
Faculdade de Tecnologia Nilo De Stéfani

Trabalho de Graduação

CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA “PAULA SOUZA”

FACULDADE NILO DE STÉFANI DE JABOTICABAL - SP (Fatec-JB)

**CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM TECNOLOGIA EM
BIOCOMBUSTÍVEIS**

**APLICAÇÕES TÉCNICAS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA NO DIAGNOSTICO DE MICOTOXINAS.**

ERIK BEZERRA DE OLIVEIRA

PROF. ORIENTADOR: MS. WAGNER RODRIGUES MEYER

PROF. COORIENTADOR: DR. MARCELO HENRIQUE ARMOA

PROFA COORIENTADORA: DRA. MARIANA CARINA FRIGERI SALARO

JABOTICABAL, S.P.

2023

ERIK BEZERRA DE OLIVEIRA

**APLICAÇÕES TÉCNICAS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA NO DIAGNOSTICO DE MICOTOXINAS.**

Trabalho de graduação (TG) apresentado à
Faculdade de Tecnologia Nilo De Stéfani de Jaboticabal
(Fatec-JB), como parte dos requisitos para a obtenção do título
de Tecnólogo em **Biocombustíveis**.

Orientador: Prof. **Wagner Rodrigues Meyer**

Coorientador: Prof. **Marcelo Henrique Armoa**

Coorientadora: Profa. **Mariana Carina Frigeri Salaro**

JABOTICABAL, S.P.

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Oliveira, Erik.

Aplicações técnicas da cromatografia líquida de alta eficiência no diagnóstico de micotoxinas / Erik Bezerra de Oliveira. — Jaboticabal: Fatec Nilo de Stéfani, Ano.

Orientador: Wagner Rodrigues Meyer

Coorientador: Mariana Carina Frigeri Salaro

Trabalho (graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em 2023,
Faculdade de Tecnologia Nilo de Stéfani - Jaboticabal, Ano de conclusão do curso.

1. HPLC. 2. Cromatografia. 3 Micotoxina. I. CLAE, WRM. II.
ATCLAEDM.

ERIK BEZERRA DE OLIVEIRA

Aplicações técnicas da cromatografia líquida de alta eficiência no diagnóstico de micotoxinas

Trabalho de Graduação (TG) apresentado à Faculdade de Tecnologia Nilo de Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Tecnólogo em Biocombustíveis.

Orientador: Wagner Rodrigues Meyer

Coorientadora: Mariana Carina Frigeri Salaro

Coorientador: Marcelo Henrique Armoa

Data da apresentação e aprovação: ____/____/____.

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA

Orientador: Wagner Rodrigues Meyer

Faculdade de Tecnologia Nilo de Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB)

Titular 1: João Roberto da Silva

Faculdade de Tecnologia Nilo de Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB), Jaboticabal, SP, Brasil.

Titular 2: Leonardo Lucas Madaleno

Faculdade de Tecnologia Nilo de Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB), Jaboticabal, SP, Brasil.

Suplente 1: Julio Cesar de Souza

Faculdade de Tecnologia Nilo de Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB), Jaboticabal, SP, Brasil.

Suplente 2: Rita de Cássia Vieira

Faculdade de Tecnologia Nilo de Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB), Jaboticabal, SP, Brasil.

Local: Faculdade de Tecnologia Nilo de Stéfani de Jaboticabal (Fatec-JB)

Jaboticabal – SP – Brasil

Dedico este trabalho a Deus, o maior orientador da minha vida. Ele nunca me abandonou nos momentos de necessidade e somente através da ajuda da sua sabedoria Infinita que este trabalho foi concluído de forma satisfatória.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela minha vida, e por tudo que eu passe até aqui, pois foi por este caminho que hoje eu estou me aperfeiçoando como pessoa, todos os obstáculos enfrentados até está fazendo de mim uma pessoa melhor. Agradeço a minha mãe, por me proporcionar um ensino de qualidade e não medir esforços em me educar e moldar em mim um homem de caráter a ser zelado. E também as minhas duas irmãs por me apoiar, incentivar e acreditar nos meus sonhos. Agradeço ao meu padrasto, por sempre me encorajar a viver o melhor possível e a investir no meu futuro. Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, dando todo apoio que um amigo verdadeiro poderia receber. Aos meus professores por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual eu fui guiado ao aprendizado correto. E não poderia deixar de mencionar, aos meus orientadores deste belíssimo trabalho, obrigado por todo o suporte!

“São as nossas escolhas, mais do que nossas capacidades, que mostram quem realmente somos.”

Alvo Dumbledore

Oliveira, Erik. **Aplicações técnicas da cromatografia líquida de alta eficiência no diagnóstico de microtoxinas**. Trabalho de Graduação. Centro Estadual de Educação Tecnológica “Paula Souza”. Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal. 31 p. 2023.

RESUMO

No contexto das ciências que estudam os alimentos, a análise bromatológica é de fundamental importância, pois permite a avaliação dos diversos segmentos de qualidade e segurança de alimentos, abrangendo desde a composição química dos alimentos, suas propriedades químicas, físicas e toxicológicas a adulterações, contaminações e fraudes. Sendo os alimentos e bebidas matizes orgânicos complexos e havendo a necessidade resultados cada vez mais confiáveis, torna-se impreterível o desenvolvimento de métodos instrumentais mais precisos. Entre as técnicas de análise instrumentais atuais, a Cromatografia, em especial a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, se destaca por ser um método que permite a separação de compostos da amostra de interesse e sua avaliação qualitativa e quantitativa, além de permitir a utilização de outros métodos analíticos em conjunto. Diante das diversas possibilidades de análises por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, esta técnica se mostra eficaz para a avaliação de amostras tão complexas como os matizes alimentares, sendo possível avaliar diferentes compostos simultaneamente, o que permite uma análise panorâmica dos produtos, sendo possível concluir que a técnica apresenta uma relação custo benefício bastante considerável.

Palavras-chave: High Performance Liquid Chromatograph; aspergillus flavus; separação; quantificação; CLAE.

Oliveira, Erik. **Aplicações técnicas da cromatografia líquida de alta eficiência no diagnóstico de microtoxinas**. Trabalho de Graduação. Centro Estadual de Educação Tecnológica “Paula Souza”. Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal. 33 p. 2023.

