

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Exatas

Programa de Pós-Graduação em Química

Willian Miguel Soares

**APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA POR ANÁLISE
DIRETA NA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EM ALIMENTOS**

Belo Horizonte

2025

UFMG/ICEX/DQ. 1.686

T. 763

Willian Miguel Soares

**APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA POR ANÁLISE
DIRETA NA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EM ALIMENTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química.

Orientador: Bruno Gonçalves Botelho

Belo Horizonte

2025

Ficha Catalográfica

S676a
2025
T

Soares, Willian Miguel.
Aplicação da espectroscopia de fluorescência por análise direta na determinação de contaminantes em alimentos [manuscrito] / Willian Miguel Soares. 2025.
145 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Bruno Gonçalves Botelho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.
Bibliografia: f. 134-144.
Apêndice: f. 145.

1. Química analítica – Teses. 2. Espectroscopia de fluorescência – Teses. 3. Alimentos – Contaminação – Teses. 4. Alimentos – Análise – Teses. 5. Bebidas fermentadas – Teses. 6. Bebidas alcoólicas – Teses. 7. Malte – Teses. 8. Ocratoxinas – Teses. 9. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – Teses. I. Botelho, Bruno Gonçalves, Orientador. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Aplicação da Espectroscopia de Fluorescência por Análise Direta na Determinação de Contaminantes em Alimentos"

Willian Miguel Soares

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Bruno Gonçalves Botelho - Orientador
UFMG

Prof. Wallace Duarte Fragoso
UFPB

Prof. Cleiton Antônio Nunes
UFLA

Profa. Mariana Ramos de Almeida
UFMG

Profa. Adriana Nori de Macedo
UFMG

Belo Horizonte, 10 de outubro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Cleiton Antônio Nunes, Usuário Externo**, em 12/10/2025, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Nori de Macedo, Professora do Magistério Superior**, em 14/10/2025, às 22:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Gonçalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 23/10/2025, às 09:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Ramos de Almeida, Professora do Magistério Superior**, em 31/10/2025, às 16:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wallace Duarte Fragoso, Usuário Externo**, em 02/11/2025, às 07:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4617073** e o código CRC **BC6C0033**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus amigos por representarem a minha estrutura de apoio mais forte. Vocês compreendem e aceitam as minhas particularidades. Vocês me permitem acessar sentimentos e experiências sublimes. Vocês contemplam o meu desenvolvimento em amplos aspectos e, por isso, sou extremamente grato a vocês: Antônio Oliveira, Breno dos Anjos, Breno Urcine, Caio Hussene, Daniele Borges, Felipe Murta, Guilherme Dornas, Gustavo Castro, Hiago Esteves, Isabel Mattos, Karina Costa, Letícia Gomes, Lud Lopes, Manassés Muniz, Rafael Souza, Rayane Xavier, Renan Feitosa, Sthéfany Zaida, Taiza Cardoso, Victor Fagundes e Vinícius Cattony.

Agradeço aos membros próximos da minha família pelo suporte perante as diversas dificuldades e pela presença em momentos simples e significativos.

Agradeço ao meu orientador, Bruno Botelho, pela parceria, pelos ensinamentos e pela paciência. Você possibilitou um doutorado leve, no qual pude me aperfeiçoar de forma consistente e com bastante liberdade.

Agradeço aos colegas do laboratório LaBeer pelo companheirismo e pelas trocas ao longo desses anos de pesquisa científica.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais, ao Centro de Ensino e Inovação do Departamento de Química da UFMG, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

“O homem pode fazer o que quer,
mas não pode querer o que quer”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A contaminação de alimentos representa sérios riscos à saúde e continua sendo um desafio global devido à presença de patógenos, toxinas e resíduos químicos. Os métodos atuais de detecção são frequentemente laboriosos, possuem alto custo relativo e requerem instrumentação complexa, o que limita sua aplicabilidade no monitoramento rotineiro. A espectroscopia de fluorescência direta surge como uma alternativa rápida, não destrutiva e economicamente viável, permitindo a detecção por meio de sinais de fluorescência intrínsecos ou modificados. Essa técnica simplifica a análise e apresenta um forte potencial para o monitoramento da segurança alimentar em tempo real. Neste estudo, três métodos analíticos foram desenvolvidos utilizando espectrofluorometria para avaliar contaminantes químicos regulados em diferentes matrizes alimentares. Um método para determinação de benzo[a]pireno (B[a]P) em malte tipo Pilsen foi estabelecido e validado por meio de extração líquido-líquido e fluorescência síncrona. O método otimizado apresentou faixa linear de detecção de 0,5 a 3,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, com limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados de 0,24 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 0,81 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, sendo o LQ experimental definido como 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As avaliações de precisão e exatidão revelaram desvios padrão relativos (DPR) inferiores a 10% e taxas de recuperação entre 97,9% e 114,6% para concentrações de B[a]P de 0,5, 1,5 e 2,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Um segundo método foi desenvolvido e validado para a detecção de ocratoxina A (OTA) em vinho tinto, combinando extração líquido-líquido com fluorescência sincronizada aprimorada pela formação de complexo de inclusão com β -ciclodextrina. O método apresentou faixa linear de detecção de 0,5 a 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, com LD e LQ de 0,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,60 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, sendo o LQ experimental definido como 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os valores de DPR foram inferiores a 30%, e as taxas de recuperação variaram entre 84,9% e 95,1% para concentrações de OTA de 0,5, 2,0 e 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Adicionalmente, foi desenvolvido um modelo quimiométrico exploratório baseado em matrizes de excitação-emissão de fluorescência e análise de fatores paralelos (PARAFAC) para identificação de 5-hidroximetilfurfural (HMF) em hidromel. Os resultados preliminares demonstraram o potencial da técnica em discriminar componentes fluorescentes associados ao HMF, com significativa correlação observada entre os escores extraídos pelo modelo PARAFAC e as concentrações de referência. Esses resultados encontrados reforçam a viabilidade da incorporação dessa abordagem de modelagem em futuras estratégias de calibração multivariada, aproveitando as vantagens dos dados de segunda ordem. A integração da espectroscopia de fluorescência multidimensional, modificações supramoleculares e análise multivariada proporcionou alta seletividade e sensibilidade, evidenciando a fluorescência direta como uma alternativa simples, econômica e viável aos métodos analíticos tradicionais.

