Mariane Aissa Andrade

DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM VINHO UTILIZANDO
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO TUBO E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS
SEQUENCIAL

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade de
São Paulo como parte dos requisitos para a
obtenção do título de mestre em Química

Área de concentração: Química Analítica e
Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo
reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Amadeu e Maria Amélia, que não pouparam esforços para me educar e sempre me incentivaram e apoiaram, e aos meus irmãos, Malena, Amadeu Junior e Maria Eduarda, por estarem sempre comigo, me dando forças para continuar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a chance de estar onde estou e me dar suporte nos momentos em que mais precisei.

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças por todas as oportunidades de aprendizado que me proporcionou, pela confiança, orientação, incentivo e apoio.

À minha família, por sempre estar disposta a me ajudar, tanto nos momentos bons quanto nos de extrema dificuldade e por todo suporte e carinho que me foi dado (caronas, comida pronta quando chegava tarde da noite, etc.).

Às amigas e colegas de laboratório Amanda, Ana Lúcia, Patrícia e Vivane, que passaram grande parte do tempo comigo, me ajudando, seja academicamente ou pessoalmente, com a sua amizade sincera e sem interesse. Obrigada por aguentarem a minha ansiedade e paranoia!

Aos colegas de laboratório, Bruno, Felipe, Arley, Felipe Luis (Pipe), Maraíssa, Elaine, Odete, Anderson (Dodói), Scarlet e Tanare por todo auxílio e principalmente, Meire, Letícia, Rodrigo, Guilherme e Adriel, por disponibilizarem seu tempo e atenção para me ajudar em etapas importantes deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto e Christopher Palmer pelas sugestões e esclarecimentos no decorrer do trabalho.

Aos docentes e funcionários do IQSC que contribuíram de alguma forma.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos pela infraestrutura e auxílio fornecidos.

Ao CNPq pela bolsa fornecida e à FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro em projetos desenvolvidos pelo grupo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que esse trabalho pudesse ser concluído.

RESUMO

As micotoxinas são compostos produzidos por fungos, sendo potencialmente perigosos à saúde humana e animal. A Ocratoxina A (OTA) é uma das micotoxinas mais amplamente estudadas, sendo encontrada em várias matrizes alimentícias. A concentração dessa micotoxina nos alimentos é geralmente muito baixa (da ordem de ng g^{-1}), sendo, portanto, necessário o emprego de técnicas de preparo de amostras que realizem a purificação e pré-concentração no analito. Os métodos de separação e detecção empregados na análise de OTA também devem oferecer sensibilidade adequada para a quantificação do analito. Logo, os objetivos do trabalho foram desenvolver uma metodologia utilizando a técnica *in-tube* SPME no modo de extração única (*flow through extraction*) com partículas de C18 como fase extratora e separação e detecção por HPLC-MS/MS. Além disso, otimizar e validar a metodologia proposta e detectar e quantificar a OTA em amostras de vinho. Para isso, a técnica *in-tube* SPME foi configurada e um tubo de PEEK foi empacotado com partículas de C18, o qual foi utilizado na extração. A otimização do método foi realizada utilizando-se um planejamento experimental composto central $2^2 + 3$ pontos centrais, tendo como fatores a porcentagem de ACN e o tempo durante o carregamento da amostra. A validação da metodologia empregada foi realizada conforme o guia de validação da ANVISA e, posteriormente, amostras de vinho tinto seco e vinho branco seco foram analisadas. O método proposto foi desenvolvido, tendo sua funcionalidade atestada e suas condições de análise melhoradas, sendo utilizado 22 % de ACN e 6 minutos no carregamento da amostra. O método foi validado, mostrando sensibilidade adequada, com limites de detecção e quantificação iguais à 0,02 e 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A linearidade e precisão da metodologia foram avaliadas, apresentando coeficiente de correlação igual a 0,996 e DPR menor que 6%, respectivamente. O método mostrou-se exato nos níveis de concentração médio e alto e a recuperação máxima obtida para o nível alto foi próximo 73%. Amostras brasileiras e estrangeiras de vinho tinto seco e vinho tinto seco branco foram analisadas e a OTA não foi detectada em nenhuma delas. Entretanto, a OTA pode estar presente nas amostras analisadas em concentrações mais baixas que as determinadas pelos limites de detecção e quantificação, não sendo potencialmente perigosos à saúde.

ABSTRACT

Mycotoxins are compounds produced by fungus, being a potential danger to human and animal health. Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin widely studied, being found in a varied of food matrices. OTA concentration in food is generally low (the order of ng g^{-1}), being, therefore, necessary the use of sample preparation techniques to perform the analyte purification and preconcentration in the sample. The separation and detection methods used in OTA analysis also should offer proper sensibility in order to quantify the analyte adequately. In short, the goals of the present work were to develop a methodology using in-tube SPME in flow through extraction mode with C18 particles as extraction phase and separation and detection by HPLC-MS/MS. Further, optimize and validate the proposed methodology and detect and quantify OTA in wine samples. For this, in-tube SPME was configured and a PEEK tube was packed with C18 particles, which was used in the extraction step. The method optimization was achieved using a central composite $2^2 + 3$ central points experimental design, having as factors the percentage of ACN and time during sample loading step. Validation method was done following ANVISA validation guide after which red dry wine and white dry wine samples were analyzed. The proposed method was developed, having its functionalities attested and its analysis conditions enhanced, using 22% of ACN and 6 minutes in sample loading. The method was validated, demonstrating proper sensitivity, with detection and quantification limits equal to 0.02 and 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Linearity and precision were evaluated, exhibiting correlation coefficient equal to 0.996 e RSD under 6%, respectively. The method was accurate in medium and high concentration levels and maximum recovery was 73% in high concentration level. Brazilian and foreign red dry wine and white dry wine samples were analyzed and OTA was not detected in any of them. However, OTA may be present in samples analyzed in lower concentrations than that ones determined by detection and quantification limits, not being a potential danger to human health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das Ocratoxinas.	18
Figura 2. Estrutura química da OTA.	18
Figura 3. Rota biossintética proposta para a formação de OTA.	20
Figura 4. Rotas de biodegradação da OTA. a) Hidrólise da ligação amida da OTA. b) Hidrólise do anel lactônico da OTA.	24
Figura 5. Equilíbrio ácido-base da OTA.	25
Figura 6. Diagrama de Distribuição da OTA. OTA = Espécie neutra, OTA ¹ = Espécie monoaniônica, OTA ² = Espécie dianiônica.	25
Figura 7. Fluxograma do processo de fabricação do vinho tinto.	27
Figura 8. Fluxograma do processo de produção do vinho branco.	27
Figura 9. Produção mundial de vinho no ano de 2013.	28
Figura 10. Distribuição das bebidas alcoólicas mais consumidas, em litros de puro álcool em 2005 ^a .	29
Figura 11. Contaminação de vinhos tinto e branco em diversos países.	32
Figura 12. Princípio de funcionamento da Coluna de Imunoafinidade.	34
Figura 13. Dispositivo customizado para SPME com Seringa 7000 da Hamilton TM .	36
Figura 14. Dispositivo comercial de SPME.	36
Figura 15. Configurações da SPME.	37
Figura 16. Modo de operação da SPME. a) extração direta; b) <i>headspace</i> SPME e c) SPME protegida por membrana.	38
Figura 17. a) processo de extração em SPME; b) processo de dessorção térmica SPME-GC e c) processo de dessorção SPME-HPLC.	40
Figura 18. Configurações dos dispositivos de extração <i>in-tube</i> SPME (A) coluna capilar de sílica fundida com revestimento polimérico, (B) capilar PEEK recheado com tubos de sílica fundida com revestimento interno ou externo, (C) capilar de PEEK recheado com sólidos adsorventes e (D) capilar recheado com fase monolítica.	43
Figura 19. Configuração típica do acoplamento de preparo de amostra com a cromatografia líquida usando válvula de comutação.	44

Figura 20. Configuração típica do sistema <i>in-tube</i> SPME-LC baseado em dispositivo de comutação de coluna, mostrando a posição de extração (A) e eluição (B) com as configurações <i>forward-flush</i> (A1 e B1) e <i>back-flush</i> (A2 e B2).	44
Figura 21. Configuração típica de um sistema <i>in-tube</i> SPME automatizado no modo de (A) extração única (<i>flow through extraction</i>) e em (B) ciclos de aspirar/dispensar (<i>draw/eject extraction</i>) baseados em comutação de coluna, incluindo posições de extração (A1 e B1) e eluição (A2 e B2).	46
Figura 22. Esquema geral de montagem do sistema <i>in-tube</i> SPME utilizado.	52
Figura 23. Esquema de montagem da coluna capilar.	53
Figura 24. Esquema do sistema <i>in-tube</i> SPME com a válvula de comutação nas posições a) carregar e b) injetar.	53
Figura 25. Esquema de montagem do sistema para experimento inicial na otimização da metodologia.	55
Figura 26. Espectro de absorção molecular no UV/Vis da OTA ($c = 17,5 \text{ mg L}^{-1}$) em Tolueno/Ácido acético (99:1, v/v).	60
Figura 27. Rota de fragmentação da Ocratoxina A por Espectrometria de Massas utilizando ionização no modo positivo.	62
Figura 28. Cromatograma (TIC) da OTA ($[OTA] = 50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) em solução aquosa com tempo de carregamento de 2 minutos.	63
Figura 29. Cromatograma da OTA ($[OTA] = 50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) em solução aquosa com tempo de carregamento de 2 minutos, especificando as transições de massas estudadas.	63
Figura 30. Avaliação do tempo de retenção da OTA ($[OTA] = 1 \text{ mg L}^{-1}$) na coluna de extração com a diminuição da porcentagem de ACN (100 – 30%) no carregamento.	66
Figura 31. Avaliação do tempo de retenção da OTA ($[OTA] = 1 \text{ mg L}^{-1}$) na coluna de extração com a diminuição da porcentagem de ACN (30 e 20%) no carregamento.	66
Figura 32. Cromatograma de vinho tinto seco fortificado com OTA ($[OTA] = 5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) obtido com 15 % de ACN e 3,1 minutos no carregamento.	67
Figura 33. Comparação entre as extrações de OTA em vinho tinto seco fortificado ($[OTA] = 5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) com 7,9 e 22 % de ACN com o mesmo tempo de carregamento (6 minutos).	68
Figura 34. Diagrama de Pareto obtido para os valores de área dos experimentos do planejamento experimental.	70

Figura 35. a) Superfície de resposta; b) Gráficos de contorno, obtidos para valores de área dos experimentos do planejamento experimental.	70
Figura 36. Diagrama de Pareto obtido para os valores de sinal-ruído dos experimentos do planejamento experimental.	72
Figura 37. a) Superfície de resposta; b) Gráficos de contorno, obtidos para os valores de sinal-ruído dos experimentos do planejamento experimental.	72
Figura 38. Comparação entre os cromatogramas do vinho tinto seco isento do analito e vinho tinto seco fortificado com OTA ($[OTA] = 0,2 \mu\text{g L}^{-1}$).	74
Figura 39. Cromatograma obtido na determinação do limite de detecção ($[OTA] = 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$).	75
Figura 40. Cromatograma obtido na determinação do limite de quantificação ($[OTA] = 0,05 \mu\text{g L}^{-1}$).	75
Figura 41. Curva de calibração em vinho tinto seco fortificado com OTA.	76
Figura 42. Gráfico da dispersão de resíduos do ajuste linear da curva de calibração.	77
Figura 43. Comparações entre os cromatogramas obtidos na análise das amostras (preto) e de vinho tinto seco fortificado com $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de OTA (vermelho).	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições ótimas de temperatura e a_w para a produção de micotoxinas.	16
Tabela 2. Principais micotoxinas com seus respectivos fungos produtores, substratos e seus efeitos no homem e animais.	17
Tabela 3. Espécie de fungo responsável pela contaminação de diferentes alimentos	19
Tabela 4. Principais características dos fungos produtores de OTA.	19
Tabela 5. Presença de Ocratoxina A em diferentes gêneros alimentícios na União Europeia.	21
Tabela 6. Produção mundial de vinho por país em 2013.	28
Tabela 7. Consumo mundial, porcentagem no consumo mundial, de vinho em 2013.	29
Tabela 8. Consumo per capita de vinho de alguns países em 2013.	30
Tabela 9. Fungos responsáveis por contaminação de OTA em uvas e vinhos em diferentes países.	31
Tabela 10. Limites Máximos Tolerados (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) de OTA em alguns alimentos aceitos no Brasil e na União Europeia.	34
Tabela 11. Guia de seleção da fibra a ser utilizada em SPME.	39
Tabela 12. Aplicações de SPME para extração de OTA em alimentos nos anos de 2006 a 2012.	41
Tabela 13. Comparação entre a SPME convencional e a <i>in-tube</i> SPME combinadas à HPLC.	43
Tabela 14. Condições das etapas de limpeza, condicionamento e extração e separação por <i>in-tube</i> SPME.	54
Tabela 15. Níveis utilizados no planejamento experimental.	56
Tabela 16. Experimentos realizados no planejamento experimental.	56
Tabela 17. Resultados da análise para a avaliação da precisão do sistema <i>in-tube</i> SPME.	65
Tabela 18. Valores de área e sinal-ruído obtidos para os experimentos do planejamento experimental.	69

Tabela 19. Valores dos coeficientes dos fatores utilizados na regressão quadrática da resposta sinal-ruído. Fatores significativos em vermelho. **73**

Tabela 20. Resultados obtidos na avaliação da precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão e recuperação. **77**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN – Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ar – Gás Argônio

ATP – Adenosina Trifosfato (*Adenosine Triphosphate*)

CE – Eletroforese Capilar (*Capillary Electrophoresis*)

CMD – Concentração Média Determinada

DNA – Ácido Desoxirribonucléico (*Desoxiribonucleic Acid*)

DPR – Desvio Padrão Relativo

DP – Desvio Padrão

EFSA – Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (*European Food Safety Authority*)

ESI – Ionização por Electrospray (*Electrospray Ionization*)

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of United Nations*)

FLD – Detector de Fluorescência (*Fluorescence Detector*)

GC – Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

IACs – Colunas de Imunoafinidade (*Immunoaffinity Columns*)

IARC – Agência Internacional de Pesquisa ao Câncer (*International Agency for Research on Cancer*)

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LC – Cromatografia Líquida (*Liquid Chromatography*)

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring*)

MS – Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry*)

MS/MS – Espectrometria de Massas Sequencial

N₂ – Gás Nitrogênio

OTA – Ocratoxina A (*Ochratoxin A*)

PEEK – Poliéter éter cetona (*Polyether ether ketone*)

PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno

PKS – Policetídeo Sintase (*Polyketide Synthase*)

PLOT – Coluna tubular aberta com camada porosa (*Porous Layer Open Tubular*)

SPE – Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)

SPME – Microextração em Fase Sólida (*Solid Phase Microextraction*)

THF – Tetraidrofurano

t_r = Tempo de retenção

t-RNA – Ácido ribonucléico transportador (*Transfer Ribonucleic Acid*)

UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (*Ultra Performance Liquid Chromatography*)

WCOT – Coluna tubular aberta com parede recoberta (*Wall Coated Open Tubular*)

ε – Coeficiente de Absortividade Molar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 As micotoxinas	15
1.2 Ocratoxina A	16
1.3 OTA em vinhos	26
1.3.1 Produção de vinhos	26
1.3.2 Consumo de vinho	27
1.3.3 Contaminação de vinhos por OTA	30
1.4 Legislações para o controle de OTA	33
1.5 Métodos de extração e <i>clean-up</i> para a análise de OTA	33
1.6 Microextração em Fase sólida	35
1.6.1 Microextração em Fase Sólida no tubo	41
1.7 Detectores na análise de OTA	45
1.8 Validação de metodologia	47
1.9 Objetivos	48
2 EXPERIMENTAL	50
2.1 Reagentes	50
2.2 Preparo da solução estoque e trabalho	50
2.3 Instrumento e condições analíticas	50
2.4 Sistema <i>in-tube</i> SPME	51
2.5 Otimização da metodologia	54
2.6 Validação da metodologia	56
2.7 Análise das amostras de vinho	59
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.1 Determinação da concentração da solução estoque de OTA	60

3.2 Otimização do detector de massas	61
3.3 Sistema <i>in-tube</i> SPME	62
3.4 Otimização da metodologia	64
3.5 Validação da metodologia	73
3.6 Análise das amostras de vinho	79
4 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 As micotoxinas

As micotoxinas (*mykes* = fungo; *toxicun* = veneno) são metabólitos secundários de alguns fungos, de baixo peso molecular (massa molecular ~ 700 u), sendo uma potencial ameaça à saúde humana e animal quando alimentos contaminados com as mesmas são ingeridos, causando várias doenças e até morte ^{1, 2}. A produção de micotoxinas pode ocorrer durante as fases de crescimento, colheita e estocagem do alimento e podem ser encontradas nesses mesmo que os fungos que as produziram sejam destruídos ².