ABSTRACT

In the context of the sciences that study food, bromatological analysis is of fundamental importance, as it allows the evaluation of the various segments of food quality and safety, ranging from the chemical composition of foods, their chemical, physical and toxicological properties to adulterations, contaminations and frauds. Since foods and beverages are complex organic hues and there is a need for increasingly reliable results, the development of more precise instrumental methods becomes imperative. Among the current instrumental analysis techniques, Chromatography, especially High Performance Liquid Chromatography, stands out for being a method that allows the separation of compounds from the sample of interest and their qualitative and quantitative evaluation, in addition to allowing the use of other analytical methods together. Faced with the various possibilities of analysis through High Performance Liquid Chromatography, this technique proves to be effective for the evaluation of samples as complex as food nuances, making it possible to evaluate different compounds simultaneously, which allows a panoramic analysis of the products, making it possible to conclude that the technique has a very considerable cost-benefit ratio.

Keywords: High Performance Liquid Chromatograph; aspergillus flavus; separation; quantification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	[<i>Aspergillus Flavus</i>].....	23
Figura 2	[Representação Esquemática – Detector por fluorescência].....	17
Figura 3	[Detector por espectrometria de massas (MS)].....	28

LISTA DE GRÁFICOS

Figura1: Resultados obtidos pela CLAE em análise de aflatoxina no laboratório de controle da qualidade, amostra: 4668, lote:647.....	24
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados obtidos pela CLAE em análise de aflatoxina no laboratório de controle da qualidade, amostra: 4668, lote:647.....	23
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais vantagens e desvantagens da Cromatografia.....	20
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIA	Associação Brasileira da Indústria de Alimentos
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG	Cromatografia Gasosa
	Food and Drug Administration
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
SPD	Serial Presence Detect UVUltravioleta
UV	Ultravioleta
HPLC-MS	High-performance liquid chromatography (MS: mass spectrometry)
HPLC-IR	High-performance liquid chromatography infrared spectroscopy
PPB	Partículas por Bilhões
NP	Normal Phase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específico	17
3 METODOLOGIA	17
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
4.1 A cromatografia para identificação de micotoxinas em cereais e leguminosas.....	17
4.2 Cromatografia líquida na determinação de substâncias tóxicas em alimentos.....	18
4.3 Vantagens e Desvantagens da CLAE	19
4.4 Técnicas de separação na cromatografia líquida.....	20
4.5 <i>Aspergillus flavus</i>	22
4.6 Coluna	22
4.7 Eluente (fase móvel).....	23
4.8 Detector de Fluorescência versus Detectores por Absorbância no UV-Vis	25
4.9 Detector UV-VIS (moléculas que absorvem luz na região UV-VIS).....	26
4.10 Detector por espectrometria de massas (MS).....	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

No contexto das ciências que estudam os alimentos, a análise bromatológica, ou análise de alimentos é de fundamental importância, pois por meio dela é possível avaliar os diversos segmentos de qualidade e segurança de alimentos, bem como parâmetros de processamento e armazenamento. A bromatológica abrange desde a composição química dos alimentos, suas propriedades químicas, físicas e toxicológicas a adulterações, contaminações e fraudes, relacionando-se com o alimento humano desde a produção até a distribuição. Sendo os alimentos matizes orgânicos complexas e havendo a necessidade resultados cada vez mais confiáveis, torna-se impreterível o desenvolvimento de métodos instrumentais mais precisos (Instituto Adolfo Lutz, 2008; Ceará, 2013).

Entre as técnicas de análise instrumentais atuais, a cromatografia se destaca por ser um método que permite a separação de compostos da amostra de interesse e sua avaliação qualitativa e quantitativa, além de permitir a utilização de outros métodos analíticos em conjunto. Este é um método físico-químico e sua mecânica se baseia na separação dos compostos de uma mistura por meio de sua distribuição em duas fases, de modo que os compostos que apresentam maior solubilidade na fase móvel se movimentam mais rapidamente pela coluna e as menos solúveis se movimentam mais lentamente, sendo seletivamente retidas pela fase estacionária (Caiado, 2018; Collins, Braga e Bonato 1997). O primeiro registro que se tem da utilização do termo “cromatografia” data do ano de 1906, sendo aplicado pelo botânico russo Mikael Tswett em seus trabalhos acerca da separação de componentes presentes em extratos de folhas e gema de ovo. Entretanto experimentos de separação similares vinham sendo realizados na Inglaterra e Estados Unidos.

Com o decorrer do tempo as técnicas foram sendo aprimoradas por estudiosos e atualmente são conhecidas as técnicas de cromatografia em papel, em camada delgada, por adsorção, por troca iônica, por exclusão, por bi afinidade, gasosa, líquida e supercrítica (Collins, Braga e Bonato 1997). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um tipo de Cromatografia Líquida e utiliza equipamentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados, a fase móvel é eluída sob pressões elevadas. A CLAE apresenta vantagem sobre suas predecessoras, a cromatografia líquida convencional (CLC) e a cromatografia gasosa (CG), sendo mais rápida que a primeira devido a utilização de bombas e, diferente da segunda, independe da volatilidade e estabilidade térmica da amostra. Além disso, a CLAE é capaz realizar separações e análises quantitativas de um amplo espectro de substâncias, utilizar detectores que tornam as análises mais precisas e suas limitações se mostram mínimas diante de suas vantagens, de modo que a técnica vem sendo cada vez mais empregada (Collins, Braga e Bonato 1997).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar as formas de atuação da cromatografia líquida de alta eficiência na análise de micotoxina em alimentos de origem vegetal e suas vantagens e desvantagens.

2.2 Específico

Descrever estudos sobre a cromatografia líquida de alta eficiência aplicada a bebidas não alcoólicas de origem vegetal; mostrar as principais metodologias aplicadas; e salientar a eficácia ou ineficácia das metodologias.

