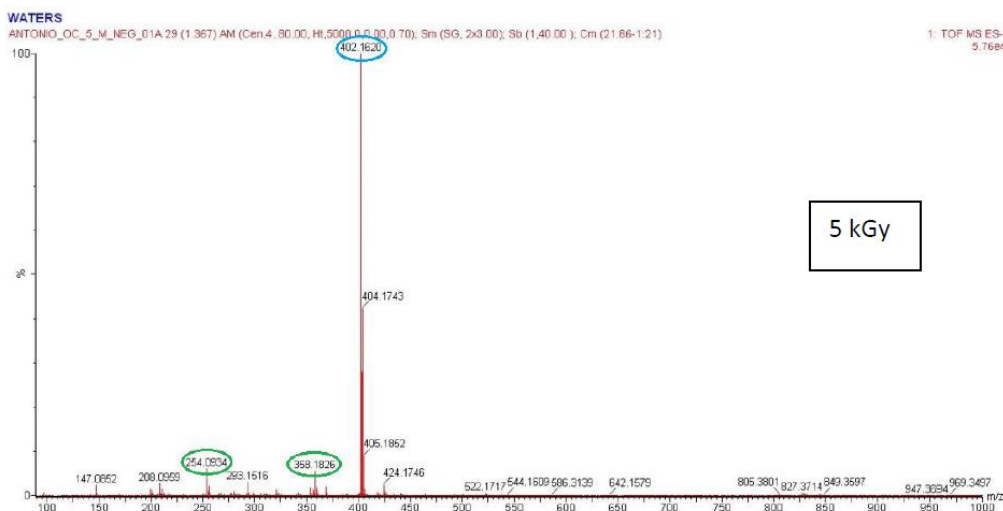
Figura 6. Gráfico da concentração de OTA em água versus dose de irradiação

Pode-se observar que analogamente ao observado para soluções metanólicas, a irradiação a 1 kGy já promove uma redução significativa no conteúdo de OTA nas amostras aquosas. A área em vermelho, no entanto indica que os tratamentos com as doses de 1 kGy e 3 kGy promovem uma inativação similar. A dose de 5 kGy é mais efetiva na irradiação que as demais.

### 3.3. Investigação dos produtos radiolíticos formados

Usou-se também EMARIES em modo negativo, com obtenção de massa exata para os produtos radiolíticos presentes nas soluções metanólicas de ocratoxina submetidas à irradiação. Foram gerados espectros de massas para as amostras submetidas a 1 kGy, 3 kGy e 5 kGy conforme a Figura 7.

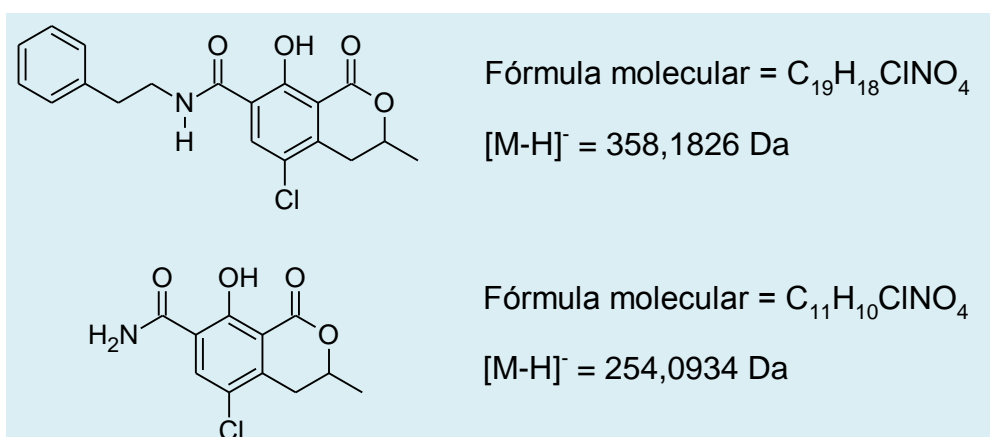




**Figura 7.** Espectros de EMARIES para soluções metanólicas submetidas a 1 kGy, 3 kGy e 5 kGy, respectivamente

Para caracterização dos produtos radiolíticos formados, usou-se o espectro de 5 kGy. O círculo azul marca o íon  $[OTA-H]^-$ , o pico encontra-se bem intenso com relação aos demais mesmo para a dose de 5 kGy, o que reforça que a inativação da OTA em soluções metanólicas não foi completa. Em verde estão os íons com massa exata para os dois principais produtos de degradação observados. Foram levados também em