Palavras-chave: espectroscopia de fluorescência; contaminantes em alimentos; concentrações traço; validação.

ABSTRACT

Food contamination poses serious health risks and remains a global challenge due to the presence of pathogens, toxins, and chemical residues. Current detection methods are often costly, time consuming, and require complex instrumentation, limiting their practicality for routine monitoring. Direct fluorescence spectroscopy presents a rapid, non-destructive, and cost effective alternative, enabling fast detection through intrinsic or modified fluorescence signals. This technique simplifies analysis and holds strong potential for real-time, food safety monitoring. In this study, three analytical methods were developed using spectrofluorometry to evaluate regulated chemical contaminants in various food matrices. A method for the determination of benzo[a]pyrene (B[a]P) in Pilsner malt was established and validated using liquid-liquid extraction and synchronous fluorescence. The optimized method showed a linear detection range of 0.5 - 3.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, with limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 0.24 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 0.81 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively, and the experimental LOQ established as 0.50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Precision and trueness assessments yielded relative standard deviations (RSD) below 10%, and recovery rates between 97.9% and 114.6% at B[a]P concentrations of 0.5, 1.5, and 2.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A second method was developed and validated for the detection of ochratoxin A (OTA) in red wine, combining liquid-liquid extraction with synchronous fluorescence enhanced by β -cyclodextrin inclusion complexation. The method exhibited a linear detection range of 0.5 - 3.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, with LOD and LOQ of 0.20 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.60 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively, and the experimental LOQ established as 0.50 $\mu\text{g L}^{-1}$. RSD values were below 30%, and recovery rates ranged from 84.9% to 95.1% at OTA concentrations of 0.5, 2.0, and 3.0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Additionally, an exploratory chemometric model based on fluorescence excitation-emission matrices and parallel factor analysis (PARAFAC) was developed to identify 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in mead. Preliminary results demonstrated the technique's potential to discriminate fluorescent components associated with HMF, with a significant correlation observed between PARAFAC-extracted scores and reference concentrations. These findings support the feasibility of incorporating such modeling approaches into future multivariate calibration strategies, benefiting from second-order data advantages. The integration of multidimensional fluorescence spectroscopy, supramolecular modifications, and multivariate analysis provided high selectivity and sensitivity, highlighting direct fluorescence as a simple, cost-effective, and viable alternative to traditional analytical methods.

Key-words: fluorescence spectroscopy; food contaminants; trace concentrations; validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Jablonksi.....	25
Figura 2. Esquemática de um espectrofluorímetro	29
Figura 3. Espectro de emissão convencional do antraceno em cicloexano	30
Figura 4. Espectros de excitação e emissão da rodamina 6G, destacando-se o deslocamento de Stokes.....	31
Figura 5. Matriz de excitação e emissão de fluorescência de amostras de aerossóis	33
Figura 6. Fórmula estrutural da β -ciclodextrina	38
Figura 7. Escala de cor para os diferentes tipos de malte	43
Figura 8. Fórmula estrutural do benzo[a]pireno	46
Figura 9. Esquemática do método de referência para a determinação de benzo[a]pireno em malte.....	50
Figura 10. Esquemática do método adaptado para a determinação de benzo[a]pireno em malte.....	51
Figura 11. Espectro sincronizado do benzo[a]pireno em acetonitrila ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) sob $\Delta\lambda = 19 \text{ nm}$	57
Figura 12. Espectro sincronizado do extrato do malte Pilsen	58
Figura 13. Eficiência da extração de benzo[a]pireno para o método isento de água ($n = 3$)	60
Figura 14. Eficiência da extração de benzo[a]pireno para o método com aquecimento brando ($n = 3$)	61
Figura 15. Eficiência da extração de benzo[a]pireno para o método sem aquecimento ($n = 3$).....	62
Figura 16. Planejamento fatorial 2^2 com ponto central.....	63
Figura 17. Espectros sincronizados do benzo[a]pireno no extrato em diferentes concentrações obtidas para diferentes massas de malte	65
Figura 18. Espectro sincronizado do benzo[a]pireno no extrato na concentração alvo ($n = 3$).....	66
Figura 19. Espectros sincronizados do benzo[a]pireno no extrato em concentrações inferiores ao alvo ($n = 3$).	67
Figura 20. Curva de calibração do benzo[a]pireno em DMSO ($n = 3$)	68
Figura 21. Comparação entre a curva no solvente e a curva matrizada para avaliação do efeito de matriz ($n = 3$) na determinação de benzo[a]pireno.....	69