3 METODOLOGIA

Para a construção desta revisão do tipo integrativa realizou-se a busca por artigos e trabalhos diversos publicados na área de cromatografia líquida de alta eficiência aplicada em alimentos nas bases de dados SCIELO, GOOGLE ACADÊMICO e demais fontes que se apresentaram úteis na coleta de dados e que compõem este trabalho de graduação.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 A cromatografia para identificação de micotoxinas em cereais e leguminosas

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos, que se desenvolvem naturalmente em alimentos, razão pela qual é importante o desenvolvimento de técnicas de quimioavaliação, constituindo-se da identificação e quantificação (CCD) e (CLAE). Estes métodos apresentam alta eficiência e segurança diagnóstica, sendo, portanto, os mais recomendados (*Organización Mundial de la Salud, 1983; Sabino, 1988*).

Dentre as micotoxinas que ocorrem com maior frequência em alimentos tem-se: a) as aflatoxinas que podem ser produzidas por fungos como *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus*, e dentre os vários tipos destacam-se B1, B2, G1 e G2 (Yu et al., 2005; Bok et al., 2004); b) as fumonisinas e os tricotecenos, que incluem deoxinivalenol e zearalenona, são produzidos por fungos do gênero *Fusarium* (Pozzi et al., 2002); c) a patulina produzida por diversas espécies de fungos sendo que o mais citado é do gênero *Penicillium* (Machinski Jr & Mídio, 1995); d) as ocratoxinas produzidas por diversas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Leeson et al., 1995). A contaminação ocasionada por micotoxinas, em geral, não pode ser visualizada a olho nu, sendo assim, os produtos uma vez contaminados seguem para

comercialização, com a presença de compostos capazes de provocar enfermidades e muitas vezes levar à morte. Tal mecanismo resulta em exposição contínua a pequenas doses de micotoxinas, levando animais ou até mesmo seres humanos a desenvolver patologias crônicas ou toxicoses difusas (Calvo, 2005).

A diversidade de doenças de animais e humanas atribuídas às micotoxinas são devidas ao seu tamanho relativamente pequeno e à grande variedade de suas estruturas químicas, sendo que os sintomas das micotoxicoses são resultados de interações das micotoxinas com moléculas funcionais e organelas da célula animal (Oga, 1996; Songsermsakul & Razzazi – Fazeli, 2008). Como nem todas as linhagens entre os fungos micotoxigênicos são produtoras de toxinas torna-se necessário a aplicação de métodos que propiciem a rápida e fácil identificação das mesmas (Saito & Machida, 1999). No entanto, as micotoxinas ocorrem e exercem seus efeitos em quantidades extremamente pequenas nos alimentos, o que requer geralmente uma amostragem, preparação de amostras, extração e técnicas de análise sofisticadas para a identificação e avaliação quantitativa da toxicidade (FAO, 2001).

4.2 Cromatografia líquida na determinação de substâncias tóxicas em alimentos

A determinação de micotoxinas envolve uma ou mais etapas de preparo da amostra utilizando técnicas de extração e concentração que visam isolar e concentrar os analitos de interesse a serem determinados. Essa é a etapa mais complexa do trabalho e torna-se um desafio para a obtenção de métodos rápidos, que utilizem menores quantidades de solventes orgânicos e com maior detectabilidade (MALDANER, 2007). Dentro desse contexto, o método de QuEChERS modificado (ANASTASSIADES et al, 2003) foi adaptado por Hackbart (2009) para permitir uma extração rápida e eficiente das micotoxinas presentes em arroz e derivados.

Uma variedade de métodos analíticos vem sendo utilizada e as recomendações de métodos oficiais enfatizam o emprego de multimétodos. A CLAE permite identificar e quantificar esses compostos tóxicos, separando-os de possíveis interferentes (MAROCHI; VALENTE-SOARES; FURLANI, 1996), conseguindo enormes ganhos em eficiência na separação de compostos, nos limites de detecção e na redução do tempo de análise. Os detectores com comprimento de onda múltiplo, conhecido como arranjo de diodos (DAD), possibilitam a escolha de qualquer comprimento de onda dentro de sua faixa de operação (VALENTE-SOARES, 2006) e propiciam a confirmação da presença das micotoxinas através da observação do seu espectro.

As Aflatoxinas são produzidas principalmente por fungos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Somente quatro foram identificadas como contaminantes naturais de produtos agrícolas. São denominadas aflatoxina B1 (AFB1); B2 (AFB2); G1 (AFG1); G2, (AFG2). A AFB1 é a mais tóxica do grupo, seguida pela AFG1, AFB2 e AFG2 com toxicidade de 50%, 20% e 10% em relação à primeira, respectivamente. Foram descobertas em 1960 com a morte de milhares de perus que consumiram ração contaminada. (OGA, 2014; ZORZETE,

2010). Quimicamente, são substâncias derivadas de difuranocumarinas, apresentando um núcleo cumaríneo ligado a um anel di-furanóide. O que as diferenciam é o tipo de anel di-furanóide que apresentam em sua estrutura química (Figura 1). A AFB1, AFB2, AFM1 e AFM2 contém um anel pentanona, e somente a AFG1 e AFG2 possuem o anel 6-lactona (CARVALHO et al.,2014). Quando expostas à luz ultravioleta, as aflatoxinas apresentam fluorescências de cores diferentes, o que possibilita sua identificação, sendo B de blue, com fluorescência azul ou G, de green, com fluorescência verde (BAGGIO, 2006).

Segundo publicação do site “*The American Phytopathological Society – APS,2008*” são dois dos métodos mais utilizados de detecção e quantificação de micotoxinas em laboratórios de segurança alimentar. A técnica de CLAE separa os componentes de uma amostra numa coluna estacionária usando um solvente, como metanol ou acetonitrilo, deste modo as micotoxinas são detectadas e quantificadas pelo tempo que levam para passar pelo detector específico. Já a técnica CG-EM/GC-MS utiliza um gás, como hélio, para separar os componentes dentro da coluna estacionária, sendo as micotoxinas detectadas e quantificadas através de um espectrômetro de massa. Ambas as técnicas requerem equipamentos caros e suporte técnico, mas oferecem um limite de detecção inferior a 0,5 ppm para muitas micotoxinas.

4.3 Vantagens e Desvantagens da CLAE

O Quadro 1, elenca as principais vantagens e desvantagens da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência conforme a revisão bibliográfica realizada.

