

FARMACOPEIA MERCOSUL: DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS

TENDO EM VISTA: O Tratado de Assunção, o Protocolo de Ouro Preto e as Resoluções Nº 31/11 e 22/14 do Grupo Mercado Comum.

CONSIDERANDO:

Que a Farmacopeia MERCOSUL tem como objetivo estabelecer requisitos mínimos de qualidade e segurança dos insumos para a saúde, especialmente dos medicamentos, apoiando as ações de regulação sanitária e promovendo o desenvolvimento técnico, científico e tecnológico regional.

Que as especificações farmacopeicas estabelecem, por meio de monografias, requisitos mínimos para o controle de segurança e qualidade dos insumos, especialidades farmacêuticas, plantas medicinais e derivados produzidos ou utilizados nos Estados Partes.

Que as especificações farmacopeicas são utilizadas como parâmetro para as ações de vigilância sanitária, incluindo o registro de medicamentos, inspeções e análises laboratoriais.

Que a Farmacopeia MERCOSUL e a produção de padrões próprios de qualidade favorecem o desenvolvimento científico e tecnológico dos Estados Partes, contribuindo para a diminuição da dependência de fornecedores estrangeiros e promovendo a indústria regional.

Que a Farmacopeia MERCOSUL deve ser primordialmente sanitária, com foco na saúde pública, e apresentar uma metodologia analítica acessível aos Estados Partes, buscando seu reconhecimento e respeitabilidade internacional.

Que o diálogo regulatório e a integração entre os Estados Partes promovem o acesso da população a medicamentos com maior qualidade e segurança.

Que o Acordo Nº 08/11 da Reunião de Ministros de Saúde do MERCOSUL constitui um marco de referência para a Farmacopeia MERCOSUL.

**O GRUPO MERCADO COMUM
RESOLVE:**

Art. 1º - Aprovar, no marco do estabelecido na Resolução GMC Nº 22/14, a monografia "Farmacopeia MERCOSUL: DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS", que consta como Anexo e faz parte da presente Resolução.

Art. 2º - Os Estados Partes indicarão, no âmbito do SGT Nº 11, os organismos nacionais competentes para a implementação da presente Resolução.

Art. 3º - Esta Resolução deverá ser incorporada ao ordenamento jurídico dos Estados Partes antes de...

XLIII SGT N° 11 – Brasília, 10/IV/15.

ANEXO
MÉTODO GERAL PARA AFLATOXINAS

Aflatoxinas são muito tóxicas. Manusear com extremo cuidado.
Aflatoxinas são fotossensíveis. Proteger da luz as soluções de padrões e amostras.

Método I

Proceder conforme descrito em Cromatografia em camada delgada em Métodos Gerais

Determinação de aflatoxinas por **cromatografia em camada delgada** (CCD).
Este método pode ser usado para detectar possível presença de aflatoxinas em Drogas Vegetais e derivados, sempre que a monografia não recomendar outro método específico.

Fase Estacionária: silica-gel com 0,25 mm de espessura

Eliminado: placas com camada de sílica

Fase Móvel: clorofórmio:acetona 9:1 (v/v)

Eliminado: CHCl₃

Revelador: UV 360-365 nm; solução de ácido sulfúrico 30% (v/v).

Eliminado: /

Eliminado:

Solução tampão fosfato pH 7,4: Transferir 1,0 g de cloreto de potássio, 1,0 g de fosfato monobásico de potássio, 5,8 g de fosfato dibásico de sódio anidro e 40,0 g de cloreto de sódio em um balão volumétrico de 5 litros. Adicionar cerca de 4,5 litros de água e dissolver. Ajustar a pH 7,4 com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Completar o volume com água e aferir novamente o pH.

Solução mãe de aflatoxinas: Dissolver o conteúdo do padrão de aflatoxina em uma mistura de benzeno e acetonitrila (98:2) (v/v). Diluir quantitativamente e em etapas com o mesmo solvente até obtenção de soluções com concentração de 8 a 10 µg por ml de cada aflatoxina. Agitar vigorosamente a solução por 1 minuto. Determinar a absorvância de cada solução a 350 nm em espectrofotômetro apropriado, empregando uma mistura de benzeno e acetonitrila 98:02 (v/v) como branco. Calcular a concentração da respectiva aflatoxina, em mg/ml, usando a seguinte fórmula:

Eliminado:

Eliminado: frasco de cada

$$1.000 AP/\epsilon$$

onde:

P = peso molecular

ϵ = absorvância molar no solvente indicado da aflatoxina correspondente.