Figura 22. Espectros sincronizados obtidos para amostras de malte analisadas pelo método validado	73
Figura 23. Características visuais dos diferentes tipos de vinho.....	76
Figura 24. Fórmula estrutural de ocratoxina A.....	79
Figura 25. Fórmulas estruturais da ocratoxina B e ocratoxina C	81
Figura 26. Esquemática do método adaptado para a determinação de ocratoxina A em vinho.....	87
Figura 27. Superfície espectral de fluorescência da ocratoxina A ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) em pH 9,3, representada em três dimensões.....	90
Figura 28. EEMs obtidas para soluções de ocratoxina A ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes condições: pH 3,0; água pura e pH 9,3.....	91
Figura 29. Equilíbrios ácido-base da ocratoxina A em função do pH.....	92
Figura 30. Representação do complexo de inclusão formado entre a β -ciclodextrina e a ocratoxina A.....	93
Figura 31. EEMs obtidas para soluções de ocratoxina A (20mg L^{-1}) com adição de β -ciclodextrina ($10^{-4} \text{mol L}^{-1}$) em diferentes condições: pH 3,0; água pura e pH 9,3.....	94
Figura 32. Espectros de fluorescência de soluções de ocratoxina A ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) sob a presença e ausência de β -ciclodextrina ($10^{-4} \text{mol L}^{-1}$) em diferentes condições: pH 3,0; água pura e pH 9,3. $\lambda_{\text{exc}} = 332 \text{nm}$ (pH 3,0 e água pura); $\lambda_{\text{exc}} = 378 \text{nm}$ (pH 9,3).....	95
Figura 33. Aspecto visual dos extratos obtidos a partir dos métodos adaptados. M1: clorofórmio como solvente de extração; M2: acetato de etila como solvente de extração	97
Figura 34. EEMs dos extratos de amostras de vinho fortificadas ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) e não fortificadas obtidas a partir dos métodos M1 e M2	99
Figura 35. Comparação dos espectros de fluorescência convencional ($\lambda_{\text{exc}} = 378 \text{nm}$) representada pela emissão e sincronizada ($\Delta\lambda = 61 \text{nm}$) representada pela excitação, obtidos a partir de extratos de amostras de vinho fortificada ($20 \mu\text{g L}^{-1}$)	100
Figura 36. Espectros de fluorescência sincronizada obtidos para vinho fortificado, vinho não fortificado e extrato fortificado ($20 \mu\text{g L}^{-1}$), empregando clorofórmio como solvente de extração.....	101
Figura 37. Espectros de fluorescência sincronizada obtidos para vinho fortificado, vinho não fortificado e extrato fortificado ($20 \mu\text{g L}^{-1}$), empregando diclorometano como solvente de extração.....	102
Figura 38. Comparação dos espectros de fluorescência sincronizada de amostras de vinho não fortificadas, obtidos com diferentes solventes de extração	103
Figura 39. Comparação entre as intensidades de fluorescência da ocratoxina A, dos compostos interferentes presentes no vinho e da eficiência de extração utilizando	

clorofórmio ou diclorometano como solventes de extração	104
Figura 40. Espectros sincronizados da ocratoxina A ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) obtidos em diferentes proporções molares de β -ciclodextrina ($[\beta\text{-CD}]/[\text{OTA}]$) no extrato de vinho.....	105
Figura 41. Variação da intensidade máxima de fluorescência da ocratoxina A ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) em função da razão molar $[\beta\text{-CD}]/[\text{OTA}]$	106
Figura 42. Comparação dos espectros sincronizados da ocratoxina A na concentração alvo ($2,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e da amostra branco obtidos com diferentes aberturas de fenda nos monocromadores ($10 \text{ nm}/10 \text{ nm}$ e $10 \text{ nm}/5 \text{ nm}$).....	107
Figura 43. Comparação dos espectros sincronizados da ocratoxina A na concentração alvo ($2,0 \mu\text{g L}^{-1}$) obtidos a partir de diferentes volumes de amostra de vinho	108
Figura 44. Comparação dos espectros sincronizados da ocratoxina A na concentração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ em vinho e da amostra branco	109
Figura 45. Curva de calibração da ocratoxina A em tampão pH 9,3 com adição de β -ciclodextrina ($1,98 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	110
Figura 46. Comparação entre a curva no solvente e a curva matrizada para avaliação do efeito de matriz ($n = 3$) na determinação de ocratoxina A	111
Figura 47. Espectros sincronizados obtidos para amostras de vinho analisadas pelo método validado	114
Figura 48. Diferentes estilos de hidromel	115
Figura 49. Fórmula estrutural do 5-hidroximetilfurfural	116
Figura 50. EEM obtidas para as amostras de hidromel analisadas	127
Figura 51. Espectros puros gerados pelo modelo PARAFAC representando os modos de excitação e emissão	127
Figura 52. Gráfico da soma dos quadrados dos resíduos das amostras de hidromel para avaliação de outliers	128
Figura 53. Correlação de Pearson entre a concentração de HMF e os escores do modelo PARAFAC.....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características de alguns tipos de malte.....	43
Tabela 2. Propriedades físico-químicas do benzo[a]pireno.....	47
Tabela 3. Publicações sobre métodos de análise de benzo[a]pireno em malte e derivados	48
Tabela 4. Níveis testados no planejamento fatorial.....	53
Tabela 5. Delineamento experimental do planejamento fatorial.....	54
Tabela 6: Figuras de mérito de validação do método de determinação de benzo[a]pireno em malte.....	71
Tabela 7. Comparação entre o método de referência e o proposto	72
Tabela 8. Propriedades físico-químicas da ocratoxina A	80
Tabela 9: Publicações recentes sobre métodos de análise de ocratoxina A em vinhos... ..	83
Tabela 10. Comprimentos de onda máximos para a ocratoxina A na presença e ausência de β -ciclodextrina sob diferentes valores de pH.....	96
Tabela 11. Figuras de mérito de validação do método de determinação de ocratoxina A em vinho	112
Tabela 12. Características experimentais do método desenvolvido para a determinação de ocratoxina A em vinho	113
Tabela 13. Propriedades físico-químicas do 5-hidroxiacetilfurfural	120
Tabela 14. Descrição dos etilos de hidromel analisados.....	122
Tabela 15. Parâmetros de ajuste do modelo PARAFAC obtidos por diferentes números de componentes	125
Tabela 16. Valores de escores fornecidos pelo modelo PARAFAC e concentrações de referência de 5-hidroxiacetilfurfural nas amostras analisadas.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectroscopia de Absorção Atômica, do inglês <i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Químicos Analistas Oficiais, do inglês <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
B[a]P	Benzo[a]pireno
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês <i>Dispersive Liquid Liquid Microextraction</i>
DMSO	Dimetilssulfóxido
d- μ SPE	Microextração dispersiva em fase sólida, do inglês <i>Dispersive micro-solid phase extraction</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
EBC	Convenção de Cervejeiros da Europa. do inglês <i>European Brewery Convention</i>
EEM	Matriz de Excitação e Emissão, do inglês <i>Excitation-Emission Matrix</i>
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, do inglês <i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima, do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EPA	Agência de Proteção Ambiental, do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>
EC	Comissão da União Europeia, do inglês <i>European Commission</i>
FID	Detector de chamas, do inglês <i>Flame Ionization Detector</i>
FLD	Detector de Fluorescência, do inglês <i>Fluorescence detector</i>
HOMO	Orbital molecular de maior energia, do inglês <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HMF	5-Hidroximetilfurfural
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IARC	Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer, do inglês, <i>International Agency on Research on Cancer</i>
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
JECFA	Comitê Conjunto de Especialistas sobre Aditivos Alimentares, do inglês, <i>Joint Expert Committee on Food Additives</i>