De acordo com o exposto, observa-se que, dependendo da empresa ou instituição que for realizar as análises, a CLAE apresenta um custo-benefício considerável, em concordância com o exposto por Collins, Braga e Bonato (1997).

Quadro 1 - Principais vantagens e desvantagens da Cromatografia

VANTAGENS	DESVANTAGENS
Permitir realizações de análises qualitativas e quantitativas	Não é uma análise de rotina
Abrange um amplo espectro de substâncias.	Elevado custo de manutenção
Independente da volatilidade e estabilidade térmica da amostra	Necessita de operador especializado
Permite a associação a outras metodologias (uso de detectores)	
Análise rápidas	

Precisão de resultados	
Permite realização de análises simultâneas	

Fonte: Gabriela Gome - 2022

4.4 Técnicas de separação na cromatografia líquida

A cromatografia líquida de alta eficiência é um importante membro de toda uma família de técnicas de separação, uma vez que consegue separar misturas que contêm muitos compostos similares. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade.

Dentro da cromatografia líquida, existem diferentes mecanismos que governam as separações de misturas. De acordo com estes mecanismos, pode-se classificar a cromatografia líquida em: cromatografia por adsorção, cromatografia por partição, cromatografia com fase ligada, cromatografia líquida quiral, cromatografia por troca iônica, cromatografia por bioafinidade e cromatografia por exclusão.

A cromatografia a gás, a cromatografia a líquido e a eletroforese capilar são exemplos de técnicas analíticas que envolvem processos de separação de acordo com as características e interações de cada analito com o meio. Essas técnicas visam a identificação, determinação e quantificação de um ou mais analitos de uma determinada amostra. No que se refere à cromatografia a líquido, esta é uma técnica analítica amplamente utilizada para a separação, identificação e quantificação de componentes de uma mistura líquida utilizando um solvente como fase móvel. Existem vários tipos de técnicas cromatográficas em fase líquida, desde a Cromatografia de Camada Delgada, até os modernos sistemas de CLAE (*CEATOX. de gaseificadas*). De uma maneira geral, esta técnica consiste no bombeamento de um solvente líquido (fase móvel) que passa através de uma coluna preenchida com um material solvente (fase estacionária). Dessa forma, a amostra a ser analisada é injetada na coluna cromatográfica por meio de uma seringa.

As colunas usadas na CLAE são preenchidas com partículas de pequena dimensão (2-50 micrométricas em tamanho médio de partícula) porosas ou com núcleo sólido. Isto dá a CLAE grande poder de resolução quando a separação de misturas, o que torna uma técnica cromatográfica popular. A CLAE inclui, tipicamente, um amostrador, bombas, e um detector. O amostrador leva a mistura da amostra para o fluxo de fase móvel que a transporta na coluna. As bombas fornecem o fluxo pretendido e a composição da fase móvel através da coluna.

O detector gera um sinal proporcional à quantidade de componente amostra emergentes da coluna, permitindo, uma análise quantitativa dos componentes da amostra. A maioria dos instrumentos de CLAE também tem um forno de coluna, que permite ajustar a temperatura

influenciando na viscosidade do solvente, sendo um importante instrumento para a separação dos constituintes da amostra.

A combinação de ambas une a excelência da separação do analito de interesse na matriz através da técnica da cromatografia líquida de alto desempenho, juntamente com a técnica da espectrometria de massas que confirma a identificação química. Dentre as alternativas disponíveis, a espectrometria de massas é a que melhor fornece as informações estruturais necessárias. O acoplamento entre estas duas técnicas dão origem a uma ferramenta analítica robusta, versátil e de grande potencial na análise qualitativa e quantitativa em toxicologia de alimentos. A CLAE utiliza suporte com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, sendo um método adequado para separação de espécies iônicas e macromoléculas (Degani et al., 1998).

Diante do acoplamento da cromatografia a técnicas espectrais várias siglas surgiram, sendo as mais utilizadas listadas a seguir: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (HPLC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectroscopia de infravermelha (HPLC-IR), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), entre inúmeras outras que surgem a cada método publicado (PateL et al., 2010; Chinchole et al., 2012). A técnica cromatográfica pode ser utilizada para dosar compostos em alimentos (Gilbert-López et al. 2012; Xu et al., 2012), no monitoramento de componentes tóxicos no meio ambiente (Marriott et al., 2003) ou mesmo na indústria petroquímica (Mühlen et al., 2006). Dessa forma é difícil definir em qual área dentro dessa ciência que mais se utiliza das técnicas cromatográficas. As análises quantitativas e qualitativas de toxinas produzidas por fungos podem ser realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC- MS), cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS), cromatografia gasosa-espectroscopia infravermelho (GC-IV), imune ensaios pelo método ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), aglutinação de látex (RPLA), imunodifusão, imunoafinidade, biosensores separação imunomagnética e imunohistoquímica (Pallaroni & Von Holst, 2003; Pettersson; 2003; Van Der Gaag, et al., 2003; Soleas et al., 2001; Scott & Trucksess, 1997; Pestka et al., 1994).

Outros tipos de técnicas de detecção de micotoxinas, como aplicação de biosensores de ressonância plásmica de superfície, eletro cinética capilar, transdução eletroquímica e monitoramento de injeção de fluxo, vêm sendo desenvolvidos no intuito de simplificar, acelerar e minimizar o custo das análises (Garden & Strachan, 2001; Ammida et al., 2004; Kolosova et al., 2006). Apesar de mais de quatro décadas de descoberta das micotoxinas, nenhum método de prevenção e controle mostrou-se seguro, eficaz e definitivo (Prado et al., 2006). Atualmente, o monitoramento da qualidade dos alimentos e procedimentos reguladores é o método utilizado para o controle de micotoxinas, sendo que inúmeros países já estabeleceram limites máximos de contaminação em alimentos e rações animais, principalmente para as aflatoxinas (Teixeira et al., 2008). A combinação com outras técnicas de separação, como a eletroforese capilar, a cromatografia em camada delgada e a cromatografia de permeação em gel é possível, mas usada com menor frequência.

