

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

INSTITUTO DE QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINAS EM CERVEJAS, POR INJEÇÃO
DIRETA, EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA.**

ELIANE MARIA RAVASI STEFANO SIMIONATO

**TESE DE DOUTORADO
2005**

ELIANE MARIA RAVASI STEFANO SIMIONATO

**DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINAS EM CERVEJAS, POR INJEÇÃO DIRETA,
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.**

Tese apresentada ao Instituto de Química de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutor, no programa de Pós-Graduação em Química, na Área de Concentração: Química Analítica.

ORIENTADOR: PROF. DR. MANOEL LIMA DE MENEZES

**ARARAQUARA
2005**

COMISSÃO EXAMINADORA

**Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes (Orientador)
Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru**

**Profa. Dra. Célia Maria de Sylos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP - Araraquara**

**Pesquisadora Dra. Myrna Sabino
Instituto Adolfo Lutz**

**Profa. Dra. Maria Lúcia Ribeiro
Instituto de Química – UNESP - Araraquara**

**Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP**

CURRICULUM VITAE

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato

Sexo: feminino

Filiação: Agenor Stéfano e Leontina Ravasi Stéfano

Nascimento: 27/05/1962 - Descalvado/SP - Brasil

Estado civil: casada

Carteira de Identidade: 8.378.616-8 SSP - SP - 22/07/1989

CPF: 08291466874

Endereço residencial: Rua Gutemberg de Campos 1-39
Jardim Marambá - Bauru
17030620, SP - Brasil

Telefone residencial: 14 - 32305921

E-mail residencial: ssimionato@terra.com.br

Endereço profissional: Universidade do Sagrado Coração
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Rua Irmã Armanda 10-50
Jardim Brasil - Bauru
17011-160, SP – Brasil

Telefone profissional: 14 - 32357072

E-mail profissional: esimionato@usc.br

2.FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1. Graduação

Curso: Farmácia e Bioquímica Industrial.

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP,
Araraquara.

Período: 1980 - 1984

2.2. Pós-Graduação

2.2.1. Mestrado em Alimentos e Nutrição

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade
Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara.

Título: Ocorrência de aflatoxinas e ocratoxina A em amostras de arroz e
efeito do tratamento térmico.

Orientador: Profa. Dra. Célia Maria de Sylos

Período: 1998 - 2001

2.2.2. Doutorado em Química

Áreas de concentração: Química Analítica

Instituição: Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara.

Título: Desenvolvimento de um método analítico para a determinação de ocratoxinas em cervejas, por injeção direta, empregando CLAE.

Orientador: Prof Dr. Manoel Lima de Menezes

Período: 2002 - 2005

3. Atuação Profissional

3.1 Instituição: Universidade do Sagrado Coração - USC

Desde: 1998 até o presente momento

- **Cargo :** Professora – Auxiliar II – 40 horas

Atividades:

Disciplinas na Graduação: Bromatologia, Biotecnologia Industrial, Análise de Alimentos e Controle de Qualidade I e II.

Supervisão de Estágio: Estágio Supervisionado em Laboratório de Análise de Alimentos.

Coordenação: Laboratório de Análise de Alimentos da Fundação Veritas – USC.

- **Grupo de Pesquisa: Biologia Aplicada á Agricultura**, participam pesquisadores da USC/UNESP/APTA e SEBRAE Bauru. Trabalho de pesquisa em andamento: **Avaliação das características físico-químicas da polpa do maracujá AFRUVEC.**
- **Cargo :** 2^a. Secretária do Conselho Curador da Fundação Veritas – USC
- **Representação:** Representante da Universidade do Sagrado Coração no Conselho Municipal de Saúde de Bauru, 2003-2005.

3.2. LPC Indústrias Alimentícias SA – DANONE/FRESCARINI

Período: 1985 - 1994

Cargo: Chefe de Controle de Qualidade

Período: 1994 - 1995

Cargo: Chefe de Garantia de Qualidade

Período: 1995 - 1998

Cargo: Chefe de Produção

3.3. Indústria Alimentícia Carlos de Brito Sa - PEIXE

Período: 1984 - 1985

Cargo: Microbiologista

4. Idiomas

Entende: Inglês (Bem), Espanhol (Razoável), Português (Bem)

Fala: Inglês (Razoavelmente), Espanhol (Pouco), Português (Bem)

Lê: Inglês (Bem) , Espanhol (Bem) , Português (Bem)

Escreve: Inglês (Razoavelmente), Espanhol (Pouco), Português (Bem)

5. Informática

Bom conhecimento do ambiente Windows, com ênfase em excell.

6. Formação complementar

6.1. Estágio

1984 (jan a set) – Microbiologia de Alimentos – Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP.

6.2 Cursos de Curta Duração

1987 - Curso de curta duração em **Controle Microbiológico em Indústria de Alimentos**. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, FTPTAT, Campinas, Brasil.

1990 - Curso de curta duração em **Círculos de Controle de Qualidade**. Associação Anhanguera de Controle da Qualidade, AACQ, Brasil.

1992 - Curso de curta duração em **Avaliação da Qualidade Física da Farinha de Trigo**. Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, Campinas, Brasil

2004 - Curso de curta duração em **Cromatografia em Fase Líquida - HPLC**. Varian Indústria e Comércio Ltda, VARIAN, Brasil.

7. Participação em Congressos

- **XI Encontro Nacional de Micotoxinas**, Fundação de Estudos Agrários Luís de Queiroz – ESALQ, Piracicaba, 2004.
- **II Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Aararaquara, 1999.
- **XX Consórcio das Instituições Brasileiras de Alimentação e Nutrição**, Universidade do Sagrado Coração, Bauru, 1999.

- **III Simpósio de Engenharia de Produção**, Faculdade de Ciências – UNESP, Bauru, 1996.

8. Trabalhos apresentados em Congresso - Painéis

8.1 SIMIONATO, E. M. R. S., FURLANETO, M. D., CREPALDI, P. F. **Comparison between the Soxhlet method and alternative methods for total lipid dosage in grated parmesan cheese samples.** In: V Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, 2004, São Carlos.

8.2. SIMIONATO, E. M. R. S., FURLANETO, M. D., CREPALDI, P. F. **Physico-chemical analysis of whole milk UHT commercialized in the Bauru region, São Paulo, Brazil.** In: V Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages, 2004, São Carlos.

8.4. SIMIONATO, E. M. R. S., CREPALDI, P. F., FURLANETO, M. D. **Comparação entre o método soxhlet e métodos alternativos para a dosagem de lipídio total em amostras de queijo parmesão ralado.** In: 51ª Jornada farmacêutica - UNESP, 2004, Araraquara. **Prêmio Alimentos e Nutrição - 2º lugar.**

8.4. SIMIONATO, E. M. R. S., COLOMBO, A. L., GARZIN, C. C., ALMEIDA, D. V. **Estudo comparativo do crescimento microbiológico do interior da borracha auto-cicatrizante de equipo para soluções parenterais e duplo lúmen após administração de medicamentos endovenosos.** In: 56º Congresso Brasileiro de Enfermagem, 2004, Gramado.

8.5. SIMIONATO, E. M. R. S., CREPALDI, P. F. **Análise Físico-química do leite UAT comercializado na região de Bauru, São Paulo, Brasil.** In: 50a. Jornada Farmacêutica da UNESP/Araraquara, 2003, Araraquara. **Prêmio José Eduardo Dutra de Oliveira - 1º lugar.**

8.6. SIMIONATO, E. M. R. S., CASTILHO, H. S. **Ocratoxina A - (OTA) - toxicologia e ocorrência em alimentos - Levantamento bibliográfico** In: XIII Jornada Científica de Toxicologia - CEATOX, 2003, Botucatu.

8.7. SIMIONATO, E. M. R. S., SYLOS, C. M. **Efeito do cozimento sobre os teores de aflatoxina B₁ e ocratoxina A em amostras de arroz.** In: 4ª Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, 2001, Campinas.

8.8. SIMIONATO, E. M. R. S., ASTRAY, R. M., SYLOS, C. M. **Methodology adequation for the determination of aflatoxin and ochratoxin A in rice.** In: Simpósio de la Seccion de America Latina y el caribe de AOAC International, 2001, Uruguai.

8.9. SIMIONATO, E. M. R. S., ASTRAY, R. M., SYLOS, C. M. **Ocorrência de Aflatoxinas e Ocartoxina A em amostras de arroz.** In: XII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000, Fortaleza.

8.10. SIMIONATO, E. M. R. S., OLIVEIRA, O. M.M.F., BELDA, M. C. R. **Alimentação intermitente e nível de peroxidase plasmática em ratos.** In: XXX Jornada Farmacêutica Prof. Luis Marcos da Fonseca, 1983, Araraquara.

9. Artigos completos publicados em periódicos

9.1. SIMIONATO, E. M. R. S., SYLOS, C. M. Effect of cooking on the level of aflatoxin B1 and ochratoxin A in rice. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.7, n.2, p.167 - 171, 2004.

9.2. SIMIONATO, E. M. R. S., ASTRAY, R. M., SYLOS, C. M. Ocorrência de aflatoxinas e ocratoxina A em arroz. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.2, n.62, p.123 - 130, 2003.

9.3. SIMIONATO, E. M. R. S., UBOLDI EIROA, M. N. U., FALCÃO, D. P., CULLEN, B. T. Pesquisa de Yersínia em Queijo de minas frescal comercializado na região de Campinas. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.271 - 283, 1986.

10. Avaliação de Projeto de Iniciação Científica

- **PIBIC/CNPQ:** A utilização do Fator de Correção na preparação magistral de Macrólidos modifica a Concentração inibitória Mínima em linhagens de *S.aureus*? – USC 2003.

11. Palestras Ministradas

- **Programa 5S**, Fundação Veritas, para todos os funcionários, abril 2005.
- **Contaminantes em Alimentos**, Faculdade de Ciências – UNESP – Bauru, para o curso de graduação em Química, maio 2005.
- **Programa 5S**, Instituto de Química – UNESP - Araraquara, 2004.
- **Atuação do profissional Farmacêutico nas suas diferentes modalidades**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Araraquara, 1998.
- **Boas Práticas de Fabricação**, Refrigerante 15 – Jaú, 2002.

- **Boas Práticas de Fabricação**, Laticínio Tavoraro, 2000.
- **Tecnologia de Massas Frescas**, na Jornada Farmacêutica – UNESP Araraquara, 1997.
- **Ferramentas da Qualidade**, na Instituição Toledo de Ensino, para o curso de Administração de Empresas, 1996.
- **Sistema APPCC aplicado ao processamento de Massas Frescas**, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 1994.
- **Problemática do mercado de Trabalho para Farmacêuticos recém-formados**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, 1985.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas, minha gratidão a todas e de forma especial:

Ao Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes, pela orientação e apoio dedicados a este trabalho, bem como pela sua acolhida e amizade.

À Universidade do Sagrado Coração:

- Departamento de Ciências Biológicas e Profissões da Saúde, na pessoa da Sra. Ana Daher pela boa vontade na adequação dos meus horários de aula neste período.
- Biblioteca CORJESU pelo fornecimento de muitos dos artigos científicos aqui citados.

À FAPESP pela aprovação do Projeto, a qual possibilitou a compra dos equipamentos utilizados neste trabalho.

À minha companheira de bancada **Profa. Ms. Márcia Zeferino**, pela companhia e sugestões.

DEDICATÓRIA

A uma dupla formidável: Luís e Ane.

RESUMO

As investigações sobre a incidência de micotoxinas em alimentos são de suma importância para que esforços possam ser concentrados na prevenção, controle e na destoxificação dos produtos susceptíveis a esse tipo de contaminação. Dentre as micotoxinas existentes, a ocratoxina A, produzida por *Aspergillus ochraceus*, e *Penicillium verrucosum* é nefrotóxica, e o seu alvo secundário é o fígado. Esta micotoxina, que também apresenta atividade fortemente teratogênica em animais de laboratórios, tem sido encontrada em baixas concentrações em amostras de milho, soja, trigo, cevada, arroz, sorgo e amendoim. O brasileiro consome em média 46,8 litros de cerveja por ano, e esta tem como matéria-prima principal cevada, além de coadjuvantes como o milho e o arroz. Considerando-se que vários métodos analíticos, relatados na literatura, para a determinação das ocratoxinas A e B em diferentes tipos de amostras, sobretudo em bebidas, requerem o pré-tratamento da amostra (*clean up*) ou o emprego de colunas de imunoafinidade, foi desenvolvido um novo método analítico, por injeção direta da amostra de cerveja, empregando cromatografia líquida de alta eficiência, com uma coluna cromatográfica aniônica-ISRP (*Internal Surface Reverse Phase*). Assim foi possível efetuar a extração e pré-concentração *on line* da ocratoxina A (OTA) e ocratoxina B (OTB) presentes em amostras reais de cervejas. Os resultados obtidos indicaram que o método proposto é eficiente para a detecção e quantificação de OTA e OTB em cervejas, pois conforme seus indicadores de mérito apresentou uma recuperação média de 85,9% para OTA e 85,0% para OTB; precisão estimada pelo coeficiente de variação médio de 7,79% e 7,17%; e limites de detecção (LD) de 0,15 e 0,35 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para OTA e OTB, e os limites de quantificação (LQ) 0,25 e 0,60 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. A avaliação da ocorrência destas ocratoxinas em cervejas comercializadas em Bauru e região mostraram que 7,1 % das amostras de cervejas nacionais, num total de 42 amostras, e 11,0 % das cervejas importadas num total de 09 amostras, estavam contaminadas com OTA, os níveis detectados foram 0,32 e 0,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Quanto a OTB, esta foi encontrada em 28,6 % das amostras de cervejas nacionais, em níveis menores que o LQ e 0,78 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A OTB não foi detectada nas amostras de cervejas importadas.

Palavras-chaves: ocratoxinas, cerveja, cromatografia, ISRP.

ABSTRACT

The investigations on the incidence of mycotoxins in food are crucial in order that the efforts can be concentrated on prevention, control, and on the de-toxication of the products susceptible to this kind of contamination. Among the existent mycotoxins, the ochratoxins A, produced by *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* and *Penicillium nomis*, is nephrotoxic, and its secondary target is the liver. This mycotoxin, which also presents an activity strongly teratogenic in laboratory animals, has been found, in low concentrations, in corn, soy, wheat, barley, rice, sorghum, and peanuts samples. Brazilian people have an average ingestion of 4.8 liters of beer yearly, and beer, has as the main raw material, barley, besides corn and rice. Considering that various analytical methods reported in the literature for determining the ochratoxins A and B, in different types of samples, particularly in alcoholic beverages, require the pre-treatment [clean-up] of the sample or the immunoaffinity columns, this present study proposed the development of a new analytic method, by direct injection of the beer sample, employing the high efficiency liquid chromatography, with an anionic chromatographic column ISRP (*Internal Surface Reverse Phase*), which possibilitate to carry out the extraction and pre-concentration *on line* of the ochratoxin A (OTA) and Ochratoxin B (OTB) present in real beer samples, without the presence of interferent peaks. This study results indicated that the proposed method is effective for detection and quantification OTA and OTB in beers, as according to the merit indicators, showed a mean recovering of 85.9% for OTA and 85.0% for OTB; precision estimated by the mean variation method of 7.79% and 7.17%, and limits of detection (LD) of the 0.15 and 0.35 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for OTA and OTB, and limits of quantification (LQ) 0.25 e 0.60 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectively. The survey of these ochratoxins occurrence in beers marketed in Bauru, and region (Sao Paulo State, Brazil), showed that 7.1% of the ochratoxins of national beers and 11.0% of the imported beers were contaminated by OTA, being the level detected 0,32 e 0,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$. As to OTB, it was found in 28.6% of national beers samples, in 0.78 $\mu\text{g.L}^{-1}$. OTB was not detected in imported beers samples.

Key words: ochratoxins, beer, chromatography, ISRP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Estrutura química da ocratoxina A, ocratoxina B e ocratoxina C (SCUSSEL, 1998).....	22
Figura 02 - Cerveja no Brasil: Produção e Consumo (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA, 2005).....	28
Figura 03 - Processo de fabricação da cerveja (HOUGH, 1985). Tabela 03 – OTA em cervejas - Metodologia analítica e ocorrência.....	30
Figura 04 - Mecanismo cromatográfico das fases RAM.....	41
Figura 05 - Classificação das fases RAM (BOSS e RUDOLPHI, 1997).....	43
Figura 06 - Partícula da fase estacionária ISRP, (MENEZES e FÉLIX, 1996).....	52
Figura 07 - Esquema representativo do preparo da amostra analítica.....	56
Figura 08 - Esquema representativo da síntese da 3-cloropropilsilano sílica gel.....	58
Figura 09 - Esquema representativo da síntese da fase estacionária cloreto de N,N-propiltriethylaminônio silano	59
Figura 10 - Esquema utilizado para empacotar as colunas cromatográficas (GARCIA, 2001).....	60
Figura 11 - Fases do preparo da coluna ISRP-HSA (C ₁₈ e aniônica).....	62
Figura 12 - Cromatógrafo de alta eficiência Varian, Modelo Pro Star Polaris.....	64
Figura 13 - Representação do <i>column switching system</i> , para transferências das ocratoxinas A e B para a coluna analítica.....	65
Figura 14 - Estabilização da camada de HSA imobilizada em fases hidrofóbicas	69
Figura 15 - Cromatogramas obtidos para a avaliação do comprimento de onda para excitação das ocratoxinas A e B.....	72
Figura 16 - Espectro de absorção na região do infravermelho do reagente trietilamina	75
Figura 17 - Espectro de absorção na região do infravermelho da fase estacionária N,N-propiltriethylaminônio silano.....	76
Figura 18 - Cromatograma obtido após a injeção de 1000µL de uma amostra	

de cerveja fortificada com soluções-padrão de ocratoxinas A e B.....	79
Figura 19 - Cromatograma obtido com matriz isenta e com matriz adicionada dos padrões. Diluição da cerveja 1:5.....	81
Figura 20 - Curvas analítica obtida após a injeção de 1000µL da solução-padrão da OTA.....	83
Figura 21 - Curvas analítica obtida após a injeção de 1000µL da solução-padrão da OTB.....	83
Figura 22 - Curva analítica obtida após a injeção de 1000µL de cerveja fortificada com OTA.....	89
Figura 23 - Curva analítica obtida após a injeção de 1000µL de cerveja fortificada com OTB.....	90
Figura 24 - Gráfico do Fator de Resposta para a cerveja fortificada com OTB.....	91
Figura 25 - Cromatograma e Co-cromatograma par uma amostra de cerveja que contém OTA 0,8 µg/L ⁻¹	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Limites máximos ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) permitidos para OTA , segundo a legislação em vários países (FONSECA,2005).....	25
Tabela 02 - Composição química da cerveja de baixa fermentação: Tipo Pilsen (CORTACERO-RAMIREZ et al. 2003).....	26
Tabela 03 - OTA em cervejas - Metodologia analítica e ocorrência.....	31
Tabela 04 - Classificação das fases RAM desenvolvidas.....	44
Tabela 05 - Número de pratos teóricos (N), resolução (Rs), fator de capacidade (k) e assimetria de pico ($As_{0,1}$) das ocratoxinas, empregando coluna cromatográfica ISRP-HSA.....	70
Tabela 06 - Valores percentuais obtidas na análise elementar das amostras das fases estacionárias.....	73
Tabela 07 - Número de pratos teóricos (N), resolução (Rs), fator de capacidade (k) e assimetria de pico ($As_{0,1}$) das ocratoxinas, empregando a coluna cromatográfica C_{18}	79
Tabela 08 - Parâmetros das curvas analíticas para OTA e OTB, injetando-se 1000 μL de padrão.....	82
Tabela 09 - Recuperação de OTA em amostras de Cerveja Pilsen.....	86
Tabela 10 - Recuperação de OTB em amostras de Cerveja Pilsen.....	87
Tabela 11 - Parâmetros da curva analítica para OTA, injetando-se 1000 μL de cerveja fortificada e posteriormente diluída.....	88
Tabela 12 - Parâmetros da curva analítica para OTB, injetando-se 1000 μL de cerveja fortificada e posteriormente diluída.....	89
Tabela 13 - Limite de Detecção e Limite de Quantificação para OTA e OTB....	91
Tabela 14 - Determinação de OTA e OTB em amostras de cervejas nacionais.....	92
Tabela 15 Determinação de OTA e OTB em amostras de cerveja importadas.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

As_{0,1} - Fator de Assimetria
CCFAC - Codex Comittee on Food Additives and Contaminants
CLAE - Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
CV - Coeficiente de variação
DI - Diâmetro Interno
DL₅₀ - Dose Letal para a metade dos organismos expostos ao agente tóxico
DNA - Ácido desoxi-ribonucleico
ELISA - Imunoensaio Enzimático
FAO - Food and Agriculture Organization
HSA - Albumina de Soro Humano
IARC - Agência Internacional de Pesquisa Sobre Câncer
ISRP - Internal Surface Reversed Phase
JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee On Food Addites
K - Fator de retenção
LD - Limite de Detecção
LQ - Limite de Quantificação
MIB - Sistema Controlador Eletrônico
N - Número de Pratos Teóricos
OTA - Ocratoxina A
OTB - Ocratoxina B
OTC - Ocratoxina C
r - Coeficiente de Correlação
RAM - Restricted-Access Media
Rs - Resolução
SD - Desvio Padrão
SINDICERV - Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja
SPE - Extração em Fase Sólida
tr -Tempo de Retenção
UV - Ultra-violeta
WHO - World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - graus Celsius
μg.L⁻¹ - micrograma por litro
μg.mL⁻¹ - micrograma por mililitro
μm - micrômetro
Å - angstrom
m/v - massa por volume
mg - miligrama
min - minuto
mL - mililitro
mm - milímetro
mol.L⁻¹ – mol por litro
ng.g⁻¹ - nanograma por grama
nm - nanômetros
pg.mL⁻¹ - picograma por mililitro
v/v - volume por volume
 \bar{X} - média aritmética

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Ocratoxinas	21
1.2. Cervejas	25
1.2.1. Composição	26
1.2.2. Mercado.....	27
1.2.3. Ocratoxinas em cervejas	29
1.3. Considerações sobre os métodos analíticos para a determinação das ocratoxinas em cervejas.	37
1.4. Desenvolvimento de diferentes colunas cromatográficas, empregadas em procedimentos de extração on line, para determinações de analitos presentes em amostras de matrizes complexas.....	39
1.4.1. Aplicações da coluna cromatográfica ISRP (Internal Surface Reversed Phase) em determinações de analitos presentes em amostras de matrizes complexas	50
2. OBJETIVOS.....	53
3. MATERIAS E MÉTODOS	54
3.1. Materiais	54
3.1.1. Reagentes e Padrões	54
3.1.2. Amostras de cervejas.....	55
3.2. Métodos	57
3.2.1. Preparo da colunas C18- ISRP	57
3.2.2. Coluna aniônica-ISRP.....	57
3.2.3. Imobilização da albumina de soro humano in situ sobre a superfície da fase estacionária Si-C ₁₈ e da fase estacionária cloreto de N,N-propiltriethylamônio silano.....	61
3.2.4. Otimização Cromatográfica.....	63
3.2.5. Validação da metodologia proposta.....	66

3.2.6. Tratamento dos resíduos.....	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1. Coluna ISRP – C₁₈ - HSA	68
4.1.1. Protocolo de avaliação da coluna cromatográfica ISRP- C18-HSA	68
4.1.2. Avaliação da coluna ISRP – C18 - HSA com amostras de cerveja	72
4.2. Coluna ISRP – aniônica - HSA	73
4.2.1. Caracterização das fases estacionárias:	73
4.2.2. Imobilização da HSA na coluna aniônica.....	77
4.2.3. Otimização Cromatográfica.....	77
4.2.3.1. Avaliação da coluna cromatográfica analítica C ₁₈	78
4.3. Validação da Metodologia Proposta	80
4.3.1. Seletividade do método	81
4.3.2. Avaliação da Linearidade do Detector.....	81
4.3.3. Avaliação da Recuperação do Método	84
4.3.4. Linearidade do Método	88
4.3.5. Limite de Detecção e Limite de Quantificação do Método	91
4.4. Análise de Amostras Reais	92
5. CONCLUSÃO	95
6. REFERÊNCIAS.....	96

1. INTRODUÇÃO

Certos fungos, freqüentemente encontrados em grãos, têm a capacidade de produzir metabólitos secundários capazes de causar alterações tóxicas, mutagênicas, teratogênicas e/ou carcinogênicas em animais e humanos. Estas substâncias químicas são denominadas micotoxinas, sua produção está associada à temperatura e umidade da região onde o cereal é cultivado e/ou armazenado.