LD	Limite de Detecção
LFIA	Teste de fluxo lateral, do inglês, <i>Lateral Flow Immunoassay</i>
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês <i>Liquid Liquid Extraction</i>
LQ	Limite de Quantificação
LUMO	Orbital molecular de menor energia, do inglês <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de Massas em tandem, do inglês, <i>Tandem Mass Spectrometry</i>
OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B
OTC	Ocratoxina C
PARAFAC	Análise de Fatores Paralelos, do inglês <i>Parallel Factor Analysis</i>
PLE	Extração líquida pressurizada, do inglês <i>Pressurized Liquid Extraction</i>
QuEChERS	Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro, do inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged, and Safe</i>
SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
UHPLC	Cromatografia Líquida de Alta e Ultra Eficiência, do inglês <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>
UV-Vis	Ultravioleta e Visível
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês, <i>World Health Organization</i>
β-CD	β-ciclodextrina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1. Espectroscopia de fluorescência.....	23
3.1.1. <i>Fundamentos teóricos.....</i>	23
3.1.2. <i>Modos de aquisição de dados.....</i>	29
3.2. Contaminantes em alimentos	33
3.2.1. <i>Análise de contaminantes.....</i>	34
3.2.2. <i>Fluorescência aplicada à análise de alimentos</i>	35
3.2.2.1. <i>Modificação química e supramolecular</i>	37
3.2.2.2. <i>Análise multivariada.....</i>	39
4. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE BENZO[A]PIRENO EM MALTE.....	41
4.1. Aspectos gerais.....	41
4.1.1. <i>Malte.....</i>	41
4.1.2. <i>Contaminação de malte</i>	44
4.1.3. <i>Benzo[a]pireno em malte</i>	45
4.1.4. <i>Métodos de análise de benzo[a]pireno em malte</i>	47
4.2. Materiais e reagentes	48
4.3. Equipamentos e softwares	49
4.4. Metodologia	49
4.4.1. <i>Preparo da solução estoque do analito.....</i>	49
4.4.2. <i>Avaliação do espectro de fluorescência sincronizada do extrato de malte</i>	49

4.4.3. Avaliação da eficiência da extração de benzo[a]pireno.....	51
4.4.4. Avaliação da influência da água na detecção de benzo[a]pireno no extrato de malte.....	52
4.4.5. Avaliação da intensidade do aquecimento na eficiência da extração de benzo[a]pireno.....	52
4.4.6. Avaliação da detecção de benzo[a]pireno em extrato de malte obtido sem aquecimento.....	52
4.4.7. Otimização de parâmetros da extração por planejamento fatorial.....	53
4.4.8. Avaliação da extração na concentração alvo de benzo[a]pireno.....	54
4.4.9. Avaliação da viabilidade do método para massas superiores de malte.....	54
4.4.10. Detecção de benzo[a]pireno na concentração alvo.....	55
4.4.11. Validação analítica.....	55
4.5. Resultados e discussão.....	56
4.5.1. Avaliação do espectro de fluorescência sincronizada do extrato de malte	56
4.5.2. Avaliação da eficiência da extração de benzo[a]pireno.....	58
4.5.3. Avaliação da influência da água na detecção de benzo[a]pireno no extrato de malte.....	59
4.5.4. Avaliação da intensidade do aquecimento na eficiência da extração de benzo[a]pireno.....	60
4.5.5. Avaliação da detecção de benzo[a]pireno em extrato de malte obtido sem aquecimento.....	61
4.5.6. Otimização de parâmetros da extração por planejamento fatorial.....	62
4.5.7. Avaliação da extração na concentração alvo de benzo[a]pireno.....	64
4.5.8. Avaliação da viabilidade do método para massas superiores de malte.....	64
4.5.9. Detecção de benzo[a]pireno na concentração alvo.....	65
4.5.10 Validação analítica.....	67
4.5.11 Aplicação do método validado.....	72
4.6. Conclusões.....	74
5. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM VINHO.....	75
5.1. Aspectos gerais.....	75