Os principais fungos produtores de micotoxinas são dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* ². Os alimentos que são estocados por mais de alguns dias são alvo do crescimento desses fungos, tornando-se alimentos potencialmente contaminados ¹.

A produção das micotoxinas é dependente das condições ambientais como temperatura, atividade de água (a_w), substrato, pH, interação microbiana, entre outros. A temperatura ideal para a produção de micotoxinas está entre a temperatura mínima e máxima para o crescimento fúngico, variando entre as espécies. Entretanto, alimentos provenientes de regiões tropicais e semi-tropicais apresentam altos níveis de contaminação, uma vez que o clima favorece o desenvolvimento de fungos toxicogênicos. As toxinas podem ser produzidas quando os valores a_w variam entre 0,60 a 0,90 em alimentos de umidade intermediária, sendo que 0,70 é o mínimo para a sobrevivência dos fungos ^{2, 3}. Dessa forma, é importante o controle desses fatores durante todo o ciclo produtivo do alimento para que a contaminação por micotoxinas não ocorra.

Na Tabela 1 são apresentadas as condições ótimas de temperatura e a_w para a produção de algumas micotoxinas.

O Homem é contaminado pelas micotoxinas principalmente pela ingestão de alimentos processados ou *in natura* contaminados, podendo também ocorrer pela ingestão de carne, leite e ovos de animais que foram alimentados com ração contaminada ⁵. Os principais alimentos fonte de micotoxinas são cereais, amendoim, castanhas, frutas secas, café, cacau, temperos, óleos de sementes, ervilhas secas,

Tabela 1. Condições ótimas de temperatura e a_w para a produção de micotoxinas.

Micotoxina	Temperatura (°C)	a_w
Aflatoxina	33	0,99
Ocratoxina	25-30	0,98
Fumonisin	15-30	0,9-0,995
Zearalenona	25	0,96
Deoxinivalenol	26-30	0,995
Citrinina	20-30	0,75-0,85

Fonte: 4.

feijão, frutas como maçã, e bebidas como cerveja e vinho, porque usam malte de cevada, cereais e uvas possivelmente contaminados ¹.

As micotoxinas consideradas de maior risco a saúde humana e animal pela Agência Internacional de Pesquisa ao Câncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) são as Aflatoxinas (AFLA), a Ocratoxina A (OTA), a Zearalenona (ZON), o Desoxinivalenol (DON) e as Fumonisin (FUMO). Existem também outras micotoxinas que podem causar problemas, porém as citadas são as com maiores problemas de contaminação e interesse de estudo ².

Na Tabela 2 são apresentados os alimentos mais comumente contaminados por micotoxinas, os seus fungos produtores e seus efeitos no homem e animais.

Devido aos graves danos à saúde humana e animal pela intoxicação através de ingestão das micotoxinas, o estudo e a quantificação das micotoxinas presentes nos alimentos vem ganhando destaque nacional e internacionalmente.

1.2 Ocratoxina A

O grupo das Ocratoxinas é compreendido por compostos que apresentam uma L-fenilalanina ligada à uma diidroisocumarina por uma ligação amida. São elas a Ocratoxina A (OTA), a Ocratoxina B e a Ocratoxina C ^{3, 6}. Na Figura 1 são apresentadas as estruturas químicas das Ocratoxinas e na Figura 2, a estrutura química da OTA, explicitando as partes oriundas da L-fenilalanina e da diidroisocumarina.

Tabela 2. Principais micotoxinas com seus respectivos fungos produtores, substratos e seus efeitos no homem e animais.

Principais substratos	Principais fungos produtores	Principal toxina	Efeitos
Amendoim e milho	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxina B1	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica
Trigo, aveia, cevada, milho e arroz	<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinina	Nefrotóxica para suínos
Centeio e grãos em geral	<i>Claviceps purpurea</i>	Ergotamina	Gangrena de extremidades e convulsões
Milho	<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisinias	Câncer de esôfago
Cevada, café e vinho	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Ocratoxina	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica
Frutas e sucos de frutas	<i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium griseofulvum</i>	Patulina	Toxicidade vagamente estabelecida
Milho, cevada, trigo, aveia e centeio	<i>Fusarium sp</i> <i>Myrothecium sp</i> <i>Strachybotrys sp</i> <i>Trichothecium sp</i>	Tricotecenos T2, neosolaniol Fusanona x, nivalenol deoxinivalenol	Hemorragias, vômitos e dermatites
Cereais	<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenona	Baixa toxicidade; síndrome da masculinização e feminização em suínos

Fonte: 5.

A OTA, a micotoxina do grupo das ocratoxinas mais tóxica, possui ampla distribuição na natureza e nos alimentos. Tanto a Ocratoxina B quando a Ocratoxina C não possuem ocorrência natural e são menos tóxicas que a OTA ⁷. Por isso, a OTA é a mais estudada dentre as três micotoxinas do grupo.

A OTA é produzida principalmente por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, tendo sido detectada primeiramente em fungos da espécie *Aspergillus ochraceus*, sendo que outras espécies no mesmo gênero também a produzem, como o *A. alliaceus*, *A. auricomus*, *A. carbonarius*, *A. citricus*, *A. ostianus*, *A. sulphureus*, *A. fonsecaeus*, *A. petrakii*, *A. glaucus*, *A. melleus* e *A. niger*. Já o principal produtor de OTA nos fungos do gênero *Penicillium* é o *Penicillium verrucosum* ⁸. Algumas espécies de fungos se desenvolvem preferencialmente em alguns alimentos específicos, como mostrado na Tabela 3. A ocorrência natural desses dois fungos é ampla, uma vez que esses crescem em variadas condições de substrato, pH, temperatura e umidade ¹.

Figura 1. Estrutura química das Ocratoxinas.

Fonte: Autoria própria

Figura 2. Estrutura química da OTA.

Fonte: Autoria própria.

No entanto, os dois gêneros de fungos crescem em condições distintas. Em regiões de clima temperado, a OTA é mais produzida por fungos do gênero *Penicillium*, enquanto que em regiões de climas tropicais e subtropicais, os do gênero *Aspergillus* são mais responsáveis pelo aparecimento de OTA nos alimentos ⁹. Na Tabela 4 é apresentada as principais características dos fungos produtores de OTA.

Tabela 3. Espécie de fungo responsável pela contaminação de diferentes alimentos.

Alimento	Espécie de Fungo
Cereais	<i>P. verrucosum</i>
Carne e Queijo	<i>P. nordicum</i>
Uvas e Vinho	<i>A. niger</i> e <i>A. carbonarius</i>
Café e Temperos	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> e <i>A. carbonarius</i>
Figos	<i>A. alliaceus</i>

Fonte: 10.

Tabela 4. Principais características dos fungos produtores de OTA.

Gênero <i>Aspergillus</i>	Gênero <i>Penicillium</i>
Crescimento a temperaturas mais altas:	
<i>A. ochraceus</i> - 8-37°C (Max 31°C); aw até 0,77	Crescimento a temp. <30°C (Max. a 20°C)
<i>A. carbonarius</i> - 32-35°C; aw 0,82	aw até 0,8; pH entre 6,0-7,0
<i>A. niger</i> - 8-47°C (Max. 37°C); aw até 0,72	Contaminante de cereais armazenados e carne
Contaminante de café, uvas passas	Norte e centro da Europa e Canadá
Regiões mais quentes e dos trópicos	

Fonte: 8.

A biossíntese da OTA ainda não é muito bem elucidada, porém acredita-se que o grupamento diidroisocumarina é formado pela reação do acetato e malonato, formando um pentacetídeo, pela ação da enzima policetídeo sintase (*polyketide synthase* – PKS). Essa enzima é considerada uma enzima chave para a produção de micotoxinas, uma vez que também está envolvida na biossíntese de fumonisinas e aflatoxinas. Uma rota biossintética para a OTA foi proposta baseando-se em um modelo mecanístico de acordo com a estrutura química dessa micotoxina ⁶. Na Figura 3 a rota biossintética proposta para a produção de OTA é apresentada.

O primeiro precursor da OTA, a meleína, formada pelo pentacetídeo, é metilada e oxidada à 7-carboxi-meleína, mais conhecida como Ocratoxina β. Ocorre uma cloração, pela cloroperoxidase, formando a Ocratoxina α. Essa, por sua vez é ativada por uma reação com ATP. O segundo precursor, o aminoácido fenilalanina, é sintetizado pela via do ácido chiquímico, seguido de uma esterificação. Os dois precur-

Figura 3. Rota biossintética proposta para a formação de OTA.

Fonte: Adaptação de 6.

sores já ativados reagem, formando a Ocratoxina C, que por uma desesterificação é transformada em OTA ⁶.

Os alimentos mais facilmente contaminados por OTA são cereais e outros alimentos ricos em amido, café, temperos, frutas secas, cerveja e vinho, sendo também encontrada em carne animal ¹. Os cereais são a maior fonte de contaminação por OTA, sendo que 50% da ingestão humana diária dessa micotoxina é devido ao consumo de derivados de cereais. A segunda maior fonte de contaminação por OTA é o vinho, o qual colabora com a porcentagem de 10-15% do total de OTA ingerido diariamente ^{6, 11}. Em um estudo realizado na União Europeia nos anos de 1999 e 2000 verificou-se a contaminação por OTA em 48% das amostras analisadas, sendo que os alimentos com maior grau de contaminação são mostrados na Tabela 5 ⁸.

A especial estabilidade da OTA a altas temperaturas e acidez faz com que a presença dessa micotoxina nos alimentos a serem processados seja também preocupante. Uma vez que o alimento está contaminado, é difícil a remoção dessa micotoxina da matriz ⁶. Estudos têm mostrado que processo de lavagem de grãos de cevada reduz em somente 2-3% a quantidade total de OTA nos grãos. O processo de moagem tende a redistribuir e concentrar as micotoxinas nos moinhos. Assim, um teor mais alto de OTA foi encontrado em trigo, cevada e outros cereais moídos. Durante o processo cervejeiro, especialmente durante a fermentação, cerca de 20-30% de OTA pode ser removida do mosto. Ao assar um pão, cozinhar feijão sob pressão e a tostar café, todos contaminados com OTA, há diminuição de cerca de 0, 84 e 13-93% da quantidade total da micotoxina presente, respectivamente nesses alimentos. Com

Tabela 5. Presença de Ocratoxina A em diferentes gêneros alimentícios na União Europeia.

Alimento	Porcentagem contaminada
Cereais e produtos à base de cereais	50%
Vinho	13%
Especiarias	8%
Cerveja	5%
Cacau	4%
Frutas secas	3%
Carne	1%

Fonte: 8.

esses dados pode-se observar que a OTA, na maioria dos casos, mostra-se moderadamente estável ao processamento, tendo sua concentração reduzida somente em condições mais extremas (ex: temperatura acima de 150 °C) ¹².

A toxicidade da OTA foi amplamente descrita na monografia da IARC (*International Agency for Research on Cancer*) em 1993, sendo classificada na classe 2B, como possível carcinogênico humano. O principal efeito já observado pela exposição por ingestão de OTA é o desenvolvimento de doenças nos rins, sendo ela sugerida como fator contribuinte para o desenvolvimento da Nefropatia Endêmica dos Balcãs (BEN – *Balkan Endemic Nephropathy*), doença crônica em que os rins são diminuídos de tamanho e peso, com fibrose difusa e tumores no trato urinário ¹³. Estudos também tem revelado uma conexão com a exposição de OTA e câncer no fígado, rins, glândulas mamárias e testículos em animais. A OTA também possui efeito neurotóxico, afetando várias áreas do sistema nervoso ¹⁴. Além disso, efeitos imunotóxicos e teratogênicos já foram evidenciados em pesquisas. A carcinogenicidade em ratos foi observada com doses relativamente baixas (70 µg kg⁻¹ de peso corporal). A teratogenicidade foi verificada principalmente a nível do sistema nervoso central, mas com concentrações muito superiores às normalmente presentes nos alimentos (1 mg kg⁻¹). Podem ser observados efeitos imunotóxicos com concentrações relativamente baixas de OTA, na ordem dos ng mL⁻¹. Concentrações na ordem dos 5 ng de OTA kg⁻¹ peso corporal originam imunossupressão em ratos ⁸.

Um dos principais mecanismos de ação da OTA parece estar relacionado com a inibição da síntese de proteínas. O grupo fenilalanina compete ao nível da tradução com o aminoácido fenilalanina para o t-RNA correspondente, inibindo a fenilalanina transferase e consequentemente a síntese proteica. A OTA parece ser capaz de induzir mecanismos de estresse oxidativo, com a formação de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio, responsáveis pela citotoxicidade. A peroxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares leva à alteração da permeabilidade iônica da membrana. Este mecanismo interfere também nas membranas mitocondriais, sendo o suposto responsável pelos efeitos observados nas mitocôndrias. Estudos recentes demonstram haver uma atividade mutagênica através da ação de algum metabólito da OTA ou pela formação de radicais livres. A exposição à micotoxina parece induzir a lesão e reparação do DNA e aberrações cromossomais em células de mamíferos, *in vitro* e *in vivo*) ⁸.

O trato gastrointestinal é a principal via de contaminação com OTA, sendo a micotoxina absorvida lentamente durante todo o percurso. A absorção de OTA ocorre primeiramente e mais rapidamente no estômago, devido a sua característica ácida, seguindo-se por uma absorção mais lenta a nível intestinal. Uma das propriedades toxicocinéticas mais significativas da OTA é a sua alta afinidade para ligar-se a proteínas plasmáticas, principalmente a albumina. A fração ligada a macromoléculas constitui um reservatório da micotoxina que permite libertá-la para os tecidos durante um longo período de tempo. Também a alta afinidade para as proteínas séricas retarda a eliminação da micotoxina pelo organismo, aumentando o seu tempo de meia-vida. De acordo com alguns estudos só uma pequena percentagem da OTA é que permanece livre na corrente sanguínea. O tempo de meia-vida em humanos é de 35 dias, o que aumenta o risco, uma vez que em outras espécies esse tempo é menor ^{8, 14}.

A excreção biliar e a filtração glomerular parecem ser a principal via de eliminação da OTA, sendo demorada e dependente da espécie e gênero ¹⁴. A excreção da micotoxina pelo leite também foi demonstrada em ratos, coelhos e humanos. Em ruminantes, a transferência para o leite parece ser muito baixa, em parte devido à sua metabolização prévia pela microflora dos referidos animais ⁸.

A hidrólise da OTA ocorre majoritariamente a nível intestinal, por ação enzimática da microflora local ⁸. Duas rotas podem estar envolvidas na degradação da OTA por microrganismos. A primeira, Figura 4 a, envolve a hidrólise da ligação amida que une o grupo L-fenilalanina e a Ocratoxina α . Uma vez que esses grupos não são tóxicos, esse mecanismo pode ser considerado uma via de desintoxicação. A segunda via, Figura 4 b, mais hipotética, envolve a hidrólise do anel lactônico. Nesse caso, o produto de degradação é a OTA com o anel lactônico aberto, que tem toxicidade semelhante a OTA quando administrada em ratos. Apesar desta ser uma via hipotética, lactonohidrolases microbiológicas são comuns ¹⁵. Algumas enzimas também são capazes de hidrolisar a OTA, como foi mostrado em alguns estudos com a carboxipeptidase A de pâncreas bovino, sendo que a enzima age fazendo a hidrólise amida da OTA ¹⁶.