Os diferentes fungos produtores de micotoxinas são encontrados em todas as regiões do mundo e podem crescer em uma grande variedade de substratos e sob várias condições de umidade, pH e temperatura. Assim, os alimentos estão sujeitos à invasão por fungos e contaminação por micotoxinas no campo, durante e após colheita, no processamento, no transporte e na estocagem, quando não são empregadas técnicas adequadas de manejo.

As investigações sobre a incidência de micotoxinas em alimentos e rações são de suma importância para que esforços possam ser concentrados na prevenção, no controle da contaminação ou na destoxificação dos produtos susceptíveis a esse tipo de contaminação. Neste sentido e com vistas ao conhecimento de micotoxinas em alimentos, estudos visando aprimorar a metodologia para sua detecção e quantificação são sem dúvida urgentes e necessários.

Além de demonstrar o desempenho do método, os levantamentos da incidência de micotoxinas apontam os alimentos de maior risco e retiram a suspeita sobre outros. Esse tipo de trabalho é muito importante nos países em desenvolvimento uma vez que os efeitos negativos das micotoxinas são mais acentuados numa população com estado nutricional inadequado. Ocorre freqüentemente na literatura a generalização, não

comprovada, de que os alimentos nestes países são altamente contaminados, colocando-os em desvantagem na disputa do mercado mundial.

1.1. Ocratoxinas

Os fungos produtores de ocratoxina A (OTA) são os do gênero *Aspergillus*, que predominam em clima tropical e subtropical, e o *Penicillium* que predominam em clima temperado, como no Canadá, Noruega, Dinamarca e Suíça. O *Aspergillus ochraceus* e o *Penicillium verrucosum* são os principais produtores (MARTH, 1992).

Vários tipos de ocratoxinas são produzidas, sendo as mais importantes a A, B e C, sendo que a ocratoxina A é a mais tóxica. Todas são constituídas por uma β -fenilamina ligada a uma isocumarina por ligação amida, A OTA - $C_{20}H_{18}ClNO_6$, apresenta um átomo de cloro responsável pela sua toxicidade. O ponto de fusão é de $169^{\circ}C$, possui fluorescência verde em meio ácido e azul em meio alcalino (STEYN, 1984). A Figura 1 apresenta as estruturas químicas das principais ocratoxinas.

A Ocratoxina B (OTB) - $C_{20}H_{19}NO_6$, possui ponto de fusão $221^{\circ}C$ e fluorescência verde azulada. A Ocratoxina C (OTC) - $C_{22}H_{22}ClNO_6$ é um etil éter da OTA, muito menos tóxica que a OTA, possuindo fluorescência verde.

A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC), classifica a OTA como sendo uma substância do Grupo 2B, ou seja, um agente possivelmente cancerígeno para o homem (OCHRATOXIN A, 2005).

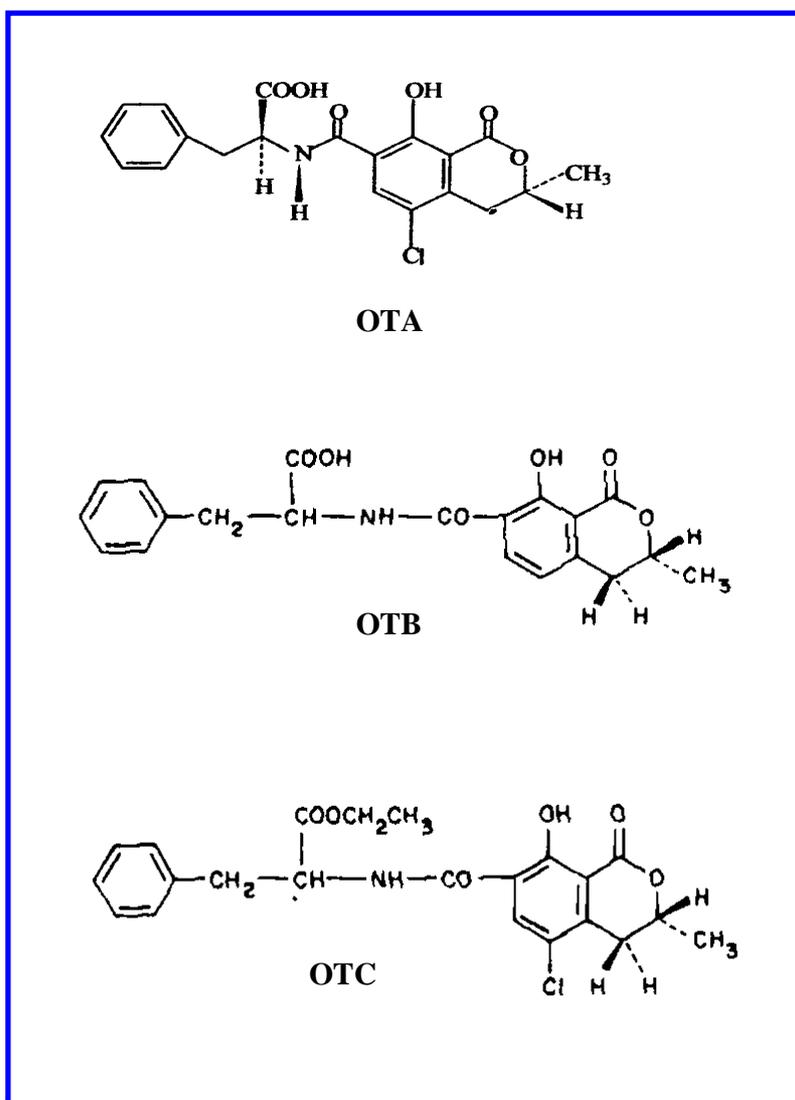


Figura 01 – Estrutura química da ocratoxina A, ocratoxina B e ocratoxina C (SCUSSEL, 1998).

A OTA é uma micotoxina nefrotóxica e o seu alvo secundário é o fígado. Esta micotoxina, que também apresenta atividade fortemente teratogênica em animais de laboratórios, tem sido encontrada em baixas concentrações em amostras de milho, soja, trigo, cevada, arroz, sorgo e amendoim (SIMIONATO, 2001).

A ocratoxina A (OTA) em ração animal pode ser transferida para os tecidos dos animais que as consomem. Isto tem ocorrido na Dinamarca onde a OTA tem sido encontrada em bacon proveniente de suínos que tenham consumido ração contaminada com OTA.

Não surpreendem então, os numerosos estudos mostrando a ocorrência de ocratoxina A em soro sanguíneo humano, em leite materno e em rins humanos. Em amostras de origem humana, cerca de 50 a 100% destas se encontram contaminadas com OTA em concentrações na ordem de $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Parece portanto se tratar de um risco para a saúde humana. (PETZINGER e ZIEGLER, 2000).

A OTA é carcinogênica, genotóxica, teratogênica, imunotóxica e nefrotóxica. Causa danos na molécula de DNA, inibição da biossíntese protéica e da gliconeogênese, peroxidação lipídica, inibição da fosforilação oxidativa na mitocôndria, além de inibição da coagulação sanguínea (OCHRATOXIN A, 2005).

STOEV, 1998, mostra evidências que a OTA seja o agente causal da Nefropatia Endêmica dos Bálcãs (Bulgária, ex-Yugoslávia e Romênia) - caracterizada por uma desordem renal crônica, de origem etiológica desconhecida - devido ao nível elevado de OTA encontrado nos alimentos daquela região e no sangue das pessoas que apresentam a doença, a qual é freqüentemente fatal.

Para pássaros, mamíferos e peixes, ela é fortemente tóxica, com DL_{50} de 5-30 mg.Kg^{-1} , enquanto que para ratos e bovinos a DL_{50} é de 20 mg.kg^{-1} . A OTA apresenta atividade fortemente teratogênica em ratos e camundongos. Em camundongos, doses de $40\mu\text{g.kg}^{-1}$ produziram adenomas renais e hepáticos em 30% do grupo amostral. Não há indícios de mutagenicidade, (SCUSSEL, 1998).

O Comitê FAO/WHO (Food and Agriculture Organization e World Health Organization) de Experts em Aditivos Alimentares (JECFA), após avaliar os efeitos tóxicos da OTA, propôs um limite máximo tolerável para ingestão semanal de $0,1\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 2005).

O Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC) órgão da FAO/WHO, em sua 30ª reunião em março de 1998, recomendou que o limite máximo de OTA seja estabelecido em $5\mu\text{g.kg}^{-1}$ para cereais e produtos derivados de cereais para consumo direto pelo homem (CODEX COMMITTEE FOOD ADDITIVES CONTAMINANTS, 2005).

Vários países já possuem legislação que estabelecem o limite máximo de OTA em alimentos e rações animais (Tabela 1). A legislação brasileira e a legislação do MERCOSUL ainda não estabelecem limite máximo para a presença de OTA nos alimentos (FONSECA, 2005).

São vários os alimentos que têm apresentado OTA, dentre eles alguns que fazem parte do consumo alimentar diário do brasileiro, como arroz, feijão, café, milho, cevada, trigo e vinho (SOARES e AMAYA, 1989; VAN EGMOND e SPEIJERS (1994), STUDER-ROHR et al., 1995; FURLONG et al., 1999; VISCONTI, PASCALE e CENTOZA, 1999).

Tabela 01 – Limites máximos ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) permitidos para OTA , segundo a legislação em vários países (FONSECA,2005).

País	Produtos	Limite estabelecido ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Dinamarca	Cereais e derivados	5
	Rins de suínos	25
Estados Unidos	Alimentos infantis	1
	Cereais	5
França	Cereais	5
Grécia	Café cru	20
Itália	Café cru	8
	Café torrado	4
	Cacau e derivados	0,5
	Carne de porco e derivados	1
	Cereais e derivados	3
	Cerveja	0,2
Israel	Cereais, legumes e derivados	50
	Ração	300
República Theca	Todos os alimentos	20
	Alimentos para crianças	5
	Alimentos infantis	1
Romênia	Todos os alimentos e rações	5
Suécia	Rações para aves	200
	Rações para porcos	100
Suíça	Cereais	2
	Café torrado, moído, solúvel.	5
União Européia	Cereais crus	5
	Derivados de cereais	3
	Frutas secas	10
Uruguai	Arroz, cevada, café e milho.	50

1.2. Cervejas

Cerveja é a bebida não destilada obtida pela fermentação alcoólica de mosto de cereal maltado, geralmente malte de cevada. É facultativa a adição de outro material amiláceo (milho, arroz), ou de lúpulo; em geral o teor alcoólico é baixo, entre 3 e 8%. São divididas em dois grandes grupos: Ale, fabricada por fermentação superficial ou alta; e Lager de fermentação baixa. As do tipo Lager são as mais comuns em todo o mundo. A cerveja Pilsen é um tipo de Lager caracterizada por sabor suave, pH em torno

de 3 a 4, teor alcoólico baixo, este é o tipo de cerveja mais produzida no Brasil, considerada adequada para o nosso clima, (VENTURINI e CEREDA, 2001).

1.2.1. Composição

Um grande número de compostos voláteis têm sido identificado na cerveja: álcoois, ésteres, carbonilas, ácidos orgânicos, compostos sulfurosos, aminas e fenóis. Algumas destas substâncias são encontradas em quantidades extremamente pequenas, enquanto outras em altas concentrações. A composição química da cerveja Pilsen é mostrada na Tabela 2.

Tabela 02 – Composição química da cerveja de baixa fermentação: Tipo Pilsen (CORTACERO-RAMIREZ et al. 2003).

Componente	Concentração média
Álcool, % m/m	3,7
Açúcares redutores, em maltose, %	1,1
Acidez, em ácido láctico, %	0,13
Proteína, %	0,31
Tanino, mg.L ⁻¹	164
Diacetil, mg.L ⁻¹	0,08
Cálcio, mg.L ⁻¹	56
Magnésio, mg.L ⁻¹	80
Potássio, mg.L ⁻¹	330
Sódio, mg.L ⁻¹	80
Cloro, mg.L ⁻¹	230
Sulfato, mg.L ⁻¹	260
Fosfato, mg.L ⁻¹	380
Oxalato, mg.L ⁻¹	12
Ferro, mg.L ⁻¹	<0,10
Cobre, mg.L ⁻¹	<0,16

O álcool encontrado em maior quantidade na cerveja é o etanol. Os carboidratos são dentre os compostos não voláteis encontrados na cerveja os de maior quantidade:

amidos, pentosanas e β -glucanas. Também são encontrados traços de D-ribose, L-arabinose, D-xilose e D-galactose. A maltotriose é o principal açúcar, representando cerca de 14% do total de carboidratos. A origem das proteínas encontradas na cerveja é do malte da cevada. São encontrados peptídeos e polipeptídios. O aminoácido prolina não é assimilado pelas leveduras fermentativas e assim representa grande parte do material nitrogenado de baixo peso molecular encontrado na cerveja (CORTACERO-RAMIREZ et al. 2003).

Os taninos são metabólitos secundários de natureza polifenólica extraídos de plantas, são substâncias adstringentes e que são coadjuvantes no processo de fabricação da cerveja com o objetivo de precipitarem as proteínas, facilitando assim a filtração das mesmas. O lúpulo também possui cerca de 4% de taninos.

Também são encontradas aminas voláteis derivadas do malte e dos processos fermentativos. Os ácidos nucleicos presentes resultam da atividade das leveduras durante a fermentação. Minerais e vitaminas são verificados em pequenas quantidades (CORTACERO-RAMIREZ et al. 2003).

1.2.2. Mercado

No mercado de cerveja, o Brasil só perde, em volume, para China (27 bilhões de litros/ano) os Estados Unidos (23,6 bilhões de litros/ano), Alemanha (10,5 bilhões de litros/ano) e Rússia (9 bilhões de litros/ano). O consumo da bebida, em 2004, apresentou aumento em relação ao ano anterior, totalizando 8,5 bilhões de litros, segundo estimativa do Sindicato Nacional de Cerveja (SINDICERV), baseada no

recolhimento de tributos pelo setor (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA, 2005).

Em relação ao consumo *per capita*, no entanto, o Brasil com uma média de 47,6 litros/ano por habitante, está abaixo do total registrado por países como México (50 litros/ano) e Japão (56 litros/ano). Embora esse consumo tenha sido incrementado nos primeiros anos de implantação do Plano Real (1994/1995), saltando de 38 litros/ano por pessoa para 50 litros/ano/habitante, o nível se mantém estável desde então, especialmente porque, ao se levar em conta o baixo poder aquisitivo de parte de seus consumidores, o preço do produto é alto, Figura 02, (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA, 2005).

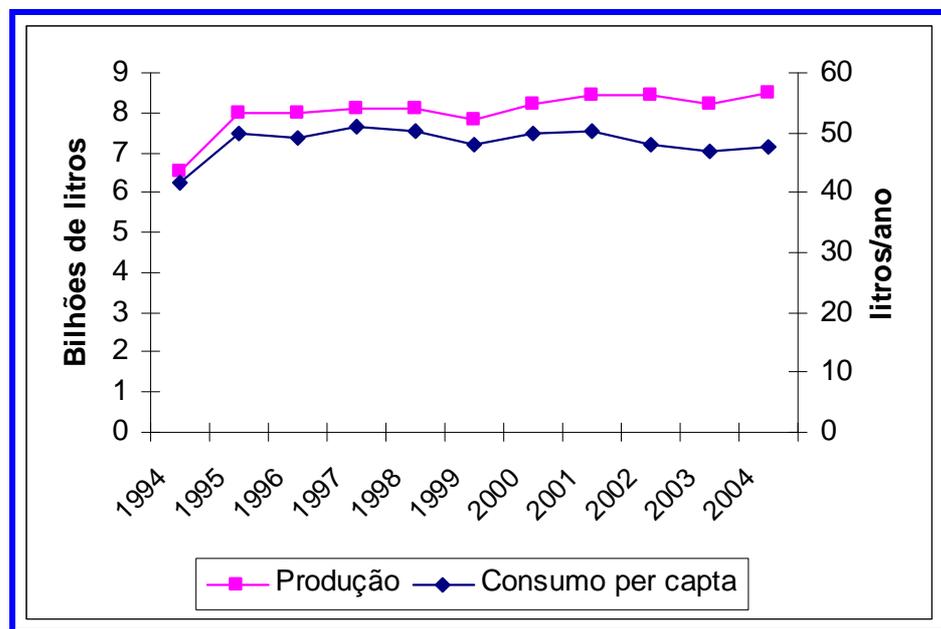


Figura 02 – Cerveja no Brasil: Produção e Consumo (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA, 2005).

1.2.3. Ocratoxinas em cervejas

A cevada é a principal matéria-prima na elaboração da cerveja, sendo empregada na forma maltada e não-maltada. O processamento da cerveja é mostrado na Figura 03, onde podemos observar duas etapas que empregam altas temperaturas, nas quais poderíamos obter redução das ocratoxinas: a **mosturação** e **esterilização** do mosto para a posterior fermentação. A fase da **fermentação** também poderia reduzir o teor de ocratoxinas.

Segundo SCOTT (1996), A OTA não foi encontrada em malte processado em laboratório a partir de cevada naturalmente contaminada com 420 e 830 ng.g⁻¹. A OTA foi estável ao processo de fervura, por 20 minutos. Contudo o processo de fermentação causou perda considerável no teor inicial de OTA, sendo recuperada apenas cerca de 2 a 7% do teor inicial.

CHU et al. (1975), avaliaram a estabilidade da OTA no processo de fermentação, confirmando que a mesma foi bastante estável ao aquecimento, mosturação e fermentação propriamente dita; a recuperação foi de 27 a 28% do total adicionado (1.160 µg.L⁻¹ de mosto a fermentar).

Segundo ALLDRICK (1996), justificar que o processo de fermentação não é capaz de eliminar OTA, torna bastante viável a ocorrência de OTA na cerveja.

Apesar do grande consumo mundial, a cerveja ainda é pouco estudada quanto à presença de micotoxinas. No período de 1995 até o momento apenas 12 artigos relatam a ocorrência de OTA em cervejas, sendo apenas um destes com cervejas brasileiras (Tabela 03).

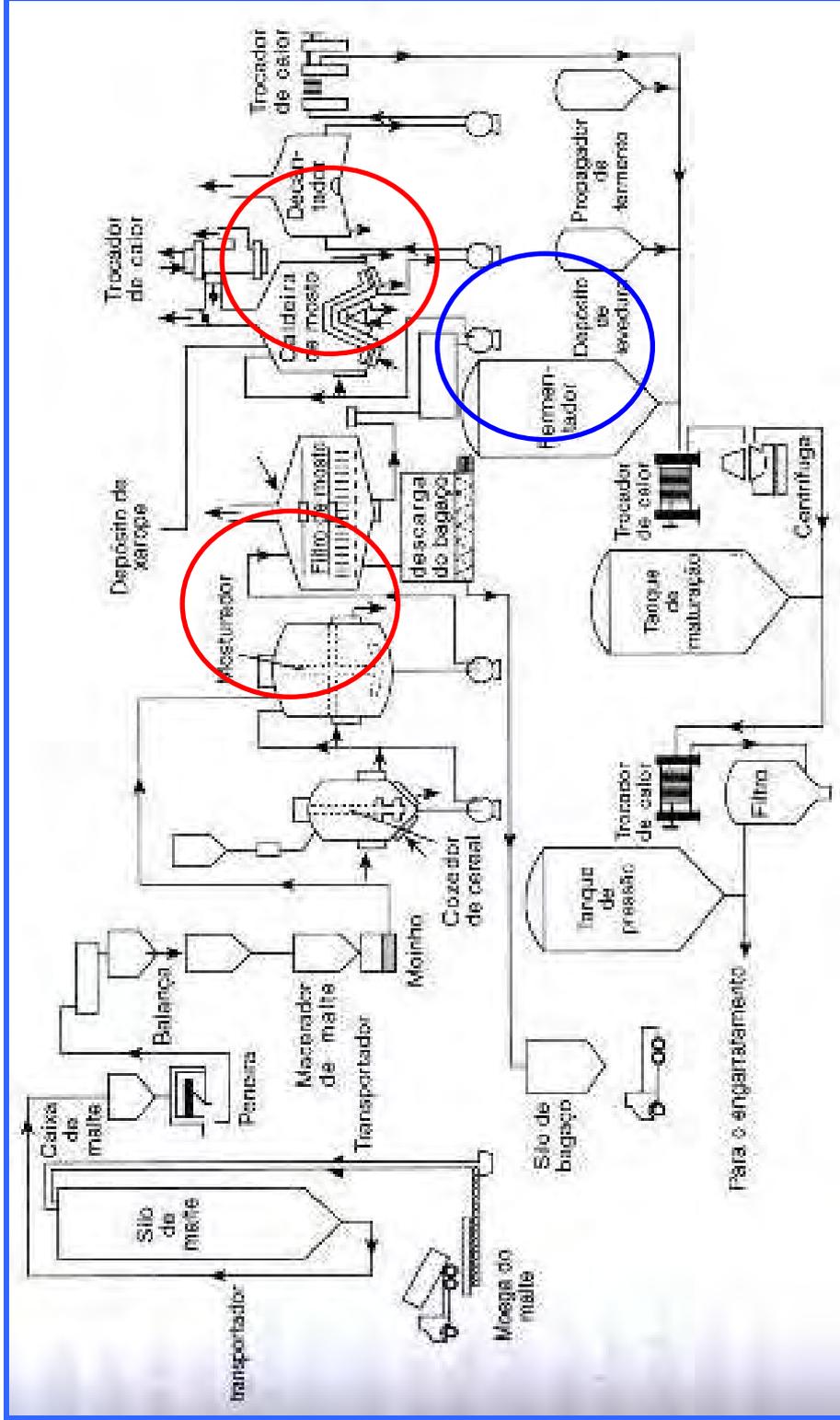


Figura 03 – Processo de fabricação da cerveja (HOUGH, 1985).

— Altas temperaturas — Fermentação

Tabela 03 – OTA em cervejas - Metodologia analítica e ocorrência.