A = absorvância da solução

Esses valores estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1.

Aflatoxina	P (peso	ϵ (absorvidade
------------	-----------	-------------------------

	molecular)	molar)
B1	312	19.800
B2	314	20.900
G1	328	17.100
G2	330	18.200

Solução padrão: Transferir para frascos com tampa alíquotas de 3 ml de cada uma das soluções mãe de aflatoxinas anteriormente preparadas, adicionar quantidades suficientes de benzeno/acetonitrila (98:2) para obter soluções com 1 µg/ml de B1, 0,5 µg/ml de B2, 1 µg/ml de G1 e 0,5 µg/ml de G2.

Eliminado: de 3 ml

Eliminado: ,

Eliminado: 0

Eliminado: preparação

Eliminado: de

Preparação da amostra.

Coluna: Usar coluna cromatográfica de imunoafinidade (IAC) com anticorpos monoclonais específicos para aflatoxinas.

Eliminado: de imunoafinidade:

Solvente de extração: Dissolver 5 g de cloreto de sódio em 200 ml de metanol:água (70:30) (v/v).

Procedimento:

Transferir 25 g de amostra, exatamente pesados, previamente moída e tamizada com tamiz no. 20, para um erlenmeyer de 500 ml. Adicionar quantidade suficiente de solvente de extração para embeber toda a amostra. Agitar em agitador mecânico por 1 hora ou por 5 minutos em liquidificador a alta velocidade. Filtrar e recolher o filtrado em erlenmeyer de 250 ml. Transferir 80,0 ml do extrato, exatamente medidos, para um erlenmeyer de 250 ml, agregar 160 ml de solução tampão de fosfato pH 7,4. Agitar e filtrar em membrana filtrante de porosidade entre 0,8 – 1,6 µm. Aplicar 120 ml do filtrado (equivalente a 5 g de amostra) na coluna cromatográfica de imunoafinidade, mantendo uma vazão de 1-2 gotas por segundo, tento a precaução de que a coluna não seque. Lavar a coluna com 20 ml de solução tampão e secar passando ar através da coluna com auxílio de uma seringa. Descartar o líquido de lavagem. Eluir lentamente as aflatoxinas adsorvidas na coluna, por ação da gravidade, com 2 ml de metanol. Recolhido todo o eluato em um balão de 25 ml com um pequeno reservatório no fundo, previamente pesado com precisão. Secar usando evaporador rotatório a 60° C. Pesar para obter a massa do resíduo. Dissolver o resíduo em 100 µl de uma mistura de benzeno:acetonitrila (98:2) (v/v).

Eliminado: ¶
Solvente de extração:
Dissolver 5 g de cloreto de sódio em 200 ml de metanol/água 70:30 (v/v), ¶
¶
Solução de amostra:

Eliminado: exatamente pesados,

Eliminado:

Eliminado: IAC

Eliminado: evitando

Eliminado: /

Eliminado: 0

Solução fortificada com solução padrão: Misturar 10 µl da solução da amostra com 4 µl da solução padrão.

Análise de aflatoxinas.

Procedimento: Aplicar em separado 10 µl da solução amostra, 2, 4 e 6 µl da solução padrão e 10 µl da solução fortificada. Deixar secas as aplicações e desenvolver os cromatogramas até que a frente do solvente percorra aproximadamente 11 cm. Retirar a placa da câmara para marcar a frente do solvente. Secar a placa ao ar, protegida da luz. Examinar a placa sob luz UV a λ=360 nm: as aflatoxinas B1 e B2 aparecem como manchas azuis e G1 e G2 como manchas verdes. Os valores de Rf são aproximadamente: 0,4 para G2, 0,5 para G1,

Eliminado: de

0,6 para B2 e 0,7 para B1. Para confirmar, pulverizar a placa com revelador. Deixar secar ao abrigo da luz e observar sob luz UV a $\lambda=360$ nm: as quatro aflatoxinas são observadas como manchas amarelas. Calcular a concentração de cada aflatoxina, em $\mu\text{g}/\text{kg}$, na porção da amostra tomada, pela fórmula:

Con formato: Sin Resaltar

$$(PCV)/(Sm)$$

Onde:

P = volume, em μl , da solução padrão;

C = concentração de aflatoxina na solução padrão ($G1$ e $B1$, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ e $G2$ e $B2$, $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$);

Eliminado: e G1

Eliminado: e G2

V = volume, em μl , da solução final do resíduo;

S = volume de solução de amostra;

m = peso do resíduo em g.