O nome químico da OTA, de acordo com IUPAC, é N-(((3R)-5-Cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-7-isocromanil)carbonil)-3-fenil-L-alanina. Possui massa molecular igual a 403,81 g mol⁻¹ e estrutura cristalina variando de incolor a branco. A molécula possui

Figura 4. Rotas de biodegradação da OTA. a) Hidrólise da ligação amida da OTA. b) Hidrólise do anel lactônico da OTA.

Fonte: 15.

intensa fluorescência na cor verde em condições ácidas sobre luz UV e fluorescência na cor azul em condições alcalinas ⁶. O ácido livre é pouco solúvel em água (1,31 mg L⁻¹ a 25 °C) e moderadamente solúvel em solventes orgânicos como etanol, metanol, clorofórmio e xilenos ¹⁷. A OTA é um ácido orgânico fraco, tendo valor de pKa igual a 4,4 e 7,5 para o grupo carboxílico e fenólico, respectivamente ¹⁸. A Figura 5 mostra o equilíbrio ácido-base envolvendo a OTA.

Em pH 3,0, a OTA está presente predominantemente em solução na forma não ionizada (96%), sendo que as espécies monoaniônica e dianiônica estão presentes em sua minoria (4%), como pode ser observado no Diagrama de Distribuição da OTA, apresentado na Figura 6 ¹⁹.

A absorção de luz e a fluorescência da OTA é fortemente dependente do pH. As espécies neutra e monoaniônica da OTA, que estão presentes em pH < 4,5, possuem absorção máxima de luz no comprimento de onda de 333 nm (ϵ metanol = 6640 L mol⁻¹ cm⁻¹ ¹⁸; ϵ tolueno/ácido acético (99:1, v/v) = 5440 L mol⁻¹ cm⁻¹ ²⁰). Quando o pH é maior que 4,5, há um deslocamento do máximo de absorção para maiores comprimento de onda, aparecendo uma segunda banda de absorção no comprimento de onda de 380 nm, sendo a OTA dianiônica a espécie responsável por essa absor-

Figura 5. Equilíbrio ácido-base da OTA.

Fonte: Autoria própria.

Figura 6. Diagrama de Distribuição da OTA. OTA = Espécie neutra, OTA¹ = Espécie monoaniônica, OTA² = Espécie dianiônica.

Fonte: 19.

ção. Em valores de pH mais altos, somente a banda com máximo de absorção em 380 nm é observada, devido à presença exclusiva da OTA na forma dianiônica em solução ²¹.

1.3 OTA em vinhos

1.3.1 Produção de vinho

De acordo com a Portaria nº 229 de 25 de outubro de 1988 e as leis nº 7.678 de 8 de novembro de 1988 e nº 10.970 de 12 de novembro de 2004, os vinhos são definidos e classificados no Brasil ^{22, 23}. O vinho, de acordo com esses instrumentos legais, é uma bebida proveniente exclusivamente da fermentação alcoólica de uva madura e fresca ou suco de uva fresca, com o conteúdo de álcool adquirido mínimo de 7% (v/v a 20 °C). Os vinhos são classificados quanto à classe como: de mesa, leve, fino, espumante, frisanter, gaseificado, licoroso e composto; quanto à cor: tinto, rosado e branco; quanto ao teor de açúcar: nature, extra-brut, brut, seco, meio doce, suave e doce ^{24, 25}.

O vinho tinto é definido como o produto da fermentação alcoólica do mosto simples de uvas tintas sãs, fresca e maduras. Entretanto, há uma enorme gama de tipos de vinhos tintos, em função da variedade da uva que lhe deu origem, da origem geográfica do vinhedo, da estrutura química, da capacidade de envelhecimento, do teor de açúcar e do método empregado na sua elaboração ²⁶.

A diferença entre o vinho tinto e o vinho branco se dá pelo tipo de uva utilizado. O vinho branco é produzido a partir de uvas brancas ou uvas rosadas ou tintas, desde que essas estejam sem as cascas, seguindo as mesmas etapas de processamento do vinho tinto ²⁷.

Nas Figuras 7 e 8 são apresentados fluxogramas do processo de fabricação do vinho tinto e branco, respectivamente.

O vinho é produzido em grande parte do mundo, como pode observado na Figura 9. No entanto, de acordo com a FAO (*Food and Agriculture Organization of United Nations*) o continente que detém a maior produção média de vinho entre os anos de 1993 e 2013 é a Europa, com cerca de 67,4% da produção nesses anos, seguida das Américas, com 19,10%, Ásia, com 5,80%, Oceania, com 4,10%, África com 3,60% ³⁰.

No ano de 2013 foram produzidos cerca de 28 milhões de litros de vinho em todo mundo, sendo que os países que mais produziram a bebida podem ser observados na Tabela 6.

Figura 7. Fluxograma do processo de fabricação do vinho tinto.

Fonte: 28.

Figura 8. Fluxograma do processo de produção do vinho branco.

Fonte: 28.

1.3.2 Consumo de vinho

As bebidas alcoólicas são consumidas amplamente por todo o mundo como pode ser observado na Figura 10, a qual mostra a distribuição das bebidas alcoólicas mais consumidas no mundo ³².

O consumo total e *per capita* mundial de vinho em alguns países no ano de 2013 é apresentado na Tabela 7 e 8, respectivamente. O país que mais consome vinho é os Estados Unidos, retendo 13,5 % do consumo mundial. Já o país que mais consome vinho *per capita* é o Vaticano, sendo consumidos cerca de 50 litros de vinho

Figura 9. Produção mundial de vinho no ano de 2013.

Fonte: Adaptação de 29.

Tabela 6. Produção mundial de vinho por país em 2013.

País	Consumo total (L)	Porcentagem no consumo mundial (%)
Itália	4.449.000	15,97
Espanha	4.270.000	15,32
França	4.201.600	15,08
Estados Unidos	3.234.600	11,61
Chile	1.282.000	4,60
China	1.170.000	4,20
África do Sul	1.097.200	3,94
Austrália	1.092.000	3,92
Argentina	920.000	3,30
Alemanha	830.000	2,98
Portugal	674.000	2,42
Rússia	640.000	2,30
Romênia	427.000	1,53
Moldávia	401.000	1,44
Grécia	370.000	1,33
Nova Zelândia	345.000	1,24
Áustria	230.000	0,83
Hungria	224.300	0,80
Brasil	210.000	0,75

Fonte: Adaptado de 31.

Figura 10. Distribuição das bebidas alcoólicas mais consumidas, em litros de puro álcool em 2005^a.

^a Melhor estimativa de 2005, usando o consumo médio entre 2003 e 2005 (excluindo o consumo por turistas).

Fonte: Adaptação de 32.

por pessoa. O Brasil consumiu cerca de 1,70 L de vinho per capita, sendo o volume total consumido da bebida igual a 348.800 L, o que corresponde a 1,4% do volume total consumido mundialmente no ano de 2013 ^{33, 34}.

Tabela 7. Consumo mundial, porcentagem no consumo mundial, de vinho em 2013.

País	Consumo total (L)	Porcentagem no consumo mundial (%)
Estados Unidos	3.331.557	13,50
França	2.818.100	11,40
Itália	2.179.500	8,80
Alemanha	2.030.000	8,20
China	1.747.100	7,10
Reino Unido	1.273.800	5,20
Rússia	1.050.000	4,30
Argentina	1.033.700	4,20
Espanha	910.000	3,70
Romênia	524.300	2,10
Canadá	498.000	2,00
Portugal	455.100	1,80
Austrália	453.000	1,80
África do Sul	368.000	1,50
Holanda	358.500	1,50
Brasil	348.800	1,40

Fonte: Adaptação de 33.

Tabela 8. Consumo per capita de vinho de alguns países em 2013.

País	Consumo per capita (L)
Vaticano	49,49
França	42,94
Portugal	42,21
Suíça	40,61
Itália	35,58
Áustria	30,78
Uruguai	29,19
Argentina	24,50
Holanda	21,43
Reino Unido	20,20
Espanha	19,34
Estados Unidos	10,62
Brasil	1,70

Fonte: Adaptação de 34.

No Brasil, um estudo da Secretaria Nacional Antidrogas revela que o vinho foi a segunda bebida alcoólica mais consumida pelos brasileiros no período de Novembro de 2005 à Abril de 2006, com cerca de 25% do total consumido anualmente em 2002, perdendo somente para o consumo de cerveja (61%) ³⁵.

Conforme dados apresentados pela Secretaria Nacional Antidrogas, existe uma variação no consumo de vinho conforme à classe socioeconômica dos brasileiros, sendo que a classe A, B, C, D e E consomem 38, 27, 25, 24 e 18 % do total de bebida alcoólica ingeridas por elas, respectivamente. Além disso, a região do Brasil que mais consome vinho é a região Sul (29%), seguida pelas regiões Sudeste (27%), Norte (26%), Centro-Oeste (24%) e Nordeste (18%) ³⁵.

1.3.3 Contaminação de vinhos por OTA

A OTA foi detectada pela primeira vez em vinhos em 1995. Desde então, também tem sido detectada em outros produtos derivados de uva ¹⁰. O problema de contaminação do vinho por OTA é originado na vinha porque vários microrganismos podem se desenvolver nas cascas das bagas. Estudos têm mostrado que o fungo responsável pela maior produção de OTA nas uvas é o *Aspergillus carbonarius*, se desenvolvendo em bagas danificadas. Porém para que haja o crescimento desse fungo, as condições climáticas e de atividade de água (a_w) devem ser favoráveis ³⁶,

as quais foram apresentadas na Tabela 4. Outras espécies de fungos também foram determinadas como produtoras de OTA nas uvas e vinho em diversos países, como mostrado na Tabela 9.

Na produção do vinho tinto, as cascas das uvas ficam em contato com o mosto durante a etapa de esmagamento e fermentação, transmitindo a OTA produzida pelos fungos que se desenvolveram nas cascas para o líquido que sofrerá outras etapas de processamento. Quando são utilizadas uvas rosadas ou tintas para a produção do vinho branco, as cascas são removidas logo do começo do processamento, diminuindo, assim, a quantidade de OTA que é transmitida ao mosto ³⁷. O gráfico apresentado na Figura 11 mostra a concentração de OTA determinada em alguns vinho brancos e tintos de diferentes países, evidenciando que a concentração de OTA em vinhos brancos é mais baixa.

Muito pode ser feito para diminuição nos níveis de OTA em vinhos, como o correto gerenciamento da vinha, que pode diminuir em até 80% a quantidade dessa micotoxina no produto final. A prevenção de danos mecânicos e ambientais às bagas das uvas auxilia na não proliferação dos fungos produtores de OTA. Outra solução é

Tabela 9. Fungos responsáveis por contaminação de OTA em uvas e vinhos em diferentes países.

País	Espécie de Fungo Responsável
Argentina	Agregado de <i>A. niger</i>
Austrália	<i>A. carbonarius</i>
Brasil	<i>A. carbonarius</i> e agregado de <i>A. niger</i>
França	<i>A. carbonarius</i>
Grécia	<i>A. carbonarius</i> e agregado de <i>A. niger</i>
Hungria	Agregado de <i>A. niger</i>
Israel	<i>A. carbonarius</i> e agregado de <i>A. niger</i>
Itália	<i>A. carbonarius</i> e agregado de <i>A. niger</i>
Portugal	<i>A. carbonarius</i> , agregado de <i>A. niger</i> e <i>A. ochraceus</i>
Espanha	<i>A. carbonarius</i> e <i>A. ochraceus</i>

Fonte: Adaptação de 10.

Figura 11. Contaminação de vinhos tinto e branco em diversos países.

Fonte: Adaptação de 10.

a aplicação de fungicida na vinha, não favorecendo o desenvolvimento de fungos, e, assim, evitando a produção de OTA. Já na etapa de processamento, a remoção das bagas danificadas e estragadas antes da etapa de esmagamento diminui os níveis de OTA no produto final. Uma vez que a concentração de OTA é maior nas bagas danificadas, a seleção de somente as bagas saudáveis limita a contaminação ^{10, 38}.

Durante o processo de vinificação, a adição de sulfito ou a pasteurização do mosto inibe o crescimento dos fungos produtores de OTA, evitando o aumento da concentração de OTA no produto final por sua produção durante a fermentação. O processo de separação do mosto e as cascas é responsável pelo aparecimento de 50 – 80% do conteúdo total de OTA no vinho. Dessa forma, a prensagem em maiores pressões extrai mais OTA. As leveduras utilizadas na fermentação não são capazes de biodegradar a OTA, porém parte dela pode se adsorver em proteínas da levedura, que variam em sua capacidade adsorvente. Assim, a seleção de leveduras com maior capacidade de ligar-se a OTA auxilia na diminuição de OTA no vinho ³⁸.

1.4 Legislações para o controle de OTA

O difícil controle fúngico nos alimentos, a especial estabilidade e a alta toxicidade apresentada pela OTA sustentam o estabelecimento de níveis máximos dessa micotoxina (e também para outras) nos alimentos.

Vários países tem estabelecido os níveis máximos de OTA em alimentos, incluindo o Brasil, Israel, Suíça, Uruguai e União Europeia. Os Estados Unidos ainda não determinaram os níveis aceitáveis de OTA em alimentos e sementes ³⁹. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina pela Resolução RDC n° 7, de 18 de Fevereiro de 2011 ⁴⁰, os níveis de OTA em alimentos com aplicação imediata (2011) e para aplicação a partir de Janeiro de 2014. Já na União Europeia, os níveis máximos de OTA nos alimentos foi determinada pela Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (*European Food Safety Authority* - EFSA) através da Comissão Reguladora EC n° 1881/2006, de 19 de Dezembro de 2006 ⁴¹. A EFSA também determina o valor de ingestão semanal tolerável provisória de OTA sendo igual a 120 ng kg⁻¹ de peso corpóreo. Na Tabela 10 são compilados os níveis máximos permitidos para OTA em alguns alimentos no Brasil e na Europa.

Tanto a ANVISA quanto a EFSA estabelecem para o vinho a concentração máxima permitida OTA sendo igual a 2 µg kg⁻¹ de alimento. Dessa forma, concentrações menores à estabelecida no produto em questão são considerados seguras.

1.5 Métodos de extração e *clean-up* para a análise de OTA

A técnica mais utilizada ainda hoje para o preparo de amostra na determinação de OTA em alimentos envolve o uso de Coluna de Imunoafinidade (*Immunoaffinity Columns* – IACs) ⁴². As IACs contém anticorpos imobilizados que exclusivamente retém certa micotoxina ou classe de micotoxinas através da ligação específica entre o anticorpo e o analito ^{43, 44}. Os anticorpos anti-micotoxinas são imobilizados em um suporte sólido contido em um cartucho de plástico. Passando a amostra através do cartucho, os anticorpos imobilizados irão capturar os analitos de interesse, extraíndo-os e concentrando-os. Na etapa de lavagem, as impurezas do extrato são removidas e um solvente orgânico como, por exemplo, metanol é percolado pela coluna, liberan-

Tabela 10. Limites Máximos Tolerados (em $\mu\text{g kg}^{-1}$) de OTA em alguns alimentos aceitos no Brasil e na União Europeia.

Alimento	Brasil	União Europeia
Cereais não processados	10,0	5,0
Derivados de cereais não processados	10,0	3,0
Frutas secas	10,0	10,0
Grão de café e café torrado	10,0	5,0
Café solúvel	10,0	10,0
Vinho e suco de uva	2,0	2,0
Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	2,0	0,50
Cerveja, Cacau, Produtos com cacau	Não determinado	Não determinado

Fonte: Adaptado de 40 e 41.

do os analitos de interesse na etapa de eluição. Dessa forma, as IACs podem ser usadas para a purificação e concentração de micotoxinas antes da análise por técnicas cromatográficas ou outras, como apresentado em trabalhos publicados, utilizando fluorimetria ⁴⁴⁻⁴⁶. A Figura 12 exemplifica as etapas necessárias para a extração de uma micotoxina utilizando uma IAC.