5.1.1. Vinho	75
5.1.2. Contaminação de vinho	77
5.1.3. Ocratoxina A em vinho.....	78
5.1.4. Métodos de análise de ocratoxina A em vinho	82
5.2. Materiais e reagentes	84
5.3. Equipamentos e softwares	84
5.4. Metodologia	84
5.4.1. Preparo das soluções	84
5.4.2. Avaliação da influência do pH na superfície espectral de fluorescência da ocratoxina A.....	85
5.4.3. Avaliação da influência da β -ciclodextrina na superfície espectral de fluorescência da ocratoxina A.....	85
5.4.4. Avaliação da extração da ocratoxina A	85
5.4.5. Avaliação da eficiência da extração da ocratoxina A por fluorescência sincronizada	86
5.4.6. Avaliação do efeito do solvente na eficiência da extração da ocratoxina A ...	87
5.4.7. Avaliação da influência da proporção molar de β -ciclodextrina e ocratoxina A no extrato vinho	88
5.4.8. Avaliação da extração na concentração alvo de ocratoxina A.....	88
5.4.9. Detecção de ocratoxina A em concentração inferior ao alvo	89
5.4.10. Validação analítica.....	89
5.5. Resultados e discussão.....	90
5.5.1. Avaliação da influência do pH na superfície espectral de fluorescência da ocratoxina A.....	90
5.5.2. Avaliação da influência da β -ciclodextrina na superfície espectral de fluorescência da ocratoxina A.....	92
5.5.3. Avaliação da extração da ocratoxina A	96
5.5.4. Avaliação da eficiência da extração da ocratoxina A por fluorescência sincronizada	100
5.5.5. Avaliação do efeito do solvente na eficiência da extração da ocratoxina A ...	101
5.5.6. Avaliação da influência da proporção molar de β -ciclodextrina e ocratoxina A no extrato vinho	104

5.5.7. Determinação de ocratoxina A na concentração alvo	107
5.5.8. Detecção de ocratoxina A em concentração inferior à concentração alvo.....	109
5.5.9. Validação analítica.....	109
5.5.10. Aplicação do método validado	114
5.6. Conclusões.....	115
6. ANÁLISE EXPLORATÓRIA MULTIVARIADA DE 5-HIDROXIMETILURFURAL EM HIDROMEL.....	116
6.1. Aspectos gerais.....	116
6.1.1. Hidromel	116
6.1.2. Contaminação de hidromel.....	118
6.1.3. 5-Hidroximetilfurfural em hidromel.....	119
6.1.4. Métodos de análise de 5-Hidroximetilfurfural em hidromel.....	121
6.2. Materiais e reagentes	122
6.3. Equipamentos e softwares	122
6.4. Metodologia	122
6.4.1. Análise das amostras de hidromel	122
6.4.2. Construção do modelo PARAFAC	123
6.5. Resultados e discussão.....	123
6.5.1. Modelo PARAFAC.....	124
6.5.2. Análise de correlação.....	129
6.6. Conclusões.....	132
7. CONCLUSÕES GERAIS	133
REFERÊNCIAS	134
APÊNDICE A – MODELO ESTATÍSTICO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	145

1. INTRODUÇÃO

A alimentação é uma necessidade básica para a existência humana. Por este processo, assimilam-se nutrientes responsáveis por funções vitais, como o crescimento, o movimento, a reprodução e a manutenção do organismo.

O crescimento contínuo da população global, aliado ao avanço das tecnologias modernas, tem impactado significativamente a estrutura do sistema alimentar. A integração científica na indústria de alimentos possibilita maior capacidade de prevenção, rastreabilidade e resposta às exigências de segurança alimentar, contribuindo para uma cadeia de abastecimento mais segura e eficiente. Entretanto, é crucial reconhecer que, paralelamente a esses avanços, emergem potenciais riscos. Resíduos de pesticidas, o uso indiscriminado de antibióticos (que favorecem a resistência bacteriana) e a contaminação acidental durante o processamento industrial representam preocupações relevantes. Além disso, a introdução de novos aditivos, conservantes e organismos geneticamente modificados pode estar associada à presença de toxinas ou à indução de reações alérgicas. As mudanças climáticas e o surgimento de novas enfermidades também têm o potencial de modificar os padrões de produção e processamento de alimentos, exigindo a utilização de substâncias ou tratamentos cujos efeitos adversos ainda não são plenamente conhecidos (Valoppi *et al*, 2021).

Neste contexto, a análise de alimentos configura-se como um campo de estudo essencial para a avaliação da qualidade dos produtos alimentícios. Por meio da verificação de características físicas, químicas, biológicas e toxicológicas, torna-se possível regulamentar práticas de controle de qualidade, autenticar produtos, determinar informações nutricionais, verificar prazos de validade, detectar contaminantes, entre outras aplicações fundamentais (Medana, 2021).

O estudo de substâncias tóxicas presentes em alimentos, sejam elas de origem natural ou sintética, é desafiador devido à elevada variabilidade dos compostos envolvidos, o que demanda o desenvolvimento de métodos analíticos específicos para cada circunstância. Considerando que os alimentos são matrizes complexas, isolar o contaminante sem interferência na análise representa uma dificuldade técnica considerável. Além do mais, esses compostos estão frequentemente presentes em concentrações extremamente baixas, na ordem de partes por milhão, partes por bilhão

ou partes por trilhão, muitas vezes próximas aos limites de detecção das técnicas analíticas. Isso exige o emprego de métodos com elevada capacidade de pré-concentração, etapas eficazes de purificação (*cleanup*) e instrumentação sofisticada (Rovina, 2020).