Ano/Autores/ País	Limpeza do extrato	Condições cromatográficas	Validação	Ocorrência
1995 SCOTT e KANHERE Canadá	Cartuchos SPE C ₁₈ e Colunas de imunoafinidade OchraTest TM - Vicam	Coluna: C ₁₈ , 5µm, 250mm x 4,6 mm FM: ácido fosfórico 0,083M; acetônitrila: metanol (1:1:1) Looping: 20µL Fluxo: 0,8 mL.min ⁻¹ Detector: Flu Em: 470 Ex: 330 nm Confirmação: metilester com BF ₃	LD: 0,0025 µg.L ⁻¹ (3:1) LQ: não apresenta r: curva linear entre 2,5 e 5,0 pg.mL ⁻¹ % recup.: para 1 ng.mL ⁻¹ foi de 82 – 100%	41 amostras 26 traços < 0,2 µg.L ⁻¹
1998 JORGENSEN Dinamarca	Colunas de imunoafinidade (Easy- Extract) – Rhône Diagnostics.	Coluna: Phase Sep RP-18, 5µm, 125mm x 4 mm FM: acetônitrila: água: ácido acético (50:49:1) Looping: 25 µL Fluxo: 1,0 mL.min ⁻¹ Detector: Flu Em: 440 Ex: 385nm Confirmação: derivatização com amônia	LD: 0,001µg.L ⁻¹ (3:1) LQ: não apresenta r: não apresenta % recup.: 66 a 113% em 0,3µg.L ⁻¹ (n=12)	21 amostras 100% OTA, média foi 0,049 e o máximo foi 0,160µg.L ⁻¹
1998 LEGARDA e BURDASPAL Espanha	Extração com bicarbonato sódio a 2% e NaCl 15%. Limpeza do extrato em coluna de imunoafinidade - Vicam	Coluna: ODS –1 de 5 µm, 250 x 4,6 mm FM: metanol: ácido acético 9%(72:28, v/v) Looping: 50 µL Fluxo: 1mL.min ⁻¹ Temp. coluna: 50 °C Detector: Flu Em: 440 Ex: 390nm Confirmação: derivatização com amônia	LD: 0,004 µg.L ⁻¹ (3:1 ruído) LQ: não apresenta Curva: 0,010 a 0,200 µg.L ⁻¹ r: 0,999983 valores de 0,009 – 0,190 µg.L ⁻¹ % recup.: 100,4% CV 1,2%	Amostras espanholas: Com álcool: 30 amostras: 96,7%, valor médio: 0,026 µg.L ⁻¹ Sem álcool: 8 amostras: 100%, valor médio: 0,018 µg.L ⁻¹
				Amostras estrangeiras: Com álcool: 30 amostras: 100,0%, valor médio: 0,026 µg.L ⁻¹ Sem álcool: 4 amostras: 100%, valor médio: 0,025 µg.L ⁻¹

Tabela 03 – OTA em cervejas - Metodologia analítica e ocorrência (continuação)

1999 DEGELMANN Et al Alemanha	Extração com MgCl ₂ e tolueno, limpeza em Sep-Pak.	Coluna: Eurospher 100-C ₁₈ , de 250 x 4,0 mm FM: acetônitrila: água: ácido acético (99:99:1, v/v) Looping: 50 µL Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Detector: Flu Em: 460 Ex: 330nm Confirmação: conforme Terada et al, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, 960-964, 1986.	LD: 3,0 pg.L ⁻¹ (3:1) LQ: 0,05 µg.L ⁻¹ r: 0,9999 apresenta % recup.: 0,1 a 2,0 µg.L ⁻¹ : 78 a 88%	35 amostras de cervejas da Alemanha. 60% traços 25,7% entre 0,1 e 0,26 µg.L ⁻¹ . As demais não apresentaram OTA
1999 NAKAJIMA Et al Japão	Limpeza do extrato em coluna de imunoafinidade – Ochra Test – Vicam	Coluna: Capcell Pak C ₁₈ SG, 120, de 250 x 4,6 mm FM: acetônitrila: metanol: tampão fosfato 0,2 M, pH 5,0: água (23:4:3:70, v/v) Looping: 100 µL Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Temp. coluna: 40 °C Detector: Flu Em: 432 Ex: 383nm Confirmação: conforme Terada et al, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69, 960-964, 1986.	LD: 1,0 ng.L ⁻¹ (3:1) LQ: não apresenta r: não apresenta % recup.: 250 ng.L ⁻¹ : 88,2% RSD 2,4 25 ng.L ⁻¹ : 86,1% RSD 2,4	Amostras importadas: 94 amostras 91,5% com média de 0,0101 µg.L ⁻¹ . Amostras japonesas: 22 amostras 95,5% com média 0,0125 µg.L ⁻¹ .
2000 VISCONTI Et al Itália	Limpeza com coluna de imunoafinidade Ochar Test – Vicam	Coluna: Discovery C18, de 150 x 4,6 mm, e 5µm de \square artícula. FM: acetônitrila: água: ácido acético 49,5:49,5:1 v/v) Looping: 100 µL Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Temp. coluna: ambiente Detector: Flu Em: 460 Ex: 333nm Confirmação: não apresenta	LD: 0,01 µg.L ⁻¹ (3:1) LQ: não apresenta r: 0,99998, 4 pontos entre 0,02 – 2,0 µg.L ⁻¹ . % recup.: 0,04; 0,2 e 1,0 µg.L ⁻¹ : 96,4% CV 2,9%	10 amostras nacionais 51 amostras importadas Total 61 amostras sendo 50% apresentaram OTA, entre 0,01 e 0,135 µg.L ⁻¹ .

Tabela 03 – OTA em cervejas - Metodologia analítica e ocorrência (continuação)

2001 FILALI Et al Marrocos	Extração com MgCl ₂ e ácido clorídrico, limpeza em Sep-Pak.	Coluna: Spherisorb ODS 1 de 250 x 4,6 mm FM: acetonitrila 48%; 52% tampão acetato de \square bsor 4 mM – ácido \square bsorbã (19:1 v/v) Looping: 50 μ L Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Temp. coluna: ambiente Detector: Flu Em: 470 Ex: 330nm Confirmação: com carboxypeptidase	LD: não apresenta LQ: 0,01 μ g.L ⁻¹ r: não apresenta % recup.: 0,1; 1; 2,0; e 35 μ g.L ⁻¹ . % de recuperação μ g.L ⁻¹ de 80 a 90% para os dois primeiros níveis, e 100% para os demais.	5 marcas de cerveja produzidas no Marrocos, nenhuma apresentou OTA acima do limite de quantificação do método: 0,01 μ g.L ⁻¹ .
2001 SOLEAS Et al Canadá	Extração em SPE em coluna octadecil C ₁₈ .	Coluna: Nucleosil C ₁₈ de 250 x 4 mm, \square bsorbãnc de 5 μ m. FM: 0,2 mL de tampão fosfato 3mM em 1 L H ₂ O, pH 3,1 na Bomba ^a 0,2 mL de tampão fosfato 3mM em 1 L acetonitrila, pH 3,4 na Bomba B. Looping: 100 μ L Fluxo: 0,7 mL.min ⁻¹ Temp. coluna: ambiente Detector: PDA (fotodiiodo), com \square bsorbância a 333nm Confirmação: esterificação com BF ₃ /metanol	LD: 0,05 μ g.L ⁻¹ (3:1) LQ: 0,10 μ g.L ⁻¹ r: não apresenta % recup.: 4 níveis entre 0,1 e 2,0 μ g.L ⁻¹ , foi de 83 a 94% com CV entre 4,0 e 8,9 %.	107 amostras do Canadá, Reino Unido, Europa, EUA e Oriente. Em apenas duas amostras foram encontradas OTA entre 0,05 e 0,1 μ g.L ⁻¹ .
2002 ODHAV e NAICKER África do Sul	Extração líquido/líquido com clorofórmio.	Coluna: Lichrospher C18 FM: acetonitrila: ácido ortofosfórico 0,1% (55:45 v/v) Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Looping: não apresenta Temp. da coluna: não apresenta Detector: Flu Em: 470 Ex: 333nm Confirmação: não apresenta	LD: 0,1 μ g.L ⁻¹ LQ: não apresenta r: não apresenta % recup.: 89%	6 marcas comerciais e não encontrou OTA. 29 amostras de cerveja feita em casa – OTA 34,5%. Com níveis de 3 a 2340 μ g.L ⁻¹ .

Tabela 03 – OTA em cervejas - Metodologia analítica e ocorrência (continuação)

2002 TANGNI Et al Bélgica	Extração líquido/líquido seguida de centrifugação. Limpeza em coluna de imunoafinidade Ochra Test – Viçam.	Coluna:Hypersil™ BDS C18, de 150 x 4 mm), 3µm de partícula. FM: acetoneitrila: água;ácido acético (45:54:1 v/v) Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Looping: 50µL Temp. da coluna: ambiente Detector: Flu Em: 462 Ex:332nm Confirmação: por metilação segundo Zimmerli and Dick (1995) e Studere-Rohr et al. (1995).	LD: 3 ng.L ⁻¹ (3:1) LQ: 10 ng.L ⁻¹ (10:1) r: 0,995 na faixa de 1 –5 µg.L ⁻¹ % recup.: 50 a 200 ng.L ⁻¹ foi em média de 97,2% com RSD 2,8%	62 amostras belgas 82% OTA entre 0,010 e 0,20µg.L ⁻¹ valor médio 0,185µg.L ⁻¹ . 15% apresentaram traços 20 amostras importadas 85% OTA entre 10 e 200ng/L. Sendo o valor médio 0,087µg.L ⁻¹ . 15% apresentaram traços
2003 PRADO Et al. Brasil	Limpeza com coluna de imunoafinidade Ochar Test – Viçam (Visconti, 2000)	Coluna:ODS, de 250 x 4,6 mm), 5µm de partícula. FM: acetoneitrila: água;ácido acético (49,5:49,5:1 (v/v) Fluxo: 1 mL.min ⁻¹ Looping: 100µL Temp. da coluna: ambiente Detector: Flu Em: 460 Ex:333nm Confirmação: por metilação BF ₃	LD: 0,002 µg.L ⁻¹ (3:1 ruído) LQ: 0,008 µg.L ⁻¹ . Curva: 0,02 a 1,6 µg.L ⁻¹ . r: 0,9998 % recup.: 88,0% CV de 4 a 11%	26 nacionais 23% = traços; 04 importadas = duas contaminadas: 0,25 e 0,83 µg.L ⁻¹ .
2004 GUMUS Et al. Turquia	Filtração	Imunoensaio enzimático (ELISA)	LD 0,08 µg.L ⁻¹ Recuperação 85%	150 amostras: 28% apresentaram entre 0,1 e 8,10µg L ⁻¹ 82% abaixo do LD 0,08µg L ⁻¹

LD = Limite de Detecção LQ = Limite de Quantificação

SCOTT e KANHERE (1995), analisaram 41 amostras de cervejas canadenses e 11 amostras importadas (República Tcheca, Dinamarca, Alemanha, Irlanda, Itália, Japão, Quênia, Holanda, Polônia, Reino Unido e Estados Unidos) e verificaram a presença de traços de OTA ($< LD = 0,2 \text{ ng.mL}^{-1}$) em 63,4% das amostras.

SCOTT e LAWRENCE (1997), analisaram 24 amostras de cervejas, sendo a maioria americana e mexicana. Verificaram a presença de aflatoxina B₁ em 5 amostras de cervejas mexicanas (média de $6,4 \text{ ng.L}^{-1}$) e em uma amostra de cerveja brasileira ($< 10 \text{ ng.L}^{-1}$).

JORGENSEN (1998), analisou 21 cervejas na Dinamarca, todas apresentaram OTA sendo que o valor médio encontrado foi de 0,049 e o máximo $0,160 \mu\text{g.L}^{-1}$.

LEGARDA E BURDASPAL (1998), analisaram 38 amostras de cervejas espanholas sendo 30 com álcool e 8 sem álcool, encontraram OTA em 96,75 e 100% das amostras, sendo a média de $0,026 \text{ ng.mL}^{-1}$ e $0,018 \text{ ng.mL}^{-1}$ respectivamente. Também analisaram 34 amostras de cervejas importadas, sendo que encontraram OTA em todas as amostras, com valores médios de $0,026 \text{ ng.mL}^{-1}$ para cerveja com álcool e $0,025 \text{ ng.mL}^{-1}$ para as cervejas sem álcool.

DEGELMANN et al. (1999), analisaram 35 amostras de cervejas alemãs e encontraram traços de OTA em 60% destas, outras 26% apresentaram OTA entre 0,1 e $0,26 \mu\text{g.L}^{-1}$.

NAKAJIMA et al. (1999), analisaram 94 amostras de cervejas importadas e 22 de origem japonesa, sendo que das importadas 91,5% apresentaram OTA, valor médio de $10,1 \text{ pg.mL}^{-1}$; e 95,5% das japonesas apresentaram valor médio $12,5 \text{ pg.mL}^{-1}$. Quanto a

aflatoxina B₁, 11,7 % das cervejas importadas e 9,1% das japonesas apresentaram entre 0,5 a 83,1 pg.mL⁻¹ e 0,5 a 0.8 pg.mL⁻¹, respectivamente.

VISCONTI, PASCALE e CENTOZE (2000), analisaram 10 amostras de cervejas italianas e 51 amostras de cervejas importadas, do total de 61 amostras 50% apresentaram OTA, os valores variaram entre 0,01 e 0,135 ng.mL⁻¹.

FILALI et al. (2001), analisaram 5 amostras de cerveja da região de Marrocos, sendo que nenhuma delas apresentou OTA acima do limite de quantificação do método 0,01µg.L⁻¹.

SOLEAS et al (2001), analisaram 107 amostras de cerveja de cinco regiões distintas: Canadá, Reino Unido, Europa, EUA e Oriente. Em apenas duas amostras foram encontradas OTA entre 0,05 e 0,1µg.L⁻¹.

ODHAV e NAICKER (2002), analisaram 6 marcas comerciais de cervejas da África do Sul e não encontraram OTA. Dez amostras de 29 de cerveja feita em casa apresentaram OTA (34,5%), com níveis de 3 a 2340 µg.L⁻¹.

TANGNI et al. (2002), analisaram 62 amostras de cervejas belgas sendo que 82% das amostras apresentaram OTA entre 10 e 200ng.L⁻¹, com valor médio de 33, variando de 10 a 185 ng.L⁻¹; 15% apresentaram traços. Também analisaram 20 amostras importadas e 85% das amostras apresentaram OTA entre 10 e 200ng.L⁻¹, sendo o valor médio 32, variando de 12 a 87 ng.L⁻¹; 15% apresentaram traços.

GUMUS et al. (2004), analisaram 150 amostras de cerveja da Turquia, sendo que 28% destas apresentaram OTA entre 0,1 e 8,10 µg.L⁻¹, 72% não apresentaram OTA em níveis detectáveis utilizando a metodologia de imunoenensaio enzimático (ELISA).

As pesquisas com cervejas brasileiras são poucas. ROSA, SANTANA e DIREITO (1996) analisaram 14 marcas diferentes de cervejas em lata importadas pelo Brasil, sendo que duas amostras (14,3 %) apresentaram aflatoxina B₁ entre 9,8 e 33,8 ng.mL⁻¹, SCOTT e LAWRENCE (1997), verificaram a presença de aflatoxina B₁ em uma única amostra de cerveja brasileira que havia sido importada pelo Canadá, com valor menor que 10ng.L⁻¹. PRADO et al. (2003) analisaram 26 amostras de cervejas fabricadas no Brasil e 4 importadas, sendo que encontraram traços (> 0,002µg.L⁻¹ e <0,008µg.L⁻¹) e 23% das amostras nacionais e duas amostras importadas, uma da Irlanda e outra da Alemanha com 25 pg.mL⁻¹ e 82 pg.mL⁻¹, respectivamente.

Apenas um artigo científico relata a pesquisa de OTB em cerveja: MEYER e NEUGEBAUER, 2000; pesquisadores alemães, analisaram juntamente com a OTA a ocratoxina B, em 161 amostras de cerveja, destas 102 (63,0%) apresentaram OTA, em valores até 0,35 µg.L⁻¹, mas nenhuma delas apresentou OTB.

1.3. Considerações sobre os métodos analíticos para a determinação das ocratoxinas em cervejas.

A separação e quantificação da ocratoxina A em diferentes tipos de amostras, tem apresentado algumas dificuldades no que se refere à preparação da amostra. Recente progresso tem sido alcançado para a limpeza de extratos alimentares contendo micotoxinas com o uso de colunas de imunoafinidade.

Estas colunas são compostas de anticorpos monoclonais específicos para uma determinada micotoxina. O extrato é forçado a passar pela coluna e a micotoxina se liga ao anticorpo. Os materiais interferentes podem ser retirados da coluna com água ou tampões aquosos e depois a micotoxina é eluída com solvente adequado. Estas

colunas eliminam muitos interferentes, geram baixos limites de detecção, reduzem a velocidade da análise, utilizam pouco solvente, apresentam possibilidade de automação e de reutilização. A desvantagem é o alto custo e o fato de que existem colunas somente para algumas micotoxinas (SCOTT e TRUCKSESS, 1997).

SOLFRIZZO et al. (1998) estabeleceram um método rápido para análise de OTA em cereais com a utilização de limpeza em coluna de imunoafinidade, conseguindo baixar o limite de detecção do método de $1 \mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$ para $0,2 \mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$.

CHATURVEDI et al. (1999), desenvolveram uma coluna de imunoafinidade para limpeza simultânea de aflatoxinas e ocratoxina A, "AflaOchraHPLCTM" que contém anticorpos para aflatoxinas e ocratoxina A, para análise de grãos. As micotoxinas são posteriormente eluídas da coluna com metanol e injetadas em um cromatógrafo líquido. O método apresentou recuperação maior que 70% e limite de detecção de $0,25 \mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$ para ambas micotoxinas, a variação foi menor 10% (CV), em nível de $20\mu\text{g}.\text{Kg}^{-1}$.

Dentre os 12 artigos relacionados na Tabela 3, à partir da página 31, onze artigos relatam a pesquisa de OTA em cerveja pela técnica da cromatografia líquida de alta eficiência, sendo que em sete destes a limpeza do extrato é feita por colunas de imunoafinidade. GUMUS et al., 2004, empregaram uma metodologia diferente da cromatografia para a análise de OTA em cervejas, o imunoensaio.

1.4. Desenvolvimento de diferentes colunas cromatográficas, empregadas em procedimentos de extração on line, para determinações de analitos presentes em amostras de matrizes complexas.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica analítica extremamente importante para a análise de amostras com as mais variadas estruturas e propriedades físico-químicas. Contudo, o sucesso de uma análise depende da qualidade do pré-tratamento da amostra que visa à obtenção de soluções homogêneas, reprodutíveis e compatíveis com o método de CLAE escolhido, tornando o método fidedigno.

Materiais biológicos e produtos farmacêuticos são complexos e freqüentemente contêm proteínas, sais, ácidos, bases e compostos orgânicos com propriedades similares ao analito. Portanto, o pré-tratamento de tais amostras tem como objetivo:

- a) remover os interferentes, aumentando a seletividade do método;
- b) concentrar o analito, tornando o método mais sensível;
- c) converter o analito, se necessário, em um analito mais adequado para detecção ou separação;
- d) fornecer um método robusto e reprodutível que seja independente de variações da matriz da amostra.

Além disso, o procedimento de preparo da amostra deve ser rápido e prático, com perdas mínimas de analito e baixo custo de análise (KATAOKA, 2003; SMITH, 2003).

Há várias técnicas ditas *off-line* para o pré-tratamento de amostras biológicas, por exemplo a extração em fase sólida (*solid-phase extraction*) e a extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*) são as mais clássicas. No entanto, apesar destas

técnicas serem mais seletivas e modernas, alguns problemas ainda persistem: o tempo gasto no preparo das amostras, o manuseio laborioso e os materiais usados no desenvolvimento de um método. Assim, o uso de procedimentos de extração *on-line* é particularmente atrativo em situações onde um grande número de amostras deva ser analisado rotineiramente e/ou materiais perigosos (tóxicos), ou altamente infectante devam ser processados. Dentre as técnicas de injeção direta e repetitiva de amostras biológicas não tratadas no sistema de CLAE, a que utiliza fases RAM (*Restricted-Access Media*) tem um enorme destaque, sendo extremamente vantajosa em pesquisas e análises clínicas, toxicológicas e farmacêuticas, entre outras, devido a sua capacidade de reduzir o tempo e o manuseio laborioso empregados no procedimento analítico.

A terminologia *Restricted-Access Media* (RAM) foi introduzida por DESILET et al. (1991) e, expressa a acessibilidade limitada de compostos macromoleculares aos sítios de adsorção do suporte que são quimicamente modificados para permitir injeções diretas de fluídos com matrizes complexas sem acúmulo destrutivo do material macromolecular sobre a fase cromatográfica.

O mecanismo das fases RAM baseia-se na cromatografia de exclusão não adsortiva de macromoléculas (proteínas, ácidos nucléicos), porque possuem uma região hidrofílica, e na cromatografia de fase-reversa, que promove a retenção do analito de interesse na superfície hidrofóbica da coluna (OERTEL et al. 1998; HAGESTAM e PINKERTON, 1985). Assim, macromoléculas, como as proteínas, eluem no volume morto da coluna sem acumulação destrutiva, mas as pequenas moléculas (por exemplo, fármacos e seus metabólitos) se ligam aos sítios hidrofóbicos e são separadas (Figura 4), (BOSS e RUDOLPHI, 1997; HAGINAKA, 1991).

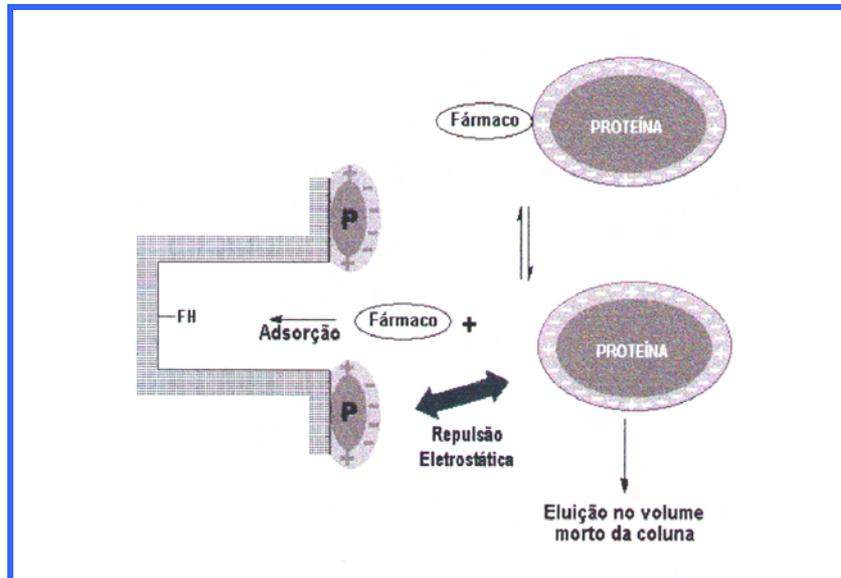


Figura 04 - Mecanismo cromatográfico das fases RAM.

P: proteínas; FH: fase hidrofóbica (BOSS e RUDOLPHI, 1997).

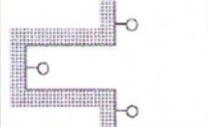
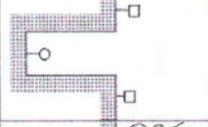
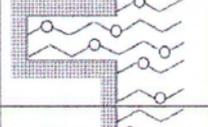
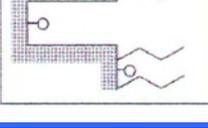
A separação de compostos macromoleculares por exclusão não adsortiva pode ser realizada usando-se os mecanismos das barreiras de difusão física ou química (BOSS e RUDOLPHI, 1997). Na barreira de difusão física, a limitação da acessibilidade macromolecular se deve à estrutura do poro da fase cromatográfica, por exemplo, poros com diâmetros de 6 nm promovem uma exclusão completa das proteínas séricas e plasmáticas. Por outro lado, no mecanismo da barreira de difusão química, a superfície da sílica é quimicamente ligada a estruturas que previnem a adsorção de macromoléculas sobre a fase, bem como previnem sua denaturação. Neste mecanismo, polímeros naturais ou sintéticos, bem como proteínas, são ligados adsortiva ou covalentemente à superfície da sílica.

Com relação ao mecanismo cromatográfico da superfície quimicamente ligada, as fases RAM são classificadas em dois grupos: fases de superfície bimodal e fases de

superfície unimodal (BOSS e RUDOLPHI, 1997; HAGINAKA, 1991; PINKERTON, 1991).

As fases de superfície bimodal apresentam duas classes de substâncias orgânicas, ligadas quimicamente sobre a superfície da sílica, originando dois mecanismos de separação, caracterizada pela presença de uma região externa hidrofílica e outra interna hidrofóbica. Aqui estão agrupadas, entre outras, as fases reversas proteína-mobilizadas, as fases ISRP (*Internal Surface Reversed Phase*), ADS (*Alkyl-Diol Sílica*) e SPS (*Semi-Permeable Surface*). Em relação às fases de superfície unimodal, elas também podem apresentar uma ou duas substâncias orgânicas ligadas quimicamente de forma uniforme, apresentando uma cobertura homogênea, ou melhor, ambas as superfícies externa e interna têm simultaneamente características hidrofílicas e hidrofóbicas. Neste grupo estão incluídas, por exemplo, as fases MMP (*Mixed Mode Phases*), MFP (*Mixed-function Phases*) e SHP (*Shielded Hydrophobic Phases*).