Figura 12. Princípio de funcionamento da Coluna de Imunoafinidade.

Fonte: Adaptação de 44

Devido a sua alta especificidade, esse tipo de preparo de amostra produz um extrato limpo, com níveis mínimos de interferentes da matriz e excelente relação sinal-ruído quando comparado a sorventes menos seletivos de Extração de Fase Sólida (*Solid Phase Extraction* – SPE) ⁴³.

Uma das maiores desvantagens das IACs é a desnaturação dos anticorpos imobilizados mesmo na presença de solventes orgânicos em baixas concentrações. Uma maneira de contornar esse problema é a diluição de amostra, porém isso pode causar perda da sensibilidade ⁴⁷.

O uso das IACs no preparo da amostra, juntamente com a detecção de fluorescência, a qual possui sensibilidade adequada, fácil operação e menor custo (quando comparado ao detector de massas) ⁴⁸, é suficiente para a análise de OTA em alimentos. No entanto, quando utilizadas fases extratoras não seletivas, como C18, C8 e outras fases poliméricas, o uso detector de massas é especialmente desejável, uma vez que este oferecerá alta seletividade na análise, permitindo que o analito de interesse seja corretamente identificado e quantificado.

Dessa forma, a seletividade necessária para a análise pode ser obtida tanto no preparo de amostra quanto na detecção do analito, sendo o analito extraído de forma seletiva da matriz ou detectado seletivamente.

1.6 Microextração em Fase Sólida

A Microextração em Fase Sólida (*Solid Phase Microextraction* – SPME) é uma microtécnica de extração e concentração de analitos, que apresenta várias vantagens com relação aos métodos convencionais de extração, como rápido processo operacional, possibilidade de automação, reutilização das fibras extratoras e uso sem solventes orgânicos (em Cromatografia Gasosa, GC) ou diminuta quantidade de solventes orgânicos (em Cromatografia Líquida, LC) ^{49, 50}. O dispositivo básico de SPME consiste de uma fibra de sílica fundida de 10 mm de comprimento e de 110 a 160 µm de diâmetro, recoberta com polímeros sorventes ou sólidos adsorventes, com espessuras de 7 a 100 µm ⁵⁰. Na Figura 13 é apresentado o dispositivo customizado da fibra da SPME da Seringa 7000 da HamiltonTM e na Figura 14 é apresentado o dispositivo comercial produzido pela Supelco.

Figura 13. Dispositivo customizado para SPME com Seringa 7000 da Hamilton™.

Fonte: Adaptado de 51.

Figura 14. Dispositivo comercial de SPME.

Fonte: Adaptado de 51.

Existem outras configurações da SPME, como o uso de um pedaço de um tubo capilar de GC dentro de um sistema de HPLC, caracterizando o sistema de extração no tubo (*in-tube* SPME). Na Figura 15 são mostrados outros tipos de configurações da SPME.

A SPME baseia-se no processo de equilíbrio entre fases, tendo dois passos: No primeiro passo, a fibra recoberta é exposta dentro da amostra, que faz com que os

Figura 15. Configurações da SPME.

Fonte: Adaptação de 52.

analitos de interesse saiam da matriz e sejam absorvidos ou adsorvidos pelo polímero que recobre a fibra. No segundo passo, a fibra, tendo os analitos concentrados, é transferida para um instrumento para dessorção, onde a separação e quantificação do analito ocorre ⁵³.

Existem três modos de operação da SPME no formato de fibra: extração direta, *headspace* e protegido por membrana, todos ilustrados na Figura 16. Na extração direta a fibra é colocada dentro da matriz aquosa, permitindo a partição dos analitos entre o recobrimento e a matriz. No modo *headspace* a fibra é colocada no *headspace* da amostra, tendo somente os componentes voláteis extraídos. Esse modo de operação é vantajoso para amostras que possuam interferentes de alto peso molecular. Para amostras que possuam analitos não voláteis e com interferentes de alto peso molecular, usa-se a extração protegida por membrana ou materiais de acesso restrito ⁵³.

Figura 16. Modo de operação da SPME. a) extração direta; b) *headspace* SPME e c) SPME protegida por membrana.

Fonte: Adaptação de 53.

O tipo do recobrimento da fibra é um parâmetro importante para garantir seletividade do analito frente a outros componentes da matriz. Existe um número grande de fibras disponíveis comercialmente, sendo apresentados na Tabela 11 os tipos mais indicados para dados analitos.

O transporte de analitos da matriz para a fase extratora inicia-se logo que a fibra é inserida a amostra. Considera-se que a extração por SPME é completa quando a concentração do analito atinge o equilíbrio de partição entre a matriz e a fase extratora. Isso significa que a quantidade de analito extraída se mantém constante mesmo que o tempo de extração seja aumentado ⁵⁶. Por essa razão, a transferência do analito para a fase extratora é quantitativa, mas não exaustiva ⁵⁷. A condição de equilíbrio para fases poliméricas do tipo dimetilpolisiloxano pode ser representada pela Equação 1.

$$n = \frac{(K_{fs}V_fV_sC_0)}{(K_{fs}V_f+V_s)} \quad (1)$$

onde, n é a massa de analito extraída pelo recobrimento, K_{fs} é a constante de distribuição entre o recobrimento e a matriz, V_f é o volume do recobrimento, V_s é o volume da amostra e C_0 é a concentração inicial do analito estudado na amostra ⁵⁵.

Tabela 11. Guia de seleção da fibra a ser utilizada em SPME.

Tipo da analito	Fibra recomendada
Gases e compostos moleculares de baixo peso (M.M. 30-225)	75 µm/85 µm Carboxen/polidimetilsiloxano
Voláteis (M.M. 60-275)	100 µm polidimetilsiloxano
Volatéis, aminas e compostos nitro-aromáticos (M.M 50-300)	65 µm polidimetilsiloxano/divinilbenzeno
Semi-voláteis polares (M.M. 80-300)	85 µm poliacrilato
Compostos não polares de alto peso molecular (M.M. 125-600)	7 µm polidimetilsiloxano
Non-polar semi-voláteis (M.M. 80-500)	30 µm polidimetilsiloxano
Álcoois e compostos polares (M.M. 40-275)	60 µm Carbowax (PEG)
Compostos de aroma: voláteis e semi-voláteis, C3-C20 (M.M. 40-275)	50/30 µm divinilbenzeno/Carboxen e polidimetilsiloxano em fibra StableFlex
Análises de compostos traço (M.M. 40-275)	50/30 µm divinilbenzeno/Carboxen e polidimetilsiloxano em fibra StableFlex de 2 cm
Aminas e compostos polares (somente uso em HPLC)	60 µm polidimetilsiloxano/divinilbenzeno

Fonte: Adaptação de 54.

Existe uma relação diretamente proporcional entre a quantidade de analito extraída e a concentração do analito na amostra quando o equilíbrio é atingido, sendo essa a base para a quantificação.

Quando o volume da amostra é grande, a Equação 1 pode ser simplificada, dando origem a Equação 2.

$$n = K_{fs} V_f C_0 \quad (2)$$

Dessa forma, a quantidade de analito extraída é diretamente correspondente a sua concentração na matriz, independentemente do volume da amostra.

Em análises realizadas por cromatografia gasosa (SPME-GC), a fibra, após o processo de extração, é inserida no injetor aquecido e os analitos são rapidamente dessorvidos termicamente para a coluna cromatográfica. Desta forma, as análises realizadas por SPME-GC não utilizam solventes orgânicos ⁵⁶.

O acoplamento entre a SPME convencional e a HPLC pode ser realizada de forma *on-line* ⁵⁶. A interface *on-line* para SPME-HPLC, comercializada pela Supelco,

possui o formato de um T, onde a fibra é inserida na extremidade superior e as demais extremidades, lateral e inferior, são conectadas à válvula de seis pórticos do HPLC ⁵⁰. A Figura 17 exemplifica o processo de extração utilizando um dispositivo comercial e a dessorção direta em um GC e a dessorção em um HPLC utilizando a interface apropriada.

A SPME é uma técnica de extração que apresenta inúmeras vantagens em relação às técnicas convencionais, das quais se destacam: fácil manipulação, elevada sensibilidade e reprodutibilidade, extração altamente seletiva, versatilidade, tempo de extração relativamente curto, não requer etapas prévias de limpeza da amostra, permite que a análise seja facilmente automatizada em combinação com vários tipos de equipamentos como (GC, HPLC, LC-MS, etc.) ⁵⁷.

O primeiro trabalho sobre a determinação de OTA, simultaneamente com outros compostos, utilizando a SPME foi publicado em 2003 ⁵⁸ sendo, portanto, uma técnica recente. Na Tabela 12 são apresentados os trabalhos publicados nos anos de 2006 a 2012 que utilizam SPME como preparo de amostra para a análise de OTA nas matrizes alimentícias.

Figura 17. a) processo de extração em SPME; b) processo de dessorção térmica SPME-GC e c) processo de dessorção SPME-HPLC.

Fonte: 50.

Tabela 12. Aplicações de SPME para extração de OTA em alimentos nos anos de 2006 a 2012.

Matriz	Recuperação ^a (%)	Fase extratora	Referência
Cerveja	-	PDMS/DVB	59
Grão de café verde	92,8 %	PDMS/DVB	60
Vinho	-	PDMS/DVB	61
Grãos e Castanhas	> 80 %	Carboxen-1006 PLOT (<i>in-tube</i> SPME)	62
Queijo	~ 93 %	Fibra de carbono	63

^a para diferentes níveis de *spiking*.

Fonte: Autoria própria.

A maioria dos trabalhos que utilizam SPME para a extração e pré-concentração de OTA usam a SPME convencional (fibra com recobrimento polimérico), sendo a fase extratora mais comum, nesse caso, a polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) ⁵⁹⁻⁶¹. Existe somente um trabalho relatando o uso do sistema *in-tube* SPME no modo de operação em ciclos aspirar/dispensar, o qual utiliza uma coluna de GC do tipo tubular aberta com camada porosa (*Porous Layer Open Tubular* – PLOT) ⁶². Nesse trabalho, também foram testadas colunas do tipo tubular aberta com parede recoberta (*Wall Coated Open Tubular* – WCOT), porém essas apresentaram menor recuperação do analito, por terem menor área superficial para a extração quando comparadas com a coluna PLOT.

1.6.1 Microextração em Fase Sólida no tubo

A Microextração em Fase Sólida no tubo (*in-tube* SPME) é uma técnica de preparo de amostra eficiente, a qual usa um tubo capilar aberto empregado como coluna em cromatografia gasosa (GC) revestida internamente com fase estacionária como dispositivo de SPME. Pode ser acoplada de forma *on-line* com HPLC, LC-MS ou CE. A *in-tube* SPME foi desenvolvida com o objetivo de superar os problemas que a SPME convencional possui, como a fragilidade, baixa capacidade de sorção e a “sangria” da fase extratora ^{64,65}.

Essa técnica permite extrair diretamente os analitos de interesse na matriz aquosa e concentrá-los na fase estacionária que recobre internamente o capilar. Os analitos podem ser dessorvidos, então, com a fase móvel no modo dinâmico, ou seja, passando a fase móvel em um fluxo contínuo, ou no modo estático, quando os analitos ficam fortemente adsorvidos no recobrimento do capilar. Os analitos dessorvidos são diretamente introduzidos em uma coluna de LC para a análise ⁶⁴.

Existe um grande número de colunas GC comercialmente disponíveis que podem ser utilizadas no sistema *in-tube* SPME (Figura 18 A), permitindo, assim, a análise de uma variada gama de compostos ⁶⁴. Capilares de PEEK recheados com tubos de sílica fundida com revestimento interno ou externo (Figura 18 B), capilares de PEEK recheados com partículas sólidas adsorventes (Figura 18 C), ou ainda capilares de sílica fundida com fase monolítica (Figura 18 D) também têm sido utilizados ⁶⁵.

A eficiência da extração por *in-tube* SPME também é determinada pelo número de mols do soluto extraído, sendo obtida através da Equação 1.

Na Tabela 13 são apresentadas algumas características da SPME convencional e o *in-tube* SPME combinadas à HPLC.

O acoplamento *on-line* entre as técnicas *in-tube* SPME-HPLC pode ser realizado através de um dispositivo de comutação de coluna (*Column Switching*). O dispositivo de comutação de coluna tem o princípio apresentado na Figura 19. A amostra é passada pela coluna ou capilar, tendo os analitos de interesse aprisionados na fase extratora, enquanto que os interferentes da matriz são lavados e direcionados para o descarte. Mudando a posição da válvula, os analitos são eluídos e transferidos para a coluna analítica ⁵⁶.

Neste tipo de acoplamento *on-line* existem duas direções de fluxo para a eluição dos analitos: Na mesma direção do fluxo de carregamento da amostra (*forward-flush*) ou na direção contrária ao fluxo de carregamento da amostra (*back-flush*), mostrados na Figura 20 (A1 e B1) e (A2 e B2), respectivamente. O modo *back-flush* é geralmente o mais adotado, pois nele o alargamento da banda cromatográfica do analito de interesse é minimizado por evitar sua dispersão na coluna de extração ou no capilar ⁵⁶.

Figura 18. Configurações dos dispositivos de extração *in-tube* SPME (A) coluna capilar de sílica fundida com revestimento polimérico, (B) capilar PEEK recheado com tubos de sílica fundida com revestimento interno ou externo, (C) capilar de PEEK recheado com sólidos adsorventes e (D) capilar recheado com fase monolítica.

Fonte: 65.

Tabela 13. Comparação entre a SPME convencional e a *in-tube* SPME combinadas à HPLC.

	SPME convencional	<i>In-tube</i> SPME
Fase extratora	Vários tipos de fibras de SPME disponíveis comercialmente	Vários tipos de colunas de GC disponíveis comercialmente
Sítio de extração	Superfície externa da fibra	Superfície interna da coluna capilar
Tempo de equilíbrio	30 – 60 min (dependendo do composto)	10 – 15 min (dependendo do composto)
Dessorção	A fibra é exposta à fase móvel ou solvente apropriado na câmara de dessorção	O solvente de dessorção ou fase móvel é carregada para dentro do capilar
Carryover	~ 10% (dependendo do composto)	Desprezível
Amostras	Amostras limpas e sujas	Amostras limpas
Operação	Manual e automatizada	Manual e automatizada
Precaução	O recobrimento da fibra pode ser danificado na inserção e retirada da fibra da interface	A solução da amostra deve ser compatível com a fase móvel e não conter matéria insolúvel que possa entupir a tubulação.

Fonte: Adaptação de 66.

Figura 19. Configuração típica do acoplamento de preparo de amostra com a cromatografia líquida usando válvula de comutação.

Fonte: Adaptação de 57.

Figura 20. Configuração típica do sistema *in-tube* SPME-LC baseado em dispositivo de comutação de coluna, mostrando a posição de extração (A) e eluição (B) com as configurações *forward-flush* (A1 e B1) e *back-flush* (A2 e B2).

Fonte: Adaptação de 56.

Os sistemas de operação do *in-tube* SPME baseados no acoplamento *on-line* por dispositivo de comutação de coluna podem ser separados em sistemas de extração única (*flow through extraction*), no qual a amostra passa continuamente em uma direção pelo capilar, ou em ciclos de aspirar/dispensar (*draw/eject extraction*), no qual a amostra é aspirada e dispensa repetidamente pelo capilar ⁶⁴. A Figura 21 mostra um esquema dos sistemas de *in-tube* SPME nos dois modos de operação.