As principais técnicas analíticas empregadas na análise de contaminantes em alimentos são a cromatografia líquida de alta e ultra eficiência (*High and Ultra High Performance Liquid Chromatography* - HPLC e UHPLC), cromatografia gasosa (*Gas Chromatography* - GC), espectrometria de massas (*Mass Spectrometry* - MS), a espectroscopia de absorção atômica (*Atomic Absorption Spectroscopy* - AAS) e a espectroscopia molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) (Rodriguez *et al*, 2020).

A espectroscopia de fluorescência molecular, ou espectrofluorimetria, é uma técnica analítica versátil que pode auxiliar cientistas e fabricantes na garantia da qualidade e segurança dos alimentos. Embora a fluorescência seja comumente utilizada como detector na instrumentação de HPLC-FLD (*Fluorescence detector*), a análise direta com o espectrofluorímetro representa uma alternativa viável para a análise de alimentos. Apesar de a cromatografia ser altamente eficiente na separação de misturas, há situações em que a análise direta por fluorescência se mostra vantajosa devido à sua simplicidade, rapidez, sensibilidade e seletividade (Sirorska, 2019).

A natureza dos dados espectrais fornecidos pela fluorescência permite que sejam realizados tratamentos quimiométricos como a Análise de fatores paralelos (*Parallel factor analysis* – PARAFAC), medições multidimensionais por *fingerprint* e escaneamento no modo sincronizado. Estas manipulações visam superar as limitações inerentes à técnica, aprimorando a análise (Sirorska, 2016).

O interesse na aplicação da espectroscopia de fluorescência na ciência dos alimentos tem crescido nas últimas décadas. A investigação de poluentes emergentes e prioritários tem evidenciado que os seres humanos estão, invariavelmente, expostos a compostos associados à progressão de diversas doenças. O benzo[a]pireno, a ocratoxina A e o hidroximetilfurfural são substâncias fluorescentes altamente tóxicas, o que reforça a importância do monitoramento de contaminantes ambientais. Governos e agências regulatórias estabelecem limites de exposição a essas substâncias, que podem atingir os seres humanos por meio da alimentação (Clément *et al.*, 2017). Com esta perspectiva, destaca-se a necessidade de estabelecer e

atualizar diretrizes, normas e pesquisas voltadas ao estudo da incidência desses compostos químicos na dieta.

O cerne deste presente trabalho é o desenvolvimento de métodos mais simples e acessíveis em comparação a outros procedimentos bem estabelecidos na literatura científica, que possam ser executados em menor tempo e com um menor consumo de solventes orgânicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral desta tese foi desenvolver métodos analíticos utilizando espectroscopia de fluorescência direta com simplificação do preparo de amostras para a determinação de contaminantes em matrizes alimentares, atendendo as legislações para diferentes compostos.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Desenvolver o preparo de amostra para a determinação de benzo[a]pireno em malte de cevada, otimizar a análise por espectroscopia de fluorescência sincronizada e avaliar parâmetros de desempenho analítico para validação quantitativa.
- Desenvolver o preparo de amostra para a determinação de ocratoxina A em vinho, otimizar a análise por espectroscopia de fluorescência sincronizada e avaliar parâmetros de desempenho analítico para validação quantitativa.
- Realizar a análise exploratória da presença de 5-hidroximetilfurfural em hidromel por PARAFAC.

3. CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Espectroscopia de Fluorescência

3.1.1 Fundamentos teóricos

A espectroscopia é o estudo da interação da radiação com a matéria. As regiões do espectro eletromagnético denominadas ultravioleta (200 a 400 nm) e visível (400 a 750 nm) normalmente são unificadas como uma única categoria, considerando o comportamento observado nos compostos que são expostos a estas faixas de radiação (Lacowicz, 2006).

Quando uma molécula absorve um fóton do UV-Vis, a molécula é elevada do seu estado fundamental de energia para um estado eletrônico excitado. Este fenômeno é caracterizado como transição eletrônica e consiste no deslocamento de um elétron entre os orbitais HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital* - Orbital ocupado de energia mais alta) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital* - Orbital ocupado de energia menos baixa) de uma molécula. Em geral, HOMO e LUMO são respectivamente os orbitais π e π^* de um grupo funcional contendo ligações duplas conjugadas. A diferença de energia entre estes orbitais corresponde à energia que deve ser absorvida pela molécula para que ocorra a transição. A quantificação desta energia é descrita pela equação de Planck:

$$E = h\nu \quad \text{ou} \quad E = hc/\lambda \quad (1)$$

A energia (E) de um fóton é proporcional à sua frequência (ν) pelo fator constante de Planck ($h = 6,6 \cdot 10^{-34}$ J s) ou inversamente proporcional ao seu comprimento de onda (λ), onde c é a velocidade da luz. Ou seja, quanto menor for a diferença de energia entre HOMO e LUMO, maior será o comprimento de onda absorvido. A magnitude desta energia é determinada principalmente pela extensão do sistema conjugado: o aumento da conjugação indica uma menor energia. Os grupos funcionais adjacentes às ligações duplas também influenciam no espaçamento entre os orbitais (Lacowicz, 2006).

O comprimento de onda que é mais intensamente absorvido por uma substância é o λ máximo ($\lambda_{\text{máx}}$), medido pela espectroscopia de absorção no UV-Vis.

Nesta técnica, o espectro exibe bandas de absorção que abrangem uma ampla faixa de comprimentos de onda. Este perfil é a resultante de um agrupamento de picos, sendo os comprimentos muito próximos que por meio da excitação, realizam simultaneamente transições eletrônicas e vibracionais. Os grupos funcionais responsáveis pela absorção são os cromóforos (Karoui, 2018).