4.5 *Aspergillus flavus*

O *Aspergillus Flavus* é um fungo filamentosso que pode produzir aflatoxinas e ácido ciclopiazônico, sendo que a presença dessas micotoxinas em alimentos e rações pode levar a um efeito tóxico no homem e em animais. Cepas de *A. flavus* produtoras de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico são frequentemente isoladas do amendoim, indicando a natural co-ocorrência dessas toxinas neste substrato. Neste estudo (, foram isoladas 47 cepas de *Aspergillus flavus* em grãos e cascas de amendoim durante diferentes fases de maturação do fruto e também durante seu armazenamento. (Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.80, n.3, p. 312-317, 2013) Das cepas isoladas, foram avaliados os potenciais para produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico, em que 91,5% foram produtoras de aflatoxinas e 70% produziram ácido ciclopiazônico, sendo que 63,8% produziram ambas as toxinas e 2,1% não produziu nenhuma. A presença de cepas toxigênicas de *A. flavus* nas amostras de amendoim analisadas indica um risco potencial da contaminação deste produto, caso seja exposto a condições ambientais favoráveis ao crescimento do fungo e produção de micotoxinas. (Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.80, n.3, p. 312-317, 2013)

Figura1: a) fungo b) *Aspergillus Flavus*



Fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Aspergillus_flavus#/media/File:Aspergillus_flavus.jpg

4.6 Coluna

Conforme o esquema cromatográfico, apresentado, a coluna cromatográfica separa substâncias presentes em uma amostra injetada, e, esta separação permite que tais substâncias sejam identificadas e quantificadas. A importância da ação da coluna cromatográfica é o objeto

deste estudo, que se propõe em apresentar a composição física, o conceitual teórico, a atuação, a recuperação e os controles exigidos pela vigilância sanitária sobre este recurso analítico. Segundo Collins, Braga e Bonato (1993) a versatilidade desta técnica reside na variedade de colunas cromatográficas disponíveis no mercado, contendo grandes variedades de fases estacionárias. Por fase estacionária compreende-se um suporte que preenche e permanece fixo no interior da coluna cromatográfica. As interações entre o soluto e a fase acontecem na superfície deste suporte e essas interações, juntamente com as interações com a fase móvel, são responsáveis pelas separações.

Atualmente, a coluna para a cromatografia líquida é um tubo de aço inoxidável, fechado em ambas as extremidades por filtros específicos, com a função de conter e preservar a fase estacionária. Segundo os fabricantes de colunas cromatográficas, como por exemplo, *ACE*, *GL Sciences Inc.*, *Tecknokroma*, *Varian*, *Waters*, *Merck*, o aço inoxidável é o material mais empregado entre todos os materiais devido à sua resistência mecânica e, devido à selagem das extremidades, a coluna cromatográfica ser capaz de resistir às altas pressões de trabalho, geralmente entre 1.000psi a 5.000psi, (E. Muniz, Souza, 2016)

Como citado, os extremos da coluna cromatográfica são fechados por filtros específicos. Estes filtros são, em geral, discos de aço inoxidável, para evitar a perda do material interno da fase estacionária ou mudanças na sua compactação. Estes discos de fechamento, além da função de reter as partículas da fase estacionária, controlam a pressão interna, devido a aplicação da fase móvel. As dimensões das colunas cromatográficas (diâmetro e comprimento), assim como o tipo de empacotamento (fase estacionária), variam conforme a sua finalidade. (E. Muniz, Souza, 2016).

Estas características das colunas cromatográficas definem a capacidade de separação, seletividade e eficiência. O ajuste de polaridade/apolaridade entre a fase móvel e a fase estacionária define a qualidade da análise cromatográfica. Por exemplo, quando a fase estacionária tem natureza apolar (hidrocarbonetos) e a fase móvel é um líquido polar (água ou álcool), a coluna cromatográfica retém os materiais apolares por mais tempo. (F. Juliano, Valmir)

4.7 Eluente (fase móvel)

O processo da cromatografia é realizado pela passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, dentro de uma coluna ou sobre uma placa. A partir dessa passagem, os componentes da mistura são separados pela diferença de afinidade. Com isso, cada um dos componentes da mistura é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais destes componentes. A força de adesão, também chamada de afinidades diferenciais, dos componentes do **analito** (mistura cujos componentes individuais devem ser separados e analisados) que movem-se em direção às fases estacionária e móvel resulta na separação diferencial dos componentes. A afinidade é ditada por duas propriedades da

molécula: "**Adsorção**" e "**Solubilidade**". A adsorção é a propriedade em que um componente da mistura adere à fase estacionária. Quanto maior for a adsorção à fase estacionária, mais lentamente a molécula se moverá pela coluna. Já a solubilidade é a propriedade em que um componente da mistura se dissolve na fase móvel. Quanto maior for a solubilidade na fase móvel, mais rapidamente a molécula se moverá pela coluna. (pfarma,19,Julho,2009)

Nesse contexto, a adsorção e a solubilidade de uma molécula podem ser manipuladas escolhendo a fase estacionária e a fase móvel apropriadas. Nessa técnica, o analito é carregado sobre o leito de sílica (embalado na coluna) e adere a ela. Assim, a sílica age como a fase estacionária, ou seja, a substância fica fixa dentro da coluna. Na separação das misturas, os diferentes componentes do analito têm vários graus de adesão à sílica. Por isso, movem-se em diferentes velocidades através da fase estacionária conforme o solvente flui através dela. (pfarma,19,Julho,2009)

No entanto, os componentes que aderem mais fortemente à fase estacionária movem-se com mais lentidão em comparação com aqueles que têm uma adesão mais fraca. A fase móvel da CLAE deve ser um solvente que respeite algumas características impostas por esse método analítico. A principal característica é que a fase móvel dissolva a amostra sem qualquer interação química entre ambas. Esta fase deve ter alto grau de pureza ou ser de fácil purificação, para que se possam fazer análises de alta sensibilidade, pois as impurezas podem interferir na detecção do analito por ultravioleta (UV). A fase móvel deve ser compatível com o detector empregado e, também possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra. Embora existam vários solventes, três deles são mais utilizados: água, metanol e acetonitrila. Como fase estacionária utilizam-se sólidos ou semirígidos, cujas partículas porosas esféricas ou irregulares apresentam diferentes diâmetros e suportam pressão até 350 bar.(pfarma,19,Julho,2009)

Ou seja, a fase móvel responsável por carregar a amostra através do sistema de bombeamento. Podem ser solventes orgânicos, soluções a base de água ou água Ultra Pura (UP). (pfarma,19,Julho,2009)

Especificação:

- Alta pureza (grau CLAE ou resíduo)
- Livre de particulados e gases dissolvidos
- Baixo custo e boa disponibilidade no mercado
- Compatível com a fase estacionária
- Boa interação com os analitos de interesse.