O sistema *in-tube* SPME no modo de extração em ciclos aspirar/dispensar é realizado através de modificações simples no injetor automático, sendo esse o modo mais utilizado. Porém, esse modo é mais adequado quando utiliza-se colunas de extração de baixa permeabilidade, uma vez que não é possível realizar ciclos de aspirar/dispensar rápidos devido à alta pressão de retorno. Sendo assim, o modo de extração é mais utilizado quando utiliza-se colunas tubulares abertas com parede recoberta (*Wall Coated Open Tubular – WCOT*) enquanto que o modo de extração única utiliza colunas capilares empacotadas ou monolíticas ⁵⁶.

1.7 Detectores na análise de OTA

O detector mais utilizado para a análise de OTA é o Detector de Fluorescência (*Fluorescence Detector – FLD*) ^{67, 69}, uma vez que ele é mais sensível, alcançando limites de detecção mais baixos que o Detector de Massas, de fácil operação e menor custo ⁶⁹, sendo ideal para esse tipo de análise devido à baixa concentração de OTA encontrada nos alimentos. Para a análise utilizando o FLD, o comprimento de onda de excitação e emissão utilizados são 333 e 460 nm ^{70, 71}, tendo somente pequena variação nesses valores. Já quando se utiliza o Detector de Massas, o valor de m/z utilizado é 404, referente ao íon $[M+H]^+$. Para a análise utilizando o Detector de Massas no modo sequencial (MS/MS), os fragmentos analisados mais abundantes são com valores de m/z igual a 358 e 239, referentes aos íons $[M+H-HCOOH]^+$ e $[M+H-fenilalanina]^+$ ^{72, 73}, respectivamente.

Brera *et al* ⁷⁴ realizam um estudo comparativo na determinação de OTA em presunto curado utilizando as técnicas HPLC-FLD (método 1) e UPLC-MS/MS (método 2). No primeiro método, a extração da OTA foi realizada utilizando uma IAC e o no segundo, o extrato do presunto curado foi diretamente injetado no sistema cro-

Figura 21. Configuração típica de um sistema *in-tube* SPME automatizado no modo de (A) extração única (*flow through extraction*) e em (B) ciclos de aspirar/dispensar (*draw/eject extraction*) baseados em comutação de coluna, incluindo posições de extração (A1 e B1) e eluição (A2 e B2).

Fonte: Adaptação de 56.

matográfico. Os dois métodos mostraram-se adequados para a determinação de OTA, porém o método utilizando a técnica HPLC-FLD apresentou limites de detecção e quantificação menores que os apresentados pela técnica UPLC-MS/MS, uma vez que a etapa de purificação pelo uso da IAC permitiu a separação entre o analito e os interferentes da matriz. O método 1 também mostrou melhores valores de exatidão e precisão. Por outro lado, o método 2 apresentou a vantagem de ser mais rápido e mais barato, uma vez que não foi necessário o uso da IAC. O autor conclui que a técnica HPLC-FLD é a melhor para atividades de controle de OTA, por ser menos afetada pelo efeito de matriz e leva a menores limites de detecção e quantificação, enquanto que para pesquisa e estudos de monitoramento, o uso do espectrômetro de massas é mais indicado pela economia de tempo por análise.

O uso do detector de fluorescência é suficiente para a análise de OTA em alimentos de modo singular, sendo geralmente acompanhada por um preparo de amostra eficiente, o qual permite a purificação e a pré-concentração da amostra. Quando utilizado um preparo de amostra eficiente, o uso do detector de massas não se faz necessário, uma vez que o detector de fluorescência oferece resultados similares. Porém, quando o preparo de amostra não é altamente eficiente ou quando não se faz um preparo de amostra, o detector de massas tem papel fundamental para a correta identificação e quantificação do analito estudado. Também, o detector de massas é bastante útil quando a análise envolve multi-micotoxinas.

1.8 Validação da metodologia

A validação da metodologia analítica compreende uma serie de experimentos que visam comprovar a confiabilidade dos resultados obtidos, sendo composta pela avaliação de alguns parâmetros ou figuras de mérito. No Brasil, alguns órgãos como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) ⁷⁵, o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) ⁷⁶ e INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) ⁷⁷ apresentam recomendações para a validação de métodos analíticos.

Apesar de haverem algumas diferenças no que se refere aos testes necessários para a validação do método analítico, os guias de validação contemplam basicamente as mesmos parâmetros, sendo eles ⁷⁵⁻⁷⁷:

- **Seletividade:** É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. O sinal do analito de interesse pode ser aumentado ou reduzido pela presença desses interferentes e a magnitude desse efeito pode ser influenciada pela concentração. Para a avaliação desse parâmetro, compara-se a resposta instrumental do analito da matriz processada e em solvente;
- **Linearidade:** É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado, sendo adequadamente ajustadas a equação de uma reta;

- **Precisão:** É a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Esta é considerada em três níveis e por meio de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo que a reprodutibilidade de um procedimento analítico somente pode ser estimada mediante a participação de um ensaio interlaboratorial colaborativo. A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição. Precisão intermediária é avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alterando algumas condições, tais como: dias de análise, analistas, equipamentos e condições ambientais, entre outras;
- **Limite de detecção:** Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas;
- **Limite de quantificação:** É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas;
- **Exatidão:** A exatidão de um método analítico é concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro;
- **Recuperação:** É a eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas.

1.9 Objetivos

Tendo em vista a elevada toxicidade apresentada pela OTA, o crescente aumento no consumo de vinho, principalmente em países desenvolvidos, a possível presença dessa micotoxina em vinhos, o estabelecimento dos níveis máximos de

concentração de OTA para vinhos e as dificuldades da utilização da IACs, os principais objetivos a cerca deste projeto de pesquisa foram:

- Desenvolvimento de uma metodologia utilizando *in-tube* SPME no modo de extração única (*flow through extraction*) com partículas de C18, para a detecção e quantificação dessa micotoxina em vinho, utilizando HPLC-MS/MS;
- Otimização das condições de análise da metodologia empregada, através do uso da quimiometria (planejamento experimental);
- Validação da metodologia desenvolvida para a análise de OTA em vinho por *in-tube* SPME;
- Identificação e quantificação da OTA presente em vinhos comerciais.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Reagentes

OTA (99,5%) foi obtida da Fluka (Alemanha), Metanol, Acetonitrila e THF grau HPLC foram obtidos da Tedia (Fairfield, CT, EUA), Tolueno grau HPLC foi obtido da Mallinckrodt (Xalostoc, México), Ácido acético glacial foi obtido da Chemco (Campinas, SP, Brasil) e Água purificada em um sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, MA, EUA).

2.2 Preparo da solução estoque e trabalho

Para a obtenção de uma solução estoque de OTA, aproximadamente 1,0 mg do sólido foi dissolvido em 25 mL de metanol, sendo a solução mantida a -18°C , uma vez que a OTA permanece estável por anos nessas condições ²⁰. A concentração exata da solução estoque foi determinada espectrofotometricamente ^{20, 76}. Para isso, 500 μL da solução estoque de OTA foram secos em N_2 e suspensos em 1,5 mL de Tolueno/ Ácido acético (99:1, v/v). A análise foi feita em um espectrofotômetro de UV-vis Jasco V-630 (Japão), em cela de quartzo de 1,5 mL, sendo a concentração exata da solução estoque determinada através da absorbância obtida no comprimento de onda de 333 nm.

A solução trabalho da OTA foi preparada a partir de uma solução estoque de aproximadamente 50 mg L^{-1} em metanol previamente preparada, sendo mantida a 15°C por até 1 dia no injetor automático do equipamento de UPLC. Quando utilizada solução aquosa, ácido acético (1%, v/v) foi adicionado para que a OTA pudesse estar presente majoritariamente em sua forma neutra em solução.

2.3 Instrumento e condições analíticas

O sistema HPLC-MS/MS foi configurado em um equipamento Acquity Ultra Performance LC (Waters) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo TQ MS Detector (Waters) com ionização à pressão atmosférica por electrospray (ESI).

Uma coluna Kinetex (Phenomenex) XB – C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 μm) foi utilizada na separação cromatográfica, nas seguintes condições: temperatura da coluna, 40 °C; fase móvel, água/acetonitrila/ácido acético (45,5: 45,5: 1, v/v/v); vazão, 0,2 mL min⁻¹.

As condições do ESI foram as seguintes: voltagem do capilar, 3,5 kV; cone, 10 V; extrator, 3 V; temperatura da fonte, 150 °C; temperatura de dessolvatação, 400 °C; vazão do gás de solvatação (gás = N₂), 800 L h⁻¹; vazão do gás de colisão (gás = Ar), 0,15 mL min⁻¹; modo de ionização, modo positivo.

As condições de detecção por espectrometria de massas sequencial (MS/MS) foram otimizadas através da infusão direta do padrão da OTA de 1 mg L⁻¹ em fase móvel. As análises foram realizadas no modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), sendo utilizadas as transições: m/z 404,22 $\rightarrow$ m/z 239,05 (voltagem do cone, 22 V; Energia de colisão, 26 eV); m/z 404,22 $\rightarrow$ m/z 221,02 (voltagem do cone, 22 V; Energia de colisão, 36 eV); O tempo de aquisição de dados (*dwel-time*) para ambas as transições foi igual a 0,6 s. Os dados foram obtidos e analisados pelo software MassLynx.

2.4 Sistema *in-tube* SPME

O sistema *in-tube* SPME utilizado é baseado na configuração de extração única (*flow through extraction*), na qual a amostra passa somente uma vez pelo capilar, tendo fluxo somente em uma direção. A Figura 22 mostra o esquema geral de montagem do sistema.

O sistema inclui uma válvula de comutação externa de 6 pórticos Supelpro (Supelco), mantida em temperatura ambiente. A bomba com Solvente 1 carrega Água/Ácido Acético (99:1, v/v), a bomba com Solvente 2 carrega ACN e a bomba com Solvente 3 carrega ACN/THF (90:10, v/v), todas inclusas no equipamento de UPLC. Os solventes 1 e 2 (vazão = 0,2 mL min⁻¹) são usados no carregamento da amostra, enquanto que o Solvente 3 é utilizado na etapa de limpeza da coluna capilar. A fase móvel é carregada por uma bomba externa Shimadzu LC – 20AD (Japão). A amostra (50 μL) é injetada no sistema através do injetor automático, o qual é conectado à válvula de comutação externa. A eluição do analito de interesse foi realizada na direção contrária ao carregamento da amostra (modo *back-flush*).

Figura 22. Esquema geral de montagem do sistema *in-tube* SPME utilizado.

Fonte: Autoria própria.

A coluna capilar foi produzida empacotando-se um tubo de PEEK (1/16 in (1,5875 mm) de diâmetro externo e 0,02 in (0,508 mm) de diâmetro interno) de 50 mm de comprimento com partículas de fase extratora (Luna C18, Phenomenex, diâmetro, 10 µm; tamanho do poro, 100 Å) através do empacotamento com metanol (técnica *Slurry Packing*). Em ambas as terminações da coluna capilar foram colocados *frits* de 1/16 in (1,5875 mm) de diâmetro e 2 µm de porosidade (Valco). Essas foram conectadas à 150 mm de tubos de PEEK (1/16 in (1,5875 mm) de diâmetro externo e 0,005 in (0,127 mm) de diâmetro interno) através de uma união de volume zero e anilhas, ambos 1/16 in – 1/16 in (1,5875 mm – 1,5875 mm) (SGE). A coluna capilar pronta foi conectada à válvula de comutação externa. A Figura 23 mostra um esquema da montagem da coluna capilar.

A análise pelo sistema *in-tube* SPME proposto compreende em três etapas, sendo elas: limpeza, condicionamento e extração e separação. Essas etapas podem ser controladas pela mudança da posição da válvula de comutação, vazão, tipo e composição do solvente e tempo. As Figuras 24 a e b mostram a configuração do sistema com a válvula de comutação nas posições carregar e injetar, respectivamente.

As condições de cada etapa de análise são mostradas na Tabela 14.

Figura 23. Esquema de montagem da coluna capilar.

Fonte: Autoria própria.

Figura 24. Esquema do sistema *in-tube* SPME com a válvula de comutação nas posições a) carregar e b) injetar.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 14. Condições das etapas de limpeza, condicionamento e extração e separação por *in-tube* SPME.

Etapas de Análise	Tempo	Vazão (mL min ⁻¹)	Solvente	Composição do solvente (%)	Posição Válvula
Limpeza	0,00	0,200	Solvente 1	100	Carregar
	2,00	0,500	Solvente 3	100	
	8,50	0,500	Solvente 3	100	
	9,00	0,200	Solvente 1	100	
Condicionamento	9,01	0,200	Solvente 1	78	Carregar
	12,00		Solvente 2	22	
Extração e Separação	12,01*	0,200	Solvente 1	78	Carregar
	18,00				Injetar
	21,50		Solvente 2	22	Carregar
	24,00				Carregar

Solvente 1 = Água/ Ác. Acético (99:1, v/ v); Solvente 2 = ACN; Solvente 3 = ACN/THF (90:10, v/ v);

* Etapa de carregamento da amostra.

Fonte: Autoria própria.

Tendo sido o analito de interesse extraído, o processo de dessorção ocorre através da passagem da fase móvel pela coluna capilar, transferindo-o para a coluna analítica, onde acontece a separação e subsequente detecção por espectrometria de massas.

2.5 Otimização da metodologia

Com o intuito de otimizar as condições de análise da OTA por *in-tube* SPME as variáveis porcentagem de solvente orgânico (ACN) e tempo de carregamento da amostra foram estudados.

Um teste inicial foi realizado conectando-se a saída da coluna capilar diretamente ao detector (Figura 25), variando-se a porcentagem de ACN (100 – 10 %) no carregamento e observando-se o tempo de retenção da OTA para a definição dos níveis dos fatores a serem utilizados no planejamento experimental. Foi utilizada solução aquosa de OTA para os testes iniciais de concentração igual a 1 mg L⁻¹.

A partir dos resultados obtidos nessa etapa, um planejamento composto central com 2 fatores e 2 níveis e acréscimo de mais 3 pontos centrais ($2^2 + 3$ pontos centrais) foi realizado, sendo que todas as etapas do planejamento e resultados foram realizados no software Statistica 10. Os níveis determinados pelo experimento inicial e os experimentos realizados no planejamento experimental são apresentados nas Tabelas 15 e 16.

Os experimentos do planejamento experimental foram feitos usando uma fortificação (*spiking*) de 5 µg L⁻¹ em vinho tinto seco. As configurações do sistema *in-tube* SPME utilizadas foram as citadas no item 2.5 Sistema *in-tube* SPME, alterando-se somente o tempo de carregamento da amostra na etapa de Extração e Separação e a porcentagem de ACN nas etapas de Condicionamento e Extração e Separação.

Figura 25. Esquema de montagem do sistema para experimento inicial na otimização da metodologia.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 15. Níveis utilizados no planejamento experimental.

	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
% ACN	7,9	10	15	20	22
Tempo de carregamento (min)	3,1	4	6	8	8,8

Fonte: Autoria própria.

Tabela 16. Experimentos realizados no planejamento experimental.

Experimento	% ACN	Tempo de carregamento (min)
2	10	8
8	15	8,8
10 (C)	15	6
9 (C)	15	6
4	20	8
7	15	3,1
12 (C)	15	6
1	10	4
3	20	4
13 (C)	15	6
11 (C)	15	6
5	7,9	6
6	22	6

Fonte: Autoria própria.

2.6 Validação da metodologia

O guia de validação da ANVISA (Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003) ⁷⁵ foi utilizado como base para os procedimentos de validação da metodologia empregada.

Os parâmetros utilizados para a validação foram: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e recuperação.

Para a validação da metodologia foi utilizada como matriz um vinho tinto seco, uma vez que este apresenta maior quantidade de compostos interferentes quando comparado ao vinho branco seco, sendo que a metodologia já validada deve ser aplicada para a análise de ambos os tipos de vinhos.