consideração os estudos de Cramer, Königs and Humpf<sup>25</sup> que propuseram dois produtos de degradação com massa compatível com os íons encontrados para o estudo do efeito do processo de torrefação na inativação de OTA em café. Sendo assim, sugestões para a estrutura dos compostos e a fórmula molecular calculada para as massas indicadas em EMARIES estão na Figura 8.



**Figura 8.** Possíveis radiólitos formados na irradiação da OTA em solução metanólica

Analogamente, usou-se EMARIES em modo negativo para as soluções aquosas submetidas às diferentes doses de irradiação.

Foram gerados os espectros de massas para as amostras submetidas a 1, 3 e 5 kGy apresentados na Figura 9.

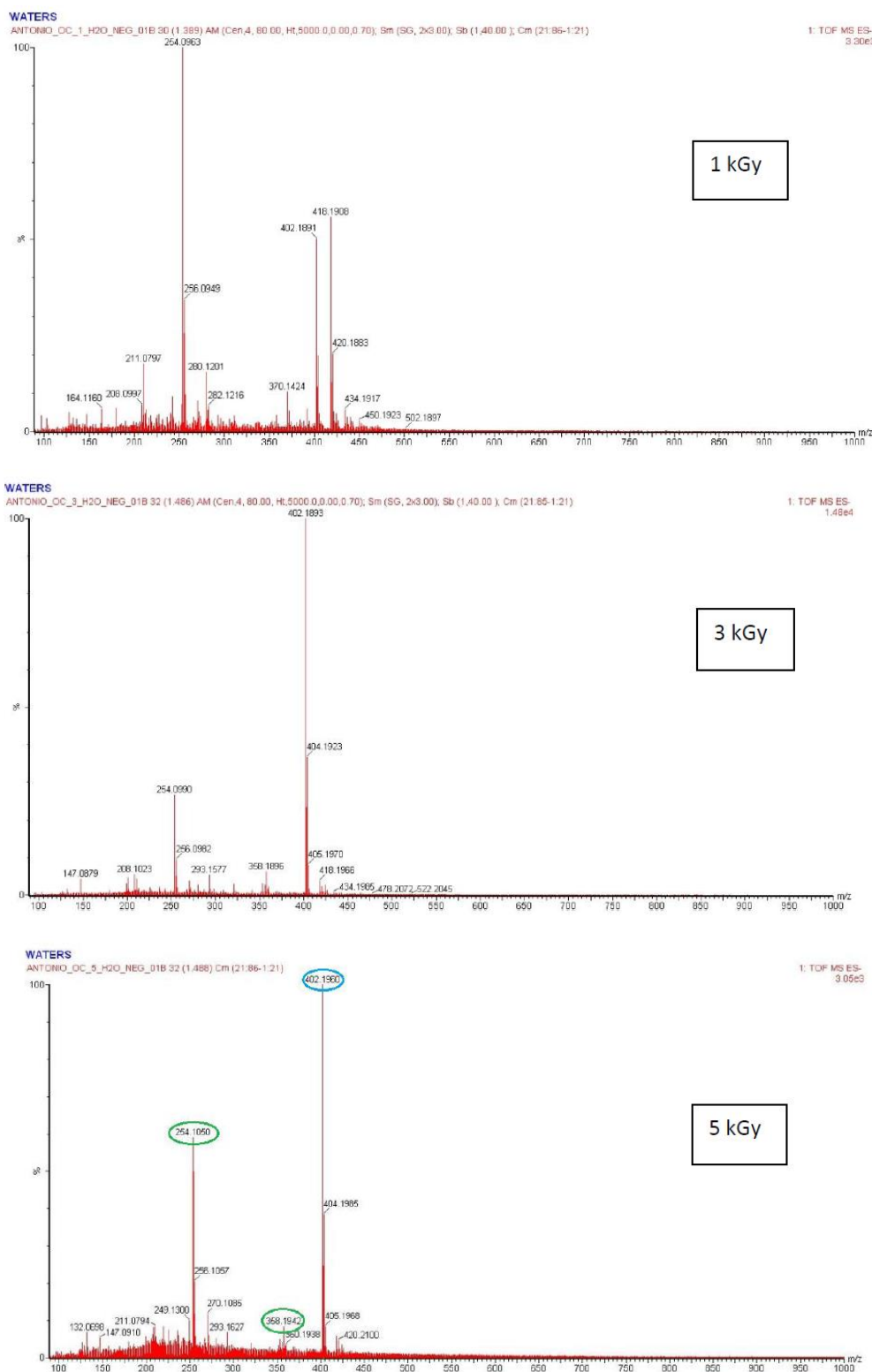


Figura 9. Espectro de EMARIES para solução aquosa de 1, 3 e 5kGy, respectivamente

Em azul está marcado o pico 402 do íon [OTA-H]<sup>-</sup> indicando que a inativação em meio aquoso não é suficiente para eliminar a OTA

por completo mesmo com doses de 5 kGy, em conformidade com as informações obtidas na análise cromatográfica. De forma



análoga, percebe-se que os picos em destaque, referentes aos possíveis produtos de degradação são os mesmos selecionados nas soluções metanólicas, conforme a Figura 8. Os produtos radiolíticos identificados são menos tóxicos que a OTA dado que os mesmos perderam a similaridade de parte da molécula com o aminoácido feniletilamina e acredita-se que uma das principais causas da toxicidade da OTA seja a inibição competitiva da mesma pela fenilalanil-tRNA.<sup>26</sup>