Critérios de aceitação: Ausência de manchas nas aplicações de solução teste nas zonas onde são observadas as manchas da solução padrão de aflatoxinas. Se alguma mancha for observada na solução amostra, verificar a correspondência com alguma mancha fluorescente da solução de aflatoxinas para identificar esta aflatoxina. A intensidade da mancha de aflatoxina, se presente na solução amostra, quando comparada com a intensidade da mancha correspondente das aflatoxinas na soluções padrão, fornecerá a concentração aproximada das aflatoxinas na solução amostra. Os limites máximos aceitos são menor que, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para AFB1 e menor que, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para a soma de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, exceto quando outros valores forem recomendados em monografia específica.

Eliminado: a

Eliminado: presente

Eliminado: de

Eliminado: aflatoxinas

Eliminado: de

Eliminado: ppb

Eliminado: ppb

Método II

Determinação de aflatoxinas por **cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência** (CLAE-FLU), recomendado para Drogas Vegetais e derivados do ginseng, gengibre, unha-de-gato e frutos de sene, com a ressalva de que para outras matrizes o método deverá ser testado, eventualmente adaptado e validado.

Solução estoque primária de aflatoxinas: Dissolver AFB1 R em acetoneitrila:tolueno (2:98) para obter uma solução a 10 µg/ml. Para determinar a concentração exata de AFB1 na solução estoque, registrar a curva de absorção entre 330-370 nm em cela de quartzo. Calcular a concentração de AFB1, em micrograma por mililitro, usando a seguinte fórmula:

Eliminado: e

$$C = (A.M.100)/\epsilon.l$$

Sendo:

A = absorvância determinada no máximo da curva de absorção;

M = massa molar de AFB1 (312 g/mol);

ϵ = absorvidade molar de AFB1 na mistura acetoneitrila/tolueno (1930 m²/mol);

l = comprimento do caminho óptico na cela (1 cm).

Solução estoque secundária de AFB1: Preparar solução secundária contendo 100 ng/ml de AFB1 diluindo a solução estoque primária com acetoneitrila/tolueno 02:98. Envolver o frasco da solução com folha de alumínio e aguardar o conteúdo atingir a temperatura ambiente. Se a solução foi estocada por longo período (p.ex., 1 mês), pese o frasco e registre a massa antes de cada uso da solução.

Soluções padrão de aflatoxinas: Transferir os volumes de solução estoque secundária de aflatoxinas indicados na tabela 2 para balões volumétricos separados. Aplicar gás nitrogênio nessas soluções, à temperatura ambiente, até evaporação do solvente. Em cada balão, adicionar 75 ml de metanol, aguardar dissolução total e completar o volume até 250 ml com água.

Tabela 2 – Soluções de aflatoxina B1 para preparação da curva analítica.

Solução Padrão	Volume de solução estoque secundária (µl)	Concentração final de AFB1 na solução padrão (µl/ml)
1	125	0,05
2	250	0,1
3	500	0,2
4	750	0,3
5	1000	0,4

Curva analítica: Preparar a curva analítica usando as soluções padrão de AFB1 1 a 5, que abrangem um faixa de concentração de 1-8 µg/kg de AFB1 na droga vegetal. Verificar se a curva tem linearidade adequada. Se o teor de AFB1 na amostra a ser examinada estiver fora da faixa de calibração, a solução teste deverá ser diluída até que o teor de aflatoxinas fique adequado para a curva de calibração estabelecida.

Coluna: C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm.

Fases Móveis

A (para a derivação pós-coluna com reator fotoquímico ou brometo de piridínio):
acetonitrila/metanol/água (2:3:6 v/v/v);

Eliminado: i

Eliminado: um

B (para derivação pós-coluna com brometo derivado eletroquimicamente): adicionar 0,12 g de brometo de potássio e 350 ml de ácido nítrico diluído R1 por litro de fase móvel A.

Vazão: 1,0 ml/min.

Detecção: Detector de fluorescência (filtro de excitação a 360 nm e filtro de emissão a 420 nm). Se usar detector com comprimentos de ondas ajustáveis, usar 365 nm para excitação e 435 nm para emissão.