A espectroscopia de fluorescência ou espectrofluorimetria é uma técnica complementar à absorção. Envolve os mesmos orbitais mencionados, mas é subsequente de um estado excitado que emite um fóton de energia mais baixa em relação ao absorvido. A variação de energia entre a absorção e a emissão é justificada pela organização dos estados, de forma que um único nível eletrônico contém múltiplos subníveis vibracionais nos quais estão contidos subníveis rotacionais. Em uma transição eletrônica, há energia suficiente para que ocorra simultaneamente transições vibracionais e rotacionais (Valeur, 2012).

Quando a molécula absorve radiação do ultravioleta ou do visível, o elétron desloca-se do HOMO (estado eletrônico fundamental) para o LUMO (primeiro estado eletrônico excitado) em um subnível vibracional excitado. A molécula estará suscetível à relaxação vibracional, perdendo de forma não-radiativa (sem emissão de um fóton) parte da energia acumulada, direcionando-se ao subnível vibracional menos energético do estado eletrônico excitado (Valeur, 2012)

Esta dissipação é provocada principalmente pela colisão com moléculas vizinhas. A partir desta condição, três eventos se tornam mais prováveis: a ocorrência de uma reação fotoquímica, o retorno ao estado eletrônico fundamental pela emissão de energia na forma de calor ou o decaimento radiativo da molécula pela emissão de um fóton. Este último define a fluorescência. O fóton emitido espontaneamente possui menor energia (maior comprimento de onda) em relação ao fóton absorvido. O diagrama de Jablonski ilustrado na **Figura 1** descreve estes processos.

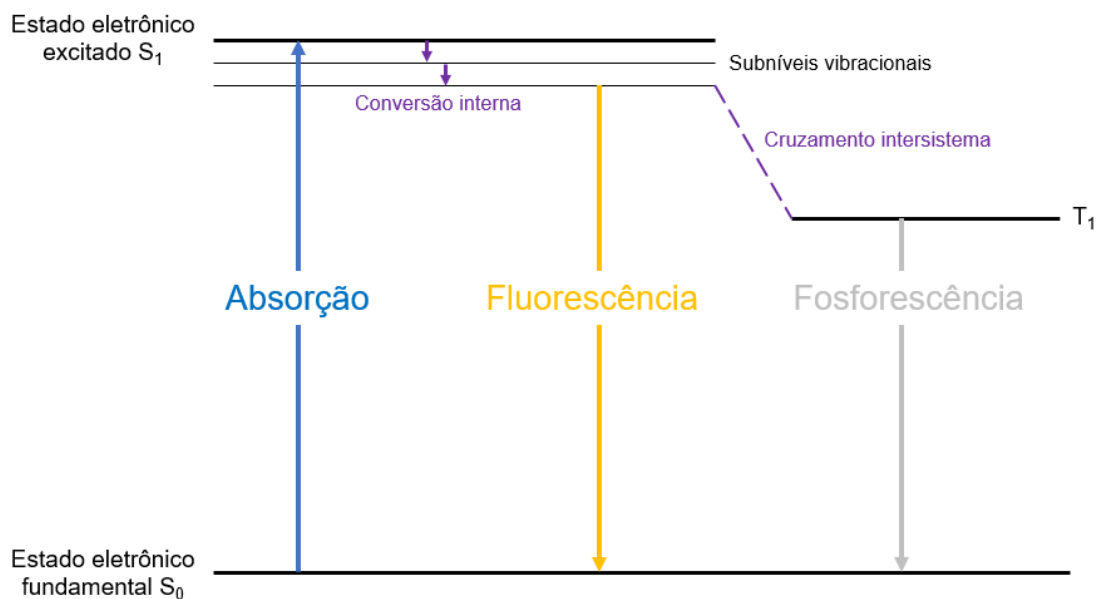


Figura 1. Diagrama de Jablonski. Fonte: Adaptado de Lalowicz, 2006.

O espectro produzido indica a intensidade da emissão por fluorescência em função do comprimento de onda (nm). Este perfil é aproximadamente a imagem refletida do espectro de absorção. A substância capaz de produzir fluorescência no meio analisado é o fluoróforo (Lacowicz, 2006).

O processo de desativação, que faz uma molécula excitada retornar ao seu estado fundamental pela dissipação da energia absorvida, engloba um conjunto de fenômenos radiativos (emissão por fluorescência) e não-radiativos que competem cineticamente. Portanto, as formas de reduzir as probabilidades de eventos indesejados ocorrerem devem ser consideradas. A regra de Kasha descreve um princípio fundamental de fluorescência. Ela determina que enquanto a energia de excitação específica determina como a molécula é excitada, a emissão de fluorescência depende somente da diferença de energia entre o estado fundamental e o estado vibracional mais baixo do estado excitado. Devido à relaxação vibracional, a emissão é tipicamente independente da excitação específica, desde que resulte na relaxação para o nível vibracional mais baixo do estado excitado (Lacowicz, 2006).

O índice da eficiência da fluorescência está associado ao rendimento quântico (ϕ), constante que relaciona o número de moléculas fluorescentes (FL) ao número total de moléculas que foram excitadas (EXC):

$$\phi = \frac{FL}{EXC} \quad (2)$$

A equação pode ser reescrita em aspectos cinéticos e o denominador corresponde ao somatório de todos os processos de desativação:

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ce} + k_{ci} + k_d} \quad (3)$$

Onde:

k_f = constante da emissão por fluorescência

k_i = constante de conversão intersistema

k_{ce} = constante de conversão externa

k_{ci} = constante de conversão interna

k_d = constante de dissociação

A intensidade da emissão por fluorescência é função de diversas variáveis que podem ser moduladas e otimizadas, sendo as principais: a estrutura molecular do fluoróforo, a concentração, o solvente, o pH, a temperatura, a viscosidade, o potencial elétrico e a presença de agentes supressores (Lacowicz, 2006).