Classificação de acordo com a fase estacionária

- Fase normal (NP – *Normal Phase*): FE (Fase estacionária) - polar, FM (Fase móvel) apolar – fase mais polar tem maior força de eluição.
- Fase reversa* (RP – *Reversa fase*): FE (Fase estacionária) apolar ou pouco polar, FM (Fase móvel) mais polar – FM menos polar tem maior força de eluição
- HILIC: Híbrido entre a (NP – *Normal Phase*) e a (RP – *Reversa phase*) a FE (Fase móvel) é a mais polar do que na RP e a FM é menos polar, com composição no mínimo 70% de solvente orgânico.
- Quiral: colunas aplicadas a estereosseletividade (fármacos e alimentos).

***Mais utilizada porque a maioria dos compostos são solúveis em água ou misturas de água e solventes orgânicos polares (metanol e ACN)

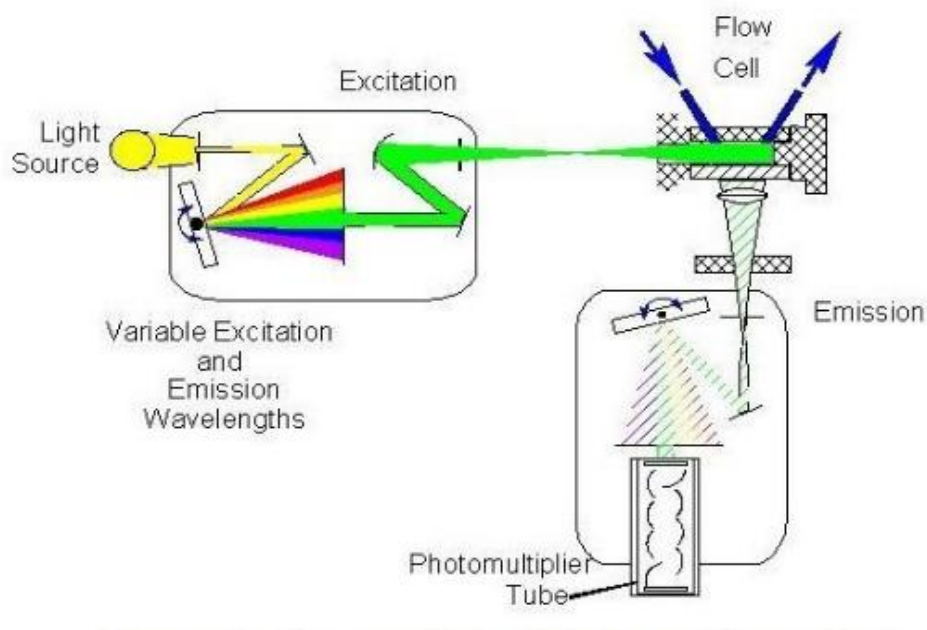
CUIDADOS IMPORTANTES PARA MANUSEIO DO EQUIPAMENTO

- Purgar a bomba antes imediatamente após ligar o equipamento para uso (velocidade de 3 a 5 vezes o fluxo de eluição do método) – evita problemas de variação de RT e perda de resolução
- Lavar o selo da bomba pelo menos 1x por semana – evita contaminação, incrustação de sais, problemas de pressão no equipamento.
- Manter todos os capilares complementares preenchidos - evita entrada de ar no sistema.
- Ao terminar o ensaio tomar o cuidado de lavar o sistema com solventes orgânicos de preferência para evitar cristalização de sais e acúmulo de sujidades nas peças da bomba.

4.8 Detector de Fluorescência versus Detectores por Absorbância no UV-Vis

A espectroscopia de fluorescência é um método de detecção dos mais sensíveis da atualidade, específico para compostos que fluorescem. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995). O funcionamento desse tipo de detector se dá através da emissão de energia fluorescente por um soluto que foi excitado por radiação UV, como ilustrado na figura 3.

Figura 3 – Representação Esquemática: Detector de Fluorescência.



Fonte: a3analitica.com.br

Baseando-se no fato de que, quando uma molécula absorve luz e um elétron é promovido a um estado de maior energia, existe uma série de caminhos pelos quais esta energia pode ser dissipada.

Conectado na saída da coluna, o detector emite um sinal elétrico e registra de forma contínua a composição da solução que chega da coluna.

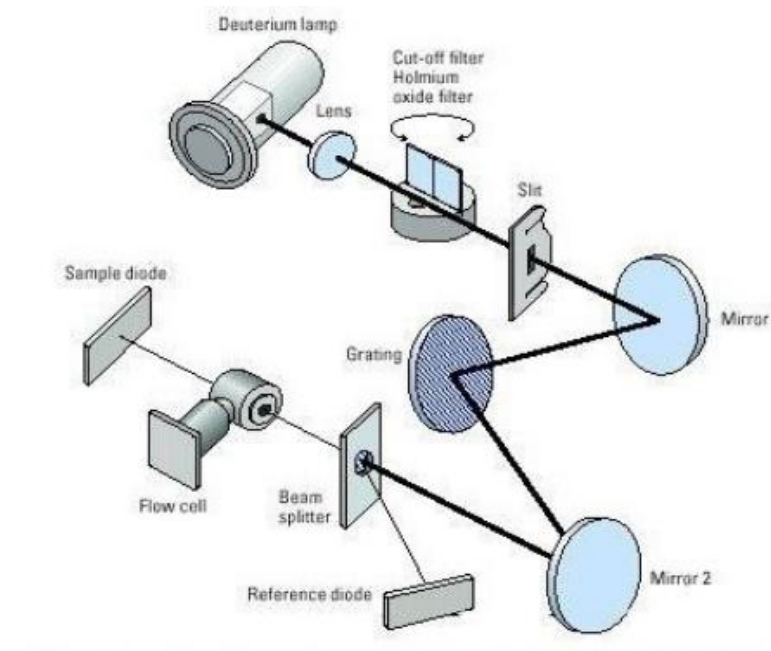
4.9 Detector UV-VIS (moléculas que absorvem luz na região UV-VIS)

Os detectores UV-VIS são os mais utilizados em CLAE, pois apresentam o mais baixo custo, aceitam o uso de gradiente e geralmente não são afetados por pequenas mudanças de fluxo e temperatura.