Outra classificação mais ampla para as fases RAM foi sugerida por BOSS e RUDOLPHI, (1997). Segundo esta classificação, as fases RAM são agrupadas em 4 tipos, de acordo com os mecanismos de exclusão e com a característica da superfície do suporte, (Figura 05).

Fase RAM	Barreira de difusão	Topoquímica superficial	Tipo
	Física	Unimodal	A
	Física	Bimodal	B
	Química	Unimodal	C
	Química	Bimodal	D

* Topoquímica: mecanismo de adsorção.

Figura 05 – Classificação das fases RAM (BOSS e RUDOLPHI, 1997).

Dentre essas diversas fases, apresentadas na Tabela 4, algumas delas obtiveram enorme sucesso quando do desenvolvimento de métodos para análises de amostras biológicas, sendo comercialmente disponíveis ou de fácil preparo em laboratório.

YOSHIDA et al. (1984), descreveram a preparação de uma fase C₁₈ imobilizada com proteína. A superfície externa desta fase era hidrofílica, permitindo a exclusão de proteínas e os poros eram hidrofóbicos o suficiente para reter xenobióticos e seus metabólitos.

Tabela 04 – Classificação das fases RAM desenvolvidas.

ANO	FASES RAM	TIPO
1990	Haginaka et al. Prepararam fases de β -ciclodextrina-diol e ligantes hidrofóbicos (fenil, butil ou octil)-diol para injeção direta de soro para análise de fármacos Quirais e aquirais, (HAGINAKA et al. , 1990).	
1991	Feibush e Santasania prepararam fases micelares suportadas: sílica 10 nm de poro recoberta com uma camada de surfactante (N,N-bis[2-metóxietil]-1-1-sililundecamida) adsorvida, (FEIBUSH e SANTASANIA, 1991).	A
1993	A Chromapack preparou a fase biomatrix (ChroSpher [®] 5 Biomatrix): sílica porosa 13 nm de poro ligada com estruturas hidrofóbicas (fenil e alquil) e hidrofílicas (hidroxilas), (BOSS e RUDOLPHI, 1997).	
1994	Sudo et al. prepararam suportes de sílica com glicerilalquilsilano (WS GP-N6 [®] , Waco Co. Japonesa), (SUDO et al., 1994).	
1995	Nimura, Itoh e Kimoshita prepararam fases de camada binária: sílica 10 nm de poro modificada com 3-(2,3-dihidropropoxi)propilsilano, (NIMURA et al. 1995).	
1985	Hagestam e Pinkerton prepararam uma fase ISRP: sílica 8 nm de poro modificada-superfície interna recoberta com glicil-L-fenilalanil-L-fenilalanina e superfície externa com ligantes glicil (GFF [®] , Regis Technologies, Illinois) (HAGESTAM e PINKERTON, 1985).	
1986	Cook e Pinkerton prepararam outras fases ISRP: sílica 8 nm de poro com superfície interna recoberta com glicil-L-fenilalanina (GF), glicil-L- fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (GFF) e superfície externa com ligantes glicil:sílica APS 8 nm de poro recoberta internamente com (1) N-tert-butoxicarbonil-L-fenilalanina, (2) N-carbobenzóxi-L-valil-L-fenilalanina, (3) N-acetil-L-fenilalanina, (4)N-benzoil-L-fenilalanina,(5)ácido fenilpropiónico e externamentecom ligantes glicidol, (COOK e PINKERTON, 1986).	B

Tabela 4 – Classificação das fases RAM desenvolvidas(continuação)

1989 Haginaka et al. prepararam uma ISRP diol: sílica 9 nm de poro modificada-superfície interna com N-octanoilaminopropil-ligantes e superfície externa com ligantes diol, (HAGINAKA et al. 1989).	
1989 Davankov e Tsyurupa prepararam a fase Styrisorb tris-modificada: suporte de poliestireno hidrofóbico com superfície externa modificada com tris-(hidroximetil)metilamina, (DAVANKOV e TSYURUPA, 1989).	
1990 Kimata et al. desenvolveram a ISRP diol:sílica 5-6 nm de poro modificada-superfície interna com ligantes C ₁ , C ₆ , C ₁₈ ou fenil etil-ligantes e superfície externa com ligantes diol,(KIMATA et al., 1990).	
1991 Boos et al. desenvolveram a fase ADS (alkyl-diol sílica) : sílica 6 nm de poro com superfície interna ligada com grupos hidrofóbicos (butil, octil ou octadecil) e superfície externa com ligantes diol (LiChrospher [®] ADS,Meck,Alemã), (BOSS et al. 1995).	B
1992 Perry et al. modificaram a ISRP de Pinkerton (GFF [®]) tomando o suporte mais homogêneo e reprodutível lote-a-lote (GFFII [®] ,Regis Technologies, Illinois), (PERRY et al. 1992).	
1994 Smigol, Svec e Fréchet desenvolveram um suporte polimetacrílico hidrofílico com superfície interna C ₁₈ ou fenil-ligada, (SMIGOL et al. 1994).	
2000 A Merck preparou a fase LiChrospher [®] XDS: sílica 6 nm de poro com superfície interna com ligantes de troca catiônica (ácidosulfônico-SO ₃) e superfície externa com ligantes diol, (RACAITYTE et al. , 2000).	
2001 Yamamoto e colaboradores prepararam uma fase reversa imobilizada com metilcelulose imobilizada, (YAMAMOTO et al. 2001	

1988 Gisch, Hunter e Feibush desenvolveram as fases SHP (Hisep [®] , Supelco) : sílica 10 nm de poro modificada-poli- meros de polioxietileno, contendo regiões hidrofóbicas (aromáticos substituídos) ligados à superfície da sílica, (GISCH et al. 1988).	C
--	---

Tabela 4 – Classificação das fases RAM desenvolvidas (continuação)

1994 Zhang et al. prepararam fases com ligantes poliglicol com resíduos hidrofóbicos (C ₈ , C ₁₈ , ciano e fenil) e sugeriram o emprego destas como fases RAM, (ZHANG et al.1996).	
1996 Kanda et al. desenvolveram uma fase MFP capeada com polímero: sílica 9 nm de poro adsorvida com camadas de materiais hidrofílicos e hidrofóbicos- uma camada de polímero de silicone e uma camada de ligantes biocompatíveis (por exemplo, polioxietileno). Variações desta coluna contendo polioxietileno com resíduos fenil, C ₁ ou C ₈ são disponíveis sob o nome de Capcell Pak® (Shiseido Co. Japonesa), (KANDA et al. 1996).	C
1982 Yoshida et al. prepararam fases C ₁₈ proteína imobilizadas: sílica 12 nm de poro, 20-32 μm de partícula imobilizadas com proteínas plasmáticas humanas, albumina sérica bovina ou proteínas plasmáticas de coelho, (YOSHIDA et al., 1984).	
1991 Desilets, Round e Regnier desenvolveram as fases SPS® (Regis Technologies, Illinois): sílica C ₈ ou C ₁₈ recoberta com surfactantes não-aniónicos de polímeros hidrofílicos (por exemplo, polioxietileno). Atualmente há versões C ₈ , C ₁₈ , ciano e fenil recobertas com polímeros hidrofílicos covalentemente ligados, (DESILETS et al. 1991).	
1991 Oda et al. prepararam a fase Bioptic® AV (GL Sciences, Japão): fase APS conjugada com avidina para injeção direta de plasma em análise quiral, (ODA et al. 1991).	
1993 A Shandon HPLC preparou a fase Ultrabiosep®. A estrutura exata desta fase não é descrita na literatura, mas o suporte base é sílica hidrofóbica (C ₄ , C ₈ e C ₁₈) recoberta com um polímero biológico, (GONZALEZ et al. 1993).	D

Tabela 4 – Classificação das fases RAM desenvolvidas (continuação)

1994 Hermansson e Grahn desenvolveram a fase Bio Trap [®] (Chrom Tech, Suécia): sílica C ₁₈ imobilizada com ácido α -L-glicoproteína,(HERMANSSON e GRAHN , 1994).	
1995 Hosoya et al. prepararam uma fase de poliestirenodivinilbenzeno recoberta covalentemente com uma camada de metacrilato hidrofílico,(HOSOYA ET AL. 1995).	D
1996 Menezes e Félix prepararam fases RAM-BSA: sílica C ₁₈ 6 nm de poro imobilizada com uma camada de albumina sérica bovina estabilizada com glutaraldeído,(MENEZES e FÉLIX, 1996).	

A = Unimodal/Física
B = Bimodal/Física

C = Unimodal/Química
D = Bimodal/Química

Fases proteína-imobilizadas têm sido empregadas com bastante sucesso na análise direta de xenobióticos em diversos fluídos biológicos, tais como leite (MENEZES e FÈLIX, 1996) e plasma (CAS et al. 2002).

A primeira fase ISRP (*Internal Surface Reversed Phase*) introduzida em 1985 apresentava a superfície interna coberta com o oligopeptídeo glicil-L-fenilalanil-L-fenilalanina e a superfície externa é exclusivamente coberta com o ligante glicil (HAGESTAM e PINKERTON, 1985). A retenção de micromoléculas neutras se deve às interações π - π e às propriedades catiônicas fracas. Essa fase é comercialmente disponível como GFF[®].

As fases chamadas de ADS (*Alkyl-Diol Sílica*) foram preparadas por BOOS et al. (1995) e apresentam uma superfície externa com características hidrofílicas contendo grupos diol e superfície interna com características hidrofóbicas contendo grupos alquílicos (butil, octil ou octadecil) ligados à sílica. Essas fases são comercialmente conhecidas como LiChrospher[®] ADS (Merck Alemã).

DESILETS et al. (1991) prepararam fases SPS (*Semi-Permeable Surface*), através do recobrimento de uma superfície de fase hidrofóbica (C₈ ou C₁₈) com uma camada de um polímero hidrofílico (polioxietileno) que limita o acesso das proteínas à fase estacionária hidrofóbica adjacente. Na primeira geração destas fases, o polímero era ligado adsortivamente à sílica, mas na segunda geração, a ligação do polímero é covalente.

As fases RAM que combinam diferentes modos cromatográficos (por exemplo, cromatografia de exclusão e de afinidade) ou diferentes funcionalidades (ligantes hidrofílicos e hidrofóbicos) sobre uma superfície uniforme de sílica, são denominadas de

fases MMP (*Mixed-Mode Phases*) e MFP (*Mixed-Function Phases*), (BOSS e RUDOLPHI, 1997, HAGINAKA et al. 1990).

As fases chamadas de SHP (*Shielded Hydrophobic Phases*), comercialmente disponíveis sob o nome de Hisep[®] (Supelco), consistem de uma rede hidrofílica (polímeros de polioxietileno) contendo regiões hidrofóbicas (aromáticos substituídos) ligadas à superfície da sílica (GISCH et al., 1988).

Analiticamente, as fases RAM têm aplicação muito versátil, podendo ser utilizadas no modo simples de análise, ou seja, a amostra não tratada é diretamente injetada na coluna, onde a matriz complexa é excluída e xenobióticos e seus metabólitos ficam retidos, sendo posteriormente analisados por eluição gradiente (BOSS e RUDOLPHI, 1997). Desta forma, a coluna funciona simultaneamente como coluna de exclusão e coluna analítica.

Essas colunas também são amplamente empregadas em análise cromatográfica multidimensional, que é uma técnica de acoplamento de duas ou mais colunas para a extração de interferentes e análise de amostras complexas contendo muitos componentes. Neste caso, uma coluna RAM curta é usada como pré-coluna e os analitos são transferidos através de uma válvula de desvio, para uma coluna analítica após eluição da matriz, (BOSS e RUDOLPHI, 1997; GIDDINGS, 1990; CORTES e ROTHMAN, 1990; ANDERSON, 1999).

1.4.1. Aplicações da coluna cromatográfica ISRP (Internal Surface Reversed Phase) em determinações de analitos presentes em amostras de matrizes complexas

A separação e quantificação de pequenas moléculas de matrizes constituídas de macromoléculas têm apresentado um desafio importante no campo da cromatografia líquida. Em particular, as análises de drogas, metabólitos e pesticidas presentes em fluídos biológicos, têm sido historicamente problemáticas. Isto se deve a necessidade de remover primeiro as proteínas, para evitar estas danifiquem as colunas cromatográficas convencionais. A preparação convencional da amostra envolve procedimentos de precipitação de proteínas, seguida por extração e pré-concentração dos analitos.

HAGESTAM e PINKERTON (1985) e PINKERTON et al. (1986), desenvolveram e patentearam a fase estacionária com Superfície Interna de Fase Reversa – ISRP. Este conceito foi inovador para as determinações de drogas e metabólitos em matrizes biológicas por CLAE. Esta fase estacionária foi sintetizada a partir de uma sílica, com diâmetro de poro apropriado, quimicamente ligado a um glicerilpropil, imobilizada com um polipeptídeo e finalmente ativada com uma enzima carboxipepdase A, que atua principalmente nos grupos carboxilas livres. Estas enzimas têm um diâmetro aproximado de 3.1 nm e a albumina, principal proteína dos fluídos biológicos, um diâmetro de 4,0 nm. Portanto, as proteínas do soro, plasma ou urina não podem alcançar a superfície interna desta fase estacionária após tratamento enzimático.

A fase estacionária ISRP possui características hidrofóbicas na superfície interna da sílica e mantém a superfície externa da sílica com propriedades hidrofílicas não adsorvidas para as proteínas.

Na coluna cromatográfica ISRP a extração das ocratoxinas presentes em amostras de fluídos biológicos, ocorrem por dois mecanismos:

a – A fase estacionária com distribuição de diâmetro de poro controla a separação. Em geral as proteínas presentes em amostras de fluídos biológicos, possuem moléculas com dimensões médias de 144 Å, sendo denominadas de macromoléculas. Isto impede que as mesmas penetrem nos poros da sílica, que possuem diâmetro médio de 100 Å. Após a imobilização da albumina humana sobre a superfície da fase estacionária, esta passa a possuir propriedades hidrofílicas, desta forma as proteínas presentes na amostra de fluído biológico não são adsorvidas, por possuírem propriedades hidrófobas.

b – As ocratoxinas possuem pequenas moléculas, capazes de penetrar nos poros da sílica e serem adsorvidas pela fase estacionária, octadecilsilano possibilitando a extração da amostra de fluído biológico. A Figura 6 apresenta o modelo do mecanismo de separação em uma partícula da fase estacionária ISRP.

Esta fase estacionária permite a injeção direta das amostras de fluídos biológicos sem tratamento prévio.

Vários métodos analíticos, empregando a técnica de injeção direta da amostra empregando colunas ISRP têm sido desenvolvidos e avaliados para aplicações semelhantes, tais como: a determinação de fenilalanina em plasma humano, para diagnóstico e tratamento de fenilcetonúria (ATHERTON, 1989), determinação de drogas enantioméricas em soro (HAGINAKA e MURASHIMA, 1993; HAGINAKA, SEYAMA e MURASHIMA, 1994), extração e identificação de carbamazepina em soro humano (DARYL et al., 1988), extração e separação de pesticidas em leite cru (MENEZES e

FÉLIX, 1996). Muitas fases estacionárias, contendo proteínas ligadas sobre a superfície da sílica, tais como: albumina de soro bovino (MENEZES, DEMARCHI e FÉLIX, 1998), albumina de soro humano (ALLENMARK, 1986) têm sido empregadas para determinação de pesticidas e cafeína presentes em amostras de fluídos biológicos.

Na execução deste projeto, será empregada uma coluna cromatográfica, com a superfície interna de fase reversa (ISRP), que possibilitará a determinação de ocratoxinas presentes em amostras de cervejas por injeção direta em CLAE (Figura 06).

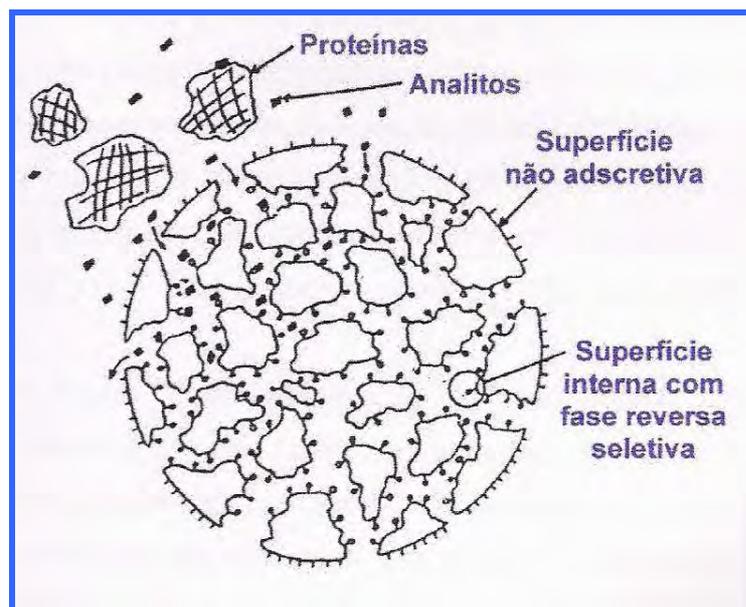


Figura 06 - Partícula da fase estacionária ISRP,
(MENEZES e FÉLIX, 1996).

2. OBJETIVOS

Considerando-se que vários métodos analíticos relatados na literatura para a determinação das ocratoxinas A, B em diferentes tipos de amostras, sobretudo em bebidas, requerem o pré-tratamento da amostra (precipitação de proteínas, centrifugação, extração e purificação) ou o emprego de colunas de imunoafinidade, foi proposto o desenvolvimento de um novo método analítico para a determinação das referidas ocratoxinas, por injeção direta da amostra de cerveja em uma coluna cromatográfica ISRP, instalada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE.

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Otimizar as condições cromatográficas, para efetuar as separações das ocratoxinas A e B;
- Validar a metodologia proposta;
- Efetuar as determinações das ocratoxinas A e B em amostras reais de cervejas.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes e Padrões

A acetonitrila e o metanol (grau CLAE) foram adquiridos junto a Mallinckrodt. Os ácidos: acético, sulfúrico, fosfórico e fosfato ácido de sódio, trietilamina, dimetilformamida, tolueno, xileno e iodeto de metila foram adquiridos junto a Merck (Merck-E, Merck RgaA, Germany). Os padrões de ocratoxina A e B, albumina de soro humano e solução a 25% (m/v) de glutaraldeído, sílica gel (com tamanho de partícula de 10 μ m e poros de 100Å), 3-cloropropiltrimetoxisilano, foram adquiridos junto a Sigma-Aldrich, (Sigma-Aldrich Chemical Company, USA).

▪ Preparo da solução de ocratoxina A (OTA)

Toda a massa do padrão (5,0mg), contida no frasco, foi solubilizada e avolumada a 10,0 mL de metanol (grau CLAE) gerando uma solução estoque com uma concentração de 498 mg.L⁻¹. A concentração real foi determinada segundo o método da AOAC - 970.44 (SCOTT, 1997).

Novas diluições foram efetuadas obtendo-se concentrações de 0,25 mg.L⁻¹ e 0,015 μ g.L⁻¹.

- **Preparo da solução de ocratoxina B (OTB)**

Toda a massa do padrão (1,0mg), contida no frasco foi solubilizada e avolumada a 10,0 mL de metanol (grau CLAE) gerando uma solução estoque com uma concentração de 101 mg.L⁻¹. A concentração real foi determinada segundo o método da AOAC - 970.44 (SCOTT, 1997).

Novas diluições foram efetuadas obtendo-se concentrações de 0,25 mg.L⁻¹ a 0,015 µg.L⁻¹.

Todas as soluções contendo as micotoxinas foram mantidas congeladas a -20 °C.

3.1.2. Amostras de cervejas

As amostras de cervejas foram adquiridas no comércio de Bauru, Estado de São Paulo e região. Das cervejas líderes de mercado foram analisadas 3 amostras diferentes de cada marca, das demais apenas uma amostra foi analisada.

Foram analisadas 42 amostras de cervejas, no período de maio a agosto de 2005; além de 09 amostras de cervejas importadas comercializadas nesta mesma região, sendo: 03 da Alemanha, 02 do México, 01 Argentina, 01 Canadá, 01 da Holanda e 01 do Japão. Entre as cervejas analisadas estão relacionadas cervejas do tipo Pilsen, cervejas escuras e sem álcool.

- **Preparo da amostra para a análise de ocorrência de ocratoxinas**

Uma amostra de 50 mL de cerveja, foi desaerada em banho ultrassônico por 30 minutos, à seguir foi diluída na proporção de 1:5 (cerveja:água destilada) e realizada a determinação.

- **Preparo da amostra fortificada**

Uma amostra de 50 mL de cerveja, considerada amostra controle, foi desaerada em banho ultrassônico por 30 minutos, à seguir foi fortificada com a quantidade calculada para cada nível desejado, após foi diluída na proporção de 1:5 (cerveja:água destilada) e realizada a determinação pela técnica de padrão externo, com auxílio de uma curva padrão construída diariamente (Figura 07).

A diluição da cerveja em água destilada 1:5 foi necessária para se evitar a sobreposição de um pico cromatográfico da cerveja, cujo componente também fica retido na pré-coluna aniônica – ISRP, juntamente com as micotoxinas.

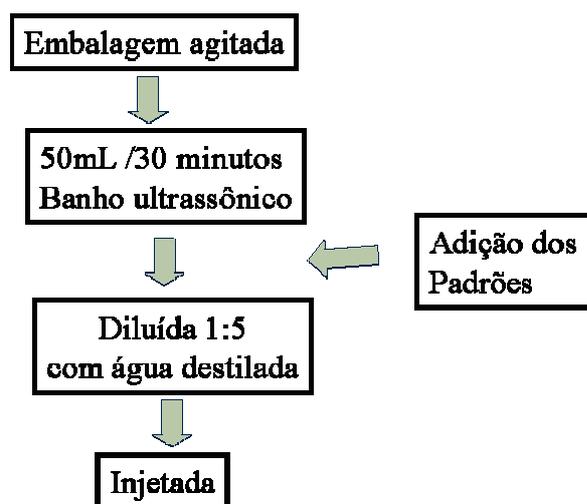


Figura 07 – Esquema representativo do preparo da amostra analítica

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo da colunas C18- ISRP

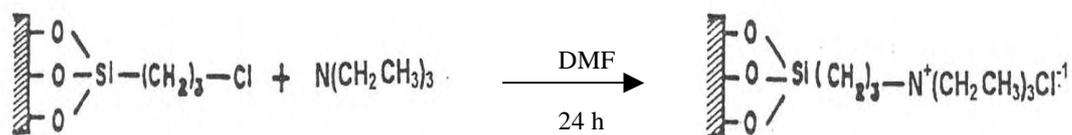
A coluna C₁₈ empregada foi Phenomenex-Luna, adquirida da Labtron (Labtron-Comércio e Representações Ltda), (250 mm x 2,0mm DI) com diâmetro das partículas de 5μ. A imobilização da proteína seguiu o procedimento descrito por MENEZES e FÉLIX (1996), sendo que o mesmo foi também empregado para a coluna aniônica sintetizada.

3.2.2. Coluna aniônica-ISRP

O preparo desta coluna para posterior imobilização de proteína seguiu várias etapas:

a. Síntese da 3-cloropropilsilano sílica gel

Esta fase estacionária foi obtida fazendo-se reagir o grupo orgânico trietilamina com o 3-cloropropil sílica gel, previamente preparado. A reação química ocorreu de acordo com a equação química abaixo:



Para 20,0g de sílica gel previamente ativada (mantida sob vácuo por 24 horas a uma temperatura de 180 °C), foram adicionados 50,0 mL de uma solução contendo

10% (v/v) de 3-cloropropiltrimetoxissilano dissolvido em xileno. A mistura foi mantida sob refluxo e agitação mecânica por 24 horas. O produto obtido foi filtrado e lavado com xileno seguido por porções de acetona. A sílica gel obtida foi mantida em estufa a 80 °C por 12 horas (Figura 08).