A fluorescência é proficiente em substâncias que possuem alta capacidade de transferência eletrônica intramolecular, ou seja, elétrons desemparelhados em ligações duplas conjugadas. A emissão mais intensa e útil é encontrada em compostos aromáticos, sendo que o rendimento quântico aumenta com o número de anéis e o grau de condensação. Moléculas alifáticas contendo o grupo carbonila ou ligações duplas altamente conjugadas também fluorescem em menor intensidade (Lacowicz, 2006).

Estruturas rígidas favorecem a fluorescência por possuírem maior coeficiente de absorção molar, de forma que moléculas mais flexíveis (baixa conjugação) tendem a dissipar mais energia por meio de vibrações. A flexibilidade aumenta a constante de conversão interna, induzindo a desativação não-radiativa. Algumas espécies

inorgânicas como complexos metálicos e íons de terras raras também exibem fluorescência sob determinadas condições.

A relação quantitativa entre a concentração do fluoróforo e a intensidade da fluorescência pode ser racionalizada ao observarmos a equação 2, onde a intensidade da emissão por fluorescência (I_{FL}) é proporcional à intensidade do feixe de radiação que a molécula do analito absorve (I_{EXC}):

$$I_{FL} = \phi I_{EXC} \quad (4)$$

O índice de absorção é a diferença entre a intensidade do feixe incidente e a intensidade após atravessar uma distância b do meio, então:

$$I_{FL} = \phi(I_0 - I) \quad (5)$$

A Lei de Beer-Lambert estabelece a relação entre a concentração do analito (c) e a intensidade da radiação absorvida

$$A = \varepsilon bc \quad \text{ou} \quad \frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon bc} \quad (6)$$

Onde ε é a absorvidade molar característica da molécula absorvente. Combinando a equação 6 com a equação 5, temos a equação 7:

$$I_{FL} = \phi I_0 (1 - 10^{-\varepsilon bc}) \quad (7)$$

Considerando que na solução contendo o analito haja uma perda mínima da intensidade da radiação por espalhamento, esta igualdade pode ser expandida como uma série de McLaurin, sendo escrita como:

$$I_{FL} = \phi I_0 \left[2,303 \varepsilon bc - \frac{(2,303 \varepsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2,303 \varepsilon bc)^3}{3!} + \dots \right] \quad (8)$$

Para sistemas de baixa concentração ($\varepsilon bc < 0,05$) apenas o primeiro termo é relevante, obtendo-se:

$$I_{FL} = \phi I_0 [2,303 \epsilon b c] \quad \text{ou} \quad F = k c \quad (9)$$

Logo, para um sistema de caminho óptico fixo e cuja concentração obedeça a tais condições, a fluorescência (F) é diretamente proporcional à concentração do fluoróforo. Eventuais desvios da linearidade podem ser atribuídos às concentrações elevadas, auto-supressão e auto-absorção.

A alta sensibilidade da espectrofluorimetria é justificada pela forma distinta que o fenômeno é medido em relação à absorbância. A absorção é medida pela diferença entre a luz que atravessa a solução de referência e a amostra estudada. A intensidade da fluorescência é medida diretamente, sem que haja a comparação com algum feixe de referência. A detecção de luz, mesmo em níveis baixíssimos é relativamente mais fácil quando realizada sob um fundo escuro, que é o caso da fluorescência. Os impulsos eletrônicos devido aos fótons são mensuráveis pela maior parte de tubos fotomultiplicadores o que garante uma grande vantagem à técnica, sendo capaz de quantificar analitos presentes em concentrações da ordem de partes por bilhão ($\mu\text{g kg}^{-1}$ ou $\mu\text{g L}^{-1}$), indicando uma sensibilidade de 10 a 1000 maior que a absorção no UV-Vis (Valeur, 2012).

A seletividade é garantida pelo fato de que moléculas são fluorescentes sob comprimentos de onda de excitação e de emissão característicos, sendo resultado do tamanho, distribuição eletrônica, carga, hidrofobicidade e outras grandezas. Esta especificidade auxilia a detecção de fluoróforos diante de outras substâncias presentes em matrizes complexas (Valeur, 2012)

3.1.2 Modos de aquisição de dados

O espectrofluorímetro é o instrumento medidor da fluorescência. Os seus componentes são bastante semelhantes ao espectrofotômetro do UV-Vis, mas a fonte de radiação deve ser mais energética que a usada na absorção, pois a excitação deve ocorrer em comprimentos de onda inferiores. As fontes empregadas são lâmpadas de xenônio ou mercúrio e lasers. Um monocromador é usado para selecionar o comprimento de onda de excitação. A fluorescência é registrada perpendicularmente ao feixe incidente, sendo a radiação detectada em um monocromador de emissão por

um fotomultiplicador. A varredura nos comprimentos de onda é realizada automaticamente pelos dispositivos eletrônicos que controlam os monocromadores e pelo computador, onde os dados são armazenados. O módulo ótico é um compartimento que contém a porta amostra, as fendas, polarizadores e espalhador de feixe para fotodiodos que convertem luz em corrente elétrica. A fonte de radiação é posicionada a 90° em relação ao detector para que a radiação transmitida pela amostra não seja registrada junto da emissão, que ocorre espontaneamente em todas as direções. A **Figura 2** ilustra a esquematização básica de um fluorímetro (Valeur, 2012).