Ele consiste em um fotômetro que mede a absorção de luz dos compostos, em comprimento de onda pré-programado, compreendido entre as regiões visível e ultravioleta, como podemos ver na figura 4.

O princípio da detecção por UV-VIS pode ser definido através da concentração do analito relacionada à fração da luz transmitida pela célula do detector pela lei de Beer-Lambert.

Figura 4 - Representação esquemática: Detector UV-VIS



Fonte: a3analitica.com.br

Mais utilizados devidos ao baixo custo e são robustos a mudanças de fluxos e temperatura,

- Fotometro que mede a absorção da luz dos compostos nas regiões UV e visíveis,
- Pode ter comprimento de onda fixo ou variável,
- Dinodo – permite o uso de diferentes ondas durante a análise,
- Atende aos princípios da lei de Beer-Lambert – relação da concentração da amostra à fração de luz transmitida pela célula do detector.

4.10 Detector por espectrometria de massas (MS)

O interessante é que os compostos quando fragmentados, dificilmente se “quebram” em moléculas de mesmo tamanho. Um composto A de massa 122, pode se quebrar em duas moléculas menores, uma de massa 70 e outra de massa 52. Um composto B, de mesma massa, pode se quebrar em duas moléculas menores, uma de massa 100 e outra de massa 22, etc.

De forma bastante resumida, um sistema de espectrometria de massas consegue identificar um composto utilizando-se desta peculiaridade da fragmentação.

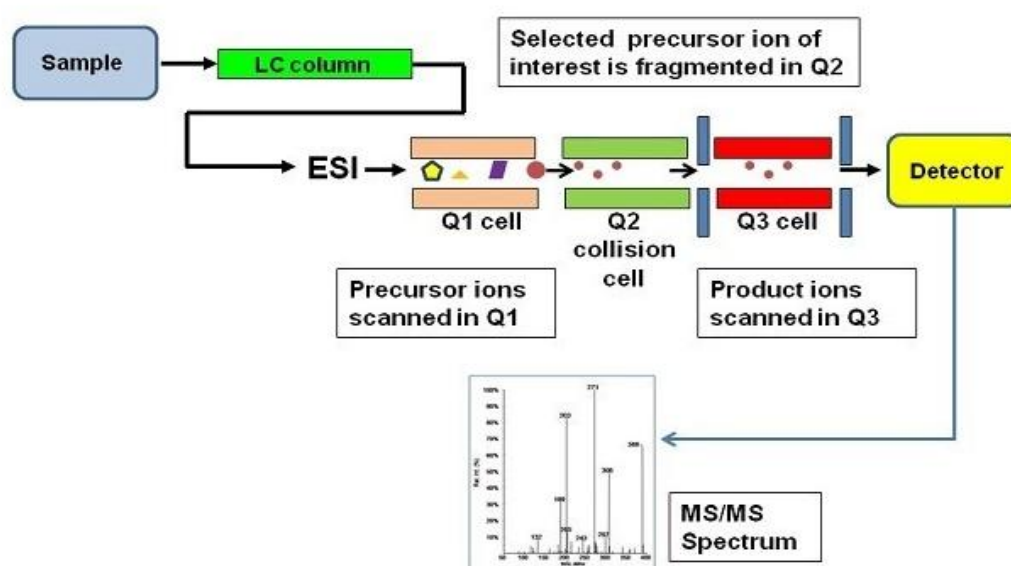
O composto Benzanida, por exemplo, de massa 121 sofre a primeira fragmentação e se “quebra” em duas moléculas menores mais abundantes, uma de massa 105 e outra de massa 44.

Em seguida, a molécula de massa 105 é novamente fragmentada e nos leva a identificação do composto de massa 77 (benzeno), que é nosso composto de interesse.

Utilizando-se da técnica de fragmentação de moléculas via MS, dificilmente você obterá um falso positivo (identificação de um composto sem ele estar presente na amostra) ou um falso negativo (não identificação do composto, mesmo ele estando presente na amostra).

- ✓ Identificamos dos compostos pela fragmentação da molécula
- ✓ Esta fragmentação é feita pelo bombardeamento de elétrons nas moléculas pela liberação de elétrons por um filamento específico.

Figura 5: Representação esquemática: Detector por Espectrometria de Massas (MS/MS)



Fonte: a3analitica.com.br

5 Considerações finais

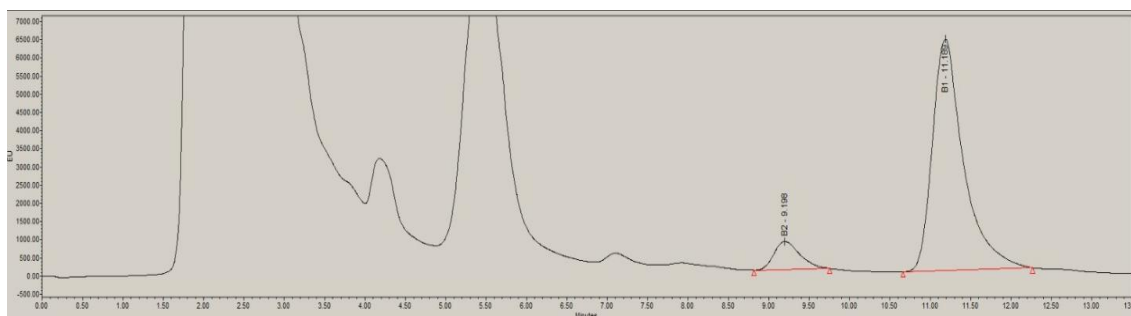
Na Tabela 1 e Figura 2, podemos observar uma análise quantificada, onde a CLAE detectou picos B1 e B2 na amostra de pasta de amendoim preparada, na somatória destes dois resultados (38,664 ppb) o nível de aflatoxina esta consideravelmente elevado se for comparado com os padrões de limites exigidos por legislações/normas.