A seletividade foi avaliada realizando-se a comparação entre os cromatogramas obtidos pela análise de vinho tinto seco isento do analito estudado e um vinho tinto seco fortificado com concentração de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$. O critério de aceitação para esse parâmetro é a ausência de picos cromatográficos que coeluem com o analito estudado e que o sinal analítico do composto estudado seja igual quando analisado em solução e na matriz (avaliação do efeito de matriz).

A determinação do limite de detecção foi realizada através de consecutivas diluições do analito em vinho tinto seco até que o sinal apresentado pela OTA tivesse a proporção de 3:1 com relação ao ruído. Da mesma forma, o limite de quantificação foi determinado, sendo que para sua determinação a proporção sinal-ruído utilizada foi de 10:1.

A linearidade do método foi avaliada analisando-se 5 concentrações diferentes de OTA em vinho tinto seco em triplicata, sendo que a faixa de trabalho utilizada foi de $0,2$ à $3,8 \mu\text{g L}^{-1}$, com a concentração máxima permitida da OTA em vinho ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) no ponto central da curva. O critério aceitável para esse parâmetro é um coeficiente de correlação do ajuste da reta mínimo de 0,99. O guia de validação utilizado não faz referência a qualidade do ajuste da reta realizado. No entanto, esta foi avaliada através do gráfico de resíduos, identificando-se a homocedasticidade ou heterocedasticidade do ajuste linear.

A repetibilidade (precisão intra-corrida) e a precisão intermediária (precisão inter-corridas) foram avaliadas analisando-se vinho tinto seco com fortificações nos níveis baixo ($0,2 \mu\text{g L}^{-1}$), médio ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) e alto ($3,8 \mu\text{g L}^{-1}$). Ambos parâmetros foram avaliados com diferença de 2 dias entre as análises. A precisão pode ser expressa pelo desvio padrão relativo (DPR), que pode ser calculado pela Equação 3.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (3)$$

onde, DPR é o desvio padrão relativo, DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

O critério de aceitação para esses parâmetros é que o DPR seja inferior à 5%. No entanto, o MAPA define os valores aceitáveis para esses parâmetros levando-se em consideração a concentração do analito e a micotoxina, devendo o DPR ser menor que 40% e 20% para concentrações menores que 1 µg L⁻¹ e entre 1 e 10 µg L⁻¹, respectivamente para a OTA ⁷⁶.

A exatidão foi determinada após o estabelecimento da linearidade e especificidade e seletividade do método, analisando-se vinho tinto seco com fortificações nos níveis baixo (0,2 µg L⁻¹), médio (2 µg L⁻¹) e alto (3,8 µg L⁻¹) em triplicata. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica, como amostrada na Equação 4.

$$Exatidão = \frac{Conc.média\ experimental}{Conc.teórica} \times 100 \quad (4)$$

A ANVISA não estabelece critérios de aceitação para a exatidão. No entanto, o MAPA define os valores aceitáveis para esses parâmetros levando-se em consideração a concentração do analito e a micotoxina, devendo a exatidão estar entre 50 e 120% e 70 e 110% para concentrações menores que 1 µg L⁻¹ e entre 1 e 10 µg L⁻¹, respectivamente para a OTA ⁷⁶.

A recuperação não é um parâmetro abordado no guia da ANVISA para a validação de métodos analíticos. No entanto, esse parâmetro foi avaliado realizando-se a coleta do analito extraído durante a etapa de eluição, desconectando a tubulação da coluna analítica, em tubos do tipo *ependorf* pelo tempo de 3,5 minutos. A extração foi realizada utilizando-se vinho tinto seco fortificado em 3 níveis de concentração (baixo (0,2 µg L⁻¹), médio (2 µg L⁻¹) e alto (3,8 µg L⁻¹)) em triplicata. Soluções aquosas de OTA com os mesmos níveis de concentração passaram pelo mesmo procedimento de coleta, sem que houvesse a etapa de extração. O sinal analítico obtido na análise das soluções extraídas foram comparadas com aqueles obtidos para as não extraídas pela injeção de 20 µL dessas no modo direto (unidimensional). O MAPA considera a exatidão e recuperação como sendo sinônimos, adotando os mesmos critérios de aceitação já descritos para o primeiro.

2.7 Análise das amostras de vinho

Foram obtidas 8 amostras comerciais de vinho, sendo elas 5 de vinho tinto seco e 3 de vinho branco seco, de origem estrangeira (Portugal e Chile) e brasileira. As amostras de vinho foram mantidas em geladeira até a sua utilização. Os vinhos foram filtrados em filtro de éster de celulose de 0,22 μm antes da injeção no sistema *in-tube* SPME, sendo somente esse procedimento adotado. As amostras foram analisadas em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da concentração da solução estoque de OTA

Para a determinação exata da concentração de OTA na solução estoque, foi obtido um espectro de absorção molecular no UV/Vis da OTA em Tolueno/ Ácido acético (99:1, v/v), que pode ser observado na Figura 26.

Através do espectro apresentado na Figura 26 é possível observar a presença de uma banda de absorção com máximo em 333 nm. A partir do comprimento de onda 280 nm, não é possível observar a presença de outras bandas de absorção da OTA, uma vez que o tolueno começa a absorver radiação, comprometendo a análise. Entretanto, na literatura a banda utilizada para cálculo da concentração de OTA é a banda presente no espectro, com máximo em 333 nm ²⁰. A análise é feita em meio acidificado para garantir que os grupos funcionais ionizáveis da OTA estejam protonados, evitando o deslocamento da banda em 333 nm. O cálculo da concentração da solução estoque preparada foi efetuado através da Equação de

Figura 26. Espectro de absorção molecular no UV/Vis da OTA ($c = 17,5 \text{ mg L}^{-1}$) em Tolueno/Ácido acético (99:1, v/v).

Fonte: Autoria própria.

Lambert-Beer (Equação 5), utilizando o coeficiente de absortividade molar da OTA em Tolueno/ Ácido acético (99:1, v/v), que é igual a $5440 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, juntamente com o posterior cálculo das diluições efetuadas.

$$Abs = C_1 \times \varepsilon \times CO, \quad (5)$$

onde, *Abs* é a absorbância obtida, *C* é a concentração da amostra (em mol L^{-1}), ε é a absortividade molar (em $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e *CO* é o caminho óptico (em cm).

Dessa forma, a concentração exata da solução estoque de OTA pode ser obtida.

3.2 Otimização do detector de massas

Como a fase extratora escolhida para a determinação de OTA em vinho não é uma fase seletiva para o analito em questão, o uso do detector de massas torna-se essencial para a correta detecção e quantificação do analito, uma vez que este é altamente seletivo, principalmente quando é operado no modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM).

Com o intuito de otimizar as condições de detecção pelo detector de massas, uma solução de OTA em fase móvel foi analisada no modo de infusão direta, sendo ionizada no modo positivo.

O íon protonado da OTA, com m/z 404,22 e as transições m/z 404,22 $\rightarrow$ m/z 239,05 e m/z 404,22 $\rightarrow$ m/z 221,02 puderam ser observados, sendo os parâmetros energia de colisão e voltagem do cone ajustados para garantir a maior abundância desses íons.

A Figura 27 apresenta uma rota de fragmentação por espectrometria de massas da OTA com a ionização no modo positivo. Os fragmentos m/z 239,05 e m/z 221,02 observados estão de acordo com o esperado, segundo a rota de fragmentação apresentada. O fragmento de m/z 358⁷⁹, mais utilizado para a quantificação da OTA, não pode ser identificado, e por isso, os limites de detecção e quantificação alcançados pela metodologia empregada serão maiores, uma vez que esse é o íon de maior abundância.

Figura 27. Rota de fragmentação da Ocratoxina A por Espectrometria de Massas utilizando ionização no modo positivo.

Fonte: Adaptação de 78.

Sendo assim, somente as duas transições observadas foram utilizadas na detecção da OTA, com a transição mais intensa usada na quantificação.

3.3 Sistema *in-tube* SPME

Tendo sido o sistema *in-tube* SPME proposto configurado, uma solução aquosa de OTA foi analisada, usando-se 2 minutos no carregamento da amostra para a avaliação da funcionalidade do sistema. O cromatograma do íon total (TIC) obtido é apresentado na Figura 28.

O pico cromatográfico da OTA é observado em 5,99 minutos, sendo que após a injeção do extrato na coluna (mudança de posição da válvula para posição injetar) o tempo que o analito demora para ser detectado é de 3,99 minutos (5,99 minutos para 2 minutos de carregamento), sendo esse considerado o tempo de retenção (t_r) da OTA na coluna analítica.

Figura 28. Cromatograma (TIC) da OTA ([OTA] = 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) em solução aquosa com tempo de carregamento de 2 minutos.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 29 apresenta o cromatograma da OTA através das duas transições observadas, no modo MRM, a transição que oferece a maior área para o pico cromatográfico da OTA é a m/z 404,22 $\rightarrow$ m/z 239,05, sendo essa a utilizada para a quantificação do analito, enquanto que a transição m/z 404,22 $\rightarrow$ m/z 221,02 é utilizada para a confirmação da identidade do mesmo.

Figura 29. Cromatograma da OTA ([OTA] = 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) em solução aquosa com tempo de carregamento de 2 minutos, especificando as transições de massas estudadas.

Fonte: Autoria própria.

A etapa de limpeza foi avaliada utilizando ACN pura e ACN/THF (90:10, v/v), observando-se o valor da área do pico cromatográfico da OTA. Uma concentração bem mais elevada ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) que a faixa de trabalho possivelmente utilizada (máximo $10 \mu\text{g L}^{-1}$) na determinação da OTA em vinho foi usada para uma melhor observação da avaliação desta no efeito de memória (*carryover*) e na precisão do método.

O efeito de memória foi analisado realizando, após a injeção da solução aquosa de OTA, a injeção de água no sistema. O pico cromatográfico da OTA foi observado nessa condição, representando aproximadamente 0,1 % da área apresentada pelo pico cromatográfico da OTA em solução aquosa, o qual é considerado baixo.

A precisão no sistema foi avaliada através da análise da área do pico cromatográfico da OTA em injeções subsequentes, sendo que os resultados para os dois solventes analisados são apresentados na Tabela 17.

Os valores de desvio padrão relativo (DPR) para os dois solventes analisados foram considerados baixos, indicando alta precisão do método. No entanto, em experimentos posteriores (principalmente no planejamento experimental) foi observada uma tendência crescente na área do pico cromatográfico da OTA quando foi utilizado somente ACN pura para a limpeza, fato que não ocorreu quando utilizado ACN/THF (90:10, v/v). Sendo assim, o solvente mais efetivo para a etapa de limpeza é o ACN/THF (90:10, v/v).

Tendo sido avaliada a funcionalidade do sistema, procedeu-se para a otimização da metodologia.

3.4 Otimização da metodologia

Os fatores que podem ser variados na metodologia proposta são a porcentagem de ACN e o tempo de carregamento da amostra. Para melhorar a qualidade da análise, esses fatores devem ser otimizados e, para isso, foi utilizado o planejamento experimental.

Um primeiro experimento foi realizado com o intuito de se definir os níveis dos fatores a serem estudados, observando-se o tempo de retenção da OTA com a variação da porcentagem de ACN no carregamento da amostra.

Nas Figuras 30 e 31 são apresentados os resultados obtidos para esse teste, sendo que na primeira podem ser observados os picos cromatográficos da OTA

Tabela 17. Resultados da análise para a avaliação da precisão do sistema *in-tube* SPME.

Análise	Área (ACN)	Área (ACN/THF (90:10, v/v))	
1	162006	277027	
2	175458	279824	
3	176018	278874	
4	180707	282446	
5	175800	334627*	
6	179503	279053	
7	162006	282553	
8		284223	
		Sem outlier	Com outlier
Média	174915,3	287328,4	280571,4
Desvio padrão	6686,314	19257,05	2552,225
DPR (%)	3,8226	6,702105	0,909653

*ponto outlier

Fonte: Autoria própria.

quando utilizadas as porcentagem de 100 à 30 % de ACN, enquanto que na última, os de 30 e 20 %. Essa separação dos cromatogramas foi necessária, uma vez que, utilizando uma menor porcentagem de solvente orgânico no carregamento, o pico cromatográfico tende a ser eluído mais lentamente, alargando-se. Assim, o pico cromatográfico tem sua intensidade diminuída, o que dificulta a comparação entre os experimentos com maiores e menores porcentagens de solvente orgânico.

Através das Figuras 30 e 31 é possível observar que em altas porcentagens de ACN (de 100 à 30 %) a OTA possui baixa afinidade pela fase extratora, com tempos de retenção (t_r) baixos. Isso pode ter ocorrido pelo fato da ACN, em altas concentrações, não favorecer a retenção do analito pela fase extratora, preferindo o mesmo ser carregado pela fase móvel “forte”. Além disso, nessa condição o pH do meio tende a elevar-se, causando a desprotonação da OTA, o que diminui sua interação com a fase extratora, a qual baseia-se em interações hidrofóbicas.

Utilizando-se 30 % de ACN, a OTA começa a ser eluída antes de 1,75 minutos, ainda não sendo adequado, uma vez que, a durante a etapa de extração, pode ocorrer grande perda do analito nesse tempo. Com 20 % de ACN, a OTA é eluída depois de 8 minutos, sendo considerado suficiente para que haja a remoção de grande parte de interferentes da amostra durante a extração. Foi realizado o experimento com 10% de ACN, porém não foi possível observar o pico cromatográfico em até 50 minutos, o que

indica uma lenta eluição da OTA.

Figura 30. Avaliação do tempo de retenção da OTA ($[OTA] = 1 \text{ mg L}^{-1}$) na coluna de extração com a diminuição da porcentagem de ACN (100 – 30%) no carregamento.

Fonte: Autoria própria.

Figura 31. Avaliação do tempo de retenção da OTA ($[OTA] = 1 \text{ mg L}^{-1}$) na coluna de extração com a diminuição da porcentagem de ACN (30 e 20%) no carregamento.

Fonte: Autoria própria.

Sendo assim, os níveis a serem estudados no planejamento experimental foram definidos como sendo 20 % e 10 % de ACN e 8 e 4 minutos para os níveis +1 e -1, respectivamente para ambos fatores. O tempo de 4 minutos foi estipulado como mínimo para uma extração eficiente da OTA sem perdas de analito, uma vez que com 20% de ACN o composto não é eluído.

Tendo sido determinados os níveis +1 e -1, os níveis 0, +1,41 e -1,41, necessários para um planejamento composto central de 2 fatores em 2 níveis puderam ser calculados, os quais podem ser observados na Tabela 15.

Os experimentos do planejamento experimental foram realizados conforme apresentado na Tabela 16. Esses foram realizados em vinho tinto seco fortificado, porque esse possui uma maior carga de interferentes quando comparado à um vinho branco. A Figura 32 mostra o cromatograma do vinho tinto seco fortificado com OTA utilizando 15% de ACN e 3,1 minutos no carregamento da amostra.

É possível visualizar que quando é utilizado vinho nas análises, picos cromatográficos de interferentes estão presentes no início do cromatograma. Como a fase extratora utilizada (C18) não é altamente seletiva para a OTA, compostos mais hidrofóbicos da matriz são coextraídos, sendo injetados na coluna analítica na etapa

Figura 32. Cromatograma de vinho tinto seco fortificado com OTA ($[OTA] = 5 \mu\text{g L}^{-1}$) obtido com 15 % de ACN e 3,1 minutos no carregamento.

Fonte: Autoria própria.

de separação e chegando até detector de massas. Porém, como o detector é seletivo para a OTA, esses interferentes são detectados em baixa intensidade.

Na Figura 33 é apresentada uma comparação entre os cromatogramas dos experimentos com menor e maior porcentagem de ACN, com mesmo tempo de carregamento (6 minutos).

Através da Figura 33 é possível observar que o uso de 22% de ACN no carregamento da amostra melhora significativamente a remoção de interferentes da amostra, sendo os picos cromatográficos desses visualizados entre 7 e 9 minutos.

Os resultados dos experimentos do planejamento experimental podem ser visualizados na Tabela 18.