#### 4. Conclusões

Pode-se observar com os resultados expostos pelas análises de cromatografia líquida de alta eficiência e o tratamento estatístico com confiança de 0,95, que a ação da radiação ionizante mesmo na menor dose aplicada (1 kGy) garantiu uma inativação efetiva tanto para soluções modelo aquosas quanto metanólicas. Para soluções metanólicas doses de 3 kGy e 5 kGy tiveram uma ação similar, mas superior a de 1 kGy. Para soluções aquosas a dose de 3 kGy teve inativação similar a de 1 kGy e ambas foram inferiores a de 5 kGy. Nas análises por EMARIES pode-se verificar que os dois picos mais relevantes, com exceção do pico característico da OTA, indicam a formação de produtos radiolíticos através de quebras de ligações, principalmente nas ramificações. Os compostos sugeridos pelas massas exatas encontradas são similares aos produtos de degradação obtidos em outros métodos de tratamento de alimentos como a torrefação. Além disso, como a modificação química ocorreu na parte da OTA referente à feniletilamina, os produtos radiolíticos perderam a similaridade com este aminoácido. Sendo assim podemos inferir que eles não atuarão mais na inibição competitiva da fenilalanil-tRNA, um dos principais fatores da toxidez da OTA. Esses resultados indicam que a ação da radiação ionizante é eficaz na redução da OTA em sistemas-modelo, produzindo compostos menos tóxicos que o original, o que revela que o tratamento é uma alternativa viável

para a redução do conteúdo de toxinas em alimentos. Tratamento esse que pode também ser empregado na eliminação de toxinas usadas como agentes de guerra química/biológica.

#### Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> WHO. WHO Global Strategy for Food safety: safer food for better health. Food Safety Programme 2002, World Health Organization (WHO): Geneva, 2002.
- <sup>2</sup> Kleter, G. A.; Marvin, H. J. P. Indicators of emerging hazards and risks to food safety. *Food and Chemical Toxicology* **2009**, *47*, 1022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>3</sup> CDC. In: *CDC Diagnosis and Management of Foodborne Illnesses - A Primer for Physicians*, CDC: Atlanta, 2001. [[Link](#)]
- <sup>4</sup> Floros, J. D.; In: *Shelf life studies of foods and beverages*. Elsevier Science Publishers: London, 1993.
- <sup>5</sup> Raso, J.; Canovas, G. V. B. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2003**, *43*, 265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>6</sup> O'Brien, E.; Dietrich, D. R. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology* **2005**, *35*, 33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>7</sup> Li, S. Marquardt, R. R.; Frohlich, A. A.; Vitti, T. G.; Crow G. Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1997**, *145*, 82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>8</sup> Schmidt, H.; Ehrmann, M.; Vogel, R. F.; Taniwaki, M. H.; Niessen, L. Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP. *Systematic and Applied Microbiology* **2003**, *26*, 138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>9</sup> Moss, M. O. Mycotoxin review – 1. *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologist* **2002**, *16*, 116. [[CrossRef](#)]
- <sup>10</sup> Nogueira, S.; Oliveira, M. B. P. P. Prevalência de ocratoxina em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. *Alimentação Humana* **2006**, *12*, 69. [[Link](#)]

- <sup>11</sup> Benford, D.; Boyle, C.; Dekant, W.; Fuchs, R.; Gaylor, D. W.; Hard, G.; Mcgregor, D. B. Ochratoxin A. *WHO Food Additives Series 47 – FAO Food and Nutrition* **2001**, 74, 281. [\[Link\]](#)
- <sup>12</sup> Trenk, H. L.; Butz, M. E.; Chu, F. S. Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*. *Applied Microbiology* **1971**, 21, 1032. [\[PubMed\]](#)
- <sup>13</sup> Diehl, J. F.; *Safety of Irradiated Foods*. Marcel Dekker: New York, 1995.
- <sup>14</sup> BRASIL. Resolução RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento para irradiação de alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília, 2001. [\[Link\]](#)
- <sup>15</sup> Diehl, J. F. Food irradiation past, present and future. *Radiation Physics and Chemistry* **2002**, 63, 211. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>16</sup> WHO. *Wholesomeness of Irradiated Food: (TRS 659)*. Organização Mundial da Saúde: Geneva, 1981.
- <sup>17</sup> Refail, M. K. Aziz, N. H., El-Far, F.; Hassan, A. A. Detection of ochratoxin produced by *A. ochraceus* in feed stuffs and its control by gamma radiation. *Applied Radiation and Isotopes* **1996**, 47, 617. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>18</sup> Temcharoen, P.; Thilly, W. G. Removal of aflatoxin B1 toxicity but not mutagenicity by 1 megarad gamma-radiation on peanut meal. *Journal of Food Safety* **1982**, 4, 199. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>19</sup> Mutluer, B.; Erkoc, F. U. Effects of gamma irradiation on aflatoxins. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **1987**, 185, 398. [\[PubMed\]](#)
- <sup>20</sup> Hooshmand, H.; Klopfenstein, C. F. Effects of gamma irradiation on mycotoxin disappearance and amino acid contents of corn, wheat, and soybeans with different moisture contents. *Plant Foods for Human Nutrition* **1995**, 47, 227. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>21</sup> Jalili, M.; Jinap, S.; Noranizan, A. Effect of gamma radiation on reduction of mycotoxins in black pepper. *Food Control* **2010**, 21, 1388. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>22</sup> van Dyck, P. J.; Tobback, P.; Feyes, M.; van de Voorde, H. Sensitivity of aflatoxin B1 to ionizing radiation. *Applied and Environmental Microbiology* **1982**, 43, 1317. [\[Link\]](#)
- <sup>23</sup> Araújo, L. M.; Dissertação de Mestrado em Engenharia Nuclear, Instituto Militar de Engenharia, 2005.
- <sup>24</sup> Vital, H. C.; Vellozo, S. O.; *Anais do VI CGEN*, Rio de Janeiro, Brasil, 1996.
- <sup>25</sup> Cramer, B.; Königs, M.; Humpf, A. U. Identification and *in vitro* cytotoxicity of ochratoxin A degradation products formed during coffee roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, 5673. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>26</sup> Könräd, I.; Röschenthaler, R. Inhibition of phenylalanine tRNA syntetase from *Bacillus subtilis* by ochratoxin A. *FEBS Letters* **1977**, 83, 341. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)