Tabela 1 - Resultados obtidos pela CLAE em análise de aflatoxina no laboratório de controle da qualidade, amostra: 4668, lote:647

Nome	Tempo	Area (%)	Unidade	Resultado
G2	6.535			
G1	7.812			
B2	9.198	9,08	ppb	2,035
B1	11.169	90.92	ppb	39,629

Fonte: Laboratório interno de controle da qualidade, localizado em Jaboticabal, SP/Brasil

Figura1: Resultados obtidos pela CLAE em análise de aflatoxina no laboratório de controle da qualidade, amostra: 4668, lote:647



Fonte: Laboratório interno de controle da qualidade, localizado em Jaboticabal, SP/Brasil

O uso da cromatografia abrange muitas áreas do conhecimento, e suas funcionalidades são inumeráveis. Os trabalhos envolvendo essas técnicas multiplicam-se dia a dia, o que torna difícil acompanhar sua evolução nas diferentes áreas. Na medicina veterinária, apesar do uso estar relatado em diferentes áreas, seu emprego está restrito à área toxicológica e na detecção de contaminantes de alimentos de origem animal. Mesmo na área toxicológica a quantidade de trabalhos que utilizam diretamente a cromatografia é restrita, sendo que grande parte destes a utiliza de forma isolada, e descrevendo como o método cromatográfico foi utilizado, o que muitas vezes torna difícil a reprodutibilidade da metodologia. Apesar da grande utilidade da cromatografia, os equipamentos empregados nas técnicas mais modernas têm alto custo e demanda de pessoal especializado para operá-los. Assim o uso dessas técnicas fica restrito, e muitas vezes há a impossibilidade de realizá-las, e por vezes, diagnósticos toxicológicos não podem ser estabelecidos com precisão.

6 CONCLUSÃO

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência se desenvolveu amplamente nas últimas décadas e novas técnicas continuam a ser desenvolvidas com o avanço da tecnologia e a busca por resultados cada vez mais rápidos e precisos. A CLAE permite análises laboratoriais diversas e apresenta muitas outras vantagens em relação aos demais métodos conhecidos, de modo que suas desvantagens se tornam menos relevantes dependendo do contexto da empresa ou instituição. O setor de alimentos é muito representativo para a economia brasileira. Estes produtos possuem em sua composição uma ampla gama de compostos que compõem suas características de qualidade, sendo necessário atender legislações vigentes e evitar defeitos e contaminantes. Além disso, o consumidor se torna cada vez mais exigente na busca por produtos saudáveis. Diante das diversas possibilidades de análises por meio da CLAE, esta técnica se mostra eficaz para a avaliação de amostras tão complexas como os matizes alimentares, sendo possível avaliar diferentes compostos simultaneamente, o que permite uma análise panorâmica dos produtos.

REFERÊNCIAS

SEPARAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS - CROMATOGRAFIA

<https://www2.ufjf.br/quimica/files/2018/08/Cromatografia.pdf>

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

<https://ceatox.ibb.unesp.br/padroao.php?id=15#:~:text=Os%20componentes%20da%20mistura%20na, chamado%20de%20%22fase%20m%C3%B3vel%22.>

A cromatografia para identificação de micotoxinas em cereais e leguminosas

<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/download/15419/13613/197600>

Bruno, R. L. A. (2000). Qualidade fisiológica e microflora de sementes de amendoim cv. Br-1 durante o armazenamento. Revista de Oleaginosa e Fibrosa, Campina Grande, 4 (3):141-152.

Prado, G., Carvalho, E.P., Madeira, J. E. G., Morais, A.D., Oliveira, M. S., Corrêa, R. F., & Cardoso, V. N. (2006). Efeito da irradiação (60C°) na frequência fúngica de amendoim in natura em função do tempo de prateleira. Ciência e Agro tecnologia, 30(5):930-936.

<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/15419>

Micotoxinas nas Lavouras (Culturas, pt): Um Perigo à Saúde Humana e de Animais Domésticos

<https://www.apsnet.org/>

ORGANISACIÓN DE LA SALUD. Critérios de salud ambiental 11: Micotoxinas. O.P.S., Cidade do México. 1983. 131p

Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim, artigo acadêmico, SciELO-Brasil.

MALDANER, L. Desenvolvimento e validação de método para determinação de agrotóxicos em grãos de soja. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Journal AOAC International, v. 86, p.412, 2003.

HACKBART, H.; DEMOLINER, A.; SILVEIRA, C.; DORS, G.; PRIMEL, E.G.; BADIALE-FURLONG, E. Aplicação de HPLC-DAD e LC-ESI/MS na determinação de micotoxinas em arroz. 12º Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, 2008.

MAROCHI, M.A.; VALENTE-SOARES, L.M.; FURLANI, R.P.Z. Testes confirmatórios para tricotecnos. Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 56, n.2, p. 17-20, 1996.

VALENTE-SOARES, L. Curso Básico de Instrumentação para analistas de alimentos e fármacos. São Paulo: Editora Manole, v.1, 337 p. 2006.

F. Juliano, Valmir. Introdução aos Métodos Cromatográficos. Valmir F. Juliano. 2015. . 21/Set/2015.

PFARMA - <https://pfarma.com.br/farmaceutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-.html>

Princípios de cromatografia a líquido (HPLC)
<https://a3analitica.com.br/>

U.F.C CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - GABRIELA GOMES BASTOS OLIVEIRA
CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COMO MÉTODO DE ANÁLISE
DE BEBIDAS NÃO ALCÓOLICAS DE ORIGEM VEGETAL: UMA REVISÃO
FORTALEZA 2022, Página 25.

Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim

Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.80, n.3, p. 312-317, 2013.

EDMILSON MUNIZ DE OLIVEIRA - INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS
FIOCRUZ - A coluna de cromatografia líquida; uso, controles e descarte – parágrafo: 2.3
Colunas cromatográficas na atualidade.

AFLATOXINAS EM ALIMENTOS: POTENCIAL CARCINOGÊNICO HEPATICO
SANTOS, Ana Cláudia GUEDES, Maria do Carmo Santosi; 2.1 – Aflatoxina.