A área do pico cromatográfico da OTA e a relação sinal-ruído foram as respostas selecionadas para a obtenção da superfície de resposta do planejamento experimental. A relação sinal-ruído foi medida por 3 minutos desde o tempo de injeção do extrato na coluna cromatográfica (exemplo: se o tempo de carregamento é de 6 minutos, a relação sinal ruído é medida entre os tempos de 6 e 9 minutos). O ajuste das respostas obtidas para o planejamento experimental foi realizado baseando-se em um modelo linear e quadrático.

Figura 33. Comparação entre as extrações de OTA em vinho tinto seco fortificado ($[OTA] = 5 \mu\text{g L}^{-1}$) com 7,9 e 22 % de ACN com o mesmo tempo de carregamento (6 minutos).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 18. Valores de área e sinal-ruído obtidos para os experimentos do planejamento experimental.

Experimento	% ACN	Tempo de carregamento (min)	Área	Sinal-Ruído
2	10	8	29622	418,1
8	15	8,8	29166	326,71
10 (C)	15	6	29987	348,55
9 (C)	15	6	30559	324,89
4	20	8	31597	1227,81
7	15	3,1	32757	354,06
12 (C)	15	6	30525	344,58
1	10	4	33526	319,13
3	20	4	33631	393,65
13 (C)	15	6	31811	311,81
11 (C)	15	6	30931	330,03
5	7,9	6	34827	276,48
6	22	6	30992	1663,93

Fonte: Autoria Própria.

A área do pico cromatográfico foi analisada para a obtenção da superfície de resposta. Para a regressão linear foi obtido um valor de coeficiente de correlação igual a 0,50, enquanto que para o modelo quadrático esse valor é igual a 0,75. Pelo melhor ajuste do modelo quadrático, as análises posteriores foram realizadas baseando-se neste.

O diagrama de Pareto obtido pelo ajuste quadrático para a área do pico cromatográfico da OTA, apresentado na Figura 34, mostra que somente o tempo de carregamento na forma linear e a porcentagem de ACN na forma quadrática foram significativos, sendo que o tempo de carregamento possui efeito negativo, os quais foram utilizados para a construção das curvas de contorno e superfície de resposta, mostradas na Figura 35.

Figura 34. Diagrama de Pareto obtido para os valores de área dos experimentos do planejamento experimental.

Fonte: Autoria própria.

Figura 35. a) Superfície de resposta; b) Gráficos de contorno, obtidos para valores de área dos experimentos do planejamento experimental.

Fonte: Autoria própria.

Através dos gráficos de contorno e superfície na Figura 35 é possível observar que o ponto ótimo para o planejamento experimental tende à análises com menores tempos de carregamento e porcentagem de ACN, o que é contraditório, uma vez que

sabe-se que o tanto o aumento do primeiro como do segundo, possibilitarão uma maior eluição dos interferentes da amostra, garantindo um extrato mais limpo. Além disso, o valor de DPR para a área do pico cromatográfico da OTA dos experimentos do planejamento experimental foi próximo de 5%, o que mostra que essa resposta não é a mais adequada para a realização do ajuste do modelo, uma vez que mudanças no tempo de carregamento e a porcentagem de ACN não alteraram significativamente a resposta obtida.

A regressão para o sinal-ruído foi realizada, sendo que para o ajuste linear obteve-se um coeficiente de correlação igual a 0,49 e para o ajuste quadrático, 0,87. O modelo quadrático foi escolhido, pelo menor ajuste, para a continuidade das análises.

O diagrama de Pareto, apresentado na Figura 36, para o modelo quadrático mostra que a porcentagem de ACN na forma linear e quadrática, o tempo de carregamento na forma linear e a interação entre os dois fatores na forma linear (1Lby2L) foram significativos, todos tendo efeito positivo. Esses foram utilizados na construção das curvas de contorno e superfície de resposta para o ajuste utilizando o sinal-ruído, os quais são apresentando na Figura 37.

Na Tabela 19 são apresentados os valores dos coeficientes dos fatores utilizados na regressão quadrática da resposta sinal-ruído.

Através da Figura 37 é possível observar que o ponto ótimo tende à análises com maior porcentagem de ACN e tempo de carregamento, estando de acordo com o previsto, uma vez que o aumento nesses dois fatores geram um extrato mais limpo. No entanto, a localização desse ponto ótimo não encontra-se na abrangência dos experimentos realizados (com porcentagem de ACN maior que 22% e tempo de carregamento maior que 8,8 min). Como não é possível a realização de um planejamento experimental aumentando-se a porcentagem de ACN para 30% pois a OTA tem pouca retenção na coluna de extração, como observado nas Figuras 30 e 31, o modelo ajustado para o planejamento experimental proposto deve ser aceito. Assim, a extração de OTA no vinho pode ter a sua metodologia melhorada e não otimizada, uma vez que o ponto ótimo não pode ser atingido.

Observando-se a Figura 37, é possível determinar-se, então, o ponto em que a metodologia tem suas condições melhoradas. O ponto com 22% de ACN e 8,8 minutos (nível +1,41 para ambos os fatores) é o que mais se aproxima do ponto ótimo predito pelo modelo ajustado. No entanto, no experimento inicial, mostrado nas Figuras 32 e

Figura 36. Diagrama de Pareto obtido para os valores de sinal-ruído dos experimentos do planejamento experimental.

Fonte: Autoria própria.

Figura 37. a) Superfície de resposta; b) Gráficos de contorno, obtidos para os valores de sinal-ruído dos experimentos do planejamento experimental.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 19. Valores dos coeficientes dos fatores utilizados na regressão quadrática da resposta sinal-ruído. Fatores significativos em vermelho.

Fator	Coeficiente	Erro Padrão do coeficiente	- 95% limite de confiança	+ 95% limite de confiança
Intercepto	331,69	6,69	313,13	350,26
% Sol. orgânico (L)	359,06	5,29	344,36	373,76
%Sol. orgânico (Q)	303,75	5,69	287,94	319,57
Tempo de carregamento (L)	111,46	5,28	96,79	126,14
Tempo de carregamento (Q)	-10,56	5,66	-26,28	5,16
Interação linear	183,80	7,48	163,04	204,55

Fonte: Autoria própria.

33, foi possível observar que com 20% de ACN a OTA começa a ser eluída em aproximadamente 8 minutos. Sendo assim, o tempo de 8,8 minutos não pode ser utilizado, pois haverá grande perda do analito, utilizando-se 22% de ACN, comprometendo a análise. Dessa forma, o ponto que mais se aproxima do ponto ótimo e que pode ser utilizado é o ponto com 22% de ACN e 6 minutos de carregamento (níveis +1,41 e 0, respectivamente), uma vez que em 6 minutos garante-se que a OTA não é eluída da coluna capilar.

3.5 Validação da metodologia

Melhoradas as condições de análise da metodologia proposta, procedeu-se com a validação do método.

A seletividade do método foi estudada, sendo que pelo guia de validação aqui utilizado, esta é avaliada qualitativamente e quantitativamente. Na avaliação

qualitativa analisa-se a presença de picos que são eluídos no mesmo tempo de retenção do analito estudado, enquanto que a avaliação quantitativa demonstra se a presença dos interferentes da matriz alteram o sinal analítico do analito de interesse. A última é comumente conhecida com a avaliação do efeito de matriz.

A avaliação qualitativa foi realizada e a comparação dos cromatogramas do vinho tinto seco isento do analito e vinho tinto seco fortificado é amostrado na Figura 38.

O vinho tinto seco não apresenta picos cromatográficos que coeluem com o pico cromatográfico da OTA. Assim, o método mostra-se seletivo para a identificação e quantificação da OTA.

A avaliação quantitativa não foi necessária, uma vez que a linearidade do método foi atestada construindo-se a curva de calibração na matriz branca fortificada. Essa avaliação se faz necessária quando a curva de calibração é feita utilizando-se o analito em solvente.

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos diluindo-se o padrão analítico em vinho tinto seco até que fossem obtidas relações sinal-ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação do método empregado foram determinados como sendo 0,02 e 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. As Figuras 39 e 40

Figura 38. Comparação entre os cromatogramas do vinho tinto seco isento do analito e vinho tinto seco fortificado com OTA ($[\text{OTA}] = 0,2 \mu\text{g L}^{-1}$).

Fonte: Autoria própria.

mostram os cromatogramas obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação, com os respectivos cálculos da relação sinal-ruído.

Figura 39. Cromatograma obtido na determinação do limite de detecção ($[OTA] = 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$

Fonte: Autoria própria.

Figura 40. Cromatograma obtido na determinação do limite de quantificação ($[OTA] = 0,05 \mu\text{g L}^{-1}$).

Fonte: Autoria própria.

A linearidade da metodologia foi avaliada construindo-se uma curva de calibração na matriz branca fortificada. Como o limite máximo permitido de OTA em vinhos já é estabelecido tanto no Brasil como na União Europeia, a curva de calibração foi construída tendo a concentração máxima de OTA permitida como ponto central da curva. Também por esse motivo, não foi necessária a construção da curva de calibração tendo como concentração mais baixa aquela determinada pelo limite de quantificação, uma vez que concentrações mais baixas que $2 \mu\text{g L}^{-1}$ são permitidas. Sendo assim, a faixa de trabalho utilizada na construção da curva de calibração foi de 0,2 a $3,8 \mu\text{g L}^{-1}$.

Na Figura 41 é apresentada a curva de calibração obtida para a determinação da linearidade da metodologia, sendo que foi obtido coeficiente de correlação igual a 0,996, valor aceito segundo o guia de validação da ANVISA.

Através do ajuste linear dos pontos obtidos pela análise de vinho fortificado com OTA em 5 diferentes concentrações foi possível obter os valores dos coeficientes linear (a) e angular (b) sendo iguais a -588,52 e 5539,26, respectivamente.

O guia de validação da ANVISA não dispõe procedimentos para a avaliação da qualidade do ajuste linear da curva de calibração. No entanto, esta foi realizada através da construção do gráfico da dispersão de resíduos, apresentado na Figura 42, no qual é possível observar-se que os resíduos encontram-se distribuídos de forma aleatória, indicando a homocedasticidade (homogeneidade das variâncias) da curva

Figura 41. Curva de calibração em vinho tinto seco fortificado com OTA.

Fonte: Autoria própria.

Figura 42. Gráfico da dispersão de resíduos do ajuste linear da curva de calibração.

Fonte: Autoria própria.

de calibração. Caso fosse notada a dispersão crescente dos resíduos, indicando a heterocedasticidade da curva, o ajuste pelo método dos mínimos quadrados ponderados seria necessário.

Os parâmetros precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão e recuperação foram avaliados em 3 níveis de concentração (baixo ($0,2 \mu\text{g L}^{-1}$), médio ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) e alto ($3,8 \mu\text{g L}^{-1}$)) e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 20.

Os resultados apresentados para a repetitividade para os níveis médio e alto estão de acordo com os critérios de aceitação da ANVISA para esse parâmetro (menor que 5%), enquanto que o nível baixo pode ser considerado, a princípio, inaceitável. No entanto o MAPA estabelece critérios de aceitação para esse parâmetro levando-

Tabela 20. Resultados obtidos na avaliação da precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão e recuperação.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetitividade (DPR %)	Precisão Intermediária (DPR %)	Exatidão (%)	Recuperação (%)
0,2	5,13	6,05	134,9	-
2,0	1,24	1,53	98,4	61,4
3,8	1,91	1,15	102,6	72,8

Fonte: Autoria própria.

-se em conta o nível de concentração e a micotoxina estudada. Assim, para o nível baixo o valor apresentado é aceitável (menor que 40% para concentrações menores que $1 \mu\text{g L}^{-1}$).

Os valores apresentados para a precisão intermediária foram aceitos pelos mesmos critérios utilizados na avaliação da repetitividade. Não houve grandes diferenças entre os valores de DPR apresentados pela repetitividade e precisão intermediária.

A ANVISA não dispõe critérios de aceitação para a exatidão. Por isso, os resultados apresentados para esse parâmetro foram analisados segundo critérios de aceitação estabelecidos pelo MAPA, os quais leva em conta o nível de concentração do analito e a micotoxina estudada. Os níveis médio e alto apresentam valores aceitáveis para a exatidão (de 70 a 110 % para concentração entre 1 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$). O nível baixo pode ser considerado inaceitável pelos critérios estabelecidos pelo MAPA (de 50 a 120 % para concentração menor de $1 \mu\text{g L}^{-1}$). Porém, para a concentração de entre os níveis baixo e médio ($1,1 \mu\text{g L}^{-1}$) a exatidão mostrou-se dentro dos critérios estabelecidos (96%). Sendo assim, a exatidão do método encontra-se fora dos critérios do MAPA em concentrações muito baixas, não afetando a correta quantificação do analito em concentrações próximas do limite máximo de OTA permitido em vinhos.

O parâmetro recuperação não é abordado pelo guia de validação para métodos analíticos da ANVISA. O guia de validação do MAPA aborda esse parâmetro, mas este considera que a exatidão (veracidade) e a recuperação são iguais. Além disso, o procedimento para tal é descrito para metodologias que empregam métodos de extração *off-line*. Por isso, foi necessário o uso de um procedimento não descrito nos guias de validação para que tal parâmetro pudesse ser avaliado no método *online*.

No procedimento de coleta do extrato, durante a etapa de eluição, ocorre uma diluição compostos que foram extraídos, fazendo com que a posterior detecção no modo unidimensional, em concentrações muito baixas, seja dificultada. Esse fato não permitiu o correto cálculo da recuperação para o nível baixo (concentração de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$). Para as concentrações nos níveis médio e alto, o cálculo pode ser efetuado. Porém, somente o valor de recuperação obtido para o nível alto encontra-se dentro dos critérios de aceitação para esse parâmetro (de 70 a 110 % para concentrações entre 1 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$).

Como os critérios de aceitação para a recuperação definidos pelo guia de validação do MAPA são assim determinados para a validação de metodologias que utilizam métodos de extração no modo *off-line* e considera que a exatidão e a recuperação são iguais, a comparação dos valores obtidos para tal parâmetro torna-se desnecessária.

Uma vez que o modo de extração utilizado na metodologia empregada é a de extração única (*flow through*), os valores de recuperação não são considerados ideais (próximo de 100%). Assim, espera-se que com a utilização do modo de extração em ciclos de aspirar/dispensar (*draw/eject extraction*), a recuperação seja aumentada, uma vez que o analito pode ter mais contato com a fase extratora e ser mais extraído.

Tendo sido validada a metodologia proposta, procedeu-se a análise de amostras de vinho.

3.6 Análise das amostras de vinho

As amostras de vinho tinto seco e vinho tinto branco foram analisadas pelo sistema *in-tube* SPME e as comparações entre os cromatogramas obtidos nas análises das amostras (traço preto) e de vinho tinto seco fortificado com $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de OTA (traço vermelho) são apresentados na Figura 43.

Figura 43. Comparações entre os cromatogramas obtidos na análise das amostras (preto) e de vinho tinto seco fortificado com $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de OTA (vermelho).

4 CONCLUSÃO

Foi possível desenvolver uma metodologia utilizando o sistema *in-tube* SPME no modo de extração única (*flow through extraction*), fazendo-se uso da fase C18, a qual não é uma fase altamente seletiva para a OTA, por HPLC-MS/MS.

As condições de análise puderam ser melhoradas com a utilização do planejamento experimental, sendo essas iguais a 22% de ACN e 6 minutos no carregamento da amostra.

A metodologia proposta foi validada, conforme o guia de validação da ANVISA, avaliando-se os parâmetros seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e recuperação.

Tendo sido validada a metodologia proposta, amostras de vinho tinto seco e vinho branco seco foram analisadas, sendo que nenhuma delas apresentou contaminação com OTA até a concentração permitida pela legislação vigente.