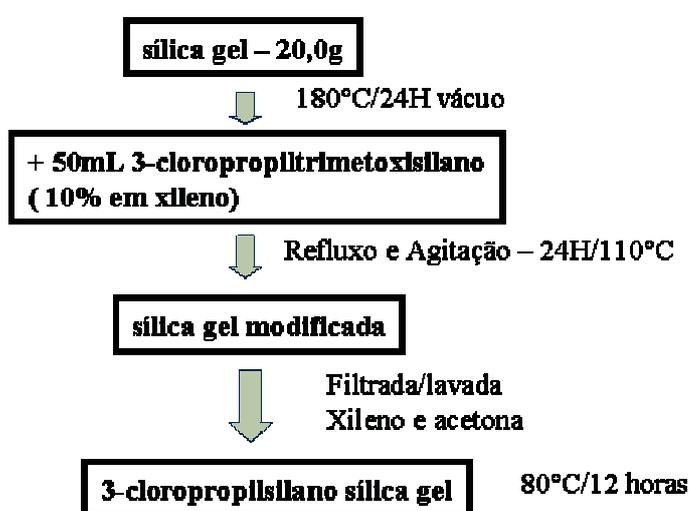


Figura 08 – Esquema representativo da síntese da 3-cloropropilsilano sílica gel

b. Síntese da fase estacionária cloreto de N,N-propiltriethylaminônio silano

Para 8,0 g de sílica 3-cloropropilsilano foram adicionados 50,0 mL de uma solução a 10% (v/v) de trietilamina dissolvida em dimetilformamida. A mistura foi mantida sob agitação mecânica por 24 horas, a temperatura ambiente (25 °C). O mesmo procedimento foi realizado mantendo o sistema reacional sob refluxo por 24 horas a uma temperatura constante de 60°C. Os produtos obtidos foram filtrados e lavados com porções de dimetilformamida seguido por porções de acetona. As fases

estacionárias obtidas foram mantidas em dessecador, sob vácuo por 24 horas em temperatura ambiente (Figura 09).

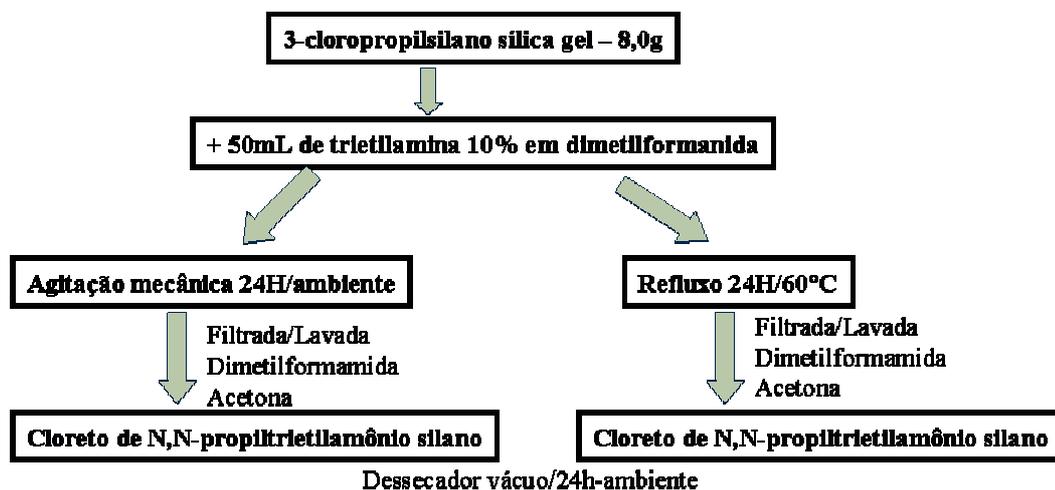


Figura 09 – Esquema representativo da síntese da fase estacionária cloreto de N,N-propiltriethylaminônio silano

c. Caracterização das fases estacionárias

c.1. Análise elementar – Determinação dos teores de C, N e H.

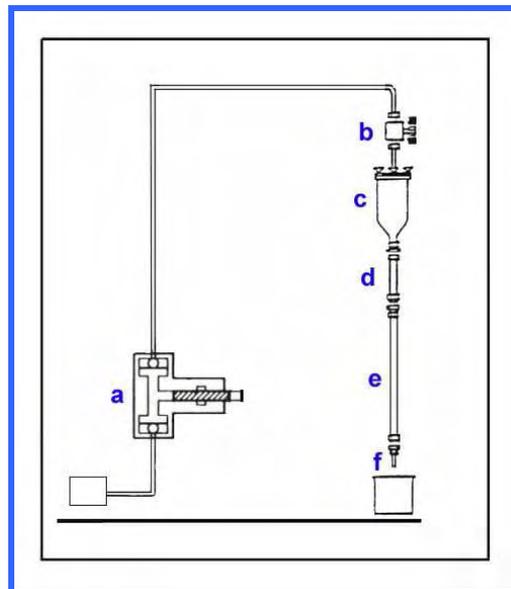
As amostras, para efetuar as referidas determinações, foram enviadas para o laboratório de multiusuários, junto ao Instituto de Química – UNESP, Campus de Araraquara. As determinações foram efetuadas empregando um equipamento de análise elementar, modelo EA 1110 da CHNSO-CE Instruments.

c.2. Obtenção dos espectros na região do infravermelho.

Os espectros na região do infravermelho para a caracterização das fases estacionárias sintetizadas foram obtidos junto ao Laboratório de Química Inorgânica – UNESP, Campus de Araraquara.

d. Empacotamento da coluna cromatográfica.

A coluna cromatográfica foi empacotada efetuando-se a suspensão de 2,0g da fase estacionária aniônica em uma solução composta por solução tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ e acetonitrila (50:50 v/v). Após a eliminação de bolhas de ar com auxílio de banho de ultrassom, a suspensão foi transferida rapidamente para um reservatório denominado “*slurry packer*”, onde foi previamente conectado o tubo de aço inoxidável (coluna cromatográfica) e este conectado a bomba do sistema CLAE. Procedeu-se o empacotamento na forma ascendente sob uma pressão de 250 atmosferas, empregando acetonitrila como solvente de eluição. A figura 10 esquematiza o sistema empregado para empacotar a coluna.



- a – bomba pneumática (CLAE)
- b – válvula de alta pressão
- c – slurry packer
- d – tubo de aço
- e – coluna a ser empacotada
- f – filtro metálico da coluna a ser empacotada

Figura 10 – Esquema utilizado para empacotar as colunas cromatográficas (GARCIA, 2001).

3.2.3. Imobilização da albumina de soro humano *in situ* sobre a superfície da fase estacionária Si-C18 e da fase estacionária cloreto de N,N-propiltriethylamônio silano

Para as duas colunas empregadas foi feita a imobilização da proteína conforme protocolo de MENEZES e FÉLIX (1996).

A imobilização da proteína *in situ* foi efetuada instalando-se a coluna cromatográfica em um sistema gradiente de cromatografia líquida de alta eficiência, modelo Pro star Polaris, adquirido junto a Varian (Varian Associates, Inc., Sunnyvale, USA), equipado com um detector de Uv-visível, com comprimento de onda ajustado em 220nm. Inicialmente lavou-se a coluna cromatográfica com acetonitrila grau CLAE, por 15 minutos, seguido por água deionizada por mais 15 minutos sob um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹.

A coluna cromatográfica foi condicionada com uma solução tampão de fosfato 0,05 mol.L⁻¹, pH 6,0, por 15 minutos. Foi eluída a um fluxo de 0,5mL.min⁻¹ uma solução de albumina de soro humano com concentração de 2,0 g.L⁻¹, preparada em solução tampão de NaH₂PO₄ 0,05 mol.L⁻¹ (pH 6,0), durante 30 minutos. Lavou-se a coluna com solução tampão de NaH₂PO₄ 0,05 mol.L⁻¹ (pH 6,0), por 15 minutos, seguido por água deionizada. Eluiu-se a referida coluna cromatográfica com uma fração de 10,0 mL de glutaraldeído a 25% (m/v), sob o fluxo de 0,5 mL.min⁻¹.

Após um repouso de 5 horas, lavou-se a coluna com água deionizada por 15 minutos, seguido por uma solução de boridreto de sódio 1,0g.L⁻¹, até se coletar um eluato com pH 10. Esta foi mantida em repouso por duas horas, a seguir, a coluna cromatográfica foi lavada com água por 60 minutos seguido por fase móvel composta

por acetonitrila:solução tampão de fosfato 0,05 mol.L⁻¹(pH 6,0) (50:50 v/v) por 15 minutos, seguido por água deionizada. Após este procedimento a coluna cromatográfica pode ser caracterizada como ISRP.

A Figura 11 mostra o fluxograma do preparo da coluna.

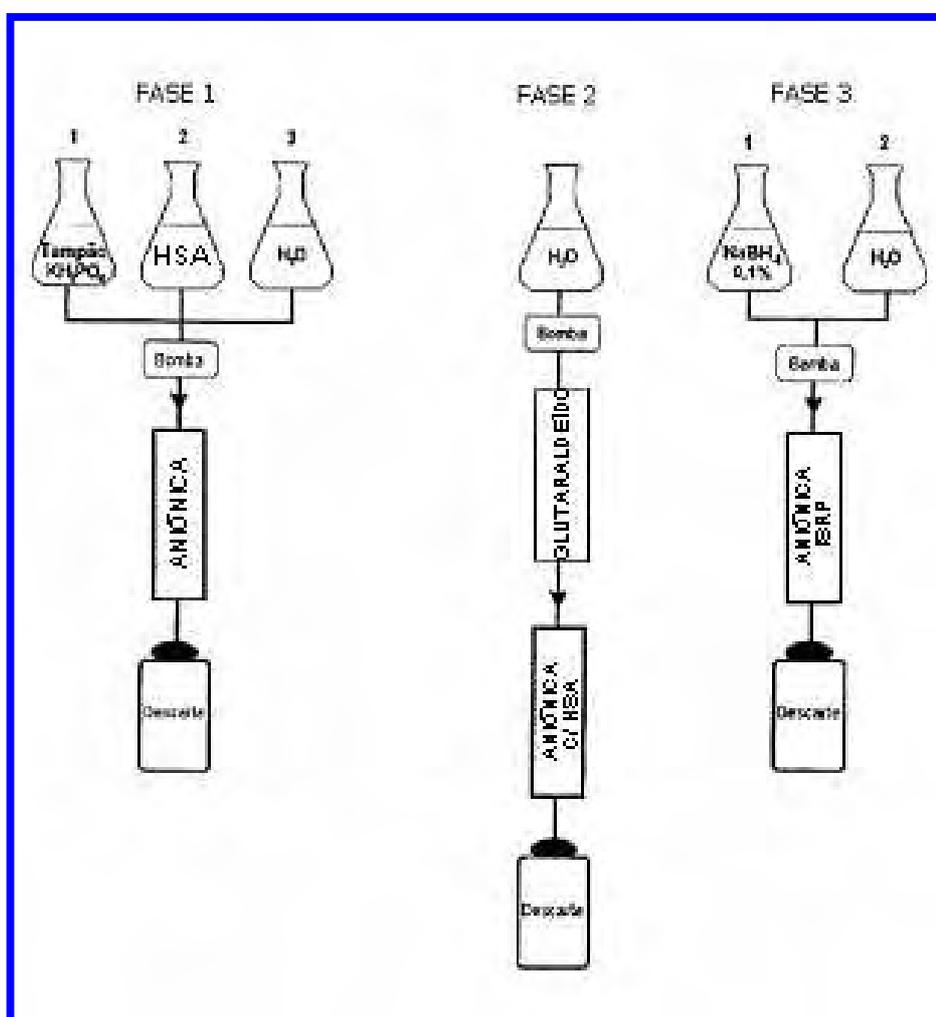


Figura 11 – Fases do preparo da coluna ISRP-HSA(C₁₈ e aniônica).

A avaliação da imobilização da proteína sobre a superfície da fase estacionária foi efetuada injetando-se 1000µL de uma solução a 1% de albumina de soro humano,

empregando a fase móvel composta por solução aquosa de ácido acético 2% : acetonitrila (60:40 v/v).

3.2.4. Otimização Cromatográfica

- **Instrumentação**

Os experimentos cromatográficos foram realizados sob condições isocráticas em um sistema gradiente de cromatografia de alta eficiência (Varian, Modelo Pro Star Polaris), equipado com duas bombas tipo seringa, um sistema controlador eletrônico (MIB), um detector espectrofotométrico de absorção na região do ultravioleta-visível, um detector espectro de fluorescência, e uma estação de tratamento de dados (Workstation -Computador Pentium IV - Dell), (Figura 12). As soluções-padrão foram injetadas em uma válvula de injeção Rheodyne 7125 , (Cotati, CA, USA). Foi utilizada uma alça de injeção com volume de 1000 μ L.

Para o emprego da pré-coluna, Fase 2 deste projeto, uma segunda válvula Rheodyne 7000, (Cotati, CA, USA), foi empregada para efetuar a mudança de fluxo para a segunda fase móvel, empregando a técnica de *column switching* de acordo com o modelo apresentado na Figura 13. A coluna analítica empregada posteriormente à coluna ISRP – aniônica foi uma coluna cromatográfica, marca Phenomenex, Gemini C₁₈, 5 μ m, 110 Å, (250 mm x 2,0 mm DI).

É necessário relatar que este equipamento possui uma limitação para o emprego de gradiente, pois a cabeça da bomba e o misturador não são adequados para a vazão empregada em colunas com proteína imobilizada, ou seja, vazões de 0,4 mL a 1,0 mL.



Figura 12 – Cromatógrafo de alta eficiência Varian, Modelo Pro Star Polaris.

Fase I: Injeção da amostra de cerveja na coluna de troca aniônica –ISRP.
 Pré-concentração das ocratoxinas A e B.
 FM: água pura Vazão: 1,0 mL.min⁻¹

Fase II: Transferência das OTA e OTB para a coluna analítica.
 FM: acetoneitrila:HCl 1% (40:60 v/v)
 Vazão: 0,4 mL.min⁻¹

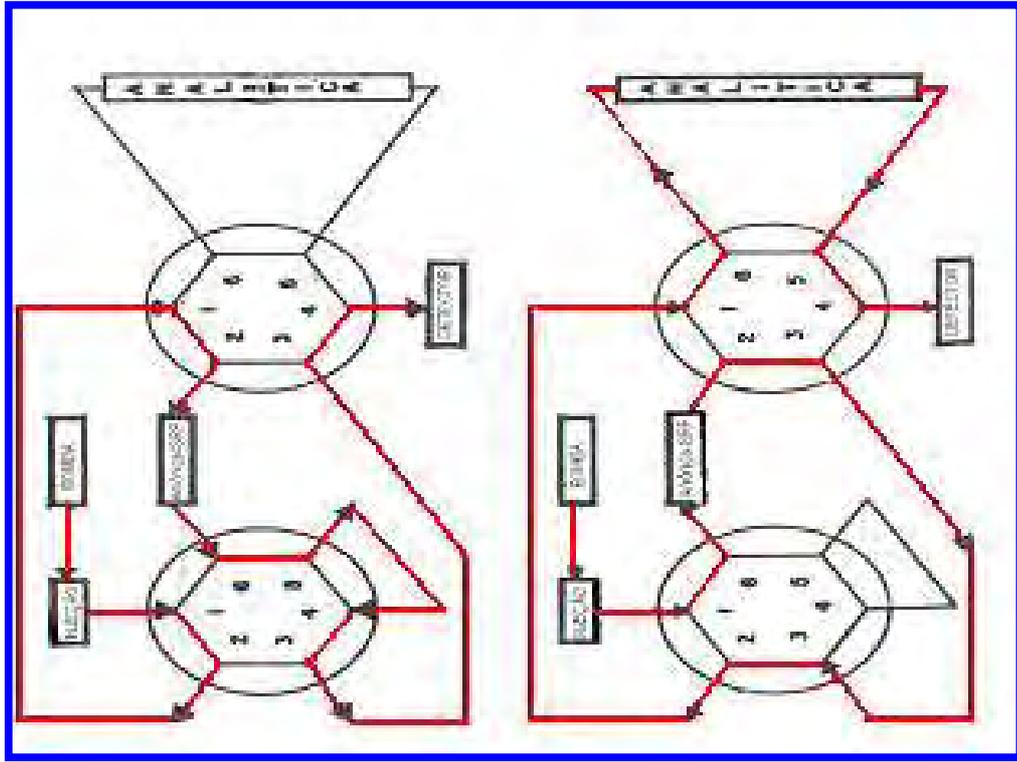


Figura 13– Representação do *column switching system*, para transferências das ocratoxinas A e B para a coluna analítica

3.2.5. Validação da metodologia proposta

A metodologia proposta foi validada através do estudo dos seguintes parâmetros:

- **Seletividade:** através da comparação dos cromatogramas da matriz isenta e da matriz adicionada dos padrões.
- **Linearidade do detector:** Para a determinação da linearidade do detector, empregando a alça de 1000 μ L, foram injetadas concentrações decrescentes das ocratoxinas, em sextuplicata.
- **Recuperações obtidas e o CV:** Foram avaliadas as recuperações em cinco níveis de fortificação para cada micotoxina estudada. A análise foi executada em quadruplicata.
- **Linearidade do Método:** Com os valores obtidos nos ensaios de recuperação foi elaborada uma curva analítica para a verificação da linearidade do método.
- **Limite de Detecção e Quantificação:** Os métodos visual e da relação sinal ruído foram empregados para esta determinação.
- **Confirmação do analito:** Segundo SOARES, 2001, a cromatografia é um poderoso método de separação de compostos, mas não de identificação. Uma coincidência de tempos de retenção entre o analito e o padrão significa que o analito talvez seja o mesmo composto que o padrão. A Co-cromatografia, técnica em que adiciona-se uma quantidade de padrão na amostra e depois verifica-se se a área do pico aumentou, é um presuntivo positivo, mas ainda seria importante uma maior confirmação

3.2.6. Tratamento dos resíduos

Por se tratar de uma análise de substância muito tóxica, todos os cuidados analíticos devem ser tomados. SCOTT e LAWRENCE (1997), indicam que toda a vidraria empregada na análise deve ser enxaguada com metanol e adicionada de hipoclorito de sódio a 1%, após duas horas deve-se adicionar acetona a 5% do volume total, e após 30 minutos deve-se enxaguar e lavar normalmente a vidraria.

SCUSSEL (1998), sugere a imersão das vidrarias em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 24 horas, seguida de enxágüe e posterior limpeza manual.

Os resíduos líquidos obtidos durante a análise foram reservados em frascos de vidro, com volume não superior a 2/3 do volume total do frasco, para posterior incineração.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Coluna ISRP – C₁₈ - HSA

4.1.1. Protocolo de avaliação da coluna cromatográfica ISRP- C18-HSA

Inicialmente foi preparada apenas a coluna ISRP – C₁₈ – HSA, conforme protocolo descrito por MENEZES E FÈLIX (1996), a imobilização da HSA foi realizada *in situ*, eluindo-se uma solução de HSA (2mg. mL⁻¹, pH 6,0), como pode ser visto na Figura 10, na página 61.

Para estabilizar a proteína imobilizada, foi efetuada a reação da desta com glutaraldeído 25% (v/v). Em seguida, para evitar possível hidrólise da dupla ligação das bases de Schiff formadas e evitar reações posteriores com os grupos aldeído residuais, esses grupamentos foram reduzidos com uma solução de 0,1% (m/v) de borohidreto de sódio, de acordo com o esquema apresentado na Figura 14. Após duas horas, a coluna foi eluída com água por uma hora, seguida por uma fase móvel composta por acetonitrila: tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹, pH6,0 (50:50 v/v) por 30 minutos. Portanto, assim a referida coluna cromatográfica está preparada para ser utilizada.

- **Avaliação da imobilização da albumina de soro humano sobre a superfície da fase estacionária**

O sistema de testes com qualquer tipo de coluna seja ela de cromatografia gasosa convencional ou líquida de alta eficiência, ou mesmo de cromatografia com fluído supercrítico, apresenta-se como uma etapa necessária, para que se possam avaliar as condições gerais de empacotamento, a eficiência da coluna e principalmente avaliar a imobilização da albumina de soro humano sobre a superfície da fase estacionária aniônica.

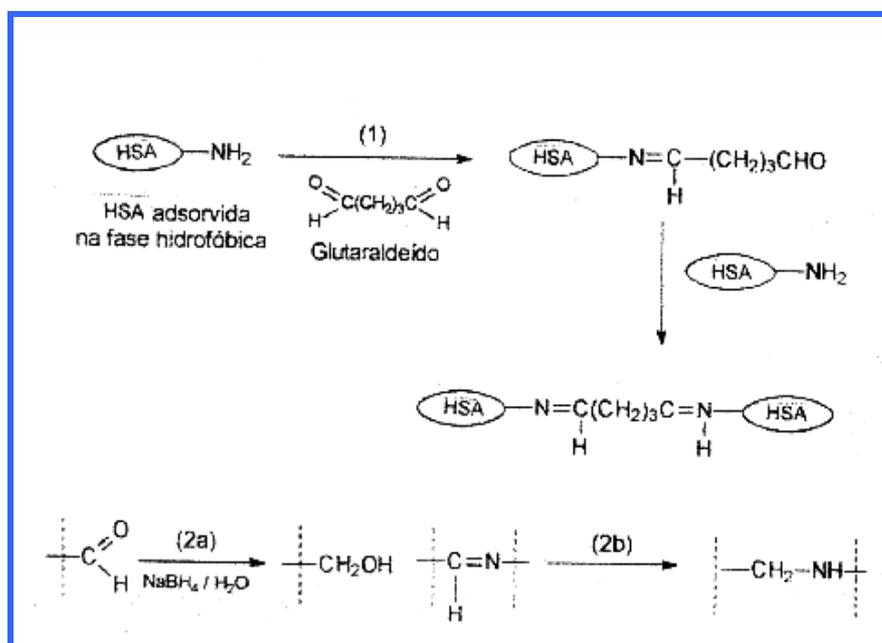


Figura 14 - Estabilização da camada de HSA immobilizada em fases hidrofóbicas; (1) intercruzamento da HSA com glutaraldeído; (2) redução de grupamentos aldeídos residuais (a) e das bases de Schiff (b) com borohidreto de sódio.

A determinação dos teores de proteínas immobilizadas sobre a superfície da fase estacionária pode ser efetuada desmontando-se a coluna e determinando-se o teor de nitrogênio elementar na amostra da fase estacionária. Todavia, adotou-se um outro método, que consistiu na injeção de amostras de material biológico.

A avaliação da imobilização da albumina de soro humano sobre a superfície da sílica indicou que os tempos de retenção das proteínas contidas nas amostras de plasma foram eluídas em um período de tempo inferior ao tempo de eluição das ocratoxinas, indicando que a imobilização da proteína de soro humano (HSA) sobre a superfície da sílica foi adequada.

- **Condições cromatográficas.**

A nova coluna cromatográfica foi avaliada determinando-se os parâmetros, do cromatograma obtido após a injeção de 1000 μ L de uma solução-padrão contendo 1,25 μ g.L⁻¹ das ocratoxinas A e B. Os valores obtidos foram satisfatórios (Tabela 05).

Tabela 05-Número de pratos teóricos (N), resolução (Rs), fator de capacidade (k) e assimetria de pico (As_{0,1}) das ocratoxinas, empregando a coluna cromatográfica ISRP-HSA.

Ocratoxinas	tr (min)	N (m)	Rs	K	As _{0,1}
Ocratoxina A	6,170	15227	2,90	1,12	1,0
Ocratoxina B	3,727	12016	---	0,28	1,2

De acordo com os valores observados na Tabela 05, o número de pratos teóricos calculados para a referida coluna cromatográfica ISRP-HSA são considerados adequados. Após a imobilização da albumina de soro humano sobre a superfície das partículas esféricas da fase estacionária C₁₈ ocorreu a redução dos sítios ativos da referida fase estacionária, ocasionando diminuição do número de pratos teóricos.

Os valores de coeficientes de assimetria em torno de 1,0 a 1,5 são considerados excelentes (CIOLA, 1998). Assim, de acordo com os valores obtidos, pode-se inferir que a coluna cromatográfica apresentou uma excelente performance cromatográfica.

Os valores de resolução acima de 1,5 indicam que dois analítos têm uma separação até a linha de base, fato importante em análises quantitativas, pois a medida exata da área depende da resolução total dos analítos envolvidos. Ainda os valores inferiores a 1,5 significam que a separação somente é parcial (CIOLA, 1998). Sendo assim, de acordo com os resultados expressos na Tabela 5 pode inferir-se que a coluna

cromatográfica permitiu excelente separação das ocratoxinas.

Os valores de k determinados encontram-se em torno de 1,12, ocorrendo portanto pouca interação dos analitos com a fase estacionária. Porém estes resultados são satisfatórios considerando a performance cromatográfica obtida.

A avaliação da imobilização da albumina de soro humano sobre a superfície da sílica indicou que os tempos de retenção das proteínas contidas nas amostras de plasma e de cerveja foram eluídas em um período de tempo inferior ao tempo de eluição das ocratoxinas, indicando que a imobilização da proteína de soro humano (HSA) sobre a superfície da sílica foi adequada.

A otimização da fase móvel foi obtida após o ensaio de diferentes concentrações de acetonitrila e os diferentes ácidos e solução aquosa de fosfato básico de sódio, empregados nas avaliações. Observou-se que apenas a ocratoxina A sofre influência do pH. Neste caso foi avaliada a separação das ocratoxinas empregando a fase móvel composta por acetonitrila:fosfato básico de sódio $0,025 \text{ mol.L}^{-1}$ (55 : 45 v/v), diminuindo a sensibilidade de detecção da referida ocratoxina, mas não alterou o tempo de retenção das ocratoxinas. Os ensaios com as soluções dos diferentes ácidos inorgânicos, tais como: solução aquosa contendo $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido perclórico, solução aquosa contendo $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido fosfórico e solução aquosa contendo $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido clorídrico, em todos estes experimentos, a eluição dos picos apresentou uma grande quantidade de ruídos. A fase com melhores resultados foi acetonitrila:solução aquosa de ácido acético 2% (v/v), (60:40).

Uma vez otimizada a fase móvel, avaliou-se o melhor comprimento de onda para excitação, objetivando adequar um valor único para a determinação simultânea das OTA e OTB. De acordo com a Figura 15, observou-se que o comprimento de onda que

apresentou o melhor resultado foi de 325 nm para excitação das ocratoxinas. O comprimento de onda para emissão, também foi avaliado, mas não apresentou alterações expressivas, comparado aos comprimentos de onda relatados na literatura. Portanto, este foi fixado em 460 nm.

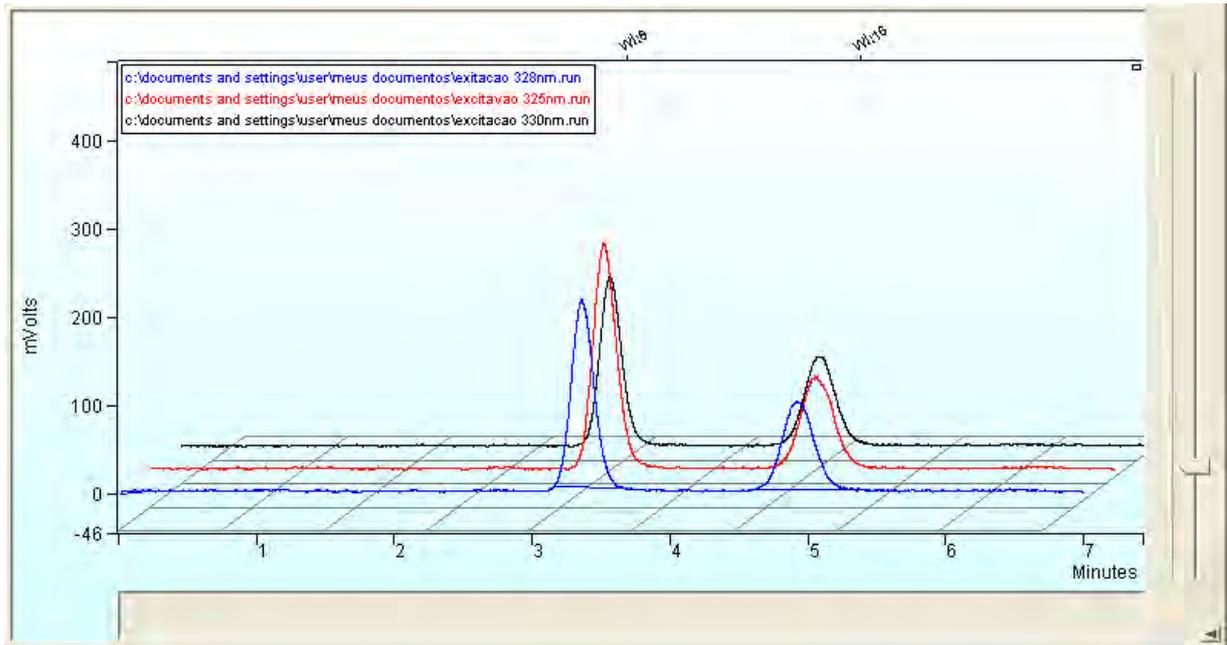


Figura 15 – Cromatogramas obtidos para a avaliação do comprimento de onda para excitação das ocratoxinas A e B.

A separação das ocratoxinas foi realizada à temperatura ambiente, com uma vazão da fase móvel ajustada em $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.1.2. Avaliação da coluna ISRP – C18 - HSA com amostras de cerveja

Nos testes preliminares foi observado que para separar e quantificar as ocratoxinas A e B, presentes em amostras de cervejas, um pico cromatográfico de

interferentes co-eluiu sobrepondo o pico cromatográfico das mesmas. Vários esforços foram feitos, como alterações de fases móveis, alterações de comprimento de onda no detector, diluição das amostras, etc., sem sucesso.

Assim foi necessária a utilização de uma pré-coluna ISRP – aniônica – HSA, para que fosse possível reter as ocratoxinas nesta pré-coluna, e em seguida as mesmas serem eluidas para uma coluna cromatográfica analítica. A escolha de uma coluna de troca aniônica para se empregar na pré-concentração das ocratoxinas A e B foi baseada no princípio de que em ambas as moléculas há um grupo carboxila. Desta forma, empregar uma fase estacionária contendo um radical de amônio quaternário foi a solução encontrada para resolver o problema dos interferentes.

4.2. Coluna ISRP – aniônica - HSA

4.2.1. Caracterização das fases estacionárias:

- **Análise elementar de nitrogênio, carbono e hidrogênio:**

Os resultados obtidos pela análise elementar de nitrogênio, carbono e hidrogênio das amostras das fases estacionárias são apresentados na Tabela 6.

Tabela 06 – Valores percentuais obtidas na análise elementar das amostras das fases estacionárias.

Fase Estacionária	Nitrogênio (% m/m)	Carbono (% m/m)	Hidrogênio (% m/m)
$\text{SiO}(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Cl}^-$	0,35	11,34	2,43
* $\text{SiO}(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Cl}^-$	0,30	5,04	1,62

* Síntese efetuada a uma temperatura constante de 60 °C.

A partir destes valores, observa-se que ambas as fases estacionárias foram sintetizadas, porém a fase estacionária sintetizada a temperatura ambiente, apresentou um melhor rendimento.

- **Espectros de absorção na região do infravermelho:**

FULCHER et al., 1981, relataram que as limitações do espectro na região do infravermelho dificultam a caracterização dos grupos funcionais quimicamente ligados a superfície da sílica gel, devido as absorções da matriz sílica, as quais mascaram as absorções dos grupos funcionais em algumas regiões dos espectros.

Apesar destas limitações, pode-se verificar que o espectro na região do infravermelho da fase estacionária cloreto de N,N-propiltriethylamônio silano (Figura 16), apresenta bandas de absorção características, quando compara-se com o espectro de absorção na região do infravermelho do reagente trietilamina, Figura17.

Cabe ressaltar que as bandas espectrais mais importantes foram observadas nos intervalos de 3000 a 800 cm^{-1} . No espectro do reagente trietilamina, Figura17, destacam-se as bandas em 2970 e 2754 cm^{-1} referente à deformação axial do C-H alifático. O mesmo espectro apresenta uma banda de absorção intensa em 1382 e 736 cm^{-1} referente à deformação angular simétrica de N-C e duas bandas de absorção em 1467 e 1204 cm^{-1} , referentes a deformação simétrica de CH_2 e estiramento simétrico C-N respectivamente.

A Figura 16, apresenta uma banda de absorção em 1734 e 801 cm^{-1} referentes à formação do amônio quaternário.

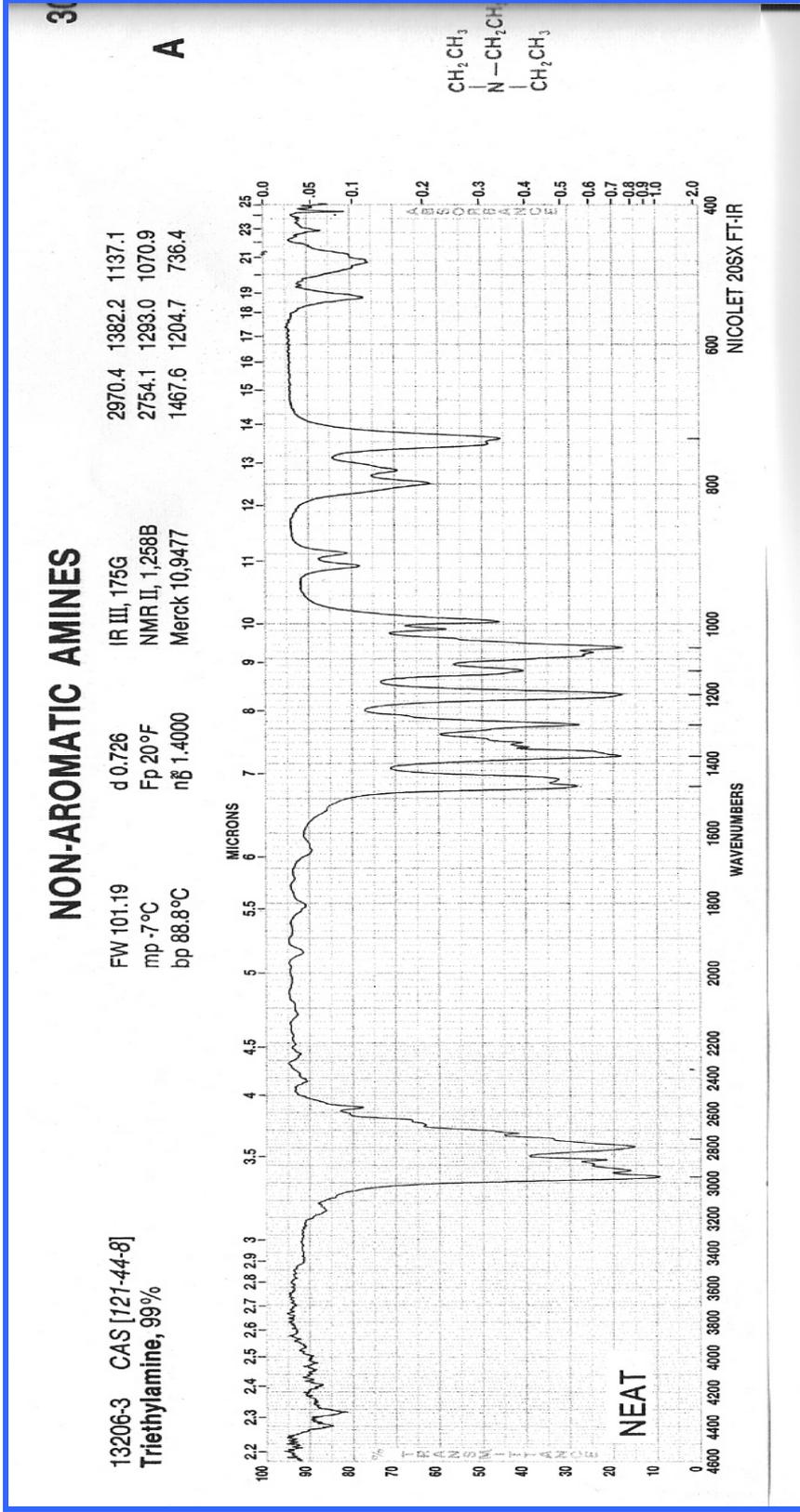


Figura 16 – Espectro de absorção na região do infravermelho do reagente trietilamina .

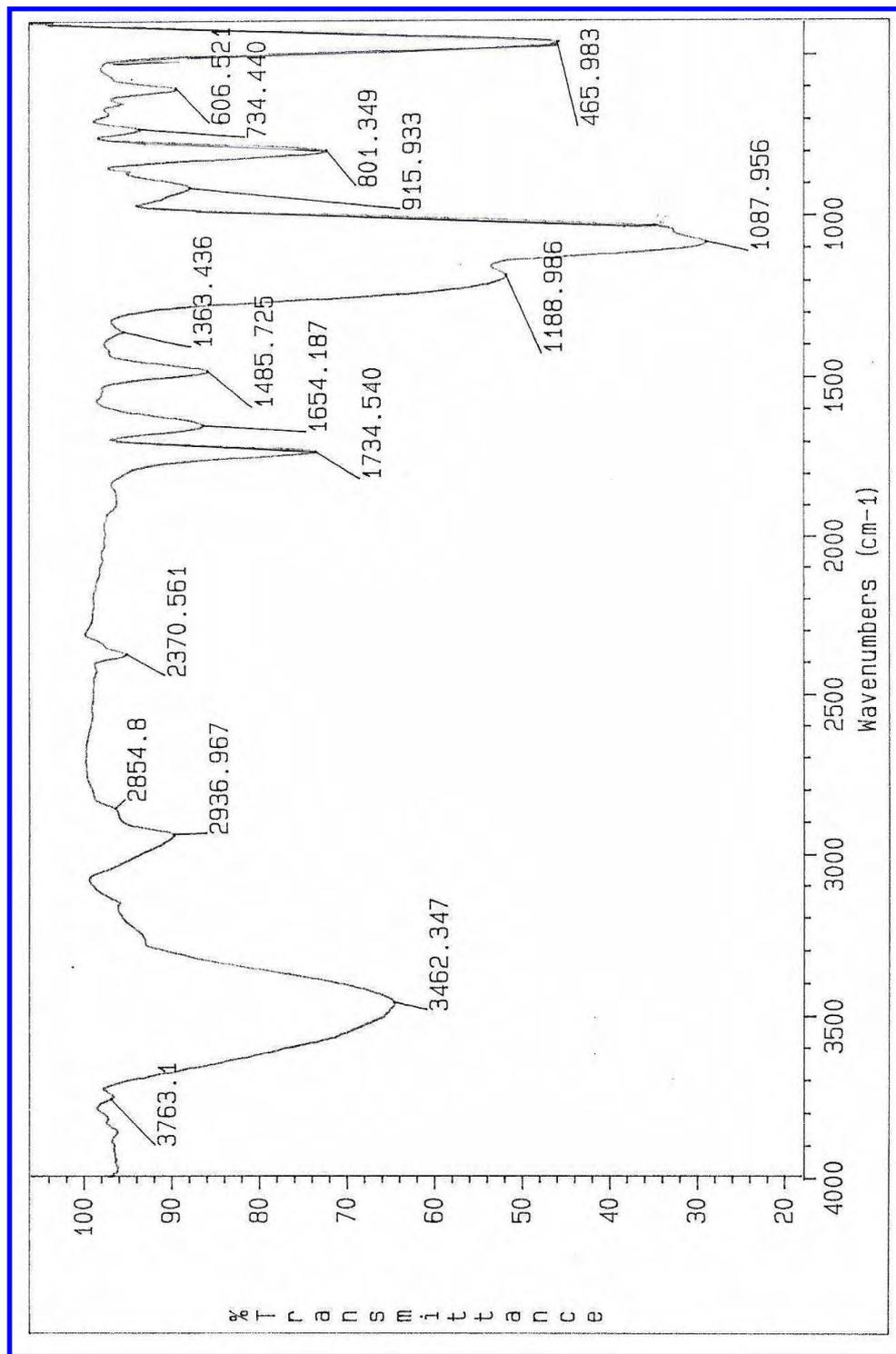


Figura 17 – Espectro de absorção na região do infravermelho da fase estacionária N,N-propiltriethylamônio silano.

Comparando-se os espectros de infravermelho da fase estacionária e o reagente trietilamina, observou-se que ocorrem as mesmas absorções em ambos os espectros analisados, exceto a banda de absorção em 1734cm^{-1} . Desta forma conclui-se que houve a formação do amônio quaternário desejado na referida fase estacionária.

4.2.2. Imobilização da HSA na coluna aniônica

- **Avaliação da imobilização da albumina de soro humano sobre a superfície da fase estacionária aniônica.**

De acordo com o ensaio realizado, injetando-se $1000\mu\text{L}$ de uma solução aquosa contendo 1% de albumina de soro humano, na coluna aniônica-ISRP, seguido pela eluição empregando a fase móvel ácido acético 2% (v/v) : acetonitrila (60:40 v/v), constatou-se que a mesma mostrou-se eficiente com relação a imobilização de proteínas sobre a superfície externa das partículas da fase estacionária. Uma segunda avaliação foi efetuada injetando-se $1000\mu\text{L}$ de uma amostra de cerveja fortificada com soluções-padrão: $0,8\mu\text{g.L}^{-1}$ das ocratoxinas A e B. Observou-se que as ocratoxinas ficaram retidas na coluna cromatográfica, eluindo-se apenas as proteínas e outros componentes presentes na amostra de cerveja.

4.2.3. Otimização Cromatográfica

A otimização da fase móvel foi obtida em duas etapas:

Inicialmente ensaiaram-se várias composições de sistemas de fases móveis que possibilitassem que as impurezas da cerveja fossem eluidas, retendo-se apenas as ocratoxinas. Após vários ensaios, concluiu-se que o emprego de água pura, como fase

móvel, empregando a bomba A, foi a mais adequada para garantir a eluição completa dos interferentes e retenção das ocratoxinas na coluna aniônica.

Na segunda etapa, avaliou-se a composição de diferentes concentrações de acetonitrila e os diferentes ácidos inorgânicos e orgânicos bem como uma solução aquosa de fosfato básico de sódio. Observou-se que a fase móvel composta por acetonitrila: solução aquosa de ácido clorídrico 1,0% (v/v), (40:60 v/v), foi a mais adequada para efetuar a extração e separação das ocratoxinas A e B presentes em amostras de cervejas.

4.2.3.1. Avaliação da coluna cromatográfica analítica C₁₈

A coluna cromatográfica Gemini C₁₈ 5 µm (250 mm x 2,0 mmDI) em série com a coluna cromatográfica aniônica-ISRP, foi avaliada determinando-se os parâmetros, do cromatograma (Figura 18), obtido após a injeção de 1000µL de uma solução-padrão contendo 0,8 µg.L⁻¹ das ocratoxinas A e B. Os valores obtidos, calculados com relação ao cromatograma, são apresentados na Tabela 07.

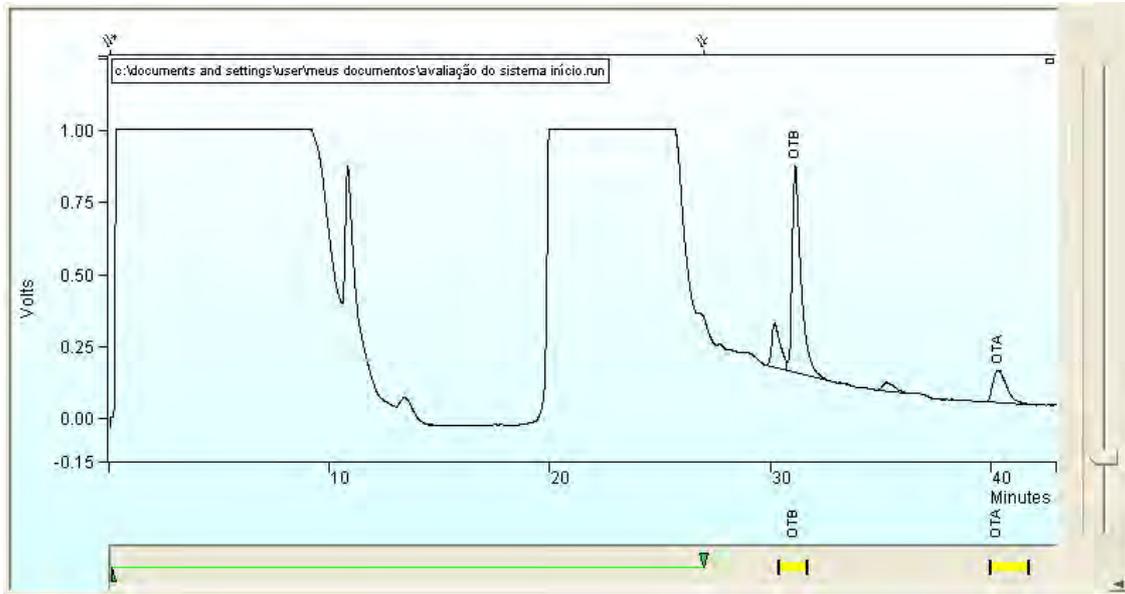


Figura 18 – Cromatograma obtido após a injeção de 1000 μ L de uma amostra de cerveja fortificada com soluções-padrão de ocratoxinas A e B (0,8 μ g.L⁻¹). **Fase I:** FM: água pura Vazão: 1,0 mL.min⁻¹. **Fase II:** FM: acetonitrila:HCl 1% (40:60 v/v) Vazão: 0,4 mL.min⁻¹. Detector de fluorescência: Em 325 nm Ex 460nm.

Tabela 07 – Número de pratos teóricos (N), resolução (Rs), fator de capacidade (k) e assimetria de pico ($As_{0,1}$) das ocratoxinas, empregando a coluna cromatográfica C₁₈.

Ocratoxinas	tr (min)	N (m)	Rs	K	$As_{0,1}$
Ocratoxina A	40,348	143087	5,1	39,35	1,0
Ocratoxina B	31,121	259848	1,4	30,12	1,0

De acordo com os valores observados na Tabela 7, o número de pratos teóricos calculados para a referida coluna cromatográfica aniônica-ISRP, ligada em série com uma coluna cromatográfica C₁₈ são considerados adequados, uma vez que nesta não foi imobilizada proteína de soro humana na superfície externa das partículas da fase estacionária. Os valores de coeficientes de assimetria em torno de 1,0 a 1,5 são

considerados excelentes (CIOLA, 1998). Assim, de acordo com os valores obtidos, pode-se inferir que a coluna cromatográfica apresentou um excelente desempenho cromatográfico.

Os valores de resolução acima de 1,5 indicam que dois analitos têm uma separação até a linha de base, fato importante em análises quantitativas, pois a medida exata da área depende da resolução total dos analitos envolvidos. Ainda os valores inferiores a 1,5 significam que a separação somente é parcial (CIOLA, 1998). Sendo assim, de acordo com os resultados expressos na Tabela 6 pode inferir-se que a coluna cromatográfica permitiu excelente separação das ocratoxinas.

Os valores de k determinados encontram-se em torno de 30,12 e 39,35, ocorrendo portanto muita interação dos analitos com a fase estacionária. Porém estes resultados são afetados pelo tempo de retenção, o qual é elevado devido a fase de limpeza on line do extrato na pré-coluna.

4.3. Validação da Metodologia Proposta

A metodologia proposta consta, portanto, de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, com pré-coluna aniônica-ISRP, seguido por coluna Analítica C₁₈, operando em sistema isocrático, em temperatura ambiente. Alça de injeção de 1000 μ L. Detector de fluorescência: excitação 325nm, e emissão 460 nm.

Com a seguinte programação de fase móvel:

Bomba A: FM: água destilada, vazão 1,0 mL.min⁻¹, por 10 minutos

Bomba B: FM: solução aquosa de ácido clorídrico 1,0% : acetonitrila (60:40) (v/v), vazão 0,4 mL.min⁻¹, por mais 35 minutos.

4.3.1. Seletividade do método

Para avaliar a seletividade do método proposto foi comparado o cromatograma obtido com a matriz isenta das micotoxinas OTA e OTB e o cromatograma da matriz adicionada dos padrões. Como mostra a Figura 19, nenhum interferente elui no tempo de retenção das substâncias de interesse.

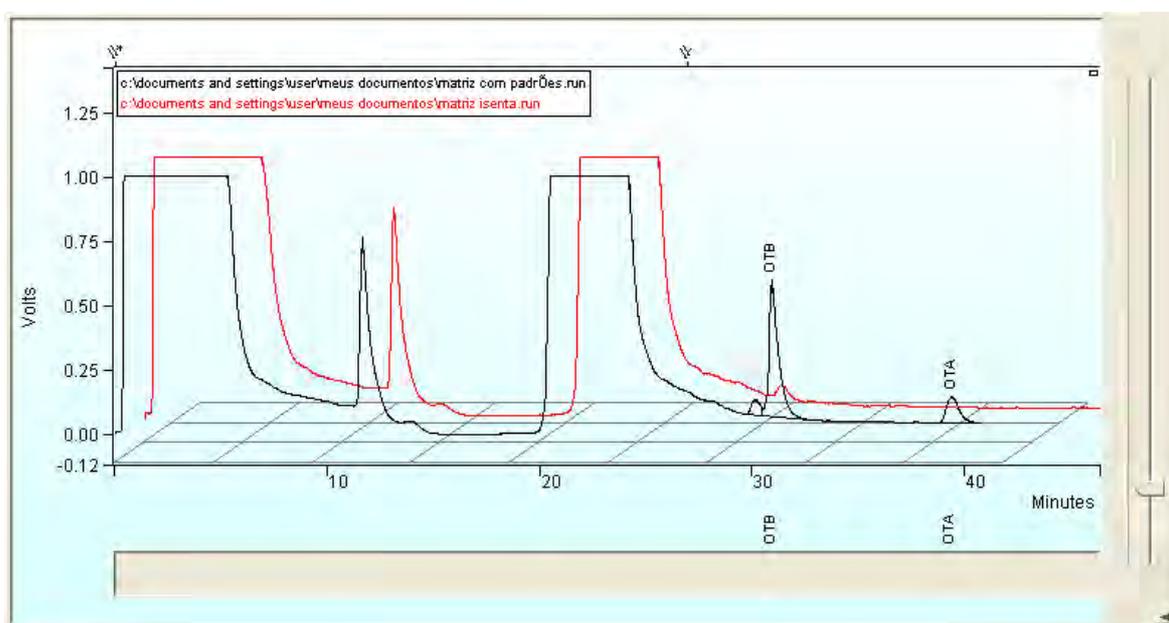


Figura 19 – Cromatograma obtido com matriz isenta e com matriz adicionada dos padrões. Diluição da cerveja 1:5. — Matriz isenta — Matriz adicionada dos padrões

Fase I: FM: água pura Vazão: 1,0 mL.min⁻¹. **Fase II:** FM: acetonitrila:HCl 1% (40:60 v/v)

Vazão: 0,4 mL. min⁻¹. Detector de fluorescência: Em 325 nm Ex 460nm.

4.3.2. Avaliação da Linearidade do Detector

Para a determinação da linearidade do detector empregando a alça de 1000µL, foram injetadas concentrações decrescentes das ocratoxinas, em sextuplicata.

A Tabela 08 apresenta as concentrações empregadas, bem como o Fator de Resposta obtido, o qual apresentou coeficiente de variação (CV) menor que 5% para OTA e OTB, indicando que a resposta do detector aos padrões é linear em toda a extensão da faixa de concentração analisada (RIBANI et al., 2004).

Tabela 08 – Parâmetros das curvas analíticas para OTA e OTB, injetando-se 1000µL de padrão.

OTA			OTB		
Concentração (µg.L ⁻¹)	Área	Fator de Resposta*	Concentração (µg.L ⁻¹)	Área	Fator de Resposta
0,05	531208	10624160	0,25	1315296	5261184
0,1	1016536	10165360	0,5	2443195	4886390
0,2	1823542	9117710	1,0	5209707	5209707
0,4	3927084	9817710	2,0	9340768	4670384
0,8	7638265	9547831	4,0	20000984	5000246
1,6	15429415	9643384	8,0	40814752	5101844
	Média	9819359		Média	5021626
	SD	476870		SD	200547
	CV (%)	4,86		CV (%)	3,99

*Fator de resposta= Área/Concentração detectada

A Figura 20 apresenta a curva analítica para a OTA, e a Figura 21 para OTB. Os coeficientes de correlação (r) foram 0,99992 e 0,9997 para OTA e OTB respectivamente, indicando que há linearidade entre as concentrações (X) e as áreas (Y) dos picos nos intervalos utilizados. A relação de X e Y na curva é expressa como r (coeficiente de correlação), em que os valores ideais esperados são -1 e 1, ou seja, quanto mais próximo da unidade, maior a probabilidade de existir uma relação linear bem definida (LEITE, 1998).

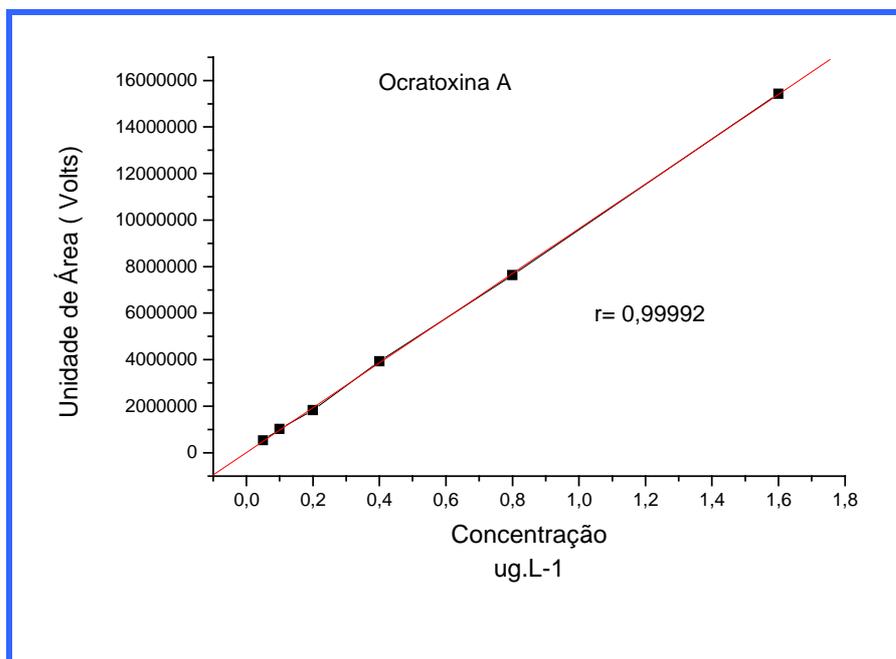


Figura 20- Curvas analítica obtida após a injeção de 1000 μ L da solução-padrão da OTA.

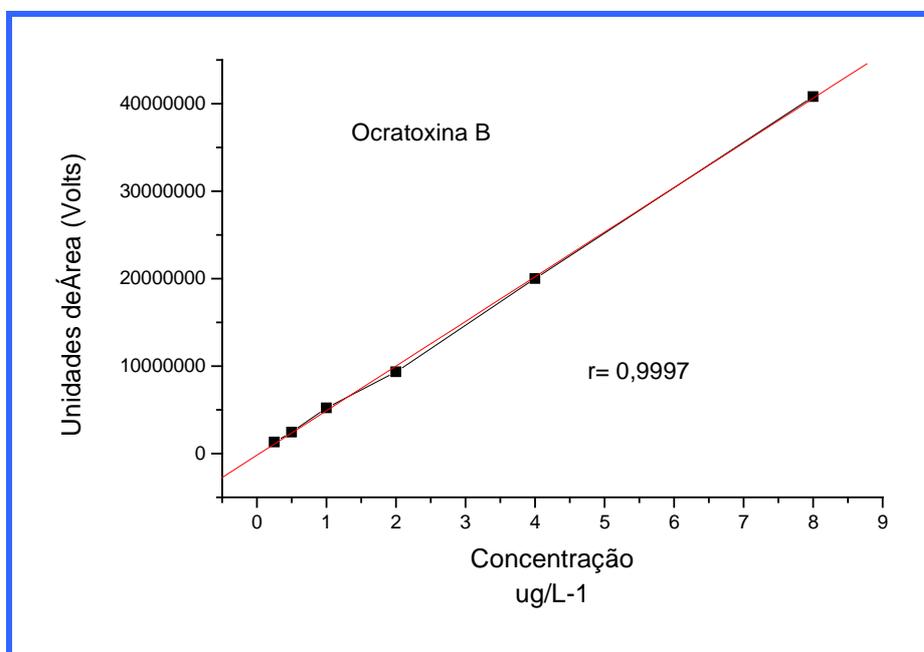


Figura 21- Curvas analítica obtida após a injeção de 1000 μ L da solução-padrão da OTB.

4.3.3. Avaliação da Recuperação do Método

Foram avaliadas as recuperações em cinco níveis de fortificação para cada micotoxina estudada. A análise foi executada em quadruplicata.

- **Recuperações obtidas**

As recuperações obtidas para OTA e OTB são apresentadas nas Tabelas 09 e 10. Foram preparados 5 níveis de fortificação sendo: 0,25 – 0,50 – 1,00 – 2,00 e 4,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para OTA, e 1,25 – 2,50 – 5,00 – 10,0 – 20,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para OTB.

As recuperações obtidas para OTA se apresentaram entre 78,5 e 92,1%, com CV de 5,36 a 11,48%. Para OTB as recuperações foram entre 76,5 e 93,1%, com CV entre 4,04 e 10,72%.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de micotoxinas geralmente estão entre 70,0 e 120%, com precisão de +/- 20% (RODRIGUEZ-AMAYA, 2000), portanto a taxa de recuperação foi considerada boa e o CV dentro do esperado.

Observando-se os valores obtidos para as recuperações de ocratoxinas A e B, estes são excelentes comparados com os métodos relatados na literatura especializada, apresentados na Tabela 3, á partir da página 33, tais como: SCOTT e KANHERE (1995); JORGENSEN (1998); LEGARDA e BURSDASPAL (1998); NAKAJIMA et al., (1999); VISCONTI et al., 2000; e PRADO et al.,2003, os quais efetuaram extrações *off line* empregando colunas de imunoafinidade, obtendo valores de recuperações que variaram de 66 a 113%.

Os autores DEGELMANN et al.,1999, e SOLEAS et al.,2001, também efetuaram extrações *off line* empregando cartuchos SPE, determinando valores de extrações na ordem de 78 a 94%.

É importante ressaltar que o emprego das colunas de imunoafinidade bem como dos cartuchos de SPE, os quais são descartáveis, geram um custo adicional à metodologia empregada, uma vez que estas análises são executadas em laboratórios de rotina, e em número elevado.

Desta forma ressalta-se que no método desenvolvido, efetuam-se as extrações *on line* por injeção direta da amostra contendo ocratoxinas A e B, empregando uma coluna cromatográfica aniônica-ISRP, a qual pré-concentra os analitos.

A pré coluna, no momento da transferência dos analitos para a coluna cromatográfica analítica, é regenerada, uma vez que a eluição é efetuada empregando-se uma fase móvel composta de uma solução aquosa de ácido clorídrico 1,0% (v/v) e acetonitrila (60:40 v/v).

Enfatizamos, portanto, que não há custo adicional na metodologia desenvolvida, uma vez que o tempo de vida da coluna cromatográfica aniônica-ISRP é longo.

Tabela 09 – Recuperação de OTA em amostras de Cerveja Pilsen.

OTA na amostra controle ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	OTA na amostra diluída (1:5) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área	Concentração Detectada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% de Recuperação	Desvio Padrão	C.V. (%)
0,25	0,05	328140	0,033	66,0	9,00	11,48
		412139	0,042	84,0		
		389143	0,039	78,0		
		420180	0,043	86,0		
				$\bar{X} = 78,5$		
0,50	0,1	849153	0,087	87,0	4,65	5,75
		867132	0,079	79,0		
		745687	0,076	76,0		
		789540	0,081	81,0		
				$\bar{X} = 80,8$		
1,00	0,2	1905856	0,197	98,5	9,01	9,78
		1951043	0,202	101,0		
		1676504	0,173	86,5		
		1598174	0,165	82,5		
				$\bar{X} = 92,1$		
2,00	0,4	3158471	0,327	81,8	4,66	5,36
		3485120	0,361	90,3		
		3521480	0,365	91,3		
		3248541	0,336	84,0		
				$\bar{X} = 86,8$		
4,00	0,8	6478520	0,672	84,0	6,02	6,59
		7254120	0,753	94,1		
		6878540	0,714	89,3		
		7540178	0,783	97,9		
				$\bar{X} = 91,3$		

Tabela 10 – Recuperação de OTB em amostras de Cerveja Pilsen.

OTB na amostra controle ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	OTB na amostra diluída (1:5) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área	Concentração Detectada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% de Recuperação	Desvio Padrão	C.V. (%)
1,25	0,25	728540	0,182	72,8	3,12	4,08
		778984	0,192	76,8		
		821450	0,201	80,4		
		768194	0,190	76,0		
				$\bar{X} = 76,5$		
2,50	0,50	1849321	0,402	80,4	8,73	10,30
		2256074	0,482	96,4		
		1982576	0,428	85,6		
		1743128	0,381	76,2		
				$\bar{X} = 84,6$		
5,00	1,00	4281735	0,879	87,9	5,87	6,73
		4293841	0,881	88,1		
		4567187	0,935	93,5		
		3845120	0,793	79,3		
				$\bar{X} = 87,2$		
10,00	2,00	8521164	1,710	85,5	3,38	4,04
		7835432	1,576	78,8		
		8100540	1,628	81,4		
		8815602	1,767	88,4		
				$\bar{X} = 83,5$		
20,00	4,00	21320056	4,219	105,5	9,99	10,72
		18115422	3,591	89,8		
		19280148	3,819	95,5		
		16472396	3,269	81,7		
				$\bar{X} = 93,1$		

4.3.4. Linearidade do Método

Com os valores obtidos nos ensaios de recuperação foi elaborada uma curva analítica para a verificação da linearidade do método.

A Tabela 11 mostra os valores obtidos para a OTA, a qual é linear em toda a faixa de concentração testada, ou seja de 0,25 a 4,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Considerando um CV máximo de 10% para o Fator de Resposta.

Tabela 11 – Parâmetros da curva analítica para OTA , injetando-se 1000 μL de cerveja fortificada e posteriormente diluída.

OTA na amostra analisada (1:5) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área Média	Concentração Média Detectada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Fator de Resposta*
0,05	387400	0,039	7748000
0,1	812878	0,081	8128780
0,2	1782894	0,184	8914470
0,4	3353403	0,347	8383507
0,8	7037839	0,731	8797299

C.V. do Fator de Resposta = 5,72

*Fator de resposta= Área/Concentração detectada

A curva analítica para amostras de cerveja fortificadas com OTA é apresentada na Figura 22, obteve-se um coeficiente de correlação de 0,99963. Desta forma pode-se inferir que o método analítico apresenta uma boa linearidade para a ocratoxina A, no intervalo de 0,25 a 4,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

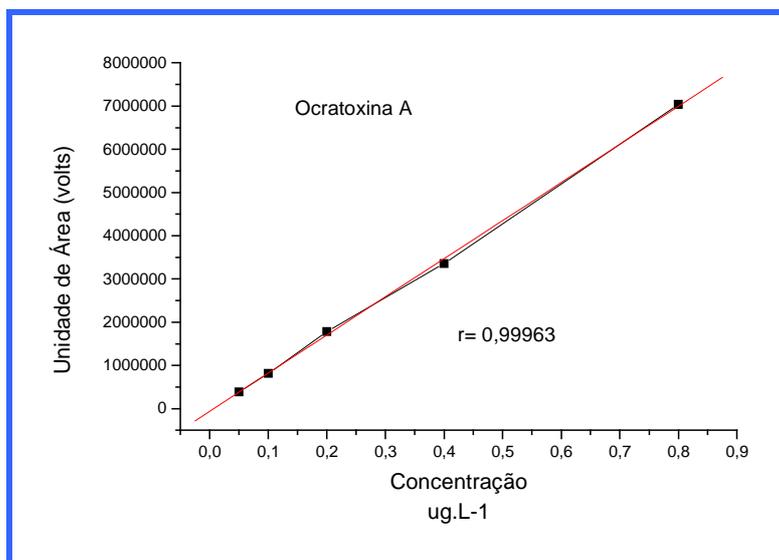


Figura 22- Curva analítica obtida após a injeção de 1000µL de cerveja fortificada com OTA.

Os dados obtidos para as amostras de cervejas fortificadas com OTB são mostrados na Tabela 12, sendo que pelo coeficiente de variação do Fator de Resposta obtido de 14,7 %, vemos que a curva não é linear em toda a extensão analisada, pois este foi maior que 10%, indicando que a resposta não é linear em toda a extensão da faixa de concentração analisada (RIBANI et al., 2004).

Tabela 12 – Parâmetros da curva analítica para OTB , injetando-se 1000µL de cerveja fortificada e posteriormente diluída.

OTB na amostra analisada (1:5) (µg.L ⁻¹)	Área Média	Concentração Média Detectada (µg.L ⁻¹)	Fator de Resposta*
0,25	774292	0,191	3097168
0,50	1957774	0,423	3915548
1,00	4246970	0,872	4246970
2,00	8318184	1,670	4159092
4,00	18797005	3,725	4699251

C.V. do Fator de Resposta = 14,7

*Fator de resposta= Área/Concentração detectada

A Figura 23 mostra a curva analítica obtida para a OTB, adicionada a cerveja.

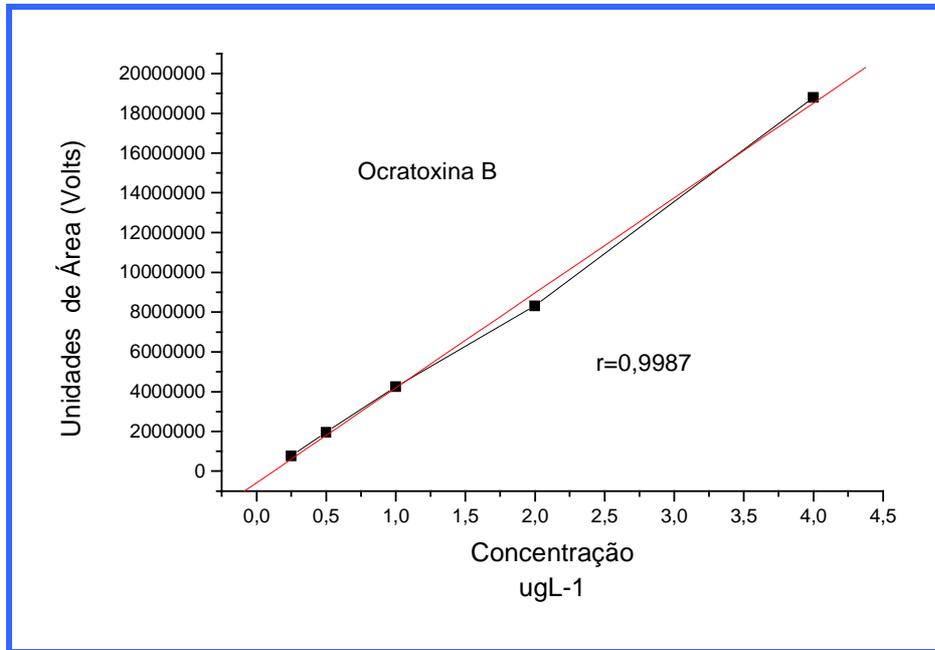


Figura 23- Curva analítica obtida após a injeção de 1000µL de cerveja fortificada com OTB.

A Figura 24 mostra um gráfico relacionando as concentrações empregadas e os seus respectivos fatores de resposta. Considerando o fator de resposta médio como sendo 4.024 (x 1.000.000), e os limites: inferior de -5% e superior de +5%, temos que a faixa de linearidade obtida para OTB, que é de 0,50 a 2,0 µg.L⁻¹, na cerveja diluída, ou seja 2,5 a 10,0 µg.L⁻¹ na cerveja pura.

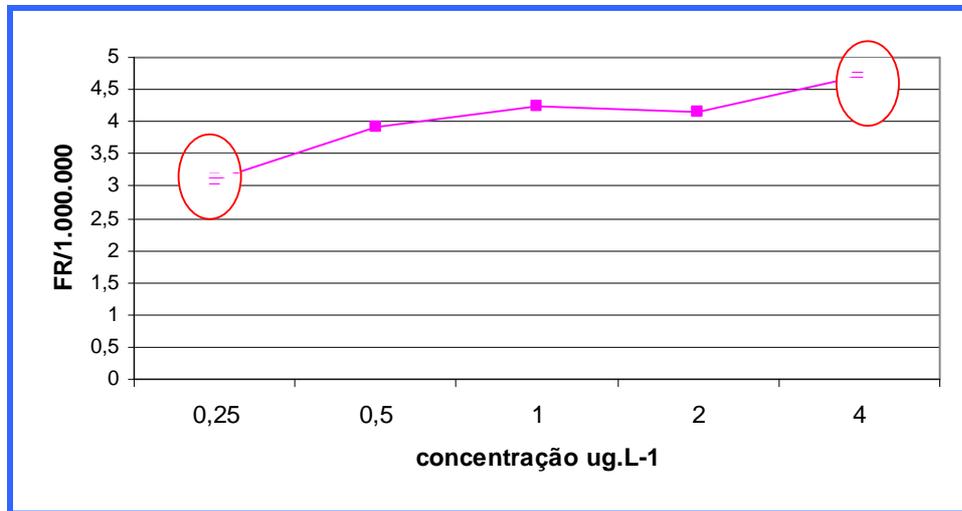


Figura 24- Gráfico do Fator de Resposta para a cerveja fortificada com OTB.

4.3.5. Limite de Detecção e Limite de Quantificação do Método

Segundo RIBANI et al., 2004, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) podem ser determinados de várias formas. Os métodos: visual e da relação sinal ruído deram os resultados apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 – Limite de Detecção e Limite de Quantificação para OTA e OTB

	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
OTA	0,03	0,05
OTB	0,07	0,12

LD= relação sinal/ruído: 1:3

LQ = concentração visível que permite a quantificação com precisão e exatidão.

Os limites de detecção e quantificação para a OTA em amostras de cerveja, obtidos por outros pesquisadores apresentados na Tabela 03, página 33, são bem menores do que os obtidos pela metodologia proposta, principalmente quando

empregam colunas de imunoafinidade ou SPE, chegando até em LD 3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (DEGELMANN et al., 1999).

O limite de detecção (LD) do método proposto se equipara ao obtido por ODHAV e NAICKER, 2002; que foi de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, empregando extração líquido-líquido.

É importante registrar que apenas a Itália apresenta um limite máximo, estabelecido em lei, para a OTA em amostras de cerveja, conforme a Tabela 01, página 26, de 0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, e o método proposto neste trabalho basicamente este valor.

4.4. Análise de Amostras Reais

As Tabelas 14 e 15 mostram os valores encontrados nos diferentes tipos de cerveja. Nas cervejas nacionais apenas uma (2,4%) apresentou OTA quantificável: 0,32 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e outras duas amostras (4,8%), valores entre LD e LQ. A OTA foi verificada em quantidade bastante elevada em uma amostra de cerveja do Canadá: 0.80 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Quanto a OTB várias amostras nacionais apresentaram valores entre LD e LQ: 10 amostras (23,8%) e uma (2,4%) apresentou valor quantificável: 0,78 $\mu\text{g.L}^{-1}$

Tabela 14 – Determinação de OTA e OTB em amostras de cervejas nacionais.

Tipos de cervejas	Número de amostras	OTA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Número de amostras	OTB ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Pilsen	30	<LD*	20	<LD
	02	<LQ e >LD**	11	<LQ e >LD
	01	0,32	01	0,78
Escura	5	<LD	5	<LD
Sem álcool	3	<LD	04	<LD
	1	<LQ e >LD	01	<LQ e >LD
Total	42	01	42	01

* < LD = menor que o Limite de Detecção

** <LQ e >LD = entre o Limite de Detecção e o Limite de Quantificação

Tabela 15 – Determinação de OTA e OTB em amostras de cervejas importadas.

Tipos de cervejas	Número de amostras	OTA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Número de amostras	OTB ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Pilsen	05	<LD*	07	<LD
	01	<LQ e >LD**		
	01	0,80		
Escura	1	<LD	01	<LD
Sem álcool	1	<LD	01	<LD
Total	09	01	09	-

*< LD = menor que o Limite de Detecção

** <LQ e >LD = entre o Limite de Detecção e o Limite de Quantificação

Os valores encontrados para OTA nas cervejas analisadas, tanto nacionais como importadas, estão em acordo aos valores relatados nos artigos apresentados na Tabela 03, página 31, onde observamos contaminações mais elevadas apenas em cervejas tipo *home made*, ODHAV e NAICKER, 2002.

PRADO et al., 2003, pesquisam a ocorrência de OTA em cervejas brasileiras e importadas, sendo que nas amostras brasileiras encontraram apenas traços (<LQ= 0,008 $\mu\text{g.L}^{-1}$), e nas amostras importadas verificaram presença de OTA entre 0,25 e 0,83 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

MEYER e NEUGEBAUER, 2000, não encontraram OTB nas 161 amostras de cerveja analisadas, mas não relatam em seu artigo qual o limite de detecção do método empregado.

A Co-cromatografia foi empregada neste trabalho com o objetivo de confirmação para OTA como para OTB, como pode ser visto na Figura 25.

Outra técnica para a confirmação do analito é o emprego de detectores em série. Como dispúnhamos de um detector de Fluorescência e um de UV em série, fizemos a observação se havia alguma relação entre os cromatogramas obtidos, mas não houve

evidência alguma que fosse útil aos nossos objetivos, uma vez que não houve a detecção das ocratoxinas pelo detector de absorção na região do ultravioleta-visível, em consequência dos baixos níveis de concentrações empregados.

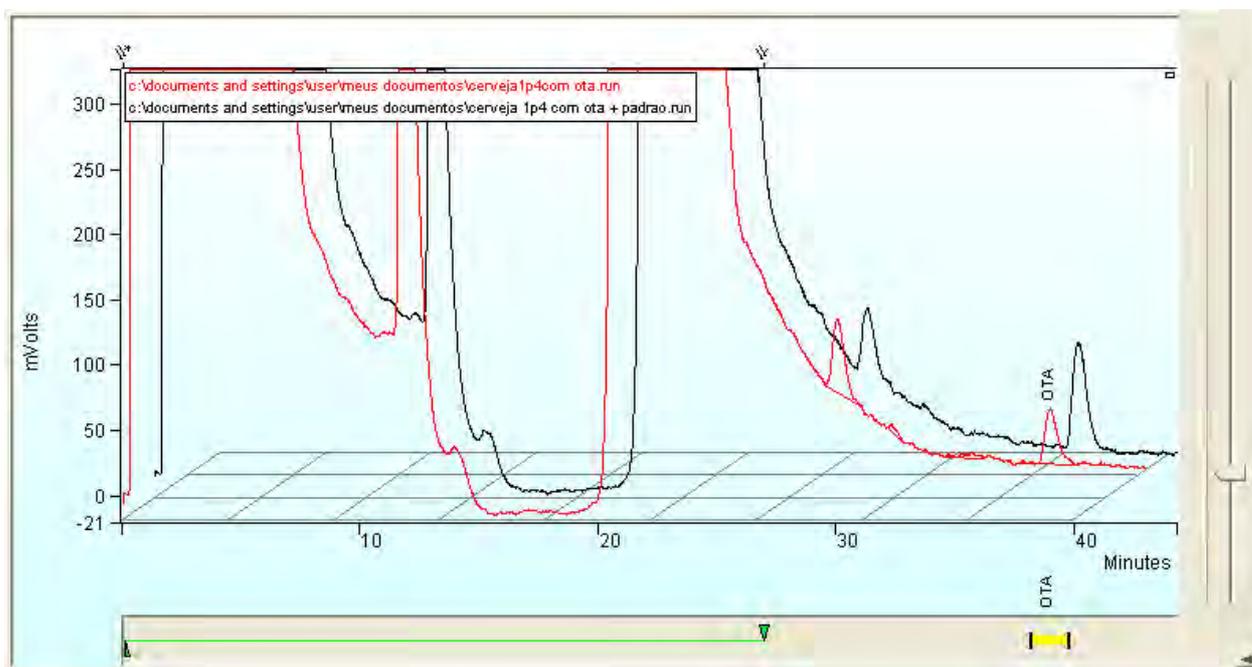


Figura 25 – Cromatograma e Co-cromatograma par uma amostra de cerveja que contém OTA $0,8 \mu\text{g/L}^{-1}$. Área $A1= 1.625.467$ Área $A2= 3.252.608$

Fase I: FM: água pura Vazão: $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. **Fase II:** FM: acetonitrila:HCl 1% (40:60 v/v) Vazão: $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Detector de fluorescência: Em 325 nm Ex 460nm.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicaram que o método desenvolvido empregando uma coluna cromatográfica aniônica-ISRPA instalada em série com uma coluna analítica C₁₈, possibilita efetuar a injeção direta das amostras de cervejas, ocorrendo a extração e separação *on line*, sem o tratamento prévio das amostras de cerveja.

O método proposto é eficiente para a detecção e quantificação de ocratoxinas A e B em cervejas, pois conforme seus indicadores de mérito apresentou uma recuperação média de 85,9% para OTA e 85,0% para OTB, precisão estimada pelo coeficiente de variação médio de 7,79% e 7,17% e limites de detecção na amostra de 0,15 e 0,35 µg.L⁻¹ para OTA e OTB, respectivamente.

O levantamento da ocorrência de OTA e OTB em cervejas comercializadas em Bauru e região mostraram que 7,1 % das amostras de cervejas nacionais e 11,0 % das cervejas importadas estavam contaminadas com OTA; os níveis detectados foram traços (<LQ = 0,25µg.L⁻¹), 0,32 e 0,80 µg.L⁻¹. Quanto à OTB, foi encontrada em 28,6 % das amostras de cervejas nacionais, em níveis de traços (<LQ = 0,60µg.L⁻¹) e 0,78 µg.L⁻¹. A OTB não foi detectada nas amostras importadas de cerveja.

O método proposto apresenta um custo baixo, comparado com as diferentes metodologias apresentadas na literatura especializada.

Desta forma, acredita-se contribuir significativamente, dentro do contexto da análise toxicológica e de controle de qualidade, uma vez que esta metodologia será enviada para publicação e posterior divulgação no meio científico.

6. REFERÊNCIAS

ALLDRICK, A. J. The effects of processing on the occurrence of ochratoxin A in cereals. **Food Addit. Contam.**, v. 13, p. 27-28, 1996. Supplement.

ALLENMARK, S. Optical resolution by liquid chromatography on immobilized bovine serum albumin. **J. Liq. Chromatogr.**, v. 9, p. 425-442, 1986.

ANDERSON, D. J. High-performance liquid chromatography in clinical analysis. **Anal. Chem.**, v. 71, p. 314R-27R, 1999.

ATHERTON, N. D. HPLC measurement of phenylalanine by direct injection of plasma onto a internal-surface-reversed-phase silica support. **Clin. Chem.**, v. 35, p. 975- 978, 1989.

BOSS, K. S.; RUDOLPHI, A. The use of restricted-access media in HPLC, part I – classification and review. **LC-GC**, v. 15, p. 602-11, 1997.

BOSS, K. S.; RUDOLPHI, A.; VIELHAUER, S.; WALFORT, A.; LUBDA, D.; EISENBEIB, F. F. Alkyl-diol silica (ADS): restricted access precolumn packings for direct injection and coupled-column chromatography of biofluids. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 352, p. 684-90, 1995.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; CASSIANO, N. M.; PEDRAZOLLI JR., J. Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B.**, v. 766, p. 153-60, 2002.

CODEX COMMITTEE FOOD ADDITIVES CONTAMINANTS **Micotoxinas**. Disponível em:
<http://www.fsis.usda.gov/regulations_&_policies/Codex_Committee_Food_Additives/index.asp>. Acesso em: 30 ago. 2005.

CHATURVEDI, P.; SMITH, T.; ZABE, N.; KOHN, B. A. A new method for simultaneous aflatoxin and ochratoxin cleanup for HPLC analysis in grains. In: INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS ANNUAL MEETING, 1999, Chicago. Abstracts... Chicago: IFT, 1999. p. 234.

CHU, F. S.; CHANG, C. C.; ASHOOR, S. H.; PRENTICE, N. Stability of aflatoxin B₁ and ochratoxina A in brewing. **Appl. Microbiol.**, v. 29, n. 3, p. 313-316, 1975.

CIOLA, R. **Fundamentos de cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC.** São Paulo: Edgar Blücher, 1998.

COOK, S. E.; PINKERTON, T. C. Characterization of internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 368, p. 233-48, 1986.

CORTACERO-RAMÍREZ, S.; CASTRO, M. H.; SEGURA-CARRETERO, A.; CRUCES-BLANCO, C.; GUTIÉRREZ, A. F. Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. **Trends Anal. Chem.**, v. 22, n. 7, p. 440-455, 2003.

CORTES, H. J.; ROTHMAN, L. D. Multidimensional high-performance liquid chromatography. In: CORTES, H. J. (Ed.). **Multidimensional chromatography: techniques and applications.** New York: Marcel Dekker, 1990. v. 50, p. 219-50.

DARYL, J.; BRIAN, G.; HUNTER, T.; FEIBUSH, B. Shielded hydrophobic phase a new concept for direct injection analysis of biological by HPLC. **J. Chromatogr.**, v. 433, p. 264-270, 1988.

DAVANKOV, V. A.; TSYURUPA, M. P. Structure and properties of porous hypercrosslinked polystyrene sorbents styrosorb. **Pure Appl. Chem.**, v. 61, p. 1881-8, 1989.

DEGELMANN, P.; BECKER, M.; HERDERICH, M.; HUMPF, H. H. Determination of ochratoxin A in beer by high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 49, n. 9/10, p. 543-546, 1999.

DESILETS, C. P.; ROUNDS, M. A.; REGNIER, F. E. Semipermeable surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 544, p. 25-39, 1991.

FEIBUSH, B.; SANTASANIA, C. T. Hydrophilic shielding of hydrophobic, cation and anion-exchange phases for separation of small analytes: direct injection of biological fluids onto high-performance liquid chromatographic columns. **J. Chromatogr.**, v. 544, p. 41-49, 1991.

FILALI, A.; OUAMMI, L.; BETHEDER, A. M.; BAUDRIMONT, I.; SOULAYMANI, R.; BENAYADA, A.; CREPPY, E. E. Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. **Food Addit. Contam.**, v. 18, n. 6, p. 565-598, 2001.

FONSECA, H. (Resp.). **Legislação sobre Micotoxinas**. Disponível em <<http://www.micotoxinas.com.br/legisla.html>>. Acesso em: 30 ago. 2005.

FULCHER, C.; CROWELL, M. A.; BAYLISS, R.; HOLLAND, K. B.; JAZOREK, J. R. Synthetic aspects of the characterization of some silica-bound complexing agents. **Anal. Chim. Acta**, v. 129, p. 29-47, 1981.

FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. S.; VIEIRA, A. P.; DADALT, G. Aflatoxinas, ocratoxina a e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 58, n. 2, p. 105-111, 1999.

GARCIA, M. A. Z. **Desenvolvimento de um método analítico para a determinação de pesticidas em amostras de fluídos biológicos por CLAE com injeção direta da amostra**. 2001. 84f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2001.

GIDDINGS, J. C. Use of multiple dimensions in analytical separations. In: CORTES, H. J. (Ed.). **Multidimensional chromatography: techniques and applications**. New York: Marcel Dekker, 1990. v. 50, p. 219-50.

GISCH, D. J.; HUNTER, B. T.; FEIBUSH, B. Shielded hydrophobic phase: a new concept for direct injection analysis of biological fluids by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 433, p. 264-268, 1988.

GONZALEZ, M. J.; JIMÉNEZ, B.; HERNANDEZ, L. M.; VIDALMADJAR, C.; PLACE, H. Use of a new HPLC stationary phase for one-step clean-up of human-milk for pcdd. HCR-J. High Resolut. **Chromatografia**, v. 16, n. 2, p. 129-30, 1993.

GUMUS, T.; ARICI, M.; DEMIRCI, M. A survey of barley, malt and beer contamination with ochratoxin A in Turkey. **J. Inst. Brew.**, v. 110, n. 2, p. 146-149, 2004.

HAGESTAM, I. H.; PINKERTON, T. C. Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography. **Anal. Chem.**, v. 57, p. 1757-1763, 1985.

HAGINAKA, J. Drug determination in serum by liquid chromatography with restricted access stationary phases. **Trends Anal. Chem.**, v. 10, p. 17-22, 1991.

HAGINAKA, J.; MURASHIMA, T. Direct injection assay of drug enantiomers in serum on ovomucoid-blended sílica materials by liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 620, p. 199-205, 1993.

HAGINAKA, J.; SEYAMA, C.; MURASHIMA, T. Retention and enantioselective properties of ovomucoid-blended sílica: influence of physical properties of base materials and space length. **J. Chromatogr.**, v. 660, p. 275-281, 1994.

HAGINAKA, J.; WAKAI, J.; YASUDA, H. Synthesis of mixed-function-phase sílica supports for liquid chromatography and their application to assays of drugs in serum. **J. Chromatogr.**, v. 535, p. 163-72, 1990.

HAGINAKA, J.; YASUDA, N.; WAKAI, J.; MATSUNAGA, H.; YASUDA, H.; KIMURA, Y. Internal-surface reversed-phase sílica support for direct injection determination of drugs in biological fluids by liquid chromatography. **Anal. Chem.**, v. 61, p. 2445-8, 1989.

HERMANSSON, J.; GRAHN, A. Determination of drugs by direct injection of plasma into a biocompatible extratin column based on a protein-entrapped hydrophobic phase. **J. Chromatogr.**, v. 660, p. 119-129, 1994.

HOSOYA, K.; KISHII, Y.; KIMATA, K.; ARAKI, T.; TANAKA, N.; SVEC, F.; FRÈCHET, J. M. J. Uniform-size hydrophobic polymer-based separation media selectively modified with a hydrophilic external polymeric layer. **J. Chromatogr. A.**, v. 690, p. 21-8, 1995.

HOUGH, J. S. **The biotechnology of malting and brewing**. Cambridge: Cambridge University Press, 1985. 159 p.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Summary of Evaluation Performed**. Disponível em:

<<http://jecfa.ilsa.org/evaluation.cfm?chemical=OCHRATOXIN%20A&keyword=%20>>.

Acesso em: 30 ago. 2005.

JOENSEN, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. **Food Addit. Contam.**, v. 15, n. 5, p. 550-554, 1998.

KANDA, T.; SHIROTA, O.; OHTSU, Y.; YAMAGUCHI, M. Synthesis and characterization of polymer-coated mixed-functional stationary phases with several different hydrophobic groups for direct analysis of biological samples by liquid chromatography. **J. Chromatogr. A.**, v. 722, p. 115-21, 1996.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. Trends. **Anal. Chem.**, v. 22, n. 4, p. 232-44, 2003.

KIMATA, K.; TSUBOI, R.; HOSOYA, K.; TANAKA, N.; ARAKI, T. Method for the preparation of internal-surface reversed-phase packing materials starting from alkylsilylated silica gels. **Anal. Chem.**, v. 62, n. 8, p. 807-10, 1990.

LEGARDA, T. M.; BURDASPAL, P. A. Ocratoxina A em cervezas elaboradas em espana y em otros paises europeos. **Alimentaria**, p. 115-122, 1998.

LEITE, F. **Validação em análise química**. São Paulo: Átomo, 1998.

MARTH, E. H. Mycotoxins: production and control. **Food Lab. News**, v. 8, n. 3, p. 35-51, 1992.

MENEZES, M. L.; DEMARCI, A. A. C.; FÉLIX, G. On-line extration and determination of carbofuran in raw milk by direct HPLC injection on a ISRP column. **Chromatografia**, v. 47, p. 81-83, 1998.

MENEZES, M. L.; FÉLIX, G. Analysis of organochlorine pesticides in plain milk using direct injection on a ISRP column, with column switching. **J. Liq. Chromatogr.**, v. 19, p. 3221-3228, 1996.

MEYER, R. A.; NEUGEBAUER, S. Bestimmung von ochratoxin A in bier mit automatischer probenreinigung an immunaffinitatssaulen. **Nahrung**, v. 44, n. 1, p. 58-59, 2000.

NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M. A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. **J. Assoc. of Anal. Chem.**, v. 82, n. 4, p. 897-902, 1999.

NIMURA, N.; ITOH, H.; KINOSHITA, T. Diol-bonded silica-gel as a restricted access packing forming a binary-layered phase for direct injection of serum for the determination of drugs. **J. Chromatogr. A.**, v. 689, p. 203-10, 1995.

OCHRATOXIN A. Disponível em <<http://www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol56/13-ochra.htm>>. Acesso em: 31 ago. 2005.

ODA, Y.; ASAKAWA, N.; ABE, S.; YOSHIDA, Y.; SATO, T. Avidin protein-conjugated column for direct injection analysis of drug enantiomers in plasma by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A.**, v. 572, p. 133-41, 1991.

ODHAV, B.; NAICKER, V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. **Food Addit. Contam.**, v. 19, n. 1, p. 55-61, 2002.

OERTEL, R.; RICHTER, K.; GRAMATTÉ, T.; KIRCH, W. Determination of drugs in biological fluids by high-performance liquid chromatography with on-line sample processing. **J. Chromatogr.**, v. 797, p. 203-9, 1998.

PERRY, J. A.; INVERGO, B.; WAGNER, H.; SZCZERBA, T. J.; RATEIKE, J. D. An improved internal-surface reversed-phase. **J. Liq. Chromatogr.**, v. 15, p. 3343-52, 1992.

PETZINGER, E.; ZIEGLER, K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. **J. vet. Pharmacol.**, v. 23, p. 91098, 2000.

PINKERTON, T. C.; MILLER, T. D.; COOK, S. E.; PERRY, J. A.; RATEIKE, J. D. The nature and use of internal surface reversed-phase columns: a new concept in high performance liquid chromatography. **Biochromatography**, v. 1, p. 96-103, 1986.

PINKERTON, T. C. High-performance liquid chromatography packing materials for the analysis of small molecules in biological matrices by direct injection. **J. Chromatogr.**, v. 544, p. 13-23, 1991.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; CARVALHO, E. P.; LIMA, L. C. O.; VELOSO, T.; SOUZA, L. A. F.; CARDOSO, A. F. Ochratoxin A determination in beer by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, p. 58-61, 2003.

RACAITYTE, K.; LUTZ, E. S. M.; UNGER, K. K.; LUBDA, D.; BOOS, K. S. Analysis of neuropeptide Y and its metabolites by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and integrated sample clean-up with a novel restricted-access sulphonic acid cation exchanger. **J. Chromatogr. A.**, v. 890, p. 135-144, 2000.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Metodologia – validação de metodologia analítica. In: SCUSSEL, V. M. **Atualidade em micotoxinas e armazenagem de grãos**. Florianópolis: VM, 2000. cap. 3, p. 42-47.

ROSA, C. A. R.; SANTANA, D. M. N.; DIREITO, G. M. Detection of AFB₁ in canned beer consumed in Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS 9th, 1996, Rome. Abstracts... Rome: IUPAC, 1996. p. 177.

SCOTT, P. M. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. **J. AOAC Int.**, v. 79, n. 4, p. 875-882, 1996.

SCOTT, P. M. Natural toxins. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists**. 16th ed. Gaithersburg: AOAC International, 1997. cap. 29, p. 01-51.

SCOTT, P. M.; KANHERE, S. R. Determination of ochratoxin a in beer. **Food Addit. Contam.**, v. 12, n. 4, p. 591-598, 1995.

SCOTT, P. M.; LAWRENCE, G. A. Determination of aflatoxins in beer. **J. AOAC Int.**, v. 80, n. 6, p. 1229-1234, 1997.

SCOTT, P. M.; TRUCKSESS, M. W. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. **J. AOAC Int.**, v. 80, n. 5, p. 941-949, 1997.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. p. 144.

SIMIONATO, E. M. R. S. **Aflotoxinas e ocratoxina A em arroz (*Oryza sativa* L.):** ocorrência e efeito do cozimento. 2001. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2001.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA. **Mercado.** Disponível em: <http://www.sindicerv.com.br/mercado/txt_mercado.htm>. Acesso em: 30 jan. 2005.

SMIGOL, V.; SVEC, F.; FRÉCHET, J. M. J. Novel uniformly sized polymeric stationary-phase with hydrophilized large pores for direct-injection HPLC determination of drugs in biological-fluids. **J. Liq. Chromatogr.**, v. 17, p. 891-911, 1994.

SMITH, R. M. Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. **J. Chromatogr. A.**, v. 1000, p. 3-27, 2003.

SOARES, L. M. V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 60, n. 1, p. 79-84, 2001.

SOARES, L. M. V.; AMAYA, D. B. R. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **J. AOAC Int.**, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

SOLEAS, G. J.; YAN, J.; GOLDBERG, D. M. Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 2733-2740, 2001.

SOLFRIZZO, M.; AVANTAGGIATO, G.; VISCONTI, A. Use of various clean-up procedures for the analysis of ochratoxin A in cereals. **J. Chromatogr. A.**, v. 815, p. 67-73, 1998.

STEYN, P. S. Ochratoxins and related dihydroisocoumarins. In: BETINA, V. **Mycotoxins – production, isolation, separation and purification.** Amsterdam: Elsevier Science, 1984. cap. 9, p.183-215

STOEV, S. D. The role of ochratoxin A as a possible cause of Balkan endemic nephropathy and its risk evaluation. **Vet. Human Toxicol.**, v. 40, n. 6, p. 352-360, 1998.

STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food Chem. Toxicol.**, v. 33, n. 5, p. 341-355, 1995.

SUDO, Y.; AKIBA, M.; SAKAKI, T.; TAKAHATA, Y. Glycerylalkylsilylated silica-gels for direct-injection analysis of drugs in serum by high-performance liquid-chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 17, p. 1743-54, 1994.

TANGNI, E. K.; PONCHAUT, S.; MAUDOUX, M.; ROZEMBERG, R.; LARONDELLE, Y. Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment. **Food Addit. Contam.**, v. 19, n. 12, p. 1169-1179, 2002.

VAN EGMOND, H. P.; SPEIJERS, G. J. A. Survey of data on the incidence and levels of ochratoxin A in food and animal feed worldwide. **J. Nat.Tox.**, v. 3, n. 2, p. 125-144, 1994.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. (Org.). Cerveja. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. (Org). **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 91-144.

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTOZE, G. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. **J. Chromatr. A.**, v. 864, n. 1, p. 89-101, 1999.

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTOZE, G. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. **J. Chromatr. A.**, v. 888, n. 4, p. 321-326, 2000.

YAMAMOTO, E.; MURATA, K.; ISHIHAMA, Y.; ASAKAWA, N. Methylcellulose-immobilized reversed-phase precolumn for direct analysis of drugs in plasma by HPLC. **Anal. Sci.**, v. 17, p. 1155-9, 2001.

YOSHIDA, H.; MORITA, I.; TAMAI, G.; MASUJIMA, T.; TSURU, T.; TAKAI, N.; IMAI, H. Some characteristics of a protein-coated ODS column and its use for the determination of drugs by the direct injection analysis of plasma samples. **Chromatographia**, v. 19, p. 466-72, 1984.

ZHANG, H. X.; LIU, M. C.; ZHU, P. L. Preparation of a polyglycol-C₈ bonded phase and its characteristics. **J. Chromatogr. A.**, v. 722, p. 115-21, 1996.