Derivação pós-coluna com brometo-perbrometo de piridínio (PBPB):

- bomba sem pulso;
- T com volume morto **igual a zero**;
- tubo de reação de teflon (PTFE) (l = 0,45 m, di = 0,5 mm);
- fase móvel A;
- reagente de pós-derivação: dissolver 50 mg de PBPB em 1000 ml de água (proteger da luz e usar até em 4 dias);
- vazão do reagente de derivação: 0,4 ml/min.

Derivação pós-coluna com reator fotoquímico (PHRED):

- reator com lâmpada de bulbo de mercúrio de baixa pressão (mínimo de 8 W) a 254 nm;
- placa de suporte polida;
- bobina de reação: tubo de PTFE firmemente trançado em torno do bulbo de UV, l = 25 cm e di = 0,25 mm, volume morto nominal de 1,25 ml;
- tempo de exposição = 2 min;
- fase móvel A.

Derivação pós-coluna com bromo gerado eletroquimicamente (KOBRA):

- KOBRA-cell: cela eletroquímica que gera uma forma reativa de bromo para derivação de aflatoxinas, resultando em intensificação da fluorescência;
- fonte de corrente **contínua** em série com a KOBRA-cell, que forneça corrente constante de cerca de 100 µA;
- tubo de reação de PTFE, l = 0,12 cm e di = 0,25 mm;
- fase móvel B;

Eliminado: continua

Coluna de imunoafinidade (IAC): Usar uma coluna de imunoafinidade contendo anticorpos contra aflatoxina B1, com capacidade de não menos do que 100 ng de AFB1 e que deve dar recuperação de pelo menos 80% quando uma solução de 5 ng de AFB1 em uma mistura de metanol:água (12,5:87,5) é aplicada. Condicionar a IAC à temperatura ambiente.

Eliminado: /

Procedimento:

A 5 g de material vegetal seco e pulverizado adicionar 100 ml de água/metanol 30:70 e extrair por sonicação por 30 minutos. Filtrar através de papel de filtro pregueado. Pipetar 10 ml do filtrado claro para um erlenmeyer de 150 ml. Adicionar 70 ml de água. Passar 40 ml através da coluna de imunoafinidade (IAC) a uma vazão de 3 ml/min (não exceder 5 ml/min). Lavar a coluna com 2 volumes de 10 ml de água, a uma vazão que não exceda 5 ml/min. Secar a IAC usando leve vácuo por 5-10 segundos ou passar ar com uma seringa, por 10 segundos. Aplicar 0,5 ml de metanol no topo da coluna e deixar eluir por gravidade. Coletar o eluato em um balão volumétrico de 5 ml. Depois de 1 min, aplicar mais 0,5 ml de metanol. Depois de 1 min, aplicar uma terceira porção de metanol. Coletar a maioria do solvente aplicado passando ar comprido no topo da coluna ou usando leve vácuo. Diluir para 5 ml com água e agitar bem. Se a solução estiver clara, pode ser usada diretamente. Caso contrário, passar a solução através de uma unidade de filtrante antes da análise. Use uma unidade de filtro descartável (p.ex., filtro de politetrafluoretileno com poros de 0,45 µm) que não causem perda de aflatoxinas por retenção.

Eliminado: eparação da amostra

Eliminado: em

Eliminado: frasco cônico

Eliminado: auxílio de

Eliminado: passe

Volume de injeção: 500 µl.

Ordem de eluição: AFG2, AFG1, AFB2 e AFB1.

Cálculo: Determinar a equação da curva analítica ($y = ax + b$) com a concentração de AFB1 (ng/ml) no eixo x e o sinal (S) no eixo y. A concentração de AFB1 na solução medida é igual a

$$(S-b)/a.$$

Calcule o teor de AFB1 na droga vegetal, em ng/g, usando a seguinte expressão:

$$(V_1 \cdot V_2 \cdot C)/(m \cdot V_i)$$

Onde:

m = massa de droga vegetal, em g;

V1 = volume do solvente usado na extração, em ml;

V_i = alíquota usada na IAC, em ml;

V2 = volume final da solução depois da eluição da IAC e diluição, em ml;

C = concentração de AFB1 na solução teste, em ng/ml.

A presença de AFB1 pode ser confirmada registrando-se o cromatograma sem derivação pós-coluna, que resulta em grande redução (> 10 x) na resposta devida a AFB1.