REFERÊNCIAS

- 1 TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p.168–180, 2009. Doi:10.1016/j.aca.2008.11.010.
- 2 IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p.138-161, 2010.
- 3 DUARTE, T. L. **Ocratoxina A em alimentos e bebidas: uma revisão bibliográfica**. 2010. 40f. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- 4 MILANI, J. M. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review. **Veterinarni Medicina**, v.58, n. 8, p. 405–411, 2013.
- 5 AS MICOTOXINAS. **Food Ingredients Brasil**, n 7, p. 32-40, 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/90.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2014.
- 6 KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. **Toxins**, v.2, p. 461-493, 2010. Doi:10.3390/toxins2040461.
- 7 CACIQUE, A. P. **Determinação de ocratoxina A em uva e produtos processados por cromatografia líquida de alta eficiência**. 2012. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2012.
- 8 NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M. B. B. P. Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Revista da Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação**, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2006.
- 9 PRELLE, A.; SPADARO, D.; DENCA, A.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Comparison of clean-up methods for ochratoxin A on wine, beer, roasted coffee and chili commercialized in Italy. **Toxins**, v. 5, p. 1827-1844; 2013. Doi:10.3390/toxins5101827.

10 VARGAS, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. **Trends in Food Science & Technology**, v.17, p. 72–81, 2006. Doi:10.1016/j.tifs.2005.10.007.

11 MATEO, R.; MEDINA, A.; MATEO, E. M.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 79-83, 2007. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.029.

12 BULLERMAN, L.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 140–146, 2007. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035.

13 INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins**, Lyon, v. 56, 1993. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56.pdf>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

14 HOPE, J.; HOPE, B. E. A review of the diagnosis and treatment of ochratoxin A Inhalational exposure associated with human illness and kidney disease including focal segmental glomerulosclerosis. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2012, p. 1-10, 2012. Doi:10.1155/2012/835059.

15 ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. **Toxins**, v. 2, p. 1078-1099, 2010. Doi:10.3390/toxins2051078.

16 PITOUT, M. J. The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. **Biochemical Pharmacology**, v. 18, p. 485-491, 1969. Doi:10.1016/0006-2952(69)90224-X

17 NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. U. S. Department of Health and Human Services. **Report on Carcinogens (RoC)**. 13. ed., Durham, 2014. Disponível em: <<http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/roc/roc13/index.html>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

18 ARESTA, A.; PALMISANO, F.; VATINNO, R.; ZAMBONIN, C. G. Ochratoxin A determination in beer by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection: a fast and sensitive method for assessment of noncompliance of legal limits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1594-1598, 2006. Doi:10.1021/jf052666o.

19 DOHNAL, V.; PAVLÍKOVÁ, L.; KUČA, K. The pH and mobile phase composition effects Ochratoxin A fluorescence at liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, p. 766-770, 2010. Doi:10.1093/chromsci/48.9.766

20 VARGAS, E.A.; DOS SANTOS, E. A.; PITTET, A. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 3. p. 773-779, 2005.

21 FRENETTE, C.; PAUGH, R. J.; TOZLOVANU, M.; JUZIO, M.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R. A. Structure–activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A: insight for detection of ochratoxin A metabolites. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, p. 153–161, 2008. Doi:10.1016/j.aca.2007.12.030.

22 UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA (UVIBRA). **Legislações**. 2014. Disponíveis em: <<http://www.uvibra.com.br/legislacao.htm>>. Acesso em: 21 ago. 2014.

23 PEDRUCCI, G.; BERTI, E. Vinho composto. In: VENTURI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010. v. 1, p.165-180.

24 BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei n. 7.678, de 8 de novembro de 1988. Regulamento Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 9 nov. 1988. Seção 1, p. 21561.

25 BRASIL. Presidência da República. Lei n. 10.970, de 12 de novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 nov. 2004, Seção 1, p. 1.

26 GUERRA, C. C. Vinho tinto. In: VENTURI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010. v. 1, p.209-233.

27 VINHO.ORG. **Processo de produção e fermentação**. 2014. Disponível em: <<http://www.vinho.org/tudo-sobre-vinho/processo-de-producao-e-fermentacao/>>. Acesso em: 08 set. 2014.

28 A QUÍMICA DO VINHO. **Fluxograma do processo**. 2015. Disponível em: <<http://aquimicadovinho.xpg.uol.com.br/fluxograma.html>>. Acesso em: 09 set. 2015.

29 INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE (OIV). **State of the vitiviniculture world market: balance is restored to wine sector.** 2014. Disponível em: <http://www.oiv.int/oiv/info/en_le_secteur_du_vin_retrouve_son_equilibre>. Acesso em: 10 set. 2015.

30 FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Statistics Division. **Production/ Crops processed.** 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QD/E>>. Acesso em: 10 set. 2015.

31 WINE INSTITUTE. **Table 3 World Wine Production by Country 2010 -2013 and % change 2013/2010 (liters).** 2015. Disponível em: <[http://www.wineinstitute.org/files/Wine%20Production%20by%20Country%202013_\(c\)TradeDataAndAnalysis.pdf](http://www.wineinstitute.org/files/Wine%20Production%20by%20Country%202013_(c)TradeDataAndAnalysis.pdf)>. Acesso em: 10 set. 2015.

32 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on alcohol and health.** 2011. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44499/1/9789241564151_eng.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2015.

33 WINE INSTITUTE. **Table 6.1 World Wine Consumption 2010-2013, % Change 2013/2012 and percent of world consumption – 2013. Quantity (liters).** 2015. Disponível em: <[http://www.wineinstitute.org/files/Consumption%20by%20Country%202013_\(c\)TradeDataAndAnalysis.pdf](http://www.wineinstitute.org/files/Consumption%20by%20Country%202013_(c)TradeDataAndAnalysis.pdf)>. Acesso em: 10 set. 2015.

34 WINE INSTITUTE. **Table 7. Per capita wine consumption by country. Countries ranked by per capita consumption and countries listed alphabetically. 2013 (1).** 2015. Disponível em: <[http://www.wineinstitute.org/files/Per%20Capita%20Wine%20Consumption%202013_\(c\)TradeDataAndAnalysis.pdf](http://www.wineinstitute.org/files/Per%20Capita%20Wine%20Consumption%202013_(c)TradeDataAndAnalysis.pdf)>. Acesso em: 10 set. 2015.

35 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional Antidrogas. **I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira.** Brasília, 2007. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_padroes_consumo_alcool.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2015.

36 CLOUVEL, P.; BONVARLET, L.; MARTINEZ, A.; LAGOUARDE, P.; DIENG, I.; MARTIN, P. Wine contamination by ochratoxin A in relation to vine environment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 74–80, 2008. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.003.

37 MATEO, R.; MEDINA, A.; MATEO, E. M.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 79-83, 2007. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.029.

38 HOCKING, A. D.; LEONG, S.-L. L.; KAZI, B. A.; EMMETT, R. W.; SCOTT, E. S. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n.1-2, p. 84-88. 2007. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.031.

39 WU, F.; BUI-KLIMKE, T.; SHIELDS, K. N. Potential economic and health impacts of ochratoxin A regulatory standards. **World Mycotoxin Journal**, v. 7, n. 3, p. 387-398, 2014. Doi:10.3920/WMJ2013.1686.

40 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - rdc nº - 7, de 18 de fevereiro de 2011 Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 9 mar. 2011. Seção 1, p 66-67.

41 UNIÃO EUROPEIA (UE). Commission regulation (EC) nº 1881/2006 of 19 december 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 49, p. 5-24, 2006.

42 BERTHILLER, F.; BURDASPAL, P.A.; CREWS, C.; IHA, M.H.; KRSKA, R.; LATTANZIO, V.M.T.; MACDONALD, S.; MALONE, R.J.; MARAGOS, C.; SOLFRIZZO, M.; STROKA, J.; WHITAKER, T.B. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2012-2013. **World Mycotoxin Journal**, v.7, n. 1, p. 3-33, 2014. Doi:10.3920/WMJ2013.1637.

43 KRSKA, R.; SCHUBERT-ULLRICH, P.; MOLINELLI, A.; SULTYOK, M.; MACDONALD, S.; CREWS, C. Mycotoxin analysis: an update. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 25, n. 2, p. 152–163, 2008. Doi:10.1080/02652030701765723.

44 LI, W.; POWERS, S.; DAI, S.Y. Using commercial immunoassay kits for mycotoxins: 'joys and sorrows'?. **World Mycotoxin Journal**; v. 7, n. 4, p. 417-430, 2014. Doi:10.3920/WMJ2014.1715.

45 SENYUVA, H. Z.; GILBERT, J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: a review. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 115–132, 2010. Doi:10.1016/j.jchromb.2009.05.04.

46 ABD-ELGHANY, S. M.; SALLAM, K. I. Rapid determination of total aflatoxins and ochratoxins A in meat products by immuno-affinity fluorimetry. **Food Chemistry**, v. 179, p. 253–256, 2015. Doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.140.

47 CIGIĆ, I. K.; PROSEN, H. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 62-115, 2009. Doi:10.3390/ijms10010062.

48 FRENETTE, C.; PAUGH, R. J.; TOZLOVANU, M.; JUZIO, M.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R. A. Structure–activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A: Insight for detection of ochratoxin A metabolites. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, p. 153–161, 2008. Doi:10.1016/j.aca.2007.12.030

49 VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000. Doi:10.1590/S0100-40422000000400016

50 QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS, F. M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005. Doi: 10.1590/S0100-40422005000500027

51 CHROMEDIA. **Principles of SPME**. 2015. Disponível em: <<http://www.chromedia.org>>. Acesso em: 11 mai. 2015.

52 PAWLISZYN, J. Theory of solid-phase microextraction. **Journal of Chromatographic Science**, v. 38, p. 270-278, 2000. Doi:10.1093/chromsci/38.7.270

53. PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction**: theory and practice. New York: Wiley-VCH, 1997. 247 p.

54 SIGMA-ALDRICH. **Selection guide for supelco SPME fibers**. 2015. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme/selecting-spme-fiber.html>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

55 LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 153–193, 2000. Doi:10.1016/S00219673(00)00535-5.

56 PAN, J.; ZHANG, C.; ZHANG, Z.; LI, G. Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 815, p. 1–15, 2014. Doi:10.1016/j.aca.2014.01.017.

57 ROCHA, S. M.; SALVADOR, A. C.; MARTINS, C.; BARBOSA, C.; SANTOS, M.; PETRONILHO, S. Microextração em fase sólida e cromatografia de gás: uma combinação de elevado potencial. **Scientia Chromatographica**; v. 5, n. 4, p. 284-300, 2013. Doi:10.4322/sc.2014.011.

58 ARESTA, A.; CIOFFI, N.; PALMISANO, F. ; ZAMBONIN, C.G. Simultaneous determination of ochratoxin A and cyclopiazonic, mycophenolic, and tenuazonic acids in cornflakes by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5232-5237, 2003. Doi:10.1021/jf034385r.

59 ARESTA, A.; PALMISANO, F.; VATINNO, R.; ZAMBONIN, C. G. Ochratoxin A determination in beer by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection: a fast and sensitive method for assessment of noncompliance to legal limits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1594-1598, 2006. Doi:10.1021/jf052666o.

60 VATINNO, R.; ARESTA, A.; ZAMBONIN, C. G.; PALMISANO, F. Determination of ochratoxin A in green coffee beans by solid-phase microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 145–150, 2008. Doi:10.1016/j.chroma.2008.02.020.

61 ARESTA, A.; VATINNO, R.; PALMISANO, F.; ZAMBONIN, C. G. Determination of ochratoxin A in wine at sub ng/mL levels by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1115, p. 196–201, 2006. Doi:10.1016/j.chroma.2006.02.092.

62 SAITO, K.; IKEUCHI, R.; KATAOKA, H. Determination of ochratoxins in nuts and grain samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1220, p. 1–6, 2012. Doi:10.1016/j.chroma.2011.11.008.

63 ZHANG, X.; CUDJOE, E.; VUCKOVIC, D.; PAWLISZYN, J. Direct monitoring of ochratoxin A in cheese with solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7505–7509, 2009. Doi:10.1016/j.chroma.2009.03.009.

64 KATAOKA, H.; ISHIZAKI, A.; NONAKA, Y.; SAITO, K. Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 655, p. 8–29, 2009. Doi:10.1016/j.aca.2009.09.032.

65 QUEIROZ, M. E. C.; MELO, L. P. Recentes avanços da in-tube SPME-LC para bioanálises. **Scientia Chromatographica** v. 5, n.3, p. 167-179, 2013. Doi:10.4322/sc.2014.002.

66 KATAOKA, H. Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application – a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p. 31–45, 2002. Doi:10.1007/s00216-002-1269-z.

67 BERTHILLER, F.; BURDASPAL, P.A.; CREWS, C.; IHA, M.H.; KRSKA, R.; LATTANZIO, V.M.T.; MACDONALD, S.; MALONE, R.J.; MARAGOS, C.; SOLFRIZZO, M.; STROKA, J.; WHITAKER, T.B. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2012-2013. **World Mycotoxin Journal**, v.7, n. 1, p. 3-33, 2014. Doi:10.3920/WMJ2013.1637.

68 BERTHILLER, F.; BRERA, C.; CREWS, C.; IHA, M.H.; KRSKA, R.; LATTANZIO, V.M.T.; MACDONALD, S.; MALONE, R.J.; MARAGOS, C.; SOLFRIZZO, M.; STROKA, J.; WHITAKER, T.B. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2013-2014. **World Mycotoxin Journal**, v. 8, n. 1, p. 5-36, 2015. Doi:10.3920/WMJ2014.1840.

69 FRENETTE, C.; PAUGH, R. J.; TOZLOVANU, M.; JUZIO, M.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R. A. Structure–activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A: Insight for detection of ochratoxin A metabolites. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, p. 153–161, 2008. Doi:10.1016/j.aca.2007.12.030.

70 GALARCE-BUSTOS, O.; ALVARADO, M.; VEGA, M.; ARANDA, M. Occurrence of ochratoxin A in roasted and instant coffees in Chilean Market. **Food Control**, v.46, p. 102-107. 2014. Doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.014.

71 MAIER, N. M.; BUTTINGER, G.; WELHARTIZKI, S.; GAVIOLI, E.; LINDNER, W. Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations. **Journal of Chromatography B**, v. 804, p. 103–111. 2004. Doi:10.1016/j.jchromb.2004.01.014.

72 BERTUZZI, T.; RASTELLI, S.; PIETRI, A. Aspergillus and penicillium toxins in chestnuts and derived products produced in Italy. **Food Control**, v. 50, p. 876-880, 2015. Doi:10.1016/j.foodcont.2014.10.047.

73 ZHANG, X.; CUDJOE, E.; VUCKOVIC, D.; PAWLISZYN, J. Direct monitoring of ochratoxin A in cheese with solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7505–7509, 2009. Doi:10.1016/j.chroma.2009.03.009.

74 BRERA, C.; PANNUNZI, E.; GUARINO, C.; DEBEGNACH, F.; GREGORI, E.; SANTIS, B. Ochratoxin A determination in cured ham by High Performance Liquid Chromatography Fluorescence Detection and Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry: a comparative study. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 37, p. 2036–2045, 2014. Doi:10.1080/10826076.2013.825859.

75 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **RE 899/2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003**, 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Equivalencia+farmaceutica/Legislacoes>>. Acesso em: 13 jan. 2016.

76 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual da garantia da qualidade analítica, resíduos de contaminantes em alimentos**. Brasília, 2011. 239 p.

77 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008 Revisão 04 – JUL/2011**. 2015. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2015.

78 SCHMIDT-HEYDT, M.; CRAMER, B.; GRAF, I.; LERCH, S.; HUMPF, H-U.; GEISEN, R. Wavelength-dependent degradation of ochratoxin and citrinin by light in vitro and in vivo and its implications on penicillium. **Toxins**, v. 4, p. 1535-1551, 2012. Doi:10.3390/toxins4121535.

79 ANDRADE, M. A.; LANÇAS, F. M. Estado-da-arte na análise cromatográfica de ocratoxina A em amostras de alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 1, p. 31-52, 2015. Doi:10.4322/sc.2015.015.