

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE OCRATOXINA A EM ALGUNS
ALIMENTOS E BEBIDAS NACIONAIS**

ANA PAULA VIEIRA
Mestre em Ciência de Alimentos

Prof^a. Dr^a. LUCIA MARIA VALENTE SOARES
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do
título de Doutor em Ciência de Alimentos

CAMPINAS – SP

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

V673a Vieira, Ana Paula
Avaliação da presença de ocratoxina A em alguns
alimentos e bebidas nacionais / Ana Paula Vieira. –
Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Lucia Maria Valente Soares
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ocratoxinas. 2. Suco de Frutas. 3. Cerveja. 4.
Cereais. I. Soares, Lucia Maria Valente. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Evaluation of the presence of ochratoxin A in some Brazilian foods and
beverages

Palavras-chave em inglês (Keywords): Ochratoxins, Fruit juice, Beer, Cereals

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Eliana Badiale Furlong

Luciane Mie Kawashima

Thais Valeria Milanes

Maria Antonia Calori Domínguez

Regina Prado Zanes Furlani

Folha de Aprovação

Tese defendida e aprovada em 06 de julho de 2005, pela banca examinadora constituída por

Prof^a Dr^a Lucia Maria Valente Soares

Prof^a Dr^a Eliana Badiale Furlong

Prof^a Dr^a Luciane Mie Kawashima

Dr^a Thais Valeria Milanês

Dr^a Maria Antonia Calori Dominguez

Dr^a Regina Prado Zanes Furlani

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Lucia Maria Valente Soares, um agradecimento especial, pela sua presença em todos os momentos na orientação deste trabalho e pela sua amizade.

Ao CNPq pela bolsa concedida e à FAPESP pelo financiamento do trabalho.

À minha mãe Maria Stela Vieira, um agradecimento muito especial, pelo incentivo e apoio em todos os momentos de minha vida.

Ao Renato pelo carinho, pela paciência e apoio no decorrer deste tempo.

Às colegas Mariana e Adriana pela colaboração e amizade.

SUMÁRIO

Sumário.....	v
Lista de Tabelas	ix
Lista de Figuras	x
Resumo	xi
Summary	xiii
1 – INTRODUÇÃO	01
2 – REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 – Aspectos químicos e microorganismos produtores	04
2.2 – Efeitos tóxicos	06
2.3 – Avaliação de risco e legislação	10
2.4 – Ocorrência	13
2.4.1 – Ocorrência de ocratoxina A em alimentos em nível mundial	13
2.4.2 – Ocorrência de ocratoxina A em alimentos nacionais	24
2.5 – Métodos Analíticos para ocratoxina	30
3 – MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 – Amostras	42
3.1.1 – sucos de frutas	42
3.1.2 – cervejas	42
3.1.3 – cereais	43
3.2 – Materiais, reagentes e padrões	44
3.3 – Preparo do padrão de ocratoxina A	45
3.3.1 – sucos de frutas	45
3.3.2 – cervejas	45
3.3.3 – cereais	45
3.4 – Preparo das amostras	47
3.4.1 – sucos de frutas	47
3.4.2 – cervejas	47
3.4.3 – cereais	48

3.5 – Detecção e quantificação	49
3.6 – Controle de qualidade analítico	50
3.7 – Recuperação da ocratoxina A em colunas de imunoafinidade	51
3.8 – Reutilização das colunas de imunoafinidade	53
3.9 – Avaliação de métodos analíticos para determinação de ocratoxina A em sucos de frutas	54
3.9.1 – Extração de ocratoxina A de amostras não clarificadas de sucos de frutas	54
3.9.2 – Clarificação das amostras de sucos de frutas	55
3.9.3 – Extração de ocratoxina A das amostras clarificadas de sucos de frutas	56
3.9.4 – Extração de ocratoxina A das amostras clarificadas de sucos de frutas e limpeza do extrato	58
3.10 – Avaliação de métodos para determinação de ocratoxina A em cervejas	60
3.10.1 – extração de ocratoxina A das amostras de cervejas	60
3.11 – Avaliação de métodos para determinação de ocratoxina A em cereais	61
3.11.1 – teste 1 – Método para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com (R-BIOPHARM RHÔNE LTD, 2002)	61
3.11.2 – teste 2 – Método para extração de ocratoxina A em café de acordo com R-BIOPHARM RHÔNE LTD, (2002)	62
3.11.3 – teste 3 – Método para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com SHARMAN <i>et al.</i> (1992)	62
3.11.4 – teste 4 – Método para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com SCUDAMORE e MACDONALD (1998)	63

3.11.5 – teste 5 – Método para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com SOLFRIZZO <i>et al.</i> (1998)	63
3.11.6 – teste 6 – Método para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com LEPON (1986)	64
3.11.7 – teste 7 – Método para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com VALENTE SOARES (1987)	65
3.11.8 – teste 8 – Método para extração de ocratoxina A de acordo com ZIMMERLI e DICK (1995)	66
3.11.9 – teste 9 – Método para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com MÖLLER e NYBERG (2003)	66
3.11.10 – teste 10 – Método para extração de ocratoxina A em páprica de acordo com R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002)	67
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1 – Controle de qualidade analítico	68
4.2 – Recuperação do padrão de ocratoxina A em colunas de imunoafinidade	68
4.3 – Reutilização das colunas de imunoafinidade	69
4.4 – Otimização do método analítico para determinação de ocratoxina A em sucos de abacaxi, laranja, maracujá e uva	72
4.4.1 – Extração de ocratoxina A das amostras não clarificadas de sucos	72
4.4.2 – Clarificação das amostras de sucos de frutas	72
4.4.3 – Extração de ocratoxina A das amostras de sucos de frutas clarificadas e limpeza dos extratos	72
4.5 – Determinação de ocratoxina A nos sucos de abacaxi, laranja, maracujá e uva	75
4.6 – Levantamento de incidência de ocratoxina A em sucos de abacaxi, laranja, maracujá e uva	77
4.7 – Otimização de método analítico para determinação de ocratoxina A em cerveja	79
4.8 – Levantamento da incidência de ocratoxina A em cerveja	82

4.9 – Otimização de método analítico para determinação de ocratoxina A em aveia, cevada e centeio	85
4.9.1 – Resultado do teste 1 para extração em cereais de acordo com R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002)	85
4.9.2 – Resultado do teste 2 para extração em café de acordo com R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002)	86
4.9.3 – Resultado do teste 3 para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com SHARMAN <i>et al.</i> (1992)	86
4.9.4 – Resultado do teste 4 para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com SCUDAMORE e MACDONALD (1998)	89
4.9.5 – Resultado do teste 5 para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com SOLFRIZZO <i>et al.</i> (1998)	90
4.9.6 – Resultado do teste 6 para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com LEPON (1986)	90
4.9.7 – Resultado do teste 7 para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com VALENTE SOARES (1987)	91
4.9.8 – Resultado do teste 8 para extração de ocratoxina A de acordo com ZIMMERLI e DICK (1995)	92
4.9.9 – Resultado do teste 9 para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com MÖLLER e NYBERG (2003)	93
4.9.10 – Resultado do teste 10 para extração de ocratoxina A para páprica de acordo com R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002)	93
4.10 – Levantamento de incidência de ocratoxina A em aveia, cevada e centeio.....	99
5 – CONCLUSÕES	102
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Sistemas testados para eluição do padrão de ocratoxina A em colunas de imunoafinidade	51
Tabela 3.2 – Extração de ocratoxina A em amostras de sucos de frutas fortificadas	54
Tabela 3.3 – Procedimento empregado para extração de ocratoxina A de amostras de cerveja e limpeza do extrato em colunas de imunoafinidade	60
Tabela 4.1 – Recuperação do padrão de ocratoxina A aplicado à coluna de imunoafinidade	69
Tabela 4.2 – Recuperação da ocratoxina A quando da utilização múltipla das colunas de imunoafinidade por tipo de amostra	70
Tabela 4.3 – Características de desempenho do método de ZIMMERLI e DICK (1995) modificado para determinação de ocratoxina A em amostras de sucos de fruta	74
Tabela 4.4 – Concentração de ocratoxina A nas amostras de cerveja contaminadas	83
Tabela 4.5 – Características de desempenho dos métodos otimizados para extração de ocratoxina A em cereais	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.1 – Estrutura da ocratoxina A	04
Figura 3.1 – Tratamento enzimático e centrifugação dos sucos de frutas de laranja e maracujá	55
Figura 3.2 – Procedimento para extração de ocratoxina A das amostras de sucos de frutas	56
Figura 3.3 – Procedimento para limpeza dos extratos de sucos de frutas utilizando colunas de imunoafinidade	57
Figura 4.1 – Cromatograma do padrão de ocratoxina A	76
Figura 4.2 – Cromatogramas de amostras de sucos contaminados artificialmente com padrão de ocratoxina A	77
Figura 4.3 – Cromatogramas de amostras de sucos não contaminados	77
Figura 4.4 – (a) cromatograma de padrão de ocratoxina A, (b) cromatograma de amostra de cerveja não contaminada, (c) cromatograma de uma amostra de cerveja contaminada.....	82
Figura 4.5 – Cromatograma do padrão de ocratoxina A	96
Figura 4.6 – (a) cromatograma de amostra de aveia não contaminada; (b) cromatograma de amostra de aveia contaminada artificialmente com ocratoxina A	96
Figura 4.7 – (a) cromatograma de amostra de cevada não contaminada; (b) cromatograma de amostra de cevada contaminada artificialmente com ocratoxina A	97
Figura 4.8 – (a) cromatograma de amostra de centeio não contaminada; (b) cromatograma de amostra de centeio contaminada artificialmente com ocratoxina A	97

RESUMO

A ocratoxina A é um composto nefrotóxico, teratogênico e imunotóxico produzido por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Foi demonstrado ser carcinogênico para ratos e é possivelmente carcinogênico para humanos. Tem sido encontrada nos mais diversos tipos de alimentos como cereais, alimentos de origem animal, cerveja, vinho, suco de uva e café. O Brasil é um grande produtor dos alimentos citados, bem como um grande consumidor.

As micotoxinas constituem um problema dos mais sérios tanto para países desenvolvidos como para os em desenvolvimento. Condições climáticas, práticas agrícolas e de armazenamento, em muitos casos contribuem para o crescimento fúngico e conseqüente produção de micotoxinas concorrendo para agravar o problema em países em desenvolvimento.

Há um grande número de alimentos produzidos e consumidos no Brasil que ainda não foram investigados para a presença de ocratoxina A ou o foram de maneira limitada. No primeiro caso estão os sucos de frutas de alto consumo como laranja, maracujá e abacaxi, assim como os cereais cevada, centeio e aveia. No segundo caso estão o suco de uva e a cerveja, dos quais um número reduzido de amostras foi examinado para a toxina até o momento.

Em uma primeira etapa, a combinação de limpeza de extrato por coluna de imunoafinidade com quantificação da toxina por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por fluorescência foi testada e otimizada para determinação de ocratoxina A em sucos de laranja, uva, abacaxi e maracujá, em cerveja e nos cereais cevada, centeio e aveia. Diferentes métodos descritos na literatura foram testados e modificados.

Em uma segunda etapa, foi avaliada a incidência de ocratoxina A em sucos de uva, abacaxi, laranja e maracujá, cerveja, aveia, cevada e centeio produzidos e comercializados no país.

Os limites de detecção para cada tipo de suco foram: suco de maracujá (0,05 ng/mL), laranja (0,03 ng/mL), uva (0,03 ng/mL) e abacaxi (0,14 ng/mL). A recuperação média de ocratoxina A foi de 74%. A toxina não foi encontrada em nenhuma das 144 amostras de sucos analisados sendo 31 de abacaxi, 29 de

laranja 49 de maracujá, , 35 de uva e. Estes resultados, apesar de limitados em número, indicam que a incidência da toxina nos sucos de frutas nacionais examinados deve ser baixa ou mesmo inexistente.

A recuperação média de ocratoxina A em cerveja foi de 93% para cerveja tipo *Pilsen* e 87% para cerveja escura. O limite de detecção foi 0,1 ng/mL. Das 123 amostras de cerveja (94 amostras de cerveja tipo *Pilsen* e 29 amostras de cerveja escura) analisadas, 5 amostras, todas do tipo *Pilsen*, continham ocratoxina A em teores de 1 a 18 ng/mL. A incidência de ocratoxina A encontrada em cerveja nacional no presente trabalho foi menor que a já relatada em outros países, porém os teores são mais elevados. Os teores encontrados não colocam em risco mesmo os grandes consumidores da bebida.

A recuperação média de ocratoxina A foi de 68% para aveia, 65% para cevada e 83% para centeio. O limite de detecção para amostras de aveia integral, aveia em flocos e farelo de aveia, foi de 0,01 µg/kg e para farinha de aveia foi de 0,004 µg/kg. O limite de detecção para cevada em flocos foi de 0,01 µg/kg e para cevada em grão foi de 0,007 µg/kg. Para centeio em grão, o limite de detecção foi 0,004 µg/kg, para centeio em flocos foi de 0,006 µg/kg para centeio farinha foi de 0,005 µg/kg. Dentre as 80 amostras de cereais (28 de cevada, 22 de centeio e 30 de aveia) analisadas não foi detectada ocratoxina A, ao contrário do que ocorre em alguns países como os do norte da Europa, sobretudo da região dos Bálcãs. Estes resultados constituem uma indicação que atualmente a ocratoxina A não representa um problema na produção nacional de cevada, centeio e aveia.

SUMMARY

Ochratoxin A is a nephrotoxic, teratogenic, and immunotoxic compound, produced by species of *Aspergillus* and *Penicillium*. It is carcinogenic to rats and possibly to humans. It has been found in a wide variety of foods including cereals, animal products, beer, wine, grape juice, and coffee. Brazil is a large producer as well as consumer of the mentioned foods and beverages.

Mycotoxins constitute a serious problem for developed countries and underdeveloped ones. Weather conditions, agricultural and storage practices, in many cases contribute to fungi development and consequently also to mycotoxin production and thus concur to worsen the problem in developing countries.

A great number of foods produced and consumed in Brazil have not yet been investigated for the presence of ochratoxin A or have been so in limited surveys. In the first case there are the highly consumed fruit juices such as orange, passion fruit, and pineapple, and the cereals such as rye, oats, and barley. In the second case there are grape juice and beer, both object so far of a limited survey each.

A first step of the present work was to test and optimize the combination of immunoaffinity column for extract cleanup with liquid chromatography associated with fluorescence detection in the foods and beverages surveyed for ochratoxin A: orange, passion fruit, grape and pineapple juices, beer, rye, oats, and barley. Different methods described in the literature were tested and modified as necessary.

The second step was to evaluate the incidence of ochratoxin A in grape, orange, passion fruit, and pineapple juices, beer, rye, oats and barley produced and commercialized within the country.

The limits of detection for the several juices were: 0.05 ng/mL for passion fruit, 0.03 ng/mL for orange, 0.03 ng/mL for grape, and 0.15 ng/mL for pineapple. The average recovery for ochratoxin A was 74%. The toxin was not found in any of the 144 samples of juice analyzed (passion fruit 49, orange 29, grape 35, and

pineapple 31). Although limited in number the results indicate that the incidence of the toxin in Brazilian fruit juices is low or nonexistent.

The average recovery for ochratoxin A in beer was 93% for *Pilsen* type beer and 87% for dark beer. The detection limit was 0.1 ng/mL. Among the 123 beer samples analyzed (94 *Pilsen* and 29 dark), 5 samples, all *Pilsen*, contained ochratoxin A in concentrations from 1 to 18 ng/mL. The incidence of ochratoxin A found in Brazilian beer in the present work was smaller than that reported among other countries, but the levels found were higher. The concentrations of ochratoxin A found, however, do not represent risk even for the great consumers of this beverage.

The average recovery for ochratoxin A was 68% for oats, 65% for barley, and 83% rye. The detection limit for whole oats, oat flakes and oat bran were 0.01 µg/kg and for oat flour was 0.004 µg/kg. The detection limit for barley flakes was 0.01 µg/kg and for whole rye 0.007 µg/kg. For whole rye the detection limit was 0.004 µg/kg, for rye flakes 0.006 µg/kg and for rye flour was 0,005 µg/kg. Ochratoxin A was not detected any of the 90 cereal samples analyzed (oats 30, rye 22, and barley 28), much in contrast with the situation in countries such the ones in north of Europe and in the Balkans area. The results constitute an indication that presently the national production of rye, oats, and barley is not at significant risk of contamination by ochratoxin A.

1 - INTRODUÇÃO

Toxinas produzidas por fungos, denominadas micotoxinas, quando presentes em alimentos e rações podem causar intoxicação em seres humanos e animais. As micotoxinas reduzem a qualidade nutricional e a aceitabilidade dos alimentos. Trata-se, portanto, de um problema de saúde pública com efeitos negativos na economia por afetar a produção animal e a vegetal.

A ocratoxina A age primeiramente como uma nefrotoxina provocando necrose no epitélio tubular renal, a qual tem sido observada principalmente em suínos. Seu alvo secundário é o fígado. Apresenta ainda, atividade teratogênica e mutagênica. A ocratoxina A é produzida principalmente por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Em humanos, a ocratoxina A está relacionada com o aparecimento de câncer no trato urinário em áreas de exposição crônica na Europa oriental (CASTEGNARO *et al.*, 1991). A chamada Nefropatia Endêmica dos Bálcãs, endemia caracterizada por uma progressiva redução da função renal que afeta a população da região da Bulgária, Romênia e Iugoslávia é associada com a alta incidência e a concentração elevada de ocratoxina A nos alimentos consumidos nestas regiões (CASTEGNARO *et al.*, 1987). Nefropatias noticiadas na Argélia e Tunísia foram relacionadas com a presença da toxina em fluídos corporais e em alimentos consumidos pela população (CREPPY *et al.*, 1993).

A ocratoxina A, devido a sua toxicidade e ocorrência mundial, é uma das micotoxinas mais pesquisadas juntamente com as aflatoxinas, as fumonisinas, os tricotecenos e a zearalenona. Tem sido encontrada

nos mais diversos tipos de alimentos tais como cereais, frutas, frutas secas, produtos de origem animal, cerveja, vinho, suco de uva e café.

A relativa estabilidade da ocratoxina A permite sua permanência no produto após aquecimento, torrefação e fermentação. Foi demonstrado que a ocratoxina A persiste durante o processo de maltagem, uma etapa da fabricação da cerveja. A limpeza e a moagem do trigo e cevada reduzem, mas não removem totalmente a ocratoxina A nos grãos contaminados. A ocratoxina A foi encontrada em cerveja em diversos países.

A região sudeste do Brasil e dentro dela principalmente o Estado de São Paulo, tem-se beneficiado com o fato de possuir vários grupos de pesquisa trabalhando com micotoxinas. Porém, vários tipos de produtos alimentícios não foram ainda pesquisados para a presença de ocratoxina A. Sucos de frutas como maracujá, laranja e abacaxi, por exemplo, não foram ainda examinados para a presença de ocratoxina A no Brasil. A existência de ocratoxina A em sucos de uva e vinhos nacionais já foi relatada. Outros produtos ainda não examinados para a presença de ocratoxina A são cereais como a cevada, o centeio e a aveia, estes assumindo presentemente uma popularidade cada vez maior no setor de produtos naturais.

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar e otimizar a combinação coluna de imunoafinidade para limpeza de extratos e CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) associada à detecção por fluorescência para quantificação de ocratoxina A em sucos de frutas, cerveja e cereais, realizar um levantamento da incidência de ocratoxina A em sucos nacionais de alto consumo (maracujá, laranja e

abacaxi), cereais (aveia, cevada e centeio) e ampliar a avaliação da presença de ocratoxina A em cerveja e suco de uva.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – ASPECTOS QUÍMICOS E MICRORGANISMOS PRODUTORES

As ocratoxinas foram descobertas na África do Sul, em 1965, por um grupo de cientistas que freqüentemente isolava linhagens de *Aspergillus ochraceus*, responsáveis por certos efeitos tóxicos em animais de laboratório.

Quanto à natureza química, as ocratoxinas (A, B, C) são formadas por uma beta fenilalanina ligada a isocumarina por ligação amida (figura 2.1.1). São produzidas por espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, a temperaturas médias de 25°C (BUSBY e WOGAN, 1981).

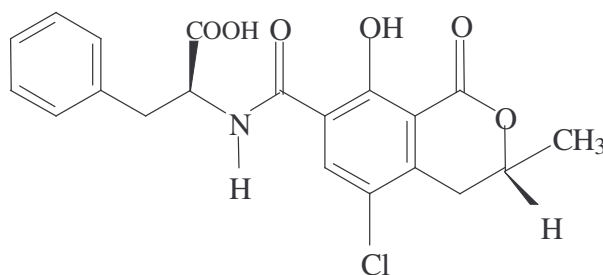


Figura 2.1.1 - Estrutura da Ocratoxina A

A ocratoxina A foi originalmente descrita como um metabólito de *Aspergillus ochraceus* em experimentos laboratoriais (VAN DER MERWE *et al.*, 1965). A ocratoxina A é produzida por espécies de *Penicillium*, *P. verrucosum* e por *A. ochraceus* e várias espécies interrelacionadas do gênero *Aspergillus*. Os principais produtores são encontrados em diferentes regiões do globo de acordo com suas

necessidades de crescimento. O *P. verrucosum* é encontrado em regiões temperadas e predomina em cereais produzidos no Canadá e na Europa. *A. ochraceus* mostra preferência por temperaturas moderadas (24 – 31 °C) e tem sido encontrado em café e em cereais armazenados. *A. carbonarius* cresce em temperaturas altas (35 – 42 °C), é encontrado principalmente em frutas e é responsável pelo aparecimento de ocratoxina A em uvas frescas, frutas secas e vinho (BENFORD *et al.*, 2001). Como *A. ochraceus* ocorre primariamente em alimentos armazenados, tem sido encontrado em uma variedade de alimentos como frutas secas, soja, nozes, amendoim, café, cereais e produtos de cereais, incluindo arroz, cevada, milho, trigo, farinha e farelo. No entanto, esta espécie raramente causa deterioração e quase sempre é encontrada em pequeno número de unidades formadoras de colônias nos alimentos. Sua presença, portanto, não é um indicador significativo da produção de micotoxinas (PITT e HOCKING, 1997).

BENKERROUM e TANTAOUIELARAKI (2001) estudaram os fungos toxigênicos e micotoxinas em ração para aves. Setenta amostras, incluindo milho, cevada, farelo de trigo, soja e girassol, foram analisadas para contaminação fúngica. *Penicillium* e *Aspergillus* foram os gêneros dominantes com 35,7 e 20,4%, respectivamente. Uma dentre quatro linhagens de *A. ochraceus* isolados e 2 dentre 14 linhagens de *P. verrucosum* produziram ocratoxina A em trigo.

2.2 – EFEITOS TÓXICOS

O principal efeito tóxico da ocratoxina A é a necrose do epitélio tubular renal, observada principalmente em suínos. A necrose causa nefropatia, acompanhada de excessiva eliminação de urina, provocando muita sede. Seu alvo secundário é o fígado. Também foi verificada que a toxina exerce atividade teratogênica em ratos e camundongos e provoca alta suscetibilidade a infecções (VELDMAN *et al.*, 1992). É fortemente tóxica com dose letal (DL_{50}) de 5-30 mg/kg peso corpóreo (p.c.) em pássaros, de 20 mg/kg p.c. para ratos e bovinos e de 3 mg/kg p.c. para patinhos (BUSBY e WOGAN, 1981; KUIPER-GOODMAN, 1990).

Em levantamentos realizados por diversos autores e publicados pelo JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants) (2001), a ocratoxina A mostrou ser nefrotóxica para todas as diferentes espécies de mamíferos testados. As fêmeas apresentaram nefrototoxicidade evidente para as diferentes espécies na ordem para porcos > ratos > camundongos fêmeas. Seu principal alvo é o tubo proximal renal, exercendo efeitos de citotoxicidade e carcinogenicidade.

A ocratoxina A atravessa a barreira placentária e é embriotóxica e teratogênica para ratos e camundongos. Possui efeito imunossupressor em um número de espécies. Administração pré-natal de ocratoxina A em ratos causou imunossupressão, mas administração pós-natal estimulou resposta imune em ratos (BENFORD *et al.*, 2001).

Mutações genéticas foram induzidas em bactérias e células de mamíferos em alguns poucos estudos de genotoxicidade. A ocratoxina

A, porém, induziu danos ao DNA, no reparo do DNA, aberrações cromossômicas em células de mamíferos *in vitro* e aberrações cromossômicas em camundongos *in vivo* (BENFORD *et al.*, 2001).

Mesmo em pequenas quantidades as micotoxinas apresentam riscos para humanos (KUIPER-GOODMAN, 1995). A ocratoxina A tem sido encontrada em amostras de sangue humano, a maioria em cidades situadas em áreas com clima temperado no hemisfério norte. No entanto, nenhum caso de intoxicação aguda foi reportado em humanos. O JECFA relata que a ocratoxina A foi encontrada com mais freqüência em amostras de sangue obtidas de pessoas que viviam em regiões onde uma doença fatal, denominada Nefropatia Endêmica dos Bálcãs, a qual afeta os rins e que ocorre de maneira endêmica e está associada com um aumento da incidência de tumores no trato urinário (JECFA, 2001).

Na área de ocorrência da nefropatia endêmica, 92 amostras de trigo e 51 amostras de milho foram pesquisadas para ocorrência de ocratoxina A. A toxina estava presente em 76% das amostras de trigo e 33% das amostras de milho em concentrações de 0,02-160,0 µg/kg (média de 38,8 µg/kg) e 0,02 - 40,0 µg/kg (média de 20,0 µg/kg), respectivamente. Foi observado, no estudo, que tanto em amostras de trigo como amostras de milho, os níveis de ocratoxina A eram consideravelmente superiores na região de ocorrência da nefropatia com relação às outras regiões (média de 8,7 µg/kg). De acordo com os autores, esses dados demonstram o envolvimento geográfico entre nefropatia endêmica e ocratoxina A (PUNTARIC *et al.*, 2001).

PFOHL-LESKOWICZ *et al.* (2004) analisaram ocratoxina A no soro, urina e nos alimentos consumidos por habitantes da região da nefropatia endêmica dos Bálcãs para confirmar a exposição da população. No estudo, foram selecionados 60 voluntários de 20-30 anos de idade de duas vilas consideradas como áreas de alto risco na Bulgária. As amostras (alimento, sangue e urina) foram coletadas durante um mês. A média de ingestão semanal de ocratoxina A variou de 130 a 14152 ng, correspondendo a uma ingestão diária de 18,6 a 2021 ng/pessoa/dia. A concentração de ocratoxina A, no sangue dos habitantes estudados nesta região foi alto, ao redor de 10 µg/L. Os níveis de ocratoxina A na urina foram correlacionados com a ingestão da toxina. De acordo com os autores, os resultados demonstraram que a população da região dos Bálcãs está mais exposta à contaminação por ocratoxina A do que a população da Europa como um todo.

Foi realizado um estudo para investigar a exposição humana à ocratoxina A. Amostras da dieta, do sangue e da urina foram coletadas semanalmente de 50 voluntários (23 homens e 27 mulheres) de 18 a 55 anos de idade que moravam em uma área próxima ao Reino Unido. Destes, 11 eram vegetarianos, 32 não vegetarianos e 7 pessoas não vegetarianas. A ocratoxina A foi detectada em todas as amostras da dieta, apresentando concentração de 10 a 115 ng/kg. Todas as amostras de sangue continham ocratoxina A, os homens apresentaram níveis da toxina maiores em relação às mulheres e a tendência aumentava com a idade. Os teores determinados de ocratoxina A nas amostras de sangue variaram de 0,4 a 3,11 ng/mL. Quanto às

amostras de urina, 92% estavam contaminadas com ocratoxina A em concentrações de 0,01 a 0,057 ng/mL (JONES, 1999b)

Na Bulgária foi realizado um estudo sobre a ocorrência de ocratoxina A e os gêneros de fungos que estavam presentes nos alimentos coletados nas vilas endêmicas e não endêmicas naquela região. Das 46 amostras analisadas (feijão, milho, farinha de trigo, amendoim, cevada, trigo), em 85% não foi detectada ocratoxina A, em 9% das amostras foi detectada não mais do que traços (1-2 µg/kg) e somente em uma amostra de milho (4%) foi detectada uma concentração de ocratoxina A de 153 µg/kg, mas não continha *Aspergillus ochraceus* e sim *Penicillium viridicatum* e *P. griseofulvum*. Um isolado de *Penicillium* (*P. solitum*) produziu ocratoxina A em cultura pura. *Aspergillus ochraceus* produziu apenas traços de ocratoxina A em cultura pura e *Aspergillus flavus* e *glaucus* produziram ocratoxina A com maior frequência (MANTLE e McHUCH, 1993).

Amostras de trigo, milho, cevada, aveia e farelo de trigo foram coletadas em 1998 em vilas fora da Bulgária e em vilas endêmicas e não endêmicas. Altas concentrações de ocratoxina A foram encontradas em vilas endêmicas (máximo=140 ng/g) e vilas não endêmicas em níveis médios de 1,3 ng/g (VRABCHEVA *et al.*, 2000).

2.3 – AVALIAÇÃO DE RISCO E LEGISLAÇÃO

Um dos mais importantes aspectos da análise de risco de substâncias químicas é o estabelecimento do grau de exposição do organismo humano e do perigo a que está exposto. O risco de exposição humana que pode ocorrer com relação aos contaminantes presentes nos alimentos, como é o caso das micotoxinas, é particularmente difícil, mas pode ser estimado, indiretamente, a partir da ingestão de alimentos contaminados e dos respectivos níveis médios de ocorrência de micotoxinas nos produtos alimentícios (KUIPER-GOODMAN, 1990). Sendo assim, o grau de exposição é medido em termos de ingestão diária provável (IDP) por unidade de peso corpóreo, sendo geralmente expressa em ng/kg de peso corpóreo (p.c.)/dia. A principal finalidade das estimativas de IDP é comparar o valor obtido com a ingestão diária tolerável (IDT) para indicar o grau de risco. A IDT é estimada a partir de administração de altas e baixas doses de micotoxinas em espécies animais e a partir dos resultados calcular uma dose segura para humanos.

No Canadá, quando a IDP estimado da micotoxina excede sua IDT, medidas podem ser tomadas, de acordo com autoridades canadenses em alimentos e drogas, para reduzir a ingestão da micotoxina. Métodos analíticos têm sido desenvolvidos e avaliados para assegurar que seja cumprido o limite de contaminação estabelecido pela regulamentação (KUIPER-GOODMAN, 1995).

Os dados mais abundantes sobre a ocratoxina A na dieta são os provenientes dos países europeus. A média total de ingestão de ocratoxina A para estes países foi estimada em 45 ng/kg p.c. por

semana, assumindo um peso corporal de 60 kg. Os cereais e o vinho contribuíram aproximadamente com 25 e 10 ng/kg p.c. por semana, respectivamente, para ingestão média. Já o suco de uva e o café contribuíram cada um com 2 e 3 ng/kg p.c. por semana. Outros produtos alimentares (frutas secas, cerveja, chá, leite, cacau, aves) contribuíram com menos de 1 ng/kg p.c. por semana (BENFORD *et al.*, 2001). De acordo com JORGENSEN e BILDE (1996), a ingestão de cereais e produtos de cereais, café, cerveja, carne de suíno, legumes e condimentos podem contribuir para a ingestão de ocratoxina A. De acordo com o autor, o alto consumo de um ou mais desses produtos podem contribuir de maneira significativa para a ingestão diária total de ocratoxina A.

Os limites máximos permitidos para ocratoxina A já existentes ou em fase de implantação em diversos países, variam de 1 a 5 ng/g para alimentos infantis, 2 a 50 ng/g para cereais e 5 a 300 ng/g para rações. Na União Européia existem sugestões de limites máximos de 5 ng/g para cereais e 1 ng/g para alimentos infantis. A Itália, em 1996, propôs um limite de 4 ng/g para café verde em grãos (VAN EGMOND, 1996). No Brasil não existem limites para ocratoxina A em alimentos. Alguns países possuem legislação para ocratoxina A em alimentos, podendo-se citar o Uruguai com limites de 50 ng/g para arroz, cevada, café e milho, a França com limite de 5 ng/g para cereais e a Suíça com limite de 2 ng/g (FAO, 1995).

Segundo VAN EGMOND (1996), muitos fatores podem influenciar as decisões tomadas pelas autoridades para estabelecer limites para ocratoxina A. Dentre estes estão fatores científicos como avaliação dos

dados toxicológicos, distribuição de ocratoxina A nos alimentos e existência de métodos analíticos confiáveis.

2.4 - OCORRÊNCIA

2.4.1 - OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A EM ALIMENTOS EM NÍVEL MUNDIAL

A presença de micotoxinas em alimentos e rações está relacionada a fatores climáticos e outros fatores de crescimento que influenciam a produção destes metabólitos secundários por fungos. Existem consideráveis diferenças entre várias regiões do mundo assim como flutuações de ano para ano. Existem também diferenças consideráveis entre países em termos de taxa de risco e de perigo, uma vez que estas estão relacionadas à quantidade de alimento contaminado ingerido e a legislação para micotoxinas (VAN EGMOND, 1989; KUIPER-GOODMAN, 1995).

Os dados de incidência de ocratoxina A em alimentos e bebidas avaliados pelo JECFA em 2001 foram provenientes principalmente da Europa (85%). Os dados restantes foram originados da América do Sul (7%), da América do Norte (6%), da África (1%) e da Ásia (1%). As concentrações de ocratoxina A mostraram alta variabilidade nos diferentes alimentos e apenas 1,4% e 0,6% das amostras continham mais que 5 ng/g e 20 ng/g, respectivamente. Dentre os cereais, 1,2% e 0,3% das amostras continham mais que 5 ng/g e 20 ng de ocratoxina A/g, respectivamente. Já os produtos de cereais continham 0,3% e 0,05%. As concentrações médias de ocratoxina A que foram usadas para estimar a ingestão foram 0,94 ng/g para cereais, 0,19 ng/g para produtos de cereais, 0,32 ng/g para vinho, 0,86 ng/g para café, 2,3 ng/g para uva passa e 0,44 ng/g para suco de uva (BENFORD *et al.*, 2001).

A ocorrência das micotoxinas está associada às condições durante o desenvolvimento das culturas, no momento da colheita, no armazenamento e processamento do alimento e às condições climáticas (BATTAGLIA *et al.*, 1996; JORGENSEN e BILDE, 1996; PIETRI *et al.*, 2001).

DRUSCH e RAGAB (2003) analisaram diferentes tipos de frutas após remoção de tecido decomposto e encontraram teores de 2,71 ng/g ocratoxina A em cereja e níveis de 1,44 ng/g em tomate e morango. Pêssego e maçã exibiram menor grau de contaminação com ocratoxina A. Os resultados mostram que frutos podem estar contaminados com ocratoxina A quando atingem um certo grau de decomposição ou quando há comprometimento da qualidade do fruto, mesmo após a remoção da parte deteriorada.

No Marrocos, a ocorrência de ocratoxina A foi investigada em bebidas através do método de CLAE com detecção fluorimétrica, sendo vinho (30 amostras), cerveja (5 amostras) e suco de frutas (14 amostras, cítricos diversos, manga, pêssego, abacaxi). Todas as amostras de vinho estavam contaminadas (concentração média de 0,65 µg/L). Uma das 14 amostras de suco de frutas (cítrico) estava contaminada com concentração de 1,16 µg/L. Nenhuma das cinco amostras de cerveja estava contaminada (FILALI *et al.*, 2001).

Um levantamento realizado na Suíça (ZIMMERLI e DICK, 1995) revelou que o homem suíço que vive no sul dos Alpes possui uma concentração de ocratoxina A no plasma mais elevada do que as mulheres da mesma região e do que as pessoas em geral que vivem no resto do país. Esta diferença foi explicada pelos autores como

devido ao consumo maior de vinho pelos homens e pela concentração mais alta de ocratoxina A no vinho da região ao sul dos Alpes.

Uma pesquisa realizada por ZIMMERLI e DICK (1996a), investigou a ocorrência e taxa de risco de ocratoxina A em vinho de mesa e suco de uva na Suíça, utilizando coluna de imunoafinidade para limpeza do extrato seguida de CLAE com detector de fluorescência. A média de concentração de ocratoxina A nos vinhos branco (24 amostras), rosé (15) e tinto (79) foram < 3 pg/mL, 19 pg/mL e 13 pg/mL, respectivamente. Em suco de uva (8 amostras), a ocratoxina A foi detectada em uma concentração média de 235 pg/mL. Os sucos de uva branca, assim como os sucos de maçã (2) e laranja (6) não continham a micotoxina ou continham menos que 5 pg/mL.

OTENEDER e MAJERUS (2000) investigaram a ocorrência de ocratoxina A em vinhos na Alemanha usando coluna de imunoafinidade para limpeza e CLAE para análise. Os autores observaram que a contaminação por ocratoxina A em vinho tinto (54%) foi maior do que em vinho rose (40%) e vinho branco (25%). Notaram ainda que o vinho tinto proveniente do norte do país mostrava uma contaminação em 12% das amostras, em contraste com o vinho proveniente de áreas no sul do país, cujas amostras mostraram uma contaminação ao redor de 95%. Os valores médios de contaminação foram de 0,1 µg/L para vinho branco, 0,11 µg/L para vinho rose e 0,20 µg/L para vinho tinto.

STEFANAKI *et al.* (2003) investigaram a presença de ocratoxina A, em vinhos comerciais, passas de uva e groselha na Grécia nos anos de 1995 a 2000, usando coluna de imunoafinidade para limpeza e CLAE para separação da toxina. A concentração de ocratoxina A em

vinho tinto seco (n=104, concentração média de 0,09 µg/L) não apresentou diferença significativa em relação ao vinho branco (n=118, concentração média de 0,06 µg/L) e vinho rose (n=20, concentração média de 0,08 µg/L). Dezoito amostras de vinho para sobremesa (doce, semi-doce e semi-seco) apresentaram maiores concentrações de ocratoxina A com média de 0,33 µg/L. Já passas de uva (n=27) apresentaram concentração média de 0,6 µg/kg e no caso de groselha (n=54) a concentração média foi de 1,3 µg/kg.

Foi investigada a presença de ocratoxina A em frutas secas (groselha, passas de uvas brancas e escuras) em 60 amostras adquiridas no Reino Unido, através de extração metanólica ácida, usando coluna de imunoafinidade para limpeza do extrato e CLAE para quantificação da toxina. A espectrometria de massas foi utilizada para confirmação da identidade de ocratoxina A nas amostras. A ocratoxina A foi encontrada em níveis de 0,2 µg/kg em 19 de 20 amostras de groselha. Dentre 17 de 20 amostras de passas de uva examinadas, a ocratoxina A foi encontrada nas concentrações que variaram de 0,2 - 53,6 µg/kg (MacDONALD *et al.*, 1999).

MÖLLER e NYBERG (2003) estudaram a ocorrência e o controle da heterogeneidade de ocratoxina A em passas de uva e groselha na Suíça nas safras de 1999/2000 e 2001/2002 usando coluna de imunoafinidade para limpeza e CLAE para determinação da toxina. A concentração de ocratoxina A encontrada no primeiro estudo variou de 0,1 a 19,0 µg/kg, com concentração média de 0,9 µg/kg. No segundo estudo, a faixa de concentração foi de 0,1 a 34,6 µg/kg, com concentração média de 0,2 µg/kg. Do total das 118 amostras

analisadas, 96 (84%) continham ocratoxina A em níveis abaixo do limite de quantificação do método (0,1 µg/kg) e cinco amostras continham ocratoxina A acima do limite da legislação europeia que é de 10 µg/kg. Grandes diferenças foram observadas entre sub-amostras individuais da amostra original indicando uma grande heterogeneidade na distribuição da toxina.

Os níveis de ocratoxina A encontrados em carne de porco, aves, café, cerveja e legumes (totalizando 286 amostras) foram investigados na Dinamarca, utilizando coluna de imunoafinidade para limpeza do extrato e CLAE com detector de fluorescência para detecção e quantificação. Os níveis encontrados para carne de porco e aves foram baixos (0,10 µg/kg e 0,03 µg/kg, respectivamente) para os animais alimentados com cereais cultivados pelo método convencional e para os alimentados com cereais orgânicos, não houve diferença significativa entre os tipos de alimentação dos animais com relação aos níveis de contaminação. Todas amostras de cerveja apresentaram ocratoxina A com concentração média de 0,049 µg/kg e todas as amostras de café continham ocratoxina A com um conteúdo médio de 0,51 µg/kg. Para as amostras de cereais contaminados os níveis não foram expressos na publicação e de acordo com o autor, o número de amostras analisadas não foi significativo (JORGENSEN, 1998).

STUDER-ROHR *et al.* (1995) estudaram a ocorrência de ocratoxina A em café na Nova Zelândia utilizando coluna de imunoafinidade para limpeza e CLAE para análise. Em grãos de café verde foi detectada ocratoxina A em 13 de 25 amostras comerciais analisadas (1-2 µg/kg). De 40 amostras de café moído a partir de

amostras comerciais a toxina foi detectada em 18 amostras em concentrações que variaram de 0,4 a 7,8 µg/kg.

Na Espanha, a infecção fúngica e a contaminação por ocratoxina A foram determinadas em amostras de café verde utilizando CLAE para análise. Ao redor de 72% das amostras de grãos analisadas apresentavam espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*. O gênero *Aspergillus* estava presente em mais de 90% dos grãos de café infectados. *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus* seção *Nigri* isolados representaram 2,8 e 65,4%, respectivamente. A capacidade para produzir ocratoxina A foi determinada em 260 isolados de *Aspergillus* seção *Nigri* e 19 de *A. ochraceus* em ágar. Resultados positivos foram constatados para 6% de *Aspergillus* seção *Nigri* isolados e 16% dos isolados de *A. ochraceus*. Os níveis de ocratoxina A em todas amostras analisadas estavam acima do limite de detecção (0,6 mg/kg) apresentando concentração média de 6,7 mg/kg (PARDO *et al.*, 2004).

Ocratoxina A tem sido encontrada em cerveja em várias partes do mundo. No Canadá, SCOTT e KANHERE (1995), determinaram ocratoxina A em 41 amostras de cervejas. Vinte e seis amostras apresentaram níveis de ocratoxina A $\leq 0,2$ ng/mL. SOLEAS *et al.* (2001) analisaram 107 amostras de cervejas, duas amostras apresentaram contaminação entre 0,05 e 0,1 ng/mL. Na Dinamarca, JORGENSEN (1998) encontrou ocratoxina A em todas amostras de cervejas (n=21) com concentração média de toxina de 0,049 µg/kg. Na Espanha, LEGARDA e BURDASPAL (1998) investigaram 38 amostras de cervejas espanholas e destas 37 apresentaram ocratoxina A em níveis médios de contaminação de 0,024 ng/mL.

No Japão, NAKAJIMA *et al.* (1999) analisaram ocratoxina A em 94 amostras de cervejas importadas e 22 amostras domésticas. A toxina foi detectada em 86 das 94 amostras de cervejas importadas com um nível médio de contaminação de 10,1 pg/mL e 21 das 22 amostras provenientes do Japão com um nível médio de 12,5 pg/mL. Na Bélgica (TANGNI *et al.* 2002), estudaram a ocorrência de ocratoxina A em 62 amostras de cerveja domésticas e 20 cervejas importadas. Em média, a contaminação foi de 33 ng/L e de 32 ng/L, respectivamente. Na Itália, VISCONTI *et al.* (2000) analisaram 61 amostras de cervejas domésticas (10) e importadas (51) que apresentaram uma incidência de 50% de contaminação total com ocratoxina A em níveis a partir de <0,01 a 0,135ng/mL.

Foi demonstrado que a ocratoxina A persiste durante o processo de maltagem durante a fabricação da cerveja (BOUDRA *et al.*, 1995; STUDER-ROHR *et al.*, 1995; SCOTT *et al.*, 1995; GAREIS, 1999; SCOTT e KANHERE, 1995; SCOTT, 1996a e b). O nível de contaminação de ocratoxina A na cerveja pode aumentar ou diminuir dependendo do emprego de adjuntos durante sua fabricação. Milho, “grits” de arroz, trigo ou “grits” de milho são empregados como substratos na fermentação (SCOTT 1996a). A limpeza e a moagem do trigo e da cevada não removem totalmente a ocratoxina A nos grãos naturalmente contaminados, uma vez que a ocratoxina A é uma molécula moderadamente estável e pode ser encontrada nos alimentos após processamento (SCOTT, 1991b, 1996b; BATTAGLIA *et al.*, 1996).

BAXTER *et al.* (2001) realizaram um estudo para determinar o destino da ocratoxina A na fabricação da cerveja em planta piloto. Foi

preparado o malte inoculando a cevada com *Penicillium verrucosum*. A concentração de ocratoxina A no malte chegou a 52 µg/kg e esse malte foi usado na fabricação de cerveja. Foram observadas perdas acima de 40% de ocratoxina A na moagem do grão, durante a mistura, a maior parte provavelmente devido à degradação proteolítica. Outros 16% foram eliminados com grãos descartados. No entanto, entre 13 e 32% de ocratoxina A presente na moagem original passou para a cerveja.

Foram avaliadas 121 amostras de alimentos de grupos étnicos chineses e indianos no Reino Unido para presença de micotoxinas. As amostras envolvidas nas análises incluíram amostras de cereais (32), azeites (7), nozes e seus produtos (20), grãos (9), legumes e especiarias (29), conservas em vinagre (picles) (16) e alimentos enlatados (8). A avaliação da presença de ocratoxina A nas amostras empregou colunas Sep-Pak de sílica para limpeza e CLAE com detecção de fluorescência para quantificar. A concentração de Ocratoxina A adicionada foi de 5 µg/kg com recuperação de 70 -110%. As amostras de cereais apresentaram níveis de ocratoxina A de 0,2 - 0,9 µg/kg. Os azeites apresentaram nível médio de 0,4 µg da toxina/kg. Em nozes e seus produtos não foi detectada ocratoxina A. Em sementes de coentro os níveis médios foram de 4,0 µg/kg, em especiarias de 1,6 - 50,4 µg/kg, “curry” de 1,8 - 23,9 µg/kg e gengibre de 2,1 - 7,5 µg/kg. Conservas em vinagre (picles) mostraram níveis de ocratoxina A de 0,5 - 1,2 µg/kg e níveis de 0,1 - 0,3 µg/kg para alimentos enlatados (PATEL *et al.*, 1996).

ESKOLA *et al.* (2001) investigaram a ocorrência de ocratoxina A, tricotecenos e zearalenona em cereais na Finlândia, empregando

coluna de imunoafinidade para limpeza do extrato e CLAE com detecção de fluorescência para quantificação. Um total de 21 amostras de cereais, incluindo 14 amostras de centeio, 4 de farinha de cevada, 1 de farelo de cevada, 1 de farelo de aveia e 1 farinha de trigo. Nenhuma das amostras estava contaminada com ocratoxina A.

Cereais provenientes de cultivo convencional e cultivo orgânico foram investigados na Polônia quanto à ocorrência de ocratoxina A durante a colheita do ano de 1997. Geralmente a frequência de ocorrência de ocratoxina A nas amostras de todos os tipos de cereais de cultivo orgânico foi substancialmente maior em relação ao cultivo convencional. Das 52 amostras de centeio de cultivo convencional 5,8% apresentaram níveis médios de ocratoxina A de 1,38 µg/kg, para as 48 amostras de cultivo orgânico, em 37,5% das amostras apresentaram concentrações médias de ocratoxina A de 3,17 µg/kg. Grãos de trigo não apresentaram contaminação para cultivo convencional para as 32 amostras, no entanto para 39 amostras de cultivo orgânico a contaminação média da toxina foi de 0,83 µg/kg para 8% das amostras. Para as 26 amostras de grãos de cevada em cultivo convencional, a concentração de ocratoxina A foi de 0,3 µg/kg para 4% das amostras e para as 40 amostras de cultivo orgânico, 8% apresentaram ocratoxina A em concentrações médias de 25,7µg/kg (CZERWIECKI *et al.*, 2002).

Foi investigada a presença de ocratoxina A em 148 amostras de trigo, 131 amostras de cevada e 21 amostras de aveia, armazenadas em depósitos no Reino Unido por um período de 12 meses (anos de 1997-1998). A ocratoxina A foi detectada em 22 amostras de trigo com

valor médio de 1,9 µg/kg, em 35 amostras de cevada com nível médio de 2,6 µg/kg e 6 amostras de aveia com contaminação média de 0,5 µg/kg. A distribuição da toxina em 77% das 237 amostras apresentou concentração de ocratoxina A em níveis menores do que 0,1 µg/kg. O trabalho mostra também a distribuição da toxina em relação as diferenças regionais, dezenove amostras (12%) provenientes do leste da Inglaterra, 25 amostras (26%) provenientes do oeste e 19 amostras (40%) provenientes do norte da Inglaterra estavam contaminadas com ocratoxina A (JONES, 1999a).

PARK *et al.* (2002) investigaram a ocorrência de ocratoxina A em cevada e alimentos a base de milho em Seoul, Coréia. A toxina estava presente em 4 das 32 amostras de cevada em níveis de 9,0 ng/g e em nenhuma amostra de milho foi detectada ocratoxina A.

Na Itália, 211 amostras de farinhas de trigo e produtos de panificação foram analisadas para ocratoxina A. Todas as amostras continham a toxina abaixo do limite legal italiano que é 3 ng/g (BIFFI *et al.*, 2004).

Ocratoxina A foi encontrada em níveis de 0,06 a 2,4 ng/g em 42 das 161 amostras de cereais e biscoitos infantis no Canadá que continham algum dos seguintes cereais: aveia, cevada, soja, arroz e misturas de cereais (LOMBAERT *et al.*, 2003).

Na Dinamarca, durante o período de 1986-1992 foram analisadas 520 amostras de trigo, 142 amostras de farelo de trigo, 616 de centeio, 92 de aveia e 61 de cevada. A contaminação por ocratoxina A atingiu 32% das amostras de trigo, 68% das de farelo, 42% das de centeio, 43% das de aveia e 28% das de cevada, com concentrações variando

de 0,05 ng/g a 25 ng/g. Levando em consideração os hábitos alimentares dinamarqueses, os autores calcularam a contribuição dos cereais para a ingestão diária de ocratoxina A pela população e concluíram que indivíduos consumidores do pão preto dinamarquês facilmente excederiam a recomendação do Conselho Nórdico de Ministros, que é uma ingestão tolerável de 5 ng/kg p.c. de ocratoxina A. O resultado da pesquisa motivou o setor graneleiro daquele país a melhorar sua capacidade de secagem dos grãos armazenados com o objetivo de melhoria da qualidade (JORGENSEN *et al.*, 1996).

2.4.2 - OCORRÊNCIA DE OCRATOXINA A EM ALIMENTOS NACIONAIS

No Brasil, a ocratoxina A foi encontrada em alimentos diversos como arroz, trigo e seus produtos (BADIALE-FURLONG, 1992, 1995a e 1995b; COELHO *et al.*, 1999; VIEIRA e FURLONG, 1997; FURLONG *et al.* 1999, NUNES, 2003), feijão, farinha de mandioca e milho (MILANEZ e SABINO, 1989; VALENTE SOARES e RODRIGUEZ AMAYA, 1989) e em ração animal (BALDISSERA *et al.*, 1992; SANTÚRIO *et al.*, 1992). Em levantamentos no Estado de São Paulo por VALENTE SOARES e FURLANI (1992, 1996 a e b) não foi constatada a contaminação com ocratoxina A em alimentos como arroz, nozes, castanhas, trigo e produtos de trigo, alimentos naturais diversos e cereais matinais.

Cerveja nacional (26 amostras) e importada (4 amostras) foram analisadas para ocratoxina A. Seis amostras nacionais apresentaram traços de ocratoxina A e 2 amostras importadas apresentaram concentrações de 25 pg/mL e 82 pg/mL (PRADO *et al.*, 2003).

GARDA *et al.* (2004), determinou tricotecenos em 72 amostras de cerveja nacional comercializada no Rio Grande do Sul. Destas 9,7% estavam contaminadas, sendo 5,3% com DON (50 a 336 ng/mL) e 4,5% com toxina T-2 (114 a 249 ng/mL).

LEONI *et al.* (2000) investigaram a ocorrência de ocratoxina A em 34 amostras de café moído e torrado, 14 amostras de café instantâneo e 2 amostras de café instantâneo descafeinado na cidade de Campinas (SP). Os autores analisaram a ocratoxina A usando coluna de imunoafinidade para limpeza e CLAE com detecção de fluorescência para quantificação. O limite de detecção para ocratoxina A foi de 0,2

ng/g. Vinte e três das 34 amostras de café moído e torrado estavam contaminadas com níveis de 0,3 a 6,5 ng/g, apresentando uma concentração média de 0,9 ng/g. Todas as amostras de café instantâneo continham ocratoxina A em níveis entre 0,5 a 5,1 ng/g, com uma média de contaminação de 2,2 ng/g.

Café produzido no Brasil, proveniente de cinco Estados produtores (Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Espírito Santo e Bahia) e destinados ao mercado nacional foi pesquisado para ocratoxina A. A toxina foi isolada em colunas de imunoafinidade e quantificada em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de fluorescência. O limite de detecção do método foi de 0,7 ng/g e o coeficiente de variação médio entre duplicatas foi 11%. Das 132 amostras analisadas, vinte e sete estavam contaminadas com ocratoxina A e a sua concentração média foi de 7,1 ng/g (LEONI *et al.*, 2001).

A ocorrência de ocratoxina A foi verificada em amostras de 10 marcas comerciais de café solúvel e 47 de café torrado e moído, comercializado em Belo Horizonte/MG, no período de outubro/1998 a maio/1999. A toxina foi isolada em colunas de imunoafinidade e quantificada pelo método de CLAE com detector de fluorescência. As recuperações obtidas variaram de 76,5 - 87%, na faixa de 1,5 a 10,0 ng de ocratoxina A /g adicionada em café solúvel e em café torrado e moído os valores de 73 e 86% de recuperação para níveis de ocratoxina A adicionada de 8,4 e 4,2 ng/g, respectivamente. Os limites de detecção para café torrado e moído e café solúvel foram de 0,25 ng/g e 0,10 ng de ocratoxina A/g de ocratoxina A, respectivamente. As amostras de café solúvel continham níveis da toxina entre 0,31 e 1,78

ng/g e as amostras de café torrado e moído de 0,99 e 5,87 ng/g. De acordo com os autores o café pesquisado não apresentava níveis de contaminação significativos (PRADO *et al.*, 2000).

ROSA *et al.* (2002) avaliaram a micoflora de uvas produtoras de vinho tinto para identificar as espécies de *Aspergillus* com potencial para produzir ocratoxina A a partir de dois importantes vinhos produzidos na Argentina e no Brasil. Foram coletadas 50 amostras de uvas das variedades Malbec e Chardonay em cada país durante a safra de 1997-98. As uvas apresentaram uma frequência média de fungos filamentosos de $1,3 \times 10^4$ a $5,4 \times 10^6$ UFC/g. Foram isolados 48 cepas de *Aspergillus niger* de uvas argentinas, sendo que oito produziram ocratoxina A e das 53 cepas de *A. niger* isoladas de uvas brasileiras, dezesseis produziram a toxina. De acordo com os autores, os resultados indicam que uma microbiota similar foi isolada a partir de uvas produtoras de vinho tinto argentino e brasileiro e que possuem o potencial de produzir ocratoxina A nesses substratos.

Suco de uva (48 amostras), polpa concentrada congelada (16 amostras) e vinhos nacionais (25 amostras) comercializados na cidade do Rio de Janeiro foram examinados para ocratoxina A usando coluna de imunoafinidade para extração e limpeza e CLAE com detector de fluorescência para quantificação da toxina. Dentre as amostras de suco de uva, 14 estavam contaminadas com níveis de 21 a 100 ng/L. Apenas 2 amostras de polpa concentrada e congelada continham a toxina em níveis de 21 e 35 ng/L. Dentre as amostras de vinho, a toxina foi encontrada em 6 amostras em níveis de 28 a 42 ng/L (ROSA *et al.*, 2004).

Foram avaliados os gêneros fúngicos e potencial toxigênico da ocratoxina A em feijão classes preto e cores, cultivados em diferentes regiões do Estado de Santa Catarina. A média total de fungos filamentosos foi de $2,8 \times 10^3$ e $6,7 \times 10^3$ UFC/g para feijão classe preto e cores, respectivamente. Os gêneros mais freqüentemente isolados foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Phoma*. Para a avaliação do potencial toxigênico, os extratos dos fungos filamentosos isolados cultivados em agar em placas de Petri, foram submetidos à análise cromatográfica pelo método de cromatografia de camada delgada. No feijão, classe preto, 11,5% das cepas de *Aspergillus* isoladas eram toxigênicas e produtoras de ocratoxina A. Para a classe cores, 5,4 % das cepas de *Aspergillus* isoladas produziram a toxina (COSTA e SCUSSEL, 2002).

Oito amostras de cevada (grão cervejeiro) de cinco fazendas localizadas em cinco diferentes cidades da Bahia-Brasil foram analisadas para aflatoxinas e ocratoxina A utilizando colunas de imunoafinidade e CLAE. Os níveis de recuperação para as toxinas foram de 89,6% e 66,7%, respectivamente. As amostras de cevada analisadas apresentaram uma co-contaminação com aflatoxinas, detectadas em 27 amostras (33,75%) com níveis de 1 a 3 ppb e com ocratoxina A em 9 amostras em níveis menores que 1 ppb (SANTOS *et al.*, 2004).

MALLMANN *et al.* (2003) investigaram os níveis de ocratoxina A em cereais de inverno consumidos no país, no período de março de 1998 até março de 2003. Foram analisadas amostras de aveia (43), centeio (5), cevada (374), trigo (469) e tritcale (33). A extração da toxina foi com clorofórmio e ácido orto-fosfórico e separação da gordura

com hexano. Para a quantificação da toxina foi empregada CLAE com detecção de fluorescência. Das amostras analisadas, 22 (2,38%) estavam contaminadas com ocratoxina A, apresentando nível máximo de 40,2 ng/g em uma amostra de trigo. De acordo com os autores, os níveis de ocratoxina A detectados em cereais de inverno não são expressivos em termos de contaminação, no entanto, esses alimentos devem ser monitorados para a presença de ocratoxina A considerando a importância econômica dos cereais para a agricultura e indústria alimentícia.

CALDAS *et al* (2002) analisaram 366 amostras de alimentos consumidos no Distrito Federal, no período de julho de 1998 a dezembro de 2001. Os alimentos analisados para a ocorrência de ocratoxina A foram amendoim (cru, torrado, em creme, confeitado e doce), castanhas (do Pará, nozes, avelã, de caju, amêndoas e pistache), milho (pipoca, canjica e grão) e farinha (trigo e aveia) por cromatografia de camada delgada. A toxina não foi detectada em nenhuma amostra analisada.

RODRIGUEZ AMAYA e SABINO (2002) analisaram os artigos de pesquisa sobre micotoxinas publicados por pesquisadores brasileiros de 1991 a 2000. Dos 128 artigos revistos, 20 artigos investigaram ocratoxina A em milho e seus produtos, trigo e seus produtos, farinha, arroz, cereais matinais, nozes e café provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Somente para amostras de café foi utilizada coluna de imunoafinidade para limpeza e CLAE com detecção de fluorescência para quantificação. Para análise das demais amostras foi empregada cromatografia de

camada delgada. Os níveis médios de ocratoxina A encontrados para uma das 18 amostras de trigo foram de 40 $\mu\text{g/kg}$, no Rio de Janeiro. Para as 79 amostras de produtos de trigo no Rio Grande do Sul, duas apresentaram níveis médios de 18 $\mu\text{g/kg}$, para farinha de trigo, das 54 amostras, 3 continham ocratoxina A em níveis de 2 a 23 $\mu\text{g/kg}$ e produtos de arroz das 47 amostras, 2 apresentaram níveis médios de 19,35 $\mu\text{g/kg}$. Café torrado e moído das 34 amostras do de São Paulo, 23 apresentaram níveis de 0,3 a 6,5 $\mu\text{g/kg}$ e em Minas Gerais, de 47 amostras, 33 apresentaram níveis de 0,99 a 5,87 $\mu\text{g/kg}$.

2.5 – MÉTODOS ANALÍTICOS PARA OCRATOXINA

Há uma ampla gama de métodos de análises disponíveis para micotoxinas. Alguns fatores determinam a escolha de uma técnica de análise para uma determinada micotoxina. Estes fatores incluem variações na composição dos materiais a serem analisados, confiabilidade do método, escolha do solvente de extração e eficiência da técnica de limpeza do extrato (VAN EGMOND, 1996). Métodos químicos para determinação de micotoxinas usualmente incluem passos básicos como amostragem, extração envolvendo solventes orgânicos e água (combinados), limpeza do extrato, separação, detecção, quantificação e confirmação da identidade. A escolha do solvente depende das propriedades químicas da matriz e da escolha da técnica de limpeza (VAN EGMOND, 1996).

Dentre os métodos disponíveis para análise de ocratoxina A em alimentos podem ser citados cromatografia de camada delgada (CCD) com detecção sob luz ultra violeta, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência e técnicas imunoquímicas. As técnicas de confirmação da identidade da toxina constituem a etapa final da determinação de micotoxinas e incluem derivações químicas, espectrometria de massas, infravermelho, técnicas de imunoafinidade ou detecção por fluorescência.

A técnica de CCD utiliza placa de sílica gel e o desenvolvimento é realizado com uma mistura de solventes (por exemplo, tolueno, acetato de etila, metanol, ácido acético). No entanto, com o desenvolvimento de métodos mais sofisticados como a CLAE e técnicas imunoquímicas, poucos avanços têm sido estabelecidos para CCD. Alguns trabalhos

foram desenvolvidos utilizando CCD modificando as fases móveis utilizadas para prevenir “streaking” nas placas de sílica gel e para melhorar o fator de retenção para ocratoxina A além de melhorar a intensidade da fluorescência na placa através de vapores de amônia (NESHEIM e TRUCKSESS, 1996). Outro estudo foi desenvolvido utilizando metanol:KCL aquoso 4% (9:1) para extração e limpeza com sulfato de amônia ou de cobre. Após a adição desses agentes clarificantes e filtração, a ocratoxina A foi extraída com clorofórmio (VALENTE SOARES, 1987).

A aplicação da técnica de CLAE tornou-se a mais popular na determinação de micotoxinas. Muitas micotoxinas podem ser detectadas por espectroscopia no ultravioleta ou fluorescência. Utilizando-se a fluorescência natural da ocratoxina A, esta pode ser determinada em várias matrizes de alimentos. EL-BANNA e SCOTT (1984) utilizaram H_3PO_4 para extração da toxina, extração em fase sólida para limpeza do extrato e separação e quantificação por CLAE fase reversa com detecção por fluorescência. As recuperações médias foram de 71,5 e 70,2% para amendoim e trigo, respectivamente, e o limite de detecção foi de 0,7 $\mu g/kg$. Para extração da ocratoxina A, geralmente são utilizados solventes orgânicos e adição de pouca quantidade de ácidos (geralmente H_3PO_4) para suprimir a ionização da ocratoxina A e facilitar a dissolução no meio orgânico (SYDENHAM e SHEPHARD, 1996).

Métodos analíticos mais recentes publicados para a determinação de ocratoxina A em cereais usam CLAE com uma etapa de limpeza anterior a extração com fase sólida (SPE) seja usando C_{18} , sílica gel 60

ou troca iônica (SAX) ou ainda coluna de inumoafinidade para obtenção de extratos limpos (NESHEIM *et al.*, 1992; SHARMAN *et al.*, 1992; VAN EGMOND, 1996; SCOTT e TRUCKSESS, 1997; BLESA *et al.*, 2004). Alguns destes métodos têm sido testados em estudos interlaboratoriais com níveis de contaminação de ocratoxina A maiores que 2 µg/kg (SHARMAN *et al.*, 1992). O Comitê Europeu de Padronização adotou dois métodos de cromatografia líquida para determinação de ocratoxina A em cereais e produtos de cereais. Os métodos usam extração em fase sólida (SPE) com sílica gel ou C₁₈ para limpeza e cromatografia líquida em fase reversa com detector de fluorescência para separação final e quantificação. O primeiro método foi validado em estudo interlaboratorial para trigo contendo de ocratoxina A em níveis de 0,4 µg/kg e 1,2 µg/kg. O segundo método foi validado para cevada (2,9 e 14,4 µg de ocratoxina A/kg), milho (8,2 e 16,3 µg de ocratoxina A/kg) e farelo de trigo (3,8 e 4,5 µg de ocratoxina A/kg) (SOLFRIZZO *et al.*, 1998).

As técnicas imunoquímicas têm sido utilizadas para pesquisa de ocratoxina A em alimentos, bem como outras micotoxinas. O método se baseia na interação entre antígenos (micotoxinas) e anticorpos específicos, produzidos em um organismo animal, pelos linfócitos B. Entre os métodos imunológicos, os de uso mais comum na análise de micotoxinas são o ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay), o RIA (Radioimunoensaio) e a cromatografia de imunoafinidade, normalmente utilizada para limpeza dos extratos (FRÉMY e CHU, 1989). A aplicação dos “kits” de método ELISA é rápida e não exige pessoal treinado em técnicas imunológicas. As colunas de imunoafinidade são mais

empregadas na etapa de limpeza das amostras em combinação com CLAE. O RIA tem seu uso limitado devido à complexidade do equipamento para a sua aplicação, além de que envolve trabalho com material radioativo (WHITAKER *et al.*, 1994).

A limpeza dos extratos contendo ocratoxina A freqüentemente faz uso de colunas de imunoafinidade. O extrato é primeiramente diluído e depois adicionado à coluna de imunoafinidade. As colunas são compostas de anticorpos específicos para ocratoxina A. Enquanto a toxina permanece ligada ao anticorpo o material estranho pode ser eliminado da coluna com água ou tampão aquoso. A ocratoxina é finalmente eluída por um solvente como metanol ou acetonitrila. O volume de solvente pode ser ajustado e o extrato eluído pode ser injetado diretamente no sistema de cromatografia líquida para separação final e determinação da micotoxina. Independente da matriz a ser analisada, o processo é o mesmo, permitindo a determinação de ocratoxina A em níveis de 1 µg/kg ou mais baixos (VAN EGMOND, 1996; SCUDAMORE e MACDONALD, 1998). Pode ser verificado o uso freqüente de colunas de imunoafinidade para limpeza do extrato e CLAE com detecção de fluorescência para quantificação da toxina nos diversos levantamentos da presença de ocratoxina A em alimentos.

BUSCARLET *et al.* (2004) estudaram o desenvolvimento de um método específico e rápido para determinação de ocratoxina A em alimentos, baseado na extração com metanol e detecção com ELISA. Este novo imunoensaio cobriu uma escala de 3 a 75 ng/g e apresentou um limite de detecção de 2 ppb e limite de quantificação de 4 ng/g. O tempo total de análise levou 30 minutos. O imunoensaio mostrou-se

específico para ocratoxina A. Amostras de milho, trigo e cevada artificialmente contaminadas com 6 e 30 µg/kg de ocratoxina A apresentaram recuperação de 70 a 90%. Extração de ocratoxina A em amostras de vinhos foi desenvolvido e não requereu coluna de imunoafinidade ou outra limpeza adicional no extrato. As amostras de vinho contaminadas artificialmente com níveis de 3 a 30 µg/kg de ocratoxina A mostraram recuperações maiores do que 90% e sem falsos positivos.

PARK *et al.* (2002) investigaram a ocorrência de ocratoxina A e outras micotoxinas em cevada e alimentos a base de milho em Seoul, Coréia. A presença das micotoxinas foi analisada por ELISA e por CLAE com detecção por fluorescência. As amostras artificialmente contaminadas com ocratoxina A em níveis de 10 ng/g, a recuperação foi de 87% para o método ELISA e 79% para CLAE e os limites de detecção foram 5 ng/g e 1 ng/g, respectivamente.

SOLFRIZZO *et al.* (1998) testaram um processo rápido baseado em desengorduramento usando partição líquido-líquido em vez de extração fase-sólida (SPE) para limpeza, na determinação de ocratoxina A em cereais. Os autores obtiveram bons resultados, em termos de custo, exatidão, repetibilidade e sensibilidade para as análises. A média de recuperação para níveis entre 1 a 100 µg/kg foi de 80 a 104%. Amostras de cevada também podem ser analisadas por este método, mas para confirmação das amostras positivas é necessário usar processos alternativos de limpeza, como a imunoafinidade. Utilizando colunas de imunoafinidade, os autores obtiveram resultados satisfatórios em termos de limpeza do extrato,

exatidão e limite de detecção (0,2 µg/kg) para análises de centeio e outras matrizes complexas como ração.

Em 1992, SHARMAN e colaboradores utilizaram coluna de imunoafinidade para limpeza do extrato e CLAE automatizado para determinar a presença de ocratoxina A em cereais (trigo, cevada, aveia e cereais matinais). Para as amostras de trigo, a contaminação média foi <0,2 µg de ocratoxina A/kg e a recuperação média de 74%. O limite de detecção do método foi de 0,2 µg/kg para trigo e cereais matinais.

TANGNI *et al.* (2002) estudaram a ocorrência de ocratoxina A usando coluna de imunoafinidade para limpeza e CLAE para determinação. A média de contaminação foi de 33 ng/L (cervejas domésticas) e de 32 ng/L (cervejas importadas). O limite de detecção foi de 3 ng/L e o limite de quantificação foi de 10 ng/L. A recuperação média da toxina foi de 97% para níveis de 50 – 200 ng de ocratoxina A/L.

SÁEZ *et al.* (2004) compararam diferentes tratamentos para determinar ocratoxina A em suco de uva e vinho utilizando coluna de imunoafinidade para limpeza e CLAE com detecção por fluorescência para quantificar a toxina. Vários procedimentos de extração e/ou limpeza foram comparados: (1) solução de diluição com PEG (polietileno glicol) 8000 e NaHCO₃ e limpeza em coluna de imunoafinidade, (2) extração com clorofórmio e coluna de imunoafinidade para limpeza e extração fase sólida (SPE), (3) fase reversa (RP) C₁₈, (4) RP fenilsilano e (5) colunas Oasis HLB. Os resultados de recuperação de ocratoxina A adicionada em níveis de 0,1, 0,5 e 1,0 ng/mL nas amostras de vinho tinto, suco de uva e cerveja

para os procedimentos de extração e/ou limpeza foram: para vinho tinto, o procedimento SPE/Oásis HLB foi o único que apresentou recuperações abaixo de 50%, os demais procedimentos apresentaram recuperações médias entre 65% e 101%. Para sucos de uva, os procedimentos com diluição com PEG-NaHCO₃ + coluna de imunoafinidade para limpeza apresentaram recuperações médias de 84% considerando todos os níveis de toxina adicionada, SPE/C18 (MeOH-HAc) apresentou recuperações médias de 82% e para o procedimento com SPE/Oasis HLB as recuperações médias foram de 74%. Para cerveja, os melhores resultados em termos da recuperação da toxina adicionada foi para o procedimento que utilizou SPE/C₁₈ (MeOH-HAc) com recuperação média de 96%.

JORGENSEN e VAHL (1999) analisaram ocratoxina A em farinha de centeio usando CLAE-Espectrometria de Massas. Os autores concluíram que o método apresenta especificidade e sensibilidade para análise e confirmação da toxina em cereais, com limite de detecção de 0,02 µg/kg.

VISCONTI *et al.* (1999) determinaram ocratoxina A em vinho de mesa comparando métodos diferentes, porém sempre usando coluna de imunoafinidade para limpeza e CLAE com detecção por fluorescência para quantificar a toxina. A presença do PEG na solução diluente foi fator determinante para aumentar a recuperação para 100%. As recuperações médias para vinho branco, rosé e tinto em níveis de 0,04 a 10 ng/mL foi de 88 a 103%. O limite de detecção foi de 0,01 ng/mL baseado na relação sinal/ruído de 3:1. O método foi aplicado para 58 amostras de vinho: tinto (38), rosé (8), branco (9). Os

níveis de contaminação de ocratoxina A variaram de $< 0,01$ a $7,6$ ng/mL, sendo que o vinho tinto estava mais contaminado que o rosé e o vinho branco.

FILALI *et al.* (2001) fizeram um estudo preliminar em bebidas marroquinas (vinho e sucos de frutas) para investigar a presença de ocratoxina A utilizando CLAE com detecção fluorimétrica e colunas Sep-Pak[®] com sílica para limpeza. O limite de quantificação do método foi de $0,01$ µg/L, a recuperação média para vinho tinto foi de 93% e para vinho branco foi de 72% para níveis de ocratoxina A adicionada de $0,1$; $1,0$; $2,0$ e 35 µg/L. Para os mesmos níveis, a média de recuperação para a categoria de sucos (laranja, manga, pêssago, abacaxi, maçã, tangerina e pomelo) foi de 80-100%.

MACDONALD *et al.* (1999) utilizando extração metanólica ácida, coluna de imunoafinidade para limpeza e CLAE com detector por fluorescência para investigar a presença de ocratoxina A em passa de uva e groselha. Os autores conseguiram limite de detecção estimado em $0,2$ µg/kg e recuperações de 63 – 77% usando um nível de adição da toxina de 5 µg/kg.

ZIMMERLI e DICK (1996a) avaliaram a ocorrência de ocratoxina A em vinho de mesa e sucos de frutas na Suíça. O método usado foi coluna de imunoafinidade para limpeza e CLAE fase reversa com detecção por fluorescência para quantificação da toxina. O limite de detecção estimado de 3 pg baseado na solução padrão (razão sinal/ruído de 3) e limite de quantificação de 5 pg/mL. A recuperação média para 55 pg/mL foi de 84%.

HALD *et al.* (1993) participaram de um projeto da Comissão de Materiais de Referência da Comunidade Européia (BCR) para avaliar métodos analíticos para determinação de ocratoxina A em alimentos e que envolveu 24 laboratórios europeus. A primeira fase do projeto foi a inter-comparação de procedimentos para a determinação de ocratoxina A em trigo contaminado com 13 µg/kg e trigo com <1 µg/kg (considerado o “branco” da amostra). Os participantes testaram vários solventes incluindo clorofórmio, metanol, tolueno e acetato de etila para extração. Para limpeza do extrato avaliaram sílica, fase reversa e colunas de imunoafinidade. A maioria dos laboratórios participantes utilizou CLAE com detector de fluorescência para determinação da toxina e apenas um laboratório usou cromatografia de camada delgada. A recuperação foi de 25 a 100%. O estudo mostrou que a variedade de resultados foi influenciada mais pela etapa de limpeza do que pelo solvente de extração. A segunda etapa do projeto ocorreu em 1996 (WOOD *et al.*, 1996) e envolveu 26 laboratórios europeus, os quais analisaram trigo contaminado com níveis de 7 µg/kg e trigo com <0,2 µg/kg (considerado o “branco” da amostra). Os participantes utilizaram uma variedade de processos analíticos envolvendo diferentes solventes de extração e diferentes técnicas de limpeza. Todos os laboratórios usaram CLAE com detector de fluorescência para determinação da ocratoxina A. Alguns laboratórios usaram coluna de imunoafinidade para limpeza do extrato em comparação com sílica (Sep-Pak), C₁₈ (Sep-Pak), extração líquido-líquido, coluna com terra diatomácea impregnada com NaHCO₃ (1,25%). A recuperação variou de 58 a 114% para CLAE e ficou na mesma faixa quando usaram

coluna de imunoafinidade para limpeza. A investigação dos protocolos dos laboratórios envolvidos no estudo mostrou que o tempo para evaporação do solvente foi crucial para obter uma boa recuperação. Quando as amostras foram analisadas imediatamente após adição do solvente (por exemplo tolueno:ácido acético) contendo a toxina a recuperação foi de 14%, após 18 horas para extração a recuperação foi de 87%.

ESKOLA *et al.* (2002) estudaram a aplicação de dois sistemas para purificação de ocratoxina A em cereais (trigo, centeio, cevada e aveia) sendo um sistema manual a vácuo e um sistema automatizado com extração em fase sólida com colunas de imunoafinidade para limpeza dos extratos e CLAE por fluorescência para quantificação. O limite de detecção do método para ocratoxina A foi de 0,1 µg/kg para os dois sistemas de purificação empregados. A recuperação média da toxina para níveis de 0,6 µg/kg e 2,5 µg/kg para o método manual foi de 82 e 87% para trigo, 96 e 95% para centeio, 85 e 88% para cevada e 101 e 88% para aveia, respectivamente. O método analítico que empregou o sistema automatizado apresentou recuperações médias de 68 e 85% para trigo, 82 e 95% para centeio, 87 e 85% para cevada e 106 e 93% para aveia, respectivamente. O desvio padrão relativo para ambos os métodos foi de 2-15%.

Em 1998, SCUDAMORE e MACDONALD participaram no Reino Unido de um estudo colaborativo para determinar ocratoxina A em trigo usando imunoafinidade de duas marcas diferentes e CLAE para determinação. A recuperação média em trigo, para níveis de 5 µg/kg, foi de 91% e 93%. O estudo mostrou que as colunas de imunoafinidade

de duas marcas comerciais exibiram desempenho confiável com excelente precisão e compatibilidade com solventes polares.

ENTWISLE e colaboradores (2000) participaram de um estudo colaborativo para determinar ocratoxina A em cevada utilizando coluna de imunoafinidade para limpeza do extrato e CLAE com detecção por fluorescência. A ocratoxina A foi extraída com acetonitrila-água. O extrato foi diluído com tampão salino (PBS) e aplicado na coluna de imunoafinidade. A toxina foi eluída da coluna com metanol. O limite de detecção foi de 0,2 µg/kg (relação sinal-ruído 3:1). A ocratoxina A foi adicionada em concentração de 4 ng/g e as recuperações obtidas foram de 65 a 113%.

Foi realizado um estudo para avaliação de métodos para determinação de ocratoxina A em cafés verdes e torrados através de CLAE. Foram utilizadas colunas de extração em fase sólida (de sílica, cianopropil e octadecilsilil), as quais não apresentaram limpeza ou recuperação adequadas para as amostras estudadas. Colunas de imunoafinidade foram também testadas. Estas últimas mostraram-se eficientes quanto à limpeza e à recuperação, pois foram capazes de remover os interferentes existentes nas amostras permitindo a determinação da toxina por cromatografia líquida de alta eficiência em concentração de 0,7 ng/g. As colunas de imunoafinidade de duas marcas diferentes foram testadas com relação à recuperação da toxina e à reutilização. As colunas de uma das marcas apresentaram maior eficiência, com recuperação média de 97% no primeiro uso e acima de 70% até a quarta utilização, indicando que a procedência da coluna de imunoafinidade é importante para bons resultados (FURLANI *et al*, 1999).

Recentemente foram desenvolvidas colunas de imunoafinidade para determinação simultânea de micotoxinas (ZABE *et al.*, 2004) para determinação das toxinas em CLAE. O método baseia-se na extração das amostras em acetonitrila e água, o extrato é diluído com tampão e passado nas colunas contendo anticorpos imobilizados para aflatoxina e ocratoxina ou colunas de imunoafinidade contendo anticorpos para aflatoxina, ocratoxina e zearalenona. A recuperação é maior do que 80% para aflatoxinas e ocratoxina. Foi demonstrado que aflatoxina, ocratoxina e zearalenona podem ser analisadas efetivamente em amostras de arroz, cevada, centeio e ração, com recuperações das toxinas em média de 90%.

BLESA *et al.* (2004) estudaram um método baseado na extração com C₈, CLAE com detector de fluorescência e espectro de massas para determinação de ocratoxina A em cereais e produtos de cereais. A recuperação de ocratoxina A foi de 86% em amostras de arroz para níveis de 10 ng/g. O limite de detecção e quantificação do método foi de 0,25 e 0,75 ng/g, respectivamente.

A técnica de cromatografia gasosa (CG) também pode ser utilizada para determinação de micotoxinas em alimentos. No entanto, é necessário que as amostras a serem analisadas sejam voláteis à temperatura da coluna, ou mais comumente possam ser convertidas em derivados voláteis (BETINA, 1989). A cromatografia gasosa tem sido utilizada para determinação simultânea de alguns tipos de tricotecenos em cereais, e em combinação com espectroscopia de massas tem sido empregada na determinação de zearalenona em produtos de milho, patulina em suco de maçã e para confirmação de aflatoxinas em amendoim (SYDENHAM e SHEPHARD, 1996; SCOTT, 1991a).

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – AMOSTRAS

3.1.1 – Sucos de frutas

Para o levantamento de incidência foram utilizadas 144 amostras de sucos de frutas sendo 49 de maracujá, 29 de laranja, 35 de uva e 31 de abacaxi, adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Campinas, SP, no período de abril/2003 a janeiro/2004. As amostras foram provenientes de fábricas situadas em 29 localidades de 9 Estados brasileiros (AL, BA, CE, ES, MG, PR, RS, SE e SP) e pertenciam a 24 marcas pertencentes a 10 fabricantes.

Para o trabalho de otimização do método analítico e para o levantamento de incidência foram usados sucos concentrados em embalagem de vidro ou plástica e sucos de frutas prontos para beber em embalagem cartonada, todos adequados para armazenamento à temperatura ambiente até abertura da embalagem.

3.1.2 – Cervejas

Um total de 123 amostras de cervejas (94 amostras de cerveja tipo *Pilsen* e 29 amostras de cerveja escura) foi coletado no período de dezembro/2003 a março/2004, na região da cidade de Campinas, SP. As amostras eram provenientes de fábricas de 16 localidades de 5 Estados (PA, PB, PR, RJ e SP) brasileiros e correspondiam a 24 marcas e a 10 fabricantes.

As amostras estavam acondicionadas em embalagens de vidro e latas de alumínio e foram armazenadas a temperatura ambiente até abertura da embalagem.

3.1.3 – Cereais

Foram utilizadas 80 amostras de cereais (28 de cevada, 22 de centeio e 30 de aveia), adquiridas em estabelecimentos comerciais na região da cidade de Campinas, SP, no período de maio/2004 a outubro/2004. As amostras eram provenientes de fábricas situadas em 6 localidades de 3 Estados brasileiros (PR, RS e SP) e pertenciam a 11 marcas.

Todas as amostras foram mantidas à temperatura ambiente até análise. Antes da abertura da embalagem as amostras foram agitadas para garantir homogeneidade. Após abertura da embalagem as amostras foram mantidas em refrigerador até realização das análises das duplicatas, período este nunca maior que uma semana.

3.2 – MATERIAIS, REAGENTES E PADRÕES

Água destilada e purificada pelo sistema Milli-Q Plus (Millipore, EUA), solventes e reagentes grau analítico para extração das amostras, solventes grau cromatográfico para fase móvel CLAE, padrão de ocratoxina A (Sigma, EUA), colunas de imunoafinidade Ochraprep (RHONE R-BIOPHARM LTD, Glasgow, Escócia), tubos de ensaio, filtros para amostra (Millipore Corp., Milford, EUA), tampão fosfato salino – PBS (NaCl 120 m mol/L, KCl 2,7 m mol/L e tampão fosfato 10 m mol/L).

3.3 – PREPARO DE PADRÃO DE OCRATOXINA A

3.3.1 – Sucos de frutas

Foi preparada uma solução estoque do padrão de ocratoxina A de 49,68 µg/mL em benzeno.

A partir da solução estoque, foi preparada a solução intermediária de 0,49 µg/mL em ácido acético/benzeno (1:9). A partir desta solução, foi realizada uma nova diluição em benzeno para preparar a solução de trabalho (9,9 ng/mL).

3.3.2 – Cervejas

Foi preparada uma solução trabalho de concentração 0,91 µg/mL a partir da solução estoque do padrão de ocratoxina A de 60,66 µg/mL em benzeno.

3.3.3 – Cereais

Foi preparada uma solução intermediária de padrão de ocratoxina A (12,59 µg/mL) em benzeno a partir da solução estoque (60,66 µg/mL). A partir da solução intermediária foi preparada uma diluição (1:5) para uma nova solução intermediária (2,519 µg/mL) e a partir desta solução foi preparada uma nova diluição (1:25) para solução trabalho (100,78 ng/mL) em benzeno.

Foi verificada a pureza de todas as soluções em camada delgada (Sílica gel em folha de alumínio, Merck, Darmstadt, Alemanha) após desenvolvimento com tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (5:4:1), visualizando-se o padrão sob luz ultravioleta. Considerou-se a presença de uma única mancha como indicativo do padrão não estar

contaminado ou decomposto. A concentração exata das soluções foi determinada espectrofotometricamente segundo o procedimento da AOAC International (1997). Durante o preparo e imediatamente antes do uso, todas as soluções do padrão foram agitadas no ultra-som por 30 segundos.

3.4 – PREPARO DAS AMOSTRAS

3.4.1 – Sucos de frutas

As amostras de sucos de uva e abacaxi foram filtradas através de filtros de microfibra de vidro e de papel de filtro grau qualitativo, respectivamente. Os sucos de laranja e maracujá foram primeiramente tratados enzimaticamente e em seguida centrifugados a 2500 rpm/30 minutos (Figura 3.1). As etapas de extração e limpeza em coluna de imunoafinidade foram realizadas de acordo com o método de ZIMMERLI e DICK (1995) modificado, conforme descrito adiante (Figuras 3.2 e 3.3). Para o teste de recuperação, foram adicionados 0,19 ng de ocratoxina A/mL em tubo de ensaio, deixado evaporar o benzeno em banho (60°C) sob fluxo de nitrogênio e então adicionadas as amostras e seguidas as etapas de extração da toxina.

3.4.2 – Cervejas

As amostras de cerveja foram primeiramente degaseificadas em agitador horizontal (New Brunswick, Alemanha). O pH foi acertado em $7,2 \pm 1$ e em seguida foi executada a metodologia para extração e eluição da ocratoxina A de acordo com procedimento da R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002).

Para avaliar a recuperação da toxina foi utilizada uma amostra não contaminada que foi adicionada de padrão de ocratoxina A de maneira que a amostra ficasse com concentração de 3 ng/mL. Foi permitida a evaporação do benzeno por cerca de 30 minutos antes da execução da metodologia do fabricante das colunas de imunoafinidade.

3.4.3 – Cereais

As amostras de cereais foram moídas até atingir granulometria de 40 mesh. Diversos métodos de extração e limpeza dos extratos foram testados conforme descrito adiante.

Quando preparadas para teste de recuperação, as amostras foram pesadas (10 g) e artificialmente contaminadas com 25 ng de ocratoxina A/g. As amostras contaminadas foram deixadas em repouso durante a noite para evaporação do benzeno e a seguir submetidas às etapas de extração e limpeza do extrato.

3.5 – DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Para detecção e quantificação foi empregado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência modelo 1050 (Hewlett Packard, Wallbron, Alemanha) com injetor manual Rheodyne com alça de amostragem de 100 μ L, detector de fluorescência modelo 1046A Hewlett Packard, integrador modelo 3393A Hewlett Packard, pré- coluna (Varian) com fase estacionária de sílica, coluna de guarda (10-4.6 RP-18E) e coluna analítica C18 (10 cm x 4,6 mm) Chromolith (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A fase móvel foi ácido acético 9%/metanol (35:65) com vazão de 1 mL/minuto. Os comprimentos de onda utilizados foram: excitação 333 nm e emissão 470 nm. A quantificação da ocratoxina A foi realizada por padronização externa a partir de injeções realizadas com o padrão. A faixa de concentração na alça de amostragem de 100 μ L foi de 0,019 a 0,19 ng para sucos, de 2,7 a 1,63 ng para cerveja, e de 1,8 a 7,0 ng para cereais. Todos os extratos secos foram redissolvidos em 1 mL da fase móvel e filtrados através de filtro com poros de 0,45 μ m.

3.6 – CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICO

Em cada série de 8-10 amostras analisadas foi incluído um teste de recuperação onde uma amostra não contaminada foi adicionada de padrão de ocratoxina A de maneira a atingir a concentração de 0,19 ng/mL para sucos de frutas, 3 ng/mL para as amostras de cerveja e 25,0 ng/g para as amostras de cereais. O critério para amostras positivas foi análise em duplicata e duplicatas analisadas em dias diferentes.

O limite de detecção do método foi determinado para cada tipo de material analisado (os sucos de maracujá, laranja, uva e abacaxi, cerveja, e os cereais cevada, aveia e centeio) a partir do desvio padrão médio calculado a partir da área conseguida com 5 a 7 injeções de uma mesma amostra artificialmente contaminada e previamente submetida ao método analítico otimizado para o tipo de matriz. Foi considerado como limite de detecção o desvio padrão médio multiplicado por três. O limite de quantificação foi estabelecido como sendo 5 vezes o limite de detecção (TAYLOR, 1987).

O limite de detecção do equipamento foi baseado na concentração do padrão que produz um sinal de três vezes a razão ruído/sinal do equipamento. A repetibilidade do detector foi determinada pelo desvio padrão relativo de uma mesma amostra ou padrão.

3.7 – RECUPERAÇÃO DA OCRATOXINA A EM COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE

Foram realizados testes para verificar a recuperação do padrão de ocratoxina A nas colunas de extração de imunoafinidade avaliando o condicionamento, lavagem e eluição da toxina, testando o procedimento da R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002) (Tabela 3.1).

Os sistemas empregados estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 3.1 – Sistemas testados para eluição do padrão de ocratoxina A em colunas de imunoafinidade ^a.

Testes		Processos de limpeza e eluição	
1 – 0,74 ng de padrão em 150 mL de tampão fosfato	Passar 20 mL água ultra-pura	Eluição da ocratoxina A com 1,5 mL ácido	
2 – 0,74 ng de padrão em 2 mL água ultra-pura	Passar 20 mL água ultra-pura	Eluição da ocratoxina A com 1,5 mL ácido	
3 - 0,74 ng de padrão em 2 mL água ultra-pura	Passar 20 mL água ultra-pura	Eluição da ocratoxina A com 3,0 mL ácido	
4 – 0,74; 1,24 e 2,48 ng de padrão em 20 mL tampão	Passar 20 mL água ultra-pura	Eluição da ocratoxina A com 1,5 mL ácido	

^a Ochraprep, R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002)

A partir dos testes da tabela 3.1, foi verificada a recuperação do padrão de ocratoxina A em tampão fosfato e a reutilização das colunas de imunoafinidade com adaptações na metodologia. Para avaliar a recuperação da toxina utilizou-se 20 mL de tampão fosfato que foi adicionado de padrão de ocratoxina A de maneira que o tampão ficasse com concentração de 0,049 ng/mL. Após foi aplicado em coluna de imunoafinidade Ochraprep com vazão de 2-3 mL/min. A coluna foi lavada com 10 mL de água ultra-pura (vazão de 5 mL/min), deixada secar passando ar e a ocratoxina A foi eluída da coluna com 3 mL de metanol (vazão de 0,5 mL/min). O extrato foi seco em banho (60°C) sob fluxo de nitrogênio e re-suspendido em 1 mL de fase móvel e injetado 100 µL em CLAE.

3.8 – REUTILIZAÇÃO DAS COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE

Foi verificado o desempenho das colunas de imunoafinidade quando reutilizadas para cada tipo de amostra do estudo. As amostras foram contaminadas artificialmente com ocratoxina A em níveis de 0,19 ng/mL para sucos, 3 ng/mL para cervejas e 25 ng/g para cereais. Foi seguido o método de extração para cada tipo de amostra e após a eluição da ocratoxina A, a coluna foi lavada com 20 mL de tampão fosfato salino (PBS) com pH 7,4 e colocada sob refrigeração (4-8°C) em refrigerador comum por no mínimo 48 horas até o próximo uso (ZIMMERLI e DICK, 1996b).

3.9 – AVALIAÇÃO DE METODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM SUCOS DE FRUTAS

3.9.1 – Extração de ocratoxina A de amostras não clarificadas de sucos de frutas

Primeiramente foi testada a metodologia de ZIMMERLI e DICK (1995) sem clarificação dos extratos, como apresentado na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Extração de ocratoxina A em amostras de sucos de frutas fortificadas.

Extração		
Zimmerli e Dick (1995)	Modificação 1	Modificação 2
Secar 100 µL do padrão* Adicionar 5 mL amostra + 10 mL NaCl-H ₃ PO ₄ Agitar por 15 s.	Secar 100 µL do padrão Juntar 100 µL metanol + 5 mL amostra 10 mL NaCl-H ₃ PO ₄ Agitar por 15 s.	Secar 100 µL do padrão Suspender em 1 mL NaCl-H ₃ PO ₄ Agitar tubos (15 s) 5 mL amostra + 9 mL NaCl-H ₃ PO ₄ + agitador tubos (15 s)
1ª partição : 10 mL clorofórmio Agitação manual 5-6 min Retirar alíquota 5 mL	1ª partição : 10 mL clorofórmio Agitação manual 5-6 min Retirar alíquota 5 mL	1ª partição : 10 mL clorofórmio Agitação manual 5-6 min Retirar alíquota 5 mL
2ª partição : 10 mL clorofórmio Agitação manual 5-6 min Retirar alíquota 5 mL	2ª partição : 10 mL clorofórmio Agitação manual 5-6 min Retirar alíquota 5 mL	2ª partição : 10 mL clorofórmio Agitação manual 5-6 min Retirar alíquota 5 mL
Extrato final Evaporar	Extrato final Evaporar	Extrato final Evaporar

*100 µL do padrão= 0,99 ng

3.9.2 – Clarificação das amostras de sucos de frutas

Foi testado o Triton-X 100 (Riedel, Alemanha) para eliminar a emulsão formada durante a extração nos sucos estudados.

Foram testados também outros procedimentos para etapa de clarificação dos sucos de frutas. Os sucos de uva e abacaxi foram submetidos a filtração através de filtros de microfibra de vidro (GF 51-B, Schleicher-Schuell, Alemanha) e papel de filtro qualitativo (Whatman), respectivamente. Para os sucos de laranja e maracujá foi necessário tratamento enzimático utilizando a enzima Ultra-L (10%) e a enzima Pectinex (10%) (Switzerland AG., Dittingen), respectivamente e centrifugação (figura 3.1).

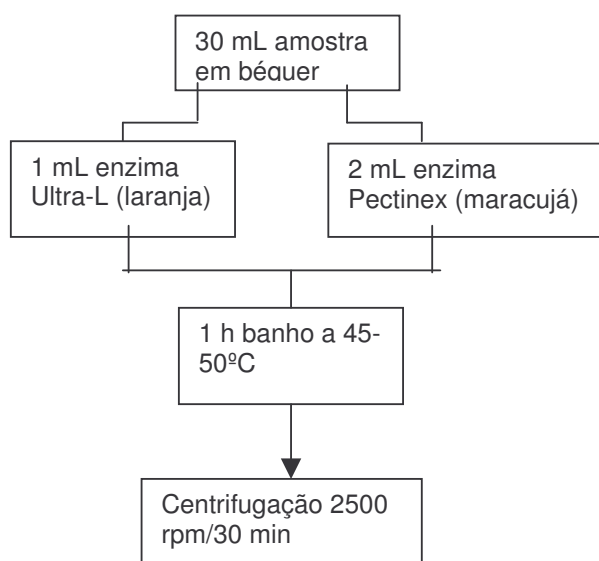


Figura 3.1 – Tratamento enzimático e centrifugação dos sucos de frutas de laranja e maracujá.

3.9.3 – Extração de ocratoxina A das amostras clarificadas de sucos de frutas

Após a clarificação das amostras, foi testado o método de ZIMMERLI e DICK (1995) modificado para extração da toxina e limpeza do extrato como apresentado nas Figuras 3.2 e 3.3. Para a limpeza do extrato foi utilizada a coluna de imunoafinidade Ochraprep (RHONE R-BIOPHARM LTD). Os extratos obtidos a partir desse procedimento foram injetados em cromatógrafo líquido de alta eficiência nas condições descritas em 3.5.

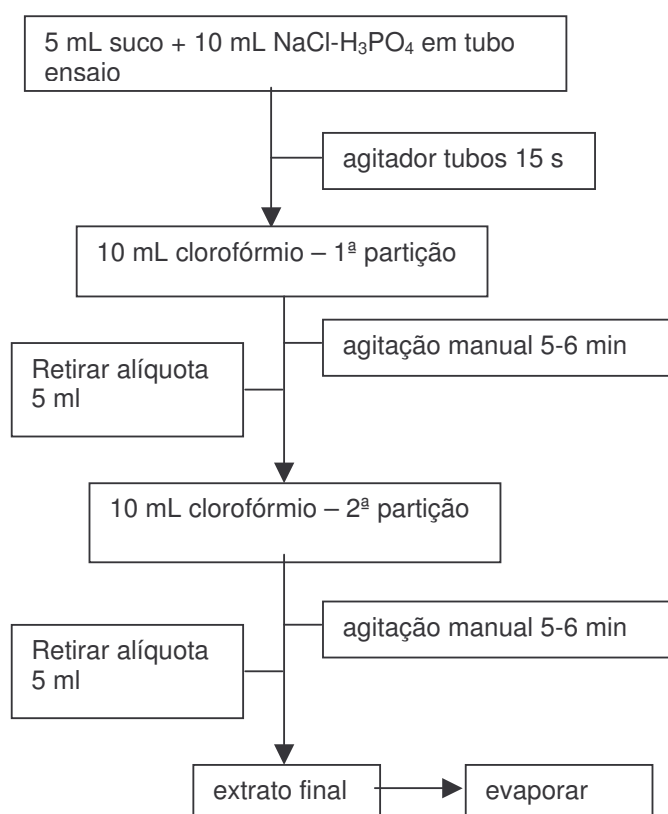


Figura 3.2 – Procedimento para extração da ocratoxina A das amostras de sucos de frutas.

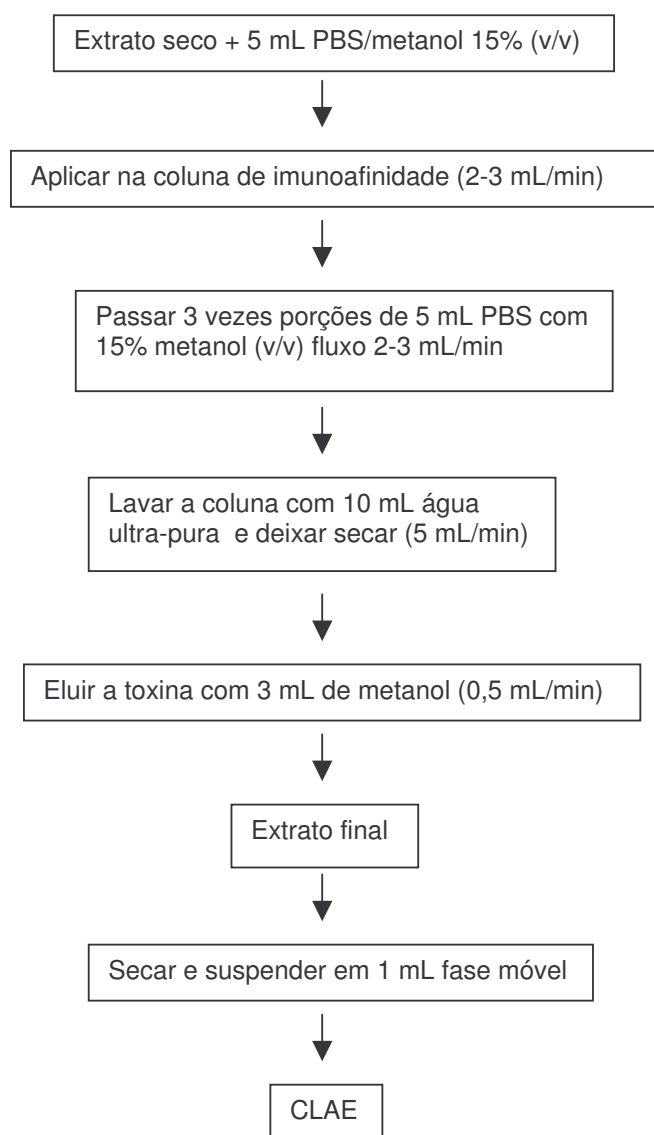


Figura 3.3 – Procedimento para limpeza dos extratos de sucos de frutas utilizando colunas de imunoafinidade

3.9.4 – Extração de ocratoxina A de amostras clarificadas de sucos de frutas e limpeza do extrato

Para a extração de ocratoxina A das amostras e limpeza do extrato foi empregado o método de ZIMMERLI e DICK (1995) modificado, como segue:

Na extração foi tomada uma alíquota de 5 mL da amostra em tubo de ensaio (1,5 x 150 mm) e adição de 10 mL da solução de NaCl- H_3PO_4 e seguiu-se uma agitação em agitador de tubos (Vortex, Phoenix AP 56) em velocidade 4, por 15 segundos para homogeneização.

Para contaminar artificialmente as amostras, foram aplicados primeiramente padrão de ocratoxina A no tubo de ensaio, de modo que as amostras ficassem com concentração de 0,19 ng/mL, que foi levado a secura em banho (50°C) sob fluxo de nitrogênio para evaporar o benzeno e então adicionada uma alíquota de 5 mL da amostra. Em seguida foram adicionados 2 mL de NaCl- H_3PO_4 agitando-se em agitador de tubos e adição de mais 8 mL da mesma solução e nova agitação. Foram adicionados 5 mL da amostra e nova agitação. A seguir foram realizadas duas partições com 10 mL de clorofórmio e agitação vigorosa por 6 minutos, sendo combinados 5 mL de cada partição de clorofórmio para o mesmo frasco e evaporados até secura em banho (50°C) sob fluxo de nitrogênio.

O extrato seco foi suspenso em 5 mL de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 contendo 15% de metanol (v/v), lavando as paredes do frasco e transferindo quantitativamente o extrato para a coluna de imunoafinidade Ochraprep adaptada em sistema para

filtração à vácuo (Visiprep DL™, Supelco, EUA). Esta operação foi repetida 3 vezes com porções de 5 mL de PBS contendo 15% de metanol. A coluna foi lavada passando 10 mL de água purificada pelo sistema Milli-Q plus (Millipore Corp., Milford, EUA) e seca deixando passar ar. A toxina foi extraída com 3,0 mL de metanol e coletada em um frasco. O extrato foi evaporado até secar em banho (50 °C) sob fluxo de nitrogênio.

O extrato seco foi dissolvido em 1000 µL de fase móvel (ácido acético 9%metanol/ 35:65), com agitação em ultra-som por 30 segundos e filtrado através de filtros com poros de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Millipore Corp., Milford, EUA) para aplicação em CLAE.

3.10 – AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CERVEJAS

3.10.1 – Extração de ocratoxina A das amostras de cervejas

Foi avaliada a extração de ocratoxina A das amostras de cervejas nacionais em colunas de extração de imunoafinidade (Ochraprep) de acordo com o procedimento da R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002).

Tabela 3.3 - Procedimento empregado para extração de ocratoxina A de amostras de cerveja e limpeza do extrato em colunas de imunoafinidade.

Método da R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002)	Método da R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002) modificado
Degaseificar a cerveja em ultrassom por 30 min	Degaseificar a cerveja em agitador por 60 min/25°C/100 rpm.
Ajustar o pH a 7,2 com NaOH 2M. Passar 150 mL da amostra na coluna (2-3 mL/min)	Ajustar o pH a 7,2 com NaOH 2M. Passar 30 mL da amostra na coluna (2-3 mL/min)
Lavar a coluna passando 20 ml de água ultra-pura (5 mL/min) Secar passando ar	Lavar a coluna passando 20 ml de água ultra-pura (5 mL/min) Secar passando ar
Eluir a ocratoxina A com 1,5 mL de solução de dessorção (2:98 ácido acético/metanol) e 1,5 mL de água ultra-pura	Eluir a ocratoxina A com 3,0 mL de metanol grau cromatográfico
Coletar num frasco e secar sob fluxo de nitrogênio	Coletar num frasco e secar sob fluxo de nitrogênio

3.11 – AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CEREAIS

Foram testados dez procedimentos descritos na literatura para extração da toxina nas amostras de aveia, cevada e centeio e limpeza do extrato em coluna de imunoafinidade avaliando a transferência da toxina para a coluna, condicionamento, lavagem e eluição da ocratoxina A da coluna.

3.11.1 – Teste 1 – Método para extração de ocratoxina A de cereais de acordo com R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002)

Pesar 50 g de amostra e adicionar 200 mL de acetonitrila/água (60% v/v) e homogeneizar em liquidificador em alta velocidade por 2 minutos, filtrar em papel de filtro Whatman nº 4 ou centrifugar (no mínimo 1600 rpm) por 10 minutos. Tomar alíquota de 4 mL do filtrado ou sobrenadante e diluir com 44 mL de tampão PBS pH 7,4. Se houver precipitação nesse estágio, re-filtrar ou re-centrifugar. Aplicar na coluna o extrato diluído (48 mL) com vazão de 2-3 mL/minuto. Lavar a coluna com 20 mL de tampão PBS (vazão aproximada de 5 mL/min). Secar a coluna deixando passar ar e eluir a ocratoxina A com 1,5 mL de solução de dessorção (ácido acético/metanol 2:98 v/v) e 1,5 mL de água ultra-pura e coletar no mesmo frasco anterior. Injetar 100 µL no sistema CLAE.

3.11.2 – Teste 2 – Método para extração de ocratoxina A em café de acordo com R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002)

Pesar 10 g de amostra, adicionar 200 mL de bicarbonato de sódio em água deionizada a 1% (v/v) e agitar em liquidificador por 2 minutos em alta velocidade. Filtrar o extrato em papel de filtro qualitativo. Diluir 5 mL do filtrado com 5 mL de tampão fosfato ou 20 mL do filtrado com 20 mL de tampão. Aplicar o extrato na coluna de imunoafinidade com vazão de 2-3 mL/minuto. Lavar a coluna com 20 mL de tampão com vazão de 5 mL/minuto. Secar a coluna deixando passar ar. Eluir a ocratoxina A com 1,5 mL de solução de dessorção (ácido acético/metanol 2:98 v/v) e 1,5 mL de água deionizada (água ultra-pura). Injetar 100 µL no sistema CLAE.

3.11.3 – Teste 3 – Método para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com SHARMAN *et al.* (1992)

Pesar 10 g de amostra em um béquer e adicionar 40 mL de tampão PBS/metanol (50:50 v/v). Misturar em homogeneizador de haste (Ultra Turrax, Tecnal, Brasil) em alta velocidade (3-5 minutos), filtrar em papel de filtro qualitativo (Whatman). Tomar uma alíquota de 15 mL e diluir com 35 mL de tampão. A coluna foi previamente condicionada com 20 mL de tampão fosfato salino antes da aplicação da amostra em vazão 5 mL/minutos. Lavar a coluna com 10 mL de água ultra-pura (vazão 6 mL/min), secar deixando passar ar. Eluir a toxina com 2 mL de metanol (vazão 2 mL/min). Diluir a amostra com 2 mL de água ultra-pura e injetar 400 µL no sistema CLAE.

3.11.4 – Teste 4 – Método para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com SCUDAMORE e MACDONALD (1998)

Pesar 25 g de amostra, adicionar 100 mL de acetonitrila/água (60:40) e homogeneizar em liquidificador por 2 minutos. Filtrar em papel de filtro grau qualitativo (Whatman) e coletar alíquota de 4 mL e diluir com 44 mL de tampão fosfato. Aplicar a amostra (vazão 5 mL/min) em coluna de imunoafinidade previamente condicionada com 20 mL de tampão fosfato. Após aplicação da amostra à coluna, lavar com 20 mL de água ultra-pura (vazão 6 mL/min) e secar deixando passar ar. Eluir a toxina com 1,5 mL de solução de dessorção (ácido acético/metanol 2:98) (vazão 2 mL/min) e 1,5 mL de água ultra-pura na mesma vazão. Secar o extrato sob fluxo de nitrogênio (60°C) e re-suspender em 1 mL de fase móvel. Injetar 100 µL em sistema CLAE.

3.11.5 – Teste 5 – Método para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com SOLFRIZZO *et al.* (1998)

Pesar 10 g de amostra, adicionar 60 mL de clorofórmio e 5 mL de ácido fosfórico 0,1M e agitar por 30 minutos e filtrar em papel de filtro qualitativo. Tomar alíquota de 10 mL do filtrado. Evaporar sob fluxo de nitrogênio (60°C). Reconstituir o resíduo com 600 µL de acetonitrila/água/ácido acético (41:58:1 v/v/v) e misturar por 1 minuto. Desengordurar o extrato com 1 mL de n-hexano em agitador de tubos por 1 minuto e centrifugar a 4000 rpm/10 minutos. Diluir o extrato desengordurado com 4,55 mL de acetonitrila/água/ácido acético (41:58:1 v/v/v) e misturar por 30 segundos. Diluir o extrato em 20 mL

de água deionizada e misturar. Filtrar através de membrana de fibra de vidro (GF/A 90 mm, Whatman, Maidstone, Reino Unido). Tomar 10 mL do extrato e passar na coluna de imunoafinidade OchraTeste (Vicom, EUA) a uma vazão de 1-2 gotas/s. Lavar a coluna com 10 mL de solução de lavagem (25 g/L de NaCl, 5 g/L de NaHCO₃, 0,1 mL/L de Tween 20) e 10 mL de água destilada a uma vazão de 1-2 gotas/s. Eluir a ocratoxina A com 1,5 mL de metanol. Evaporar à secura sob fluxo de nitrogênio (60°C). Reconstituir o extrato seco em 200 µL de acetonitrila/água/ácido acético (41:58:1 v/v/v) e injetar 100 µL em sistema CLAE.

3.11. 6 – Teste 6 – Método para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com LEPON (1986)

Extrair 25 g de amostra com 200 mL de acetonitrila/água (9:1) contendo 4% de cloreto de potássio e 0,4 mL de ácido sulfúrico concentrado e misturar em funil de separação. Filtrar em papel de filtro grau qualitativo (Whatman), tomar 100 mL do filtrado e desengordurar com 50 mL de n-hexano. Adicionar 25 mL de água, a fase acetonitrila/água foi extraída três vezes sucessivamente com 50, 10 e 10 mL de clorofórmio. A fase clorofórmica foi homogeneizada três vezes com 25 mL de solução de carbonato ácido de sódio (5%). Acidificar a fase aquosa até pH 1,5 com ácido clorídrico concentrado e extrair sucessivamente com 50, 25 e 25 mL de clorofórmio. Coletar a camada clorofórmica e secar com sulfato de sódio anidro. Filtrar e evaporar o clorofórmio em evaporador rotatório à temperatura ambiente. Transferir o resíduo quantitativamente para um frasco com

porções de clorofórmio (3 x 1 mL). Secar o solvente sob fluxo de nitrogênio. Dissolver o resíduo em volume apropriado de fase móvel (1-5 mL) e injetar 20 µL em sistema CLAE.

3.11.7 – Teste 7 – Método para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com VALENTE SOARES (1987)

Pesar 50 g da amostra, adicionar 270 mL de metanol e 30 mL de solução de cloreto de potássio (4%) e homogeneizar em liquidificador comum por 5 minutos em velocidade média. Filtrar em papel de filtro qualitativo (Whatman), coletar 150 mL do filtrado para um béquer e adicionar 150 mL de sulfato de amônio e 50 mL de Celite. Misturar e deixar em repouso por 5 minutos. Filtrar novamente, transferir uma alíquota de 150 mL para funil de separação. Adicionar 150 mL de água ultra-pura e 10 mL de clorofórmio ao funil de separação. Agitar por 3 minutos (1ª partição) e deixar repousar por 10 minutos. Coletar a fase clorofórmica em um béquer. Adicionar mais 10 mL de clorofórmio ao funil e agitar por 3 minutos. Deixar repousar por mais 10 minutos (2ª partição). Coletar a fase clorofórmica para outro béquer e coletar 5 mL de cada béquer e transferir para um terceiro frasco. Deixar secar o extrato clorofórmico sob fluxo de nitrogênio (60°C). Dissolver o resíduo em volume apropriado de fase móvel e injetar em sistema CLAE.

3.11.8 – Teste 8 – Método para extração de ocratoxina A de acordo com ZIMMERLI e DICK (1995)

Pesar 5 g de amostra em tubo, adicionar 10 mL de solução $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaCl}$ (33,7 mL H_3PO_4 (85%) e 118 g (2 moles) de NaCl por litro). Homogeneizar por 1 minuto em agitador de tubos (Vortex, Phoenix, Brasil), filtrar e extrair 4 vezes com porções de 5 mL de clorofórmio agitando por 2-3 minutos. Remover a fase orgânica para um frasco, evaporar até 5 mL e extrair 2 vezes com porções de 5 mL de bicarbonato de sódio (0,01%). Colocar a fase aquosa em funil de separação contendo 0,5 mL de ácido fórmico concentrado e 1 mL de clorofórmio. Extrair a fase aquosa 4 vezes com 1 mL de clorofórmio de cada vez. Secar e re-suspender em 5 mL de solução tampão fosfato contendo 15% (v/v) de metanol. Repetir esta operação 3 vezes com porções de 5 mL de solução de PBS contendo 15% (v/v) de metanol lavando o frasco quantitativamente e transferindo para coluna de imunoafinidade. Eluir a ocratoxina A da coluna com 3 mL de metanol em uma vazão de 0,5 mL/minuto. Secar o extrato e re-suspender em 1 mL de fase móvel. Injetar 100 μL em sistema CLAE.

3.11.9 – Teste 9 – Método para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com MÖLLER e NYBERG (2003)

Pesar 25 g de amostra, adicionar 60 mL de metanol com 1% de bicarbonato de sódio e misturar por 3 minutos em liquidificador. Filtrar em papel de filtro qualitativo (Whatman). Tomar uma alíquota de 10 mL e adicionar 40 mL de PBS. Lavar a coluna de imunoafinidade com 20 mL de água deionizada e aplicar 40 mL da amostra diluída na coluna.

Lavar a coluna com 5 mL de água, deixar passar ar para secar e eluir a toxina com 2,5 mL de metanol. Evaporar o extrato até secar sob fluxo de nitrogênio (60°C), re-dissolver em 0,5 mL de fase móvel e aplicar 100 µL em sistema CLAE.

3.11.10 – Teste 10 – Método para extração de ocratoxina A em páprica de acordo com R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002)

Pesar 10 g de amostra e adicionar 200 mL de bicarbonato de sódio a 1% e homogeneizar em liquidificador em alta velocidade por 2 minutos. Filtrar o extrato em papel de filtro qualitativo (Whatman), retirar uma alíquota de 20 mL e passar através da coluna de imunoafinidade em uma vazão de 2-3 mL/minuto. Lavar a coluna com 20 mL de tampão fosfato (pH 7,4) contendo 0,01% de Tween 20 a uma vazão de 5 mL/minutos. Eluir a toxina com 1,5 mL de ácido acético/metanol (2:98 v/v), deixar passar ar através da coluna para coletar as últimas gotas e terminar a eluição com mais 1,5 mL de água ultra-pura. Secar o extrato sob fluxo de nitrogênio (60°C), re-suspender em 1 mL de fase móvel e injetar 100 µL em sistema CLAE.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICO

O limite de detecção do equipamento foi 0,016 ng de ocratoxina A/mL, baseado na relação ruído/sinal (3:1). A repetibilidade do detector foi 1,29%, baseado no desvio padrão relativo de uma mesma amostra ou padrão.

4.2 – RECUPERAÇÃO DO PADRÃO DE OCRATOXINA A EM COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE

Os resultados de recuperação do padrão de ocratoxina A para os testes 1, 2 e 3 foram inadequados (Tabelas 3.1 e 4.1), não ocorrendo recuperação da toxina. O procedimento mostrou-se adequado para recuperação do padrão de ocratoxina A para o teste 4. No entanto, nestes casos a recuperação refere-se ao padrão em tampão fosfato, sem amostra. Quando testada a recuperação da ocratoxina A em amostra fortificada com padrão, houve necessidade de um tratamento prévio da amostra como descrito em 3.9.2.

Tabela 4.1 - Recuperação do padrão de ocratoxina A aplicado à coluna de imunoafinidade.

Tes	Ocratoxin	Recup	Desvio	Coefici
1	0.745	—	—	—
2	0.745	—	—	—
3	0.745	—	—	—
4	0.745	81	0.04	0.80
	1.242	57	0.002	1.32
	2.484	57	0.02	1.43

* Determinação da toxina por CLAE com detecção por fluorescência, n=2.

** teste 1 – 0,74 ng de padrão em 150 mL de tampão fosfato, teste 2 e 3 - 0,74 ng de padrão em 2 mL de água ultra pura, teste 4 – 0,74, 1,24, 2,48, ng de padrão em 20 mL de tampão fosfato.

4.3 – REUTILIZAÇÃO DAS COLUNAS DE IMUNOAFINIDADE

As recuperações médias (n=4) conseguidas com padrão de ocratoxina A em porções de 20 mL de tampão fosfato com uma concentração de 0,049 ng/mL e aplicado nas colunas de imunoafinidade foram 100% (1º uso), 86% (2º uso) e 73% (3º uso).

Quando o padrão foi adicionado nas amostras de sucos de frutas, de cerveja e de cereais e executada a extração da toxina de acordo com o método otimizado para cada tipo de amostra, a recuperação média para cada tipo de amostra e grau de reutilização pode ser encontrada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Recuperação da ocratoxina A quando da utilização múltipla das colunas de imunoafinidade por tipo de amostra.

	Recuperação (%) média		
	1º	2º	3º
Suco de	80	50	49
Suco de	91	86	58
Suco de uva	101	64	48
Suco de	115	82	73
Cerveja	105	92	81
Aveia	65	70	64
Cevada	71	60	62
Centeio	103	84	67
Centeio	73	67	50
Centeio grão	88	81	72

n = 3

Sucos - amostras artificialmente contaminadas com 0,19 ng/mL

Cervejas - amostras artificialmente contaminadas com 3 ng/mL

Cereais - amostras artificialmente contaminadas com 25 ng/g

A reutilização das colunas de imunoafinidade demonstrou que estas podem ser empregadas mais de uma vez dependendo do tipo de extrato aplicado, reduzindo o custo das mesmas por amostra analisada.

Pode-se observar que a reutilização das colunas foi fortemente afetada para os sucos de frutas ricas em pectinas. Isso pode ter como causa a presença de traços de sólidos insolúveis ou pectinas do sedimento centrifugado no sobrenadante após a centrifugação. De acordo com NAGY *et al.* (1993), a presença de substâncias pécticas leva a dificuldades na clarificação dos sucos e quando na ausência total de pectina, os sólidos insolúveis presentes são o fator predominante nas características reológicas.

QUEIROZ (1998) estudou o comportamento reológico dos sucos de manga e abacaxi despectinizados e sucos de manga clarificados. O uso de pectinases empregadas na clarificação de sucos, o peneiramento através do uso de diferentes dimensões da malha da peneira e malha da despoldadeira e centrifugação influenciam as propriedades reológicas através de reduções de sólidos insolúveis diminuindo a viscosidade nos sucos.

Quanto à reutilização das colunas de imunoafinidade para aveia e cevada, foi possível até o primeiro uso com recuperações em torno de 70% e para centeio a reutilização foi possível até o terceiro uso com recuperação de 72%. As variações ocorridas podem ser devidas às variações na composição química dos cereais em relação aos conteúdos de proteína, carboidrato, fibra e lipídios que podem estar

presentes na extração. Por exemplo, o conteúdo de lipídios em base seca para aveia, é de 5,8% e para cevada de 2,3%. Já para o centeio é de 1,7%. Comportamento semelhante pode ser observado para a fração fibra: aveia apresenta teores de 11%, cevada com 4,3% e centeio com 1,9% (ELIASSON e LARSSON, 1993)

4.4 – OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM SUCOS DE ABACAXI, LARANJA, MARACUJÁ E UVA

4.4.1 – Extração de ocratoxina A de amostras não clarificadas de sucos

A extração da ocratoxina A de acordo com a metodologia de ZIMMERLI e DICK (1995) ou seguindo as modificações 1 e 2 (tabela 3.2), não conduziu à recuperação da toxina, sendo necessário a clarificação prévia dos extratos, conforme Figura 3.1.

4.4.2 – Clarificação das amostras de sucos de frutas

O teste com Triton-X 100 para eliminar ou melhorar a emulsão formada na extração não foi eficiente.

Os testes para clarificação das amostras de suco de frutas empregando-se dois tipos de limpeza: a filtração e o tratamento enzimático foram eficientes (item 3.9.2). Os sucos de uva e abacaxi foram submetidos à filtração e os sucos de laranja e maracujá foram submetidos a tratamento enzimático e centrifugação. Após o tratamento enzimático e/ou filtração as amostras apresentaram diminuição na emulsão formada durante a etapa de extração.

4.4.3 – Extração de ocratoxina A das amostras de sucos de frutas clarificadas e limpeza dos extratos

Após a etapa de clarificação das amostras foi seguida a metodologia de ZIMMERLI e DICK (1995) modificada (Tabela 3.2 - modificação 2) para extração da toxina e limpeza do extrato na coluna de imunoafinidade. As recuperações médias obtidas nos sucos de

frutas fortificados com 0,19 ng de ocratoxina A/mL, encontra-se na faixa de 65 a 82% (tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Características de desempenho do método de ZIMMERLI e DICK (1995) modificado para determinação de ocratoxina A em amostras de sucos de fruta.

Am	Recu	Des	CV	LD	LQ
Ma	65	0.01	2.26	0.05	0.27
Lar	82	0.00	0.54	0.02	0.14
Uv	76	0.01	1.74	0.03	0.17
Ab	73	0.00	1.06	0.14	0.73

LD – limite de detecção LQ – limite de quantificação

A recuperação média obtida no presente trabalho esteve na faixa de 65 a 82%, dependendo do tipo de matriz. Durante o trabalho foi observado que os sucos de frutas apresentam substâncias interferentes que dificultam a extração da toxina e a obtenção de recuperações mais elevadas, assim como aumentam o tempo de análise em razão das etapas de limpeza necessárias antes da sua aplicação em colunas de imunoafinidade.

Uma comparação das características de desempenho do método otimizado com o desempenho dos métodos usados por outros autores mostra que a recuperação da toxina adicionada nas amostras de sucos de frutas no presente trabalho está na mesma ordem de grandeza que vários outros autores que trabalharam com frutas ou seus sucos. SÁEZ *et al.* (2004) obtiveram uma recuperação média de 84% de ocratoxina A para suco de uva. MACDONALD *et al.* (1999) obtiveram

recuperações de 63 – 77% para amostras de passa de uva e de groselha. ZIMMERLI e DICK (1996a) avaliaram a ocorrência de ocratoxina A em vinho de mesa e sucos de frutas e conseguiram uma recuperação média de 84%. FILALI *et al.* (2001) investigaram ocratoxina A em sucos de frutas (laranja, manga, pêssego, abacaxi, maçã e tangerina) e relatam recuperação média de 80-100 % para níveis de ocratoxina A de 0,1 e 1,0 µg/L e recuperações maiores que 100% para níveis de 2,0 e 35,0 µg/L.

Com relação a limites de detecção, o presente trabalho mostra limites menores que MACDONALD *et al.* (1999), que conseguiram limites de detecção estimado em 0,2 µg/kg. No entanto, o presente estudo apresentou limites maiores em comparação com ZIMMERLI e DICK (1996a) e FILALI *et al.* (2001). ZIMMERLI e DICK (1996a) estimaram o limite de detecção como 0,003 ng/mL, baseados em dados obtidos com a solução padrão e limite de quantificação de 0,005 ng/mL e FILALI *et al.* (2001) relatam um limite de quantificação do método de 0,01 µg/L.

4.5 – DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A NOS SUCOS DE ABACAXI, LARANJA, MARACUJÁ E UVA

O método otimizado para determinação de ocratoxina A em sucos de frutas com extração líquido-líquido, limpeza com coluna de imunoafinidade e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência demonstrou boa resolução e ausência de interferentes nos cromatogramas (Figura 4.1, 4.2 e 4.3). O tempo de retenção variou de 2,8 a 3,8 minutos com a fase móvel ácido acético 9% / metanol (35:65) com vazão de 1,0 mL/minuto. Foi observado em diversos trabalhos que o tempo de retenção para ocratoxina A pode variar de 3 a 12 minutos (ZIMMERLI e DICK, 1996a; JORNET *et al.*, 2000; SÁEZ *et al.*, 2004; LOPES de CERAIN *et al.*, 2002). Isto pode ocorrer devido à composição da fase móvel e/ou a carga de carbono da coluna analítica ou ainda devido à presença de compostos interferentes (CASTELLARI *et al.*, 2000).

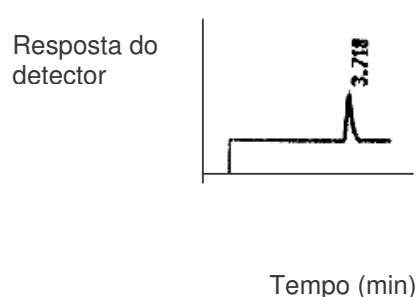


Figura 4.1 – Cromatograma do padrão de ocratoxina A (0,99 ng/mL).

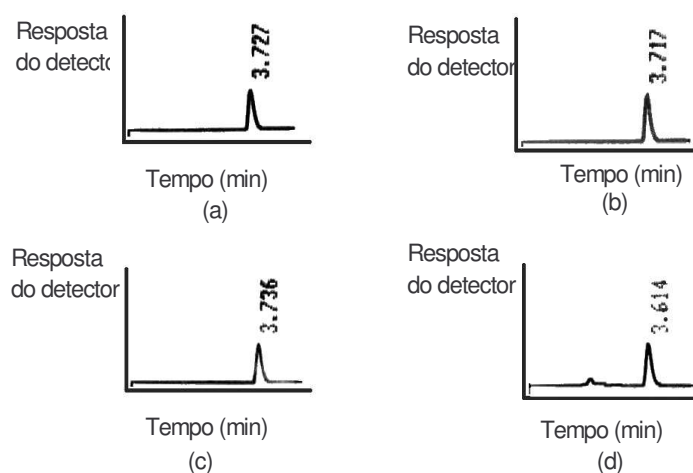


Figura 4.2 - Cromatogramas de amostras de sucos contaminados artificialmente com padrão de ocratoxina A (0,19 ng/mL) : (a) abacaxi; (b) laranja; (c) maracujá e (d) uva.

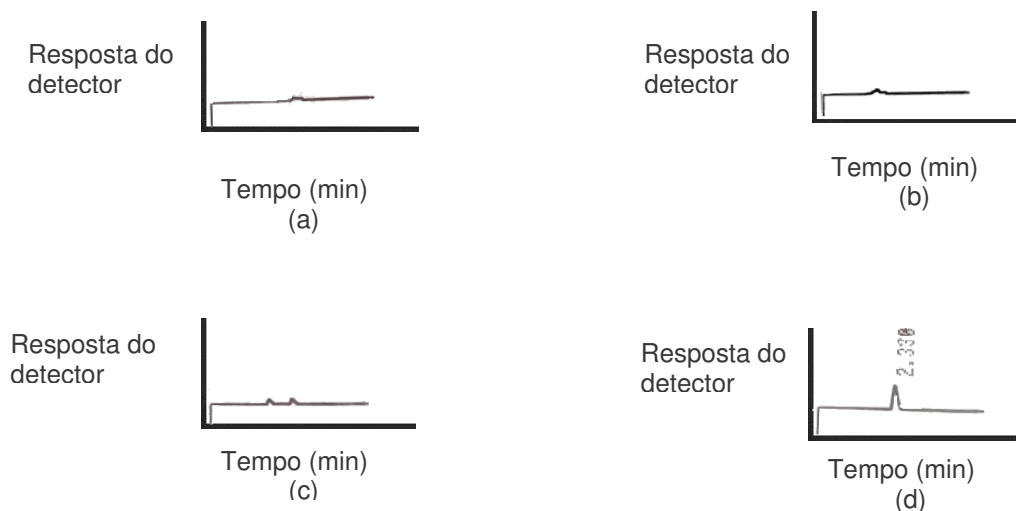


Figura 4.3 - Cromatogramas de amostras de sucos não contaminados: (a) abacaxi, (b) laranja, (c) maracujá e (d) uva.

4.6 – LEVANTAMENTO DE INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM SUCOS DE ABACAXI, LARANJA, MARACUJÁ E UVA

O levantamento realizado não evidenciou a presença de ocratoxina A nas 144 amostras analisadas (49 de maracujá, 29 de laranja, 31 de abacaxi e 35 de uva). De acordo com DRUSCH e RAGAB (2003), a ocorrência natural de micotoxinas nos frutos depende de fatores ambientais como temperatura e umidade relativa e fatores endógenos como o tipo de fruta, o pH e estágio de amadurecimento que podem determinar o crescimento do fungo e produção da toxina. PITT e HOCKINGS (1997) comentam que os mecanismos de defesa da fruta parecem ser altamente efetivos contra fungos e relativamente poucos gêneros e espécies de fungos são capazes de invadir as frutas.

De acordo com BISSESSUR *et al.* (2001), alguns fatores que podem contribuir para prevenir a ocorrência de micotoxinas nos sucos de frutas estão relacionados ao processamento do produto como a lavagem com alta pressão em combinação com a retirada das partes estragadas, a clarificação, o aquecimento e filtração.

No entanto, a ocorrência de ocratoxina A tem sido evidenciada em alguns países como na Suíça, no Marrocos, no Canadá e também no Brasil. Na Suíça foi investigada a ocorrência de ocratoxina A em sucos de uva, laranja e maçã. Dentre 11 amostras de suco de uva, 8 estavam contaminadas com média de 235 pg de ocratoxina A/mL. Os sucos de laranja e maçã continham níveis menores do que 5 pg/mL (ZIMMERLI e DICK, 1996a). No Marrocos, FILALI *et al.* (2001) estudaram a ocorrência de ocratoxina A em sucos cítricos diversos,

sucos de manga, de pêssgo e abacaxi, totalizando 14 amostras. Destas apenas uma amostra de suco cítrico apresentou ocratoxina A com concentração de 1,16 µg/L. No Canadá, foi verificada ocratoxina A em 1 de 25 amostras de suco de uvas brancas e 3 de 46 amostras de sucos de uvas vermelhas que continham níveis de ocratoxina A abaixo do limite de quantificação do método (40 pg/mL) (NG *et al.*, 2004). No Brasil, ROSA *et al.* (2004), verificaram a incidência de ocratoxina A em suco de uva, polpa congelada e vinhos nacionais e importados adquiridos em estabelecimentos comerciais no Rio de Janeiro. Das 48 amostras de sucos de uva nacionais, 14 amostras estavam contaminadas com níveis que variaram de 21 a 100 ng de ocratoxina A/L (média de 38 ng/L), das 16 amostras de polpa congelada, 14 apresentaram níveis que variaram de 21 a 35 ng de ocratoxina A/L (média de 28 ng/L) e das 25 amostras de vinho (tinto=10, branco=10 e rose=5), três amostras de vinho tinto apresentaram níveis médios de ocratoxina A de 35 ng/L, duas amostras de vinho branco com níveis de ocratoxina A de 28 ng/L e uma amostra de vinho rose com níveis de ocratoxina A de 35 ng/L.

A legislação brasileira e assim como de outros países não prevêem níveis máximos de contaminação para ocratoxina A em sucos de frutas (BENFORD *et al.*, 2001).

4.7 – OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM CERVEJA

O procedimento preconizado pelo fabricante da coluna de imunoafinidade, com algumas modificações, mostrou-se adequado para recuperação do padrão de ocratoxina A (Tabela 3.3). Para amostras de cerveja, o valor médio da recuperação foi de 93% para cerveja tipo *Pilsen* e 87% para cerveja escura para nível de contaminação de 3 ng/mL. O limite de detecção e de quantificação para cerveja tipo *Pilsen* e cerveja escura foram, respectivamente, de 0,1 ng/mL e de 0,5 ng/mL.

Os 18 testes de recuperação que acompanharam as análises das cervejas claras apresentaram um coeficiente de variação médio de 1,5% e os 6 testes de recuperação que acompanharam as cervejas escuras apresentaram um coeficiente de variação médio de 1,2%.

Os resultados do presente estudo, em relação à recuperação da toxina adicionada estão na mesma ordem de grandeza que os valores encontrados na literatura. No entanto, os limites de detecção apresentaram valores maiores quando comparados com alguns trabalhos. JORGENSEN (1998) que investigou ocratoxina A em cervejas comercializadas na Dinamarca obteve recuperações médias de 98% e limite de detecção de 0,001 µg/kg. TANGNI *et al.* (2002) estudaram a ocorrência de ocratoxina A em amostras de cerveja domésticas e cervejas importadas na Bélgica e conseguiram recuperações médias de 97% e limite de detecção e de quantificação de 0,003 ng/mL e 0,01 ng/mL, respectivamente. SOLEAS *et al.* (2001) determinaram ocratoxina A em cervejas no Canadá e obtiveram

recuperações médias de 83 a 94% e limite de detecção e quantificação de 0,05 e 0,10 µg/L, respectivamente.

Já os trabalhos de NAKAJIMA *et al.* (1999) que analisaram ocratoxina A em cervejas no Japão obtiveram recuperações para ocratoxina A de 86 a 88%. e limite de detecção de 0,001 ng/mL. PRADO *et al.* (2003) investigaram a ocorrência de ocratoxina A em cerveja nacional e importada e relataram recuperações de 81,2 e 95%, limite de detecção de 0,002 ng/mL e limite de quantificação de 0,008 ng/mL. VISCONTI *et al.* (2000) analisaram amostras de cervejas italianas e importadas e as recuperações médias de ocratoxina A nas amostras foram de 93,8 a 100% e limite de detecção de 0,01 ng/mL baseado no sinal/ruído (3:1). Foi investigada ocratoxina A em cervejas européias por LEGARDA e BURDASPAL (1998) e a recuperação da toxina foi de 100% e o limite de detecção foi de 0,004 ng/mL.

O método utilizado no presente trabalho para determinação de ocratoxina A em cerveja, com limpeza em coluna de imunoafinidade e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, demonstrou boa resolução e ausência de interferentes nos cromatogramas (Figura 4.4). O tempo de retenção variou de 2,8 a 3,8 minutos na fase móvel ácido acético 9% / metanol (35:65) com vazão de 1,0 mL/minuto.

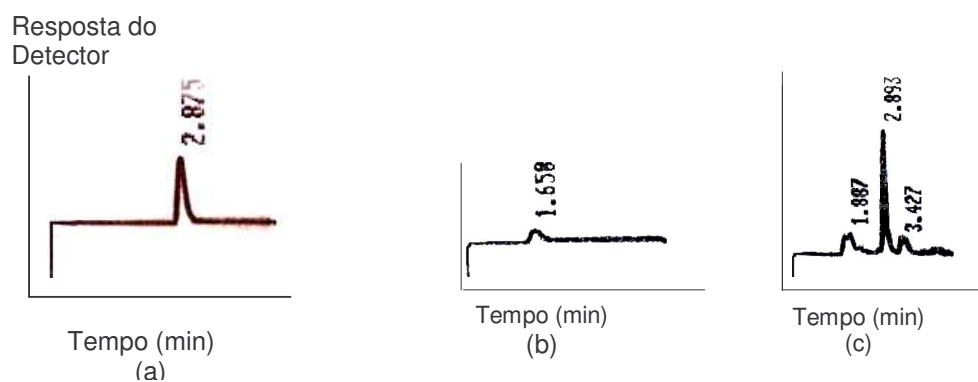


Figura 4.4 – (a) Cromatograma do padrão de ocratoxina A (0,091ng/mL); (b) cromatograma de amostra de cerveja não contaminada; (c) cromatograma de uma amostra de cerveja contaminada (7 ng/mL).

4.8 – LEVANTAMENTO DE INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM CERVEJA

Dentre as 123 amostras de cervejas analisadas (94 amostras de cerveja tipo *Pilsen* e 29 amostras de cerveja escura), apenas cinco amostras de cerveja, todas do tipo *Pilsen*, apresentaram contaminação com ocratoxina A, em níveis que variaram de 1 a 18 ng/mL (Tabela 4.4) e dentre as contaminadas uma amostra era do tipo sem álcool do total de 13 analisadas. As duplicatas das amostras exibiram um coeficiente de variação médio de 8,2 %. Quatro das amostras foram de um único fabricante e provenientes de fábricas de 3 localidades diferentes.

Tabela 4.4 – Concentração de ocratoxina A nas amostras de cerveja contaminadas.

Amostra	Tipo cerveja	Estado	Ocratoxina A (ng/mL)e
A	Pilsen	SP.	18.05 + 0.08
A	Pilsen	SP.	7.56 + 0.01
A	Pilsen	SP.	11.66 + 0.004
B	Pilsen	PA	1.03 + 0.03
A	Pilsen	PR	3.52 + 0.20

* Concentração média e estimativa de desvio padrão (n=2).

Em levantamento realizado por VISCONTI *et al.* (2000) em cervejas italianas e importadas, os autores não notaram diferença significativa de contaminação entre os dois tipos de cerveja quanto ao teor alcoólico: para teores <6% álcool, de um total de 35 amostras, 17 estavam contaminadas (49%) e de 26 amostras de cerveja para teores >6% de álcool, 13 apresentaram contaminação (50%). Os dados, de

acordo com os autores, contrastam com trabalhos realizados na Alemanha nos anos de 1992 e 1993, que apontaram que as cervejas fortes ($> 6\%$ álcool) são mais contaminadas do que as cervejas mais fracas (teores de graduação alcoólica $< 6\%$). Na Espanha, LEGARDA e BURDASPAL (1998) investigaram amostras de cervejas espanholas e de outros países europeus. Foi detectada a presença de ocratoxina A em 37 das 38 amostras espanholas em níveis médios de contaminação de 0,024 ng/mL e nas 48 amostras de outros países europeus com contaminação em níveis médios de 0,025 ng/mL. De acordo com os autores não foi encontrada nenhuma correlação significativa entre os níveis de contaminação e o grau alcoólico.

O presente levantamento demonstrou a presença de ocratoxina A em cervejas brasileiras. A recomendação provisória do Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2001) para ocratoxina A é de uma ingestão máxima tolerável de 100 ng/kg p.c. Os resultados do presente trabalho indicam que mesmo grandes consumidores da bebida (600 a 1300 mL/dia) não sofrem risco com relação a ingestão de ocratoxina A através de cerveja produzida no Brasil. Os resultados mostram também que a cerveja brasileira apresenta menor incidência de ocratoxina A (4% das 123 amostras), no entanto, valores maiores de contaminação que os relatados em levantamentos em outros países.

Os resultados obtidos por PRADO *et al.* (2003) também indicaram baixa incidência da toxina em cervejas brasileiras. De um total de 26 amostras fabricadas no Brasil, somente 6 amostras apresentaram concentrações a nível de traços de ocratoxina A.

JORGENSEN (1998) encontrou ocratoxina A em todas as 21 amostras de cervejas comercializadas na Dinamarca com concentração média de toxina de 0,049 µg/kg. VISCONTI *et al.* (2000) analisaram 61 amostras de cervejas italianas e importadas as quais apresentaram uma incidência de 50% de contaminação com ocratoxina A em níveis que variaram de <0,01 a 0,135ng/mL. TANGNI *et al.* (2002) estudaram a ocorrência de ocratoxina A em 62 amostras de cerveja domésticas e 20 cervejas importadas na Bélgica. Em média, a contaminação foi de 0,033 ng/mL e de 0,032 ng/mL, respectivamente. NAKAJIMA *et al.* (1999) analisaram ocratoxina A em 94 amostras de cervejas importadas e 22 amostras provenientes do Japão. A toxina foi detectada em 86 das 94 amostras de cervejas importadas com um nível médio de contaminação de 0,010 ng/mL e 21 das 22 amostras provenientes do Japão com um nível médio de 0,012 ng/mL. SCOTT e KANHERE (1995) determinaram ocratoxina A em 41 amostras de cervejas. Vinte e seis amostras apresentaram níveis de ocratoxina A ≤ 0,2 ng/mL. De acordo com (SCOTT, 1996a), o nível de contaminação de ocratoxina A na cerveja pode aumentar ou diminuir dependendo do uso de adjuntos durante sua fabricação.

4.9 – OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM AVEIA, CEVADA E CENTEIO

Métodos descritos por diversos autores para extração de ocratoxina A em cereais foram testados e os resultados destes testes demonstraram, descritos a seguir, a necessidade de modificações.

4.9.1 - Resultado do teste 1 para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002):

a) Teste sem modificações: não apresentou recuperação da toxina para nível de contaminação artificial de 0,012 µg de ocratoxina A/g.

b) 1ª modificação: após a filtração, foi retirada alíquota de 10 mL e adicionados 20 mL de tampão PBS e centrifugado (2500 rpm/20 minutos). Retirada alíquota de 10 mL e adicionados 40 mL de tampão e aplicado em coluna de imunoafinidade (vazão de 3 mL/min), a coluna foi lavada com 10 mL de água ultra pura (vazão aproximada de 5 mL/min) e seca deixando passar ar. A ocratoxina A foi eluída com 3 mL de metanol (vazão 2-3 mL/min) coletando-se num frasco, deixando-se secar o extrato sob fluxo de nitrogênio (60°C) e re-suspendendo o extrato seco em 1 mL de fase móvel e injetando 100 µL no sistema CLAE. Não houve recuperação da toxina nas amostras de aveia, cevada e centeio para nível de contaminação artificial de 0,012 µg de ocratoxina A/g.

4.9.2 - Resultado do teste 2 para extração de ocratoxina A em café de acordo com R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002):

Este método, recomendado para café, foi aplicado para aveia, cevada e centeio.

- a) Teste sem modificações: o extrato demorou muito para filtrar, não se conseguindo um volume de extrato adequado para aplicar na coluna de imunoafinidade.
- b) 1ª modificação: foi retirada alíquota de 10 mL do extrato e diluído com 30 mL de tampão PBS, misturado em homogeneizador de tubos (Vortex) e aplicado na coluna de imunoafinidade (vazão 2-3 mL/min). A coluna foi lavada com 10 mL de água ultra pura (vazão 5 mL/min) e seca deixando passar ar. A ocratoxina A foi eluída com 3 mL de metanol, o extrato foi seco sob fluxo de nitrogênio (60°C) e novamente suspenso em 1 mL de fase móvel e aplicados 100 µL em sistema cromatográfico (CLAE). Foram obtidos 7% de recuperação para aveia contaminada artificialmente com 0,06 µg de ocratoxina A/g. As demais amostras não apresentaram recuperação da toxina adicionada.

4.9.3 - Resultado do teste 3 para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com SHARMAN *et al.* (1992):

- a) 1ª modificação: a amostra juntamente com o tampão, foram acondicionados em um erlenmeyer e homogeneizados em agitador (30min/25°C/130rpm). O extrato foi então tratado como descrito no

método, no entanto, a ocratoxina A foi eluída com 3 mL de metanol (vazão 2 mL/min) e foi submetida a secagem sob fluxo de nitrogênio (60°C). O extrato seco foi re-suspenso em 1 mL de fase móvel e injetados 100 µL no sistema cromatográfico (CLAE). Não houve recuperação da toxina adicionada artificialmente em nível 0,06 µg de ocratoxina A/g em nenhuma das amostras do estudo.

- b)** 2ª modificação: foi aumentado o tempo de agitação para 2 horas (25°C/130rpm), filtrada em papel de filtro grau qualitativo e novamente filtrada em membrana de vidro sob vácuo. A toxina foi eluída com 3 mL de metanol. A recuperação da toxina foi de 26% para aveia para nível de contaminação de 0,06 µg de ocratoxina A/g. As demais amostras não apresentaram recuperação.
- c)** 3ª modificação: a 10 g de amostra foram adicionados 200 mL de PBS/metanol (50:50) e homogeneizados (3 min) em liquidificador em média velocidade. O extrato foi filtrado em papel de filtro grau qualitativo e uma alíquota de 100 mL foi colocada em béquer e adicionado 3 mL ferrocianeto de potássio (15%) e 3 mL de acetato de zinco (30%) e deixados em repouso por 10 minutos e filtrados novamente. Foi tomada uma alíquota de 100 mL para funil de separação e mais 100 mL de água ultra pura e 10 mL de clorofórmio, agitando por 3 minutos (1ª partição), deixando repousar por 10 minutos, coletando a fase clorofórmica em béquer, adicionando mais 10 mL de clorofórmio ao funil e agitando por 3 minutos e deixando repousar por mais 10 minutos (2ª partição). A fase clorofórmica foi retirada para um béquer e coletados 5 mL de cada béquer para um mesmo frasco. O extrato clorofórmico foi

submetido à secura sob fluxo de nitrogênio (60°C) e re-suspenso em tampão (lavando o frasco 3 vezes com 5 mL de tampão fosfato) e aplicado na coluna de imunoafinidade (vazão 3 mL/minuto). A coluna foi lavada com 10 mL de água ultra pura (5 mL/min), deixada secar passando ar. A ocratoxina A foi eluída com 3 mL de metanol (vazão 2 mL/min). O extrato foi seco sob fluxo de nitrogênio e re-suspendo na fase móvel (1 mL) e uma alíquota de 100 µL foi aplicada em sistema CLAE. As amostras não apresentaram recuperação da toxina para nível de contaminação de 0,06 µg de ocratoxina A/g.

- d)** 4ª modificação: a 10 g de amostra em béquer foram adicionados 40 mL de tampão PBS/metanol (50:50) e misturados no homogeneizador de amostras Ultra Turrax (4 min/14.000 rpm), filtrados em papel de filtro grau qualitativo e coletada uma alíquota de 15 mL. A alíquota foi diluída com 35 mL de tampão fosfato e homogeneizado em agitador de tubos Vortex. O extrato foi aplicado na coluna de imunoafinidade, a coluna foi então lavada com 10 mL de água ultra pura (vazão 5 mL/min) e seca por passagem de ar. A toxina foi eluída com 3 mL de metanol (vazão 2 mL/min). O extrato foi seco sob fluxo de nitrogênio (60°C) e re-suspenso em 1 mL de fase móvel e aplicados 100 µL em sistema CLAE. Para estas modificações a faixa de recuperação foi de 51-76% (média de 63%), para as amostras de aveia artificialmente contaminadas com 0,06 µg de ocratoxina A/g. Para as amostras de cevada a recuperação variou de 30 - 69%, com média de 56% e para as amostras de

centeio a recuperação média foi de 30% ou sem recuperação para o mesmo nível de contaminação artificial.

4.9.4 - Resultado do teste 4 para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com SCUDAMORE e MACDONALD (1998) :

- a)** Teste sem modificações: de acordo com o método foram conseguidos 11% de recuperação para aveia para nível de contaminação de 0,024 µg de ocratoxina A/g.
- b)** 1ª modificação: a 25 g de amostra foram adicionados 200 mL de acetonitrila/água (60:40) que foram homogeneizados em liquidificador por 3 minutos em velocidade média, sendo filtrados em papel de filtro grau qualitativo. Foi coletada alíquota de 15 mL e diluída com 35 mL de tampão PBS e realizada homogeneização em agitador de tubos Vortex. Após aplicação da amostra (volume total de 50 mL) na coluna de imunoafinidade, a coluna foi lavada com 10 mL de água ultra-pura (vazão 5 mL/min) e seca deixando passar ar. A toxina foi eluída com 3 mL de metanol (vazão 2 mL/min). O extrato foi seco sob fluxo de nitrogênio (60°C) e re-suspenso em 1 mL de fase móvel. Foram aplicados 100 µL em cromatógrafo a líquido de alta eficiência. Com estas modificações foram obtidos 44% de recuperação nas amostras de aveia para ocratoxina A artificialmente aplicada para nível de contaminação de 0,024 µg/g. Para as amostras de cevada a recuperação foi de 32% e amostras de centeio apresentaram extratos limpos, mas sem recuperação da toxina adicionada.

4.9.5 - Resultado do teste 5 para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com SOLFRIZZO *et al.* (1998):

- a) 1ª modificação: o extrato da amostra foi homogeneizado em agitador para erlenmeyer por 30 minutos, após o extrato ser desengordurado, foi diluído com 15 mL de tampão fosfato/metanol (15:85), sendo lavado o frasco 3 vezes com 5 mL da solução. O extrato apresentou resíduos em suspensão não sendo possível aplica-lo na coluna de imunoafinidade.

4.9.6 - Resultado do teste 6 para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com LEPON (1986):

- a) 1ª modificação: em 25 g de amostra foram adicionados 170 mL de acetonitrila/água (9:1) com 0,5 mL de ácido sulfúrico e misturados em liquidificador por 3 minutos em velocidade média, filtrando em papel de filtro grau qualitativo. Foi retirada uma alíquota de 150 mL do filtrado. Foram adicionados 150 mL de sulfato de amônio e 50 mL de Celite em um béquer e misturados com bastão de vidro. Após repouso por 5 minutos, a mistura foi filtrada e retirada alíquota de 150 mL à qual foi transferida para funil de separação. Foram adicionados 150 mL de água ultra-pura e mais 10 mL de clorofórmio e após agitação por 3 minutos (1ª partição) foi permitido um repouso de 10 minutos e coletada a fase clorofórmica para um béquer. Foram adicionados mais 10 mL de clorofórmio ao funil de separação. Após agitação por 3 minutos e repouso por 10 minutos

(2ª partição) foi retirada a fase clorofórmica para outro béquer. Foram coletados 5 mL de cada béquer para um mesmo frasco e a combinação de extratos clorofórmicos foi seco sob fluxo de nitrogênio (60°C). O extrato seco foi transferido para coluna de imunoafinidade lavando o frasco 4 vezes com 5 mL de tampão fosfato. A coluna de imunoafinidade foi lavada com 10 mL de água ultra pura mantendo uma vazão de 2-3 mL/min, e a seguir foi seca e ar passado através da mesma. A toxina foi eluída com 3 mL de metanol. O extrato foi levado a secar sob fluxo de nitrogênio (60°C), re-suspenso em 1 mL de fase móvel e 100µL aplicados em sistema CLAE. Não houve recuperação da toxina na amostra de aveia testada para um nível de adição de 0,024 µg de ocratoxina A/g.

4.9.7 - Resultado do teste 7 para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com VALENTE SOARES (1987):

- a) 1ª modificação: após secagem do extrato clorofórmico, este foi re-suspenso quantitativamente com quatro porções de 5 mL de tampão fosfato/metanol (15:85) e aplicado nas colunas de imunoafinidade (vazão 2-3 mL/min). A coluna foi lavada com 10 mL de água ultra pura e a seguir foi seca com passagem de ar. A toxina foi eluída com 3 mL de metanol. O extrato foi levado a secar sob fluxo de nitrogênio (60°C), re-suspenso em 1 mL de fase móvel e aplicados 100µL em sistema CLAE. Não houve recuperação da toxina adicionada em concentração de 0,012 µg/g para amostras de cevada e centeio analisadas.

- b)** 2ª modificação: foram adicionados 0,4 mL de ácido sulfúrico concentrado na solução de KCl. Houve formação de forte emulsão no funil de separação, não sendo possível continuar a extração da amostra de cevada.

4.9.8 - Resultado do teste 8 para extração de ocratoxina A de acordo com ZIMMERLI e DICK (1995) :

- a)** Teste sem modificações: a extração de ocratoxina A em amostras de aveia e cevada apresentou formação de emulsão no funil de separação, não sendo possível continuar com o procedimento.
- b)** 1ª modificação: foram pesadas 50 g de amostra e adicionados 170 mL de solução de H_3PO_4 . A mistura foi homogeneizada em liquidificador por 3 minutos em velocidade média e filtrada em papel de filtro grau qualitativo. Foi retirada alíquota de 150 mL para um béquer e foram adicionados 3 mL de ferrocianeto de potássio (15%) e 3 mL de acetato de zinco (30%). Após um repouso por 5 minutos foi realizada nova filtração. Foi retirada uma alíquota de 100 mL para funil de separação. Ao funil de separação foram adicionados 100 mL de água ultra pura e a toxina foi extraída conforme descrito pelo método (É segredo?). Não houve recuperação da toxina na amostra de aveia. Para cevada a recuperação foi de 24% para um nível de contaminação de 0,012 µg de ocratoxina A/g.

4.9.9 - Resultado do teste 9 para extração de ocratoxina A em cereais de acordo com MÖLLER e NYBERG (2003):

- a)** Teste sem modificação: não houve da toxina na aveia para nível de contaminação de 0,024 µg de ocratoxina A/g.

4.9.10 - Resultado do teste 10 para extração de ocratoxina A para páprica de acordo com R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002):

Este método, recomendado para páprica, quando aplicado a centeio levou a recuperações de 55 a 91% para nível de contaminação de 25 ng/g e foi, portanto, escolhido para este cereal.

De todos os métodos testados, o que apresentou melhores resultados em termos de recuperação foi o método descrito por SHARMAN *et al.* (1992) modificado, obtendo-se recuperações médias de 70% para aveia e 66% para cevada. Para as amostras de centeio, o método de extração da R-BIOPHARM RHÔNE LTD (2002) para páprica apresentou melhores resultados com recuperação média de 75% para contaminação com ocratoxina A em níveis de 25 ng/g (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 – Características de desempenho dos métodos otimizados para extração de ocratoxina A em cereais.

Am	Recu	Des	CV	LD	LQ
Ave	75	0,00	4,53	0,01	0,05
Ave	64	0,00	2,85	0,01	0,05
Ave	60	0,00	3,32	0,00	0,02
Ave	70	0,00	3,77	0,01	0,05
Ce	67	0,00	3,49	0,01	0,05
Ce	62	0,00	1,99	0,00	0,03
Ce	94	0,78	2,76	0,00	0,02
Ce	85	0,97	3,15	0,00	0,02
Ce	70	0,68	2,16	0,00	0,03

LD= limite de detecção

LQ= limite de quantificação

Os métodos utilizados para determinação de ocratoxina A em cereais constaram de extração sólido-líquido, limpeza com coluna de imunoafinidade e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Os métodos demonstraram boa resolução e cromatogramas sem interferentes (Figuras 4.6 a 4.8). O tempo de retenção variou de 3,7 a 4,2 minutos com a fase móvel ácido acético 9% / metanol (35:65) com vazão de 1,0 mL/minuto. As

recuperações obtidas para as amostras de aveia apresentaram 70% de recuperação média e para cevada foram em média de 66%.

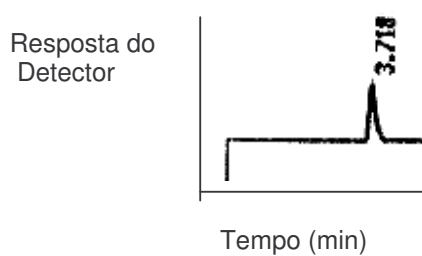


Figura 4.5 - Cromatograma do padrão de ocratoxina A (0,20 µg/mL)

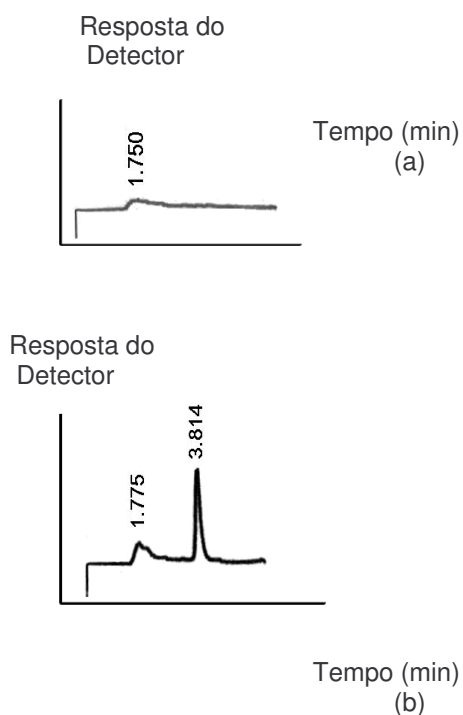
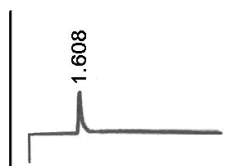


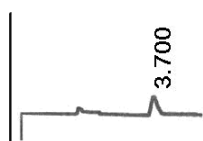
Figura 4.6 – (a) cromatograma de amostra de aveia não contaminada; (b) cromatograma de amostra de aveia contaminada artificialmente com ocratoxina A (25 ng/g)

Resposta do
Detector



Tempo (min)
(a)

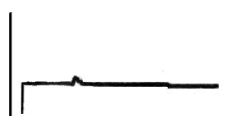
Resposta do
Detector



Tempo (min)
(b)

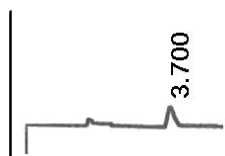
Figura 4.7 – (a) cromatograma de amostra de cevada não contaminada; (b) cromatograma de amostra de cevada contaminada artificialmente com ocratoxina A (25 ng/g)

Resposta do
Detector



Tempo (min)
(b)

Resposta do
Detector



Tempo (min)
(b)

Figura 4.8 – (a) cromatograma de amostra de centeio não contaminada; (b) cromatograma de amostra de centeio contaminada artificialmente (25 ng de ocratoxina A/g)

Os limites de detecção e de quantificação, respectivamente, foram determinados para cada tipo de amostra (Tabela 4.6). Os testes de recuperação que acompanharam as análises dos cereais apresentaram um coeficiente de variação médio de 2,45% .

Os resultados do presente estudo em relação à recuperação da toxina adicionada e aos limites de detecção do método estão na mesma ordem de grandeza dos valores relatados em trabalhos semelhantes. SANTOS *et al.* (2004) investigaram ocratoxina A em amostras de cevada (grão cervejeiro) e os níveis de recuperação da toxina foram de 66,66%. Em 1992, SHARMAN e colaboradores quantificaram a presença de ocratoxina A em cereais. Para as amostras de trigo, a recuperação média foi de 74% e o limite de detecção do método foi de 0,2 µg/kg para trigo e cereais matinais.

JORGENSEN e VAHL (1999) analisaram ocratoxina A em farinha de centeio e obtiveram limite de detecção de 0,02 µg/kg e recuperações médias acima de 100%.

ESKOLA *et al.* (2002) estudaram a presença de ocratoxina A em cereais (trigo, centeio, cevada e aveia). O limite de detecção do método para ocratoxina A foi de 0,1 µg/kg para os dois sistemas de purificação empregados. A recuperação média da toxina para níveis de 0,6 µg/kg e 2,5 µg/kg para o método manual foi de 82 e 87% para trigo, 96 e 95% para centeio, 85 e 88% para cevada e 101 e 88% para aveia, respectivamente. O método analítico que empregou o sistema automatizado apresentou recuperações médias de 68 e 85% para trigo, 82 e 95% para centeio, 87 e 85% para cevada e 106 e 93% para aveia, respectivamente.

Em 1998, SCUDAMORE e MACDONALD participaram no Reino Unido de um estudo colaborativo para determinar ocratoxina A em trigo. A recuperação média para níveis de 5 µg/kg foi de 93%.

ENTWISLE e colaboradores (2000) participaram de um estudo colaborativo para determinar ocratoxina A em cevada. O limite de detecção foi de 0,2 µg/kg (relação sinal-ruído 3:1). As recuperações obtidas foram de 65 a 113%, em níveis de 4 ng/g de ocratoxina A.

BLESA *et al.* (2004) estudaram a determinação de ocratoxina A em cereais e produtos de cereais. A recuperação foi de 86% em amostras de arroz para níveis de 10 ng/g de ocratoxina A. O limite de detecção e quantificação do método foi de 0,25 e 0,75 ng/g, respectivamente.

LEONI *et al.* (2000) investigaram a ocorrência de ocratoxina A em amostras de café. Obtiveram um limite de detecção de 0,2 ng de ocratoxina A/g e uma recuperação média de 77 a 108%. LEONI *et al.* (2001) quando investigaram café produzido no Brasil para ocorrência de ocratoxina A, obtiveram uma recuperação média de 80% e um limite de detecção do método de 0,7 ng/g.

A ocorrência de ocratoxina A foi investigada em amostras comerciais de café solúvel e café torrado e moído, comercializado em Belo Horizonte/MG, no período de outubro/1998 a maio/1999. As recuperações obtidas variaram de 76,5-87% para café solúvel e de 73-86% para café torrado e moído. Os limites de detecção para café torrado e moído e café solúvel foram de 0,25 ng/g e 0,10 ng de ocratoxina A/g, respectivamente (PRADO *et al.*, 2000).

4.10 – LEVANTAMENTO DE INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM AVEIA, CEVADA E CENTEIO

O presente levantamento em cereais não detectou ocratoxina A nas 28 amostras de cevada, nas 22 amostras de centeio e nas 30 amostras de aveia analisadas. Os resultados são semelhantes ao estudo de ESKOLA *et al.* (2001) que investigaram a ocorrência de ocratoxina A em 21 amostras de cereais e nenhuma das amostras apresentou contaminação com ocratoxina A. Levantamentos realizados em outros países relatam a ocorrência de ocratoxina A em cereais, indicando que a presença da toxina nesses produtos pode estar em maior ou menor grau e pode ser dependente das condições de colheita, secagem e qualidade no armazenamento e também da região onde são cultivados (ZIMMERLI e DICK, 1995; BENFORD *et al.*, 2001).

MACDONALD *et al.* (2004) pesquisaram ocratoxina A em grãos armazenados da colheita do ano de 1999 no Reino Unido. Os níveis da toxina estavam abaixo de 5 µg/kg em 97% das amostras, indicando condições de armazenamento satisfatórias. CZERWIECKI *et al.* (2002) relataram incidência (5,8% a 37,5%) e níveis de contaminação (0,3 a 25,7 µg/kg) variáveis de ocratoxina A em centeio, cevada e trigo na Polônia. BLESÁ *et al.* (2004) investigaram ocratoxina A em 19 amostras de grãos de cereais (arroz, trigo, e cevada) e 43 amostras de produtos de cereais na Espanha. Para os grãos de cereais, a presença de ocratoxina A não foi detectada em nenhuma amostra. No entanto, nos produtos de cereais, a ocratoxina A foi encontrada em seis amostras: 2 amostras de cereais matinais de trigo com níveis de 1,88

ng/g, duas amostras de cereais matinais de milho e trigo com 1,51 ng/g e duas amostras de cereais matinais de trigo e aveia com níveis de 5,35 ng de ocratoxina A/g.

Foi investigada a presença de ocratoxina A em 148 amostras de trigo, 131 amostras de cevada e 21 amostras de aveia, armazenadas em depósitos comerciais no Reino Unido. A ocratoxina A foi detectada em 22 amostras de trigo com valor médio de 1,9 µg/kg, em 35 amostras de cevada com nível médio de 2,6 µg/kg e 6 amostras de aveia com contaminação média de 0,5 µg/kg. O trabalho mostra também a distribuição da toxina em relação às diferenças regionais, uma vez que dezenove amostras (12%) provenientes do leste da Inglaterra, 25 amostras (26%) provenientes do oeste e 19 amostras (40%) provenientes do norte da Inglaterra estavam contaminadas com ocratoxina A (JONES, 1999a).

Na área de ocorrência da Nefropatia Endêmica do Balcãs, 92 amostras de trigo e 51 amostras de milho foram pesquisadas para ocorrência de ocratoxina A. A toxina estava presente em 76% das amostras de trigo e 33% das amostras de milho em concentrações médias de 38,8 µg/kg e 20,0 µg/kg, respectivamente (PUNTARIC *et al.*, 2001).

PFOHL-LESKOWICZ *et al.* (2004) analisaram ocratoxina A nos alimentos consumidos por habitantes de áreas da região da Nefropatia Endêmica dos Balcãs para confirmar a exposição da população. A média de ingestão semanal de ocratoxina A variou de 130 a 14.152 ng, correspondendo a uma ingestão diária de 18,6 a 2021 ng/pessoa/dia.

Foi realizado um estudo no Reino Unido para investigar a exposição humana à ocratoxina A, através de amostras da dieta de voluntários. A ocratoxina A foi detectada em todas as amostras que compunham a dieta apresentando níveis que variaram de 10 a 115 ng de ocratoxina A/kg (JONES, 1999b).

5 – CONCLUSÕES

A combinação coluna de imunoafinidade para a limpeza de extratos e cromatografia líquida com detecção por fluorescência para quantificação foi otimizada para determinação de ocratoxina A em sucos de laranja, uva, maracujá e abacaxi e mostrou-se eficiente quanto à limpeza, recuperação e sensibilidade desde que os sucos de uva e abacaxi fossem previamente filtrados e os sucos de laranja e maracujá fossem previamente submetidos a tratamento enzimático e centrifugação. A toxina não foi encontrada em nenhuma das 144 amostras analisadas.

A reutilização das colunas de imunoafinidade mostrou-se adequada até o segundo uso para suco de laranja com recuperação de 86% e para suco de uva com recuperação de 64%. Com suco de abacaxi foi possível utilizar três vezes este tipo de coluna com recuperação de 73% na terceira utilização. Já com suco de maracujá, apenas uma utilização é recomendada, uma vez que a recuperação no segundo uso cai para 50%.

O procedimento preconizado pelo fabricante da coluna de imunoafinidade com algumas modificações, mostrou-se adequado para determinação de ocratoxina A em cerveja. O valor médio da recuperação foi de 93% para cerveja

tipo *Pilsen* e 87% para cerveja do tipo escura. A reutilização das colunas de imunoafinidade mostrou-se adequada até o terceiro uso.

O levantamento realizado para verificar ocratoxina A em cerveja brasileira demonstrou contaminação por esta micotoxina em 5

amostras dentre as 123 analisadas, todas do tipo *Pilsen*, em níveis que variaram de 1 a 18 ng/mL.

As amostras de aveia, cevada e centeio provaram ser extremamente complicadas para extração da ocratoxina A e limpeza dos extratos. Após testar 10 métodos e algumas variantes dos mesmos, apenas um método mostrou-se adequado para aveia e cevada, o do SHARMAN *et al.* (1992) com recuperações médias de 67% para aveia e 65% para cevada e outro se mostrou aceitável para centeio, o da R-RIOPHARM RHÔNE LTD (2002) desenvolvido originalmente para páprica, com recuperação média de 83%. O levantamento realizado para verificar a incidência de ocratoxina A em cereais não detectou a toxina em 80 amostras analisadas.

As colunas de imunoafinidade empregadas mostraram-se adequadas, podendo ser empregadas duas vezes para as amostras de aveia, cevada e centeio.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis*, 16^a ed., 3^a ver., Gaithersburg, MD, Method 975.38, 1997.

BADIALE-FURLONG, E.B., VALENTE SOARES, L.M., LASCA, C.C., KOHARA, E.Y. Mycotoxins and fungi in wheat stored in elevators in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v. 12, n. 5, p. 683 – 688, 1995a.

BADIALE-FURLONG, E., VALENTE SOARES, L.M., LASCA, C.C., KOHARA, E.Y. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in ten test plots in the State of São Paulo, Brazil. *Mycophatology*, v. 131, n. 3, p. 185 – 190, 1995b.

BADIALE-FURLONG, E. *Tricotecenos em trigo: um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção no campo*. 1992. 120p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

BALDISSERA, M.A., SANTURIO, J.M., SILVA, J.B., ALMEIDA, C.A. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações para consumo animal no sul do Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 2, n. 1, p. 77-82, 1992.

BATTALGLIA, R., HATZOLD, T., KROES, R. Conclusions from the Workshop on Ochratoxin in Food, organized by ILSI Europe in Aix-en-Provence (10-12 january, 1996). *Food Additives and Contaminants*, v. 13, supplement, p. 1-3, 1996.

BAXTER, E.D., SLAIDING, I.R., KELLY, B. Behavior of ochratoxin A in brewing. In: *Australian Mycotoxin Newsletter - Abstracts*, v. 14, n. 4, December, 2001.

BENKERROUM, S. e TANTAOUIELARAKI, A. Study of toxigenic moulds and mycotoxins in poultry feeds. In: *Australian Mycotoxin Newsletter - Abstracts*, v. 14, n. 4, December 2001.

BENFORD, D., BOYLE, C., DEKANT, W., FUCHS, R., GAYLOR, D.W., HARD, G., MCGREGOR, D.B., PITT, J.I., PLESTINA, R., SHEPHARD, G., SOLFRIZZO, M., VERGER, P.J.P., WALKER, R. Ochratoxin A In: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Series: 47, *Safety evaluation of certain food additives and contaminants*, Geneva: World Health Organization, p. 281-388, 2001.

BETINA, V. Chromatographic methods as tools in the field of mycotoxins. *Journal of Chromatography A*, v. 477, n. 2, p. 187-233, 1989.

BIFFI, R.; MUNARI, M.; DIOGUARDI, L.; BALABIO, C.; CATTANEO, A.; GALLI, C.L.; RESTANI, P. Ochratoxin A in conventional and organic cereal derivatives: a survey of the Italian market, 2001-2002. *Food Additives and Contaminants*, v. 21, n. 6, p. 586-592, 2004.

BISSESSUR, J., PERMAUL, K., ODHAV, B. Reduction of patulin during apple juice clarification. *Journal of Food Protection*, v. 8, p. 1216-1219, 2001.

BLESA, J., BERRADA, H., SPRIANO, J.M., MOLTÓ, J.C., MAÑES, J. Rapid determination of ochratoxin A in cereals and cereal products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1046, n.1-2, p.127-131, 2004.

BOUDRA, H., LE BARS, P., LE BARS, J. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 3, p. 1156-1158, 1995.

BUSCARLET, L., DONINI, P. CRISTAU, B., ARBAULT, P. Validation of a new immunoassay for the direct detection of ochratoxin A in cereals and wine. XI International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Final Program, Maryland, EUA, May 17-21, p. 59, 2004.

BUSBY, W.F. e WOGAN, G.N. Ochratoxins In: SHANK, R.C. (ed) *Mycotoxins and N-nitroso compounds: environmental risks*. Vol II, Boca Raton: CRC Press, Florida, p. 130-136, 1981.

CALDAS, E.D., SILVA, S.C., OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Revista Saúde Pública*, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CASTEGNARO, M., PLESTINA, R., DIRHEIMER, G., CHERNOZEMSKY, I.N., BARTSCH, H. (eds.) Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary and tract tumours. *IARC Scientific Publication*, n. 115, 340 p, 1991.

CASTEGNARO, M., BARTSCH, H., CHERNOZEMSKY, I.N. Endemic nephropathy and urinary tract tumours in the Balkans, *Cancer Research*, n. 47, p. 3608-3609, 1987.

CASTELLARI, M., FABBRI, S., FABIANI, A., AMATI, A., GALASSI, S. Comparison of different immunoaffinity clean-up procedures for high-performance liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in wines, *Journal of Chromatography A*, v. 888, n.1-2, 129-136, 2000.

COELHO, C.S.P., BADIALE-FURLONG, E., ALMEIDA, T.C. Migração de micotoxinas durante a parboilização do arroz. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 21, n. 1-2, p. 39-44, 1999.

COSTA, L.L.F.e SCUSSEL, V.M. Toxigenic fungi in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, n. 2, p. 138-144, 2002.

CREPPY, E., CASTEGNARO, M., DIRHEIMER, G. *Human ochratoxicosis and its pathologies*. John Libbey Eurotext, France, 1993.

CZERWIECKI, L., CZAJKOWSKA, D., WITKOWSKA-GWIAZDOWSKA, A. On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms – Part 1: Occurrence of ochratoxin A and fungi in

cereals in 1997, *Food Additives and Contaminants*, v. 19, n. 5, p. 470-477, 2002.

DEGALE, N., d'HARLINGUE, A., COLONNA CECCALDI, B., BOMPEIX, G. Occurrence of mycotoxins in fruit juice and wine. *Food Control*, v. 14, p. 225-227, 2003.

DRUSCH, S. e RAGAB, W. Mycotoxins in fruits, juices and dried fruits. *Journal of Food Protection*, v. 66, n. 8, p. 1514-1527, 2003.

EL-BANNA, A.A. e SCOTT, P.M. Fate of mycotoxins during processing of foodstuffs III. Ochratoxin A during cooking of faba beans (*Vicia faba*) and polished wheat. *Journal of Food Protection*, v. 47, n. 3, p. 189-192, 1984.

ELIASSON, A. C. e LARSSON, K. *Cereals in breadmaking: a molecular colloidal approach*. Marcel Dekker, Inc.: New York, p. 371, 1993.

ENTWISLE, A. C., WILLIAMS, A.C., MANN, P.J., SLACK, P.T. Liquid chromatography method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in barley: collaborative study. *Journal of AOAC International*, v. 83, n. 6, p. 1377-1383, 2000.

ESKOLA, M., KOKKONEM, M., RIZZO, A. Application of manual and automated systems for purification of ochratoxin A and zearalenone in cereals with immunoaffinity columns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 1, p. 41-47, 2002.

ESKOLA, M., PARIKKA, P., RIZZO, A. Trichothecenes, ochratoxin A and zearalenone contamination and *Fusarium* infection in Finnish cereal samples in 1998. *Food Additives and Contaminants*, v. 18, n. 8, p. 707-718, 2001.

FAO – Food and Agriculture Organization. Worldwide Regulations for Mycotoxins, 1995. Disponível em:
<http://www.cmicotoxinas.com.br/legisla.html>. Acesso em: 15/12/2004.

FILALI, A.; OUAMMI, L., BETBEDER, A.M., BAUDRIMONT, I., SOULAYMANI, R., BENAYADA, A., CREPPY, E.E. Ochratoxin A in

beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food Additives and Contaminants*, v. 18, n. 6, p. 565-568, 2001.

FRÉMY, J.M. e CHU, F.S. Immunochemicals methods of analysis for aflatoxins. In: VAN EGMOND, H.P. (ed.) *Mycotoxins in Dairy Products*. Elsevier, p. 97-125, 1989

FURLANI, R.P.Z., VALENTE SOARES, L.M., OLIVEIRA, P.L.C. de. Avaliação de métodos para determinação de ocratoxina A em cafés verdes e torrados. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 58, n. 2, p. 87-98, 1999.

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

GARDA, J., MACEDO, R.M., BADIALE-FURLONG, E. Determinação de tricotecnos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4 , p. 657-663, 2004.

GAREIS, M. Vorkommen der mykotoxine ochratoxin A und B in deutscher braugerste und daraus hergestelltem maiz. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, v. 50, p. 73-120, 1999.

HALD, B., WOOD, G.M., BOENKE, A., SCHURER, B., FINGLAS, P. Ochratoxin A in wheat: na intercomparison of procedures. *Food Additives and Contaminants*, v. 10, n. 2, p. 185-207, 1993.

JECFA - JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Safety evaluation of certain mycotoxins in food, World Health Organization, Geneva, 2001.

JONES, B. *Survey of ochratoxin A in grain traded by central depots 1997-1998*. In: MAFF – JOINT FOOD SAFETY AND STANDARDS GROUP. Food Contaminants Division, London, n. 171, 1999a. Disponível em: <http://www.maff.gov.uk/food/infosheet/1999>. Acesso em 24/04/1999.

JONES, B. *A survey of human exposure to ochratoxin A*. In: MAFF – JOINT FOOD SAFETY AND STANDARDS GROUP. Food Contaminants Division, London, n. 172, 1999b. Disponível em: <http://www.maff.gov.uk/food/infosheet/1999>. Acesso em 24/04/1999.

JORGENSEN, K. e VAHL, M. Analysis of ochratoxin A in pig kidney and rye flour using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, v. 16, n. 11, p. 451-456, 1999.

JORGENSEN, K. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, v. 15, n. 5, p. 550– 54, 1998.

JORGENSEN, K. e BILDE, B. Occurrence and estimated dietary intakes of ochratoxin A in European countries – results from a SCOOP project, *Food Additives and Contaminants*, v. 13, Supplement, p. 15-16, 1996.

JORGENSEN, K., RASMUSSEN, G; THORUP, I. Ochratoxin A in Danish cereals 1986 – 1992 and daily intake by the Danish population. *Food Additives and Contaminants*, v. 13, n. 1, p. 95-104, 1996.

JORNET, D., BUSTO, O., GUASCH, J. Solid-phase extraction applied to the determination of ochratoxin A in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 882, n. 1-2, p. 29-35, 2000.

KUIPER-GOODMAN, T. Mycotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicology Letters*, v. 82, n.83, p. 853–859, 1995.

KUIPER-GOODMAN, T. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. *Canadian Journal Physiology Pharmacology*, v. 68, n. 8, p. 1017-1024, 1990.

LEGARDA, T.M. e BURDASPAL, P.A. Ochratoxin A in beers brewed in Spain and other European countries, *Alimentaria*, v. 291, n. 98, p. 115-122, 1998.

LEONI, L.A.B., FURLANI, R.P.Z., VALENTE SOARES, L.M., OLIVEIRA, P.L.C. Ochratoxin A in Brazilian green coffee. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 21, n. 1, p. 105-107, 2001.

LEONI, L.A.B, VALENTE SOARES, L.M., OLIVEIRA, P.L.C. Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. *Food Additives and Contaminants*, v. 17, n. 10, p. 867-870, 2000.

LEPON, P. Simultaneous determination of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A in wheat and barley by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 355, n. 1-2, p. 335-339., 1986.

LOPES de CERAIN, A., GONZÁLES-PEÑAS, E., JIMÉNEZ, A.M., BELLO, J. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food Additives and Contaminants*, v. 19, n. 11, p. 1058-1064, 2002.

LOMBAERT, G.A.; PELLAERS, P.; ROSCOE, V.; MANKOTIA, M.; NEIL, R.; SCOTT, P.M. Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Additives and Contaminants*, v.20, n. 5, p. 494-504, 2003.

MACDONALD, S., PRICKETT, T.J., WILDEY, K.B., CHAN, D. Survey of ochratoxin A and deoxynivalenol in stored grains from the 1999 harvest in the UK. *Food Additives and Contaminants*, v. 21, n. 2, p. 172-181, 2004.

MACDONALD, S., WILSON, P., BARNES, K., DAMANT, A., MASSEY, R., MORTBY, E., SHEPHERD, M.J. Ochratoxin A in dried wine fruit: method development and survey. *Food Additives and Contaminants*, v. 16, n. 6, p. 253-260, 1999.

MALLMANN, C.A., KOWALSKI, C.H., ALMEIDA, C.A., MÜRMANN, L., DILKIN, P., CARVALHO, R.R., DILKIN, M. *Avaliação dos níveis de contaminação dos cereais de inverno com ocratoxina A no período de março de 1998 até março de 2003*. I Amostra Científica do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, 2003.

MANTLE, P.G. e McHUCH, K.M. Nephrotoxic fungi in foods nephropathy households in Bulgaria. *Mycologi Research*, v. 97, n. 2, p. 205-212, 1993.

MILANEZ, T.V. e SABINO, M. Ocratoxina A em feijão comercializado no Estado de São Paulo e sua estabilidade ao cozimento. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 49, p. 131, 1989.

MÖLLER, T.E. e NYBERG, M. Ochratoxin A in raisins and currantes: basic extration procedure used in two small marketing surveys of the occurrence and control of the heterogeneity of the toxins in samples. *Food Additives and Contaminants*, v. 20, n. 11, p. 1072-1076, 2003.

NAGY, S., CHEN, C.S., SHAW, P.E. *Fruit juice processing technology* In: QUEIROZ, A.J.M. *Estudo do comportamento reológico dos sucos de abacaxi e manga*. 1993. 165p. Tese (doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

NAKAJIMA, M., TSUBOUCHI, H., MIYABE, M. A survey of ochratoxin A and_aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoafinity and liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, v. 82, n. 4, p. 897-902, 1999.

NESHEIM, S., STACK, M.E., TRUCKSESS, M.W., EPPLEY, R.M. Rapid solvent-efficient method for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in corn, barley and kidney: collaborative study. *Journal of AOAC International*, v. 75, n. 3, p. 481-487, 1992.

NESHEIM, S e TRUCKSESS, M.W., 1986. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. In: GILBERT, J. (ed.), *Progress in Food Contaminant Analysis*. Blackie Academic & Professional, Londres, p. 65-146, 1996.

NG, W., MANKOTIA, M., PANTAZOPOULOS, P., NEIL, R.J., SCOTT, P.M. Ochratoxin A in wine and grape juice sold in Canadá. *Food Additives and Contaminants*, v. 21, n. 10, p. 971-981, 2004.

NUNES, I.L. *Micotoxinas, micoflora e seu potencial toxigênico em arroz destinado ao consumo humano*. 2003. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2003.

OTTENEDER, H e MAJERUS, P. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants*, v. 17, n. 9, p. 793-798, 2000.

PARDO, E., MARIN, S., RAMOS, A.J., SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. *Food Science and Technology International*, v. 10, n. 1, p. 45-49, 2004.

PARK, J.W., KIM, E.K., SHON, D.H., KIM, Y.B. Natural co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food Additives and Contaminants*, v. 19, n. 11, p. 1073-1080, 2002.

PATEL, S., HAZEL, C.M., WINTERTON, A.G.M., MORTBY, E. Survey of ethnic foods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, v. 13, n. 7, p. 833-841, 1996.

PFOHL-LESKOWICZ, A., VRABCHEVA, T., PETKOVA-BOCHAROVA, T., GARREN, L., GROSO, F., NIKOLOV, I., DRAGACCI, S., CHERNOZEMSKY, I.N., CASTEGNARO, M. *Analysis of ochratoxin A in serum, urine and in food consumed by inhabitants from an area with Balkan endemic nephropathy: a one month follow up study*. XI International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Final Program, Maryland, EUA, May 17-21, p. 39, 2004.

PIETRI, A., BERTUZZI, T., PALLARONI, L., PIVA, G. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants*, v. 18, n. 7, p. 647-654, 2001.

PITT e HOCKING, 1997. In: DRUSCH, S. e RAGAB, W. Mycotoxins in fruits, juices and dried fruits. *Journal of Food Protection*, v. 66, n. 8, p. 1514-1527, 2003.

PITT e HOCKING, 1997. In: BENFORD, D., BOYLE, C., DEKANT, W., FUCHS, R., GAYLOR, D.W., HARD, G., MCGREGOR, D.B., PITT, J.I., PLESTINA, R., SHEPHARD, G., SOLFRIZZO, M., VERGER, P.J.P., WALKER, R. Ochratoxin A In: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Series: 47, *Safety evaluation of certain food additives and contaminants*, Geneva: World Health Organization, p. 281-388, 2001.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; CARVALHO, E.P.; OLIVEIRA, L.C. Ochratoxin A determination in beer by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, suplemento, p. 58-61, dez. 2003.

PRADO, G., OLIVEIRA, M.S., ABRANTES, F.M., SANTOS, L.G., VELOSO, T., BARROSO, R.E.S. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, n. 2, p. 192-196, 2000.

PUNTARIC, D., BOSNIR, J., SMIT, Z., SKES, I., BAKLAIC, Z.. Ochratoxin A in corn and wheat: geographical association with endemic nephropathy. In: *Australian Mycotoxin Newsletter - Abstracts*, v. 14, n. 4, December, 2001.

QUEIROZ, A.J.M. *Estudo do comportamento reológico dos sucos de abacaxi e manga*. 1998. 165p. Tese (doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

R-BIOPHARM RHÔNE LTD *Quantitative Detection of Ochratoxin A*, R-Biopharm Rhône LTD – Ochraprep, Glasgow, Scotland G20 OSP, p. 1-5, 2002.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., e SABINO, M.. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. *Brasilian Journal of Microbiology*, v. 33, February, p. 1-11, 2002.

ROSA, C.A.R., MAGNOLIS, C.E., FRAGA, M.E., DALCERO, A.M. SANTANA, D.M.N. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice

marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v. 21, n. 4, p. 358-364, 2004.

ROSA, C.A.R., PALACIOS, V., COMBINA, M., FRAGA, M.E., REKSON, A.O., MAGNOLI, C.E., DALCERO, A.M. Potencial ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants*, v.19, n.4, p. 408-414, 2002.

SÁEZ, J.M., MEDINA, A., GIMENO-ADELANTADO, J.V., MATEO, R., JIMÉNEZ, M.. Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1029, n. 1-2, p. 125-133, 2004.

SANTOS, M.M., BOTURA, M.B., BATATINHA, M.J.M., MALLMANN, C.A., CORREA, B., SABINO, M. Dertermination of aflatoxins and ochratoxin in brewer's grain (barley) used as dairy cattle feed in the state of Bahia, Brazil. XI International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Final Program, Maryland, EUA, May 17-21, p. 69, 2004.

SANTÚRIO, J.M., BALDISSERA, M.A., ALMEIDA, C.A.A., AHMAD, S.H.E., PRANKE, P.H.L., HEINRICH, C.M., ZANANDREA, S. Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações destinadas ao consumo animal no sul do Brasil. VII Encontro Nacional de Micotoxinas, São Paulo, 1992, Livro de resumos, p. 14, 1992.

SCOTT, P.M. e TRUCKSESS, M.W. Application of immunoafinity columns to mycotoxin analysis. *Journal of AOAC International*, v. 80, n. 5, p. 941-949, 1997.

SCOTT, P.M. Mycotoxins transmited into beer from contaminated grains during brewing. *Journal of AOAC International*, v. 79, p. 675-882, 1996a.

SCOTT, P.M. Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. *Food Additives and Contaminants*, v. 13, supplement, p. 19-21, 1996b.

SCOTT, P.M. e KANHERE, S.R. Determination of ochratoxin A in beer. *Food Additives and Contaminants*, v. 12, n. 4, p. 591-598, 1995.

SCOTT, P.M. KANHERE, S.R., LAWRENCE, G.A., DALEY, E.F., FARBER, J.J., Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B1 and B2. *Food Additives and Contaminants*, v. 12, n. 1, p. 31-40, 1995.

SCOTT, P.M., Methods of analysis for mycotoxins – an overview. In: ROSSEL, V.B. e PRITCHARD, J.L.R. (eds) *Analysis of oilseeds, fats and fatty foods*. Elsevier, p. 141-184, 1991a.

SCOTT, P.M. Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grains, cereal grain, mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. J. Chelkowski (ed.), *Cereal grain mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Amsterdam: Elsevier, p. 529-572, 1991b.

SCUDAMORE, K.A. e MACDONALD, S.J. A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up, *Food Additives and Contaminants*, v. 15, n. 4, p. 401-410, 1998.

SHARMAN, M., MacDONALD, S., GILBERT, J. Automated liquid chromatographic determination of ochratoxin A in cereals and animal products using immunoaffinity column clean-up. *Journal of Chromatography*, v. 603, n. 1-2, p. 285-289, 1992.

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 6, p. 2733-2740, 2001.

SOLFRIZZO, M., AVANTAGGIATO, G., VISCONTI, A. Use of various clean-up procedures for the analysis of ochratoxin A in cereals. *Journal of Chromatography A*, v. 815, n. 1-2, p. 67-73, 1998.

STEFANAKI, I., FOUFA, E., TSATSOU-DRITSA, A., DAIS, P. Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried wine fruits. *Food Additives and Contaminants*, v. 20, n. 1, p. 74-83, 2003.

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

SYDENHAM, E.W. e SHEPHARD, G.S. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. In: GILBERT, J. (ed.), *Progress in Food Contaminant Analysis*. Blackie Academic & Professional, Londres, p. 65-146, 1996.

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

TAYLOR, J.K. *Quality assurance of chemical measurements*. Lewis, Chelsea, 1987.

VALENTE SOARES, L.M. e FURLANI, R.P.Z. 1996. Survey of mycotoxins in wheat and wheat products sold in health food stores in the city of Campinas, State of São Paulo. *Revista de Microbiologia*, v. 27, n. 1, p. 11– 5, 1996a.

VALENTE SOARES, L.M. e FURLANI, R.P.Z. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocistin in health foods and breakfast cereals commercialized in the city of Campinas, São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.16, n.2, p. 126-129, 1996b.

VALENTE SOARES, L.M. e FURLANI, R.P.Z., Micotoxinas em milho para pipoca. *Boletim da SBCTA*, v. 26, n. 1, p. 33-36, 1992.

VALENTE SOARES, L.M. e RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin layer chromatographic method. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

VALENTE SOARES, L.M. *Micotoxinas: um método para análise simultânea e incidência em alimentos comercializados na região de Campinas – São Paulo*. 1987. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1987.

VAN EGMOND, H.P. Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, v. 13, Supplement, p. 11–13, 1996.

VAN EGMOND, H.P. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of analysis. *Food Additives and Contaminants*, v.6, n.2, p.139–188, 1989.

VAN DER MERWE, K.J., STEYN, P.S., FOURIE, L., SCOTT, D.B., THERON, J.J. 1965, Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* With. *Nature*, v. 205, p. 1112–1113. *Apud*: BENFORD, D. *et al.*, Safety evaluation of certain mycotoxin in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Geneva, 2001.

VELDMAN, A., BORGGREVE, G.J.A., MULDER, E.J., Van de LAGEMAAT, D. Occurrence of the mycotoxins ochratoxins A, zearalenone and deoxynivalenol in feed components. *Food Additives and Contaminants*, v. 9, n. 6, p. 647– 655, 1992.

VIEIRA, A. P. e FURLONG, E. B. *Triagem e quantificação de micotoxinas em farinhas de trigo comerciais*. II Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, Livro de Resumos, p. 49, 1997.

VISCONTI, A., PASCALE, M., CENTONZE, G. *Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, v. 888, n. 1-2, p. 321-326, 2000.

VISCONTI, A., PASCALE, M., CENTONZE, G. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and

high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 864, n. 1-2, p. 89-101, 1999.

VRABCHEVA, T., USLEBER, E., DIETRICH, R., MARTLBAUER, E. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 48, n. 6, p. 2483-2488, 2000.

WHITAKER, T.B., GIESBRECHT, F.G., WU, J., WINSTON JR., M.H., DOWELL, F.E. Predicting the distribution of aflatoxin test results from farmers' stock peanuts. *Journal of association of Official Analytical Chemists International*, v. 77, n. 33, p. 659-666, 1994.

WOOD, G.M.; PATEL, S.; ENTWISLE, A.C.; BOENKE, A. Ochratoxin A in wheat: a second intercomparison of procedures. *Food Additives and Contaminants*, v. 13, n. 5, p. 519-539, 1996.

ZABE, N., CHATURVERDI, P., COHEN, B.A. New immunoaffinity column sample preparation for aflatoxin and ochratoxin simultaneously and for simultaneous determination of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone. XI International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Final Program, Maryland, EUA, May 17-21, p. 44, 2004.

ZIMMERLI, B. e DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, v. 13, n. 6, p. 655-668, 1996a.

ZIMMERLI, B. e DICK, R. Study to the repeated use of commercial immunoaffinity columns. *Mitteilungen aus den Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, v. 87, p. 732-742, 1996b.

ZIMMERLI, B. e DICK, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B*, v. 666, p. 85-99, 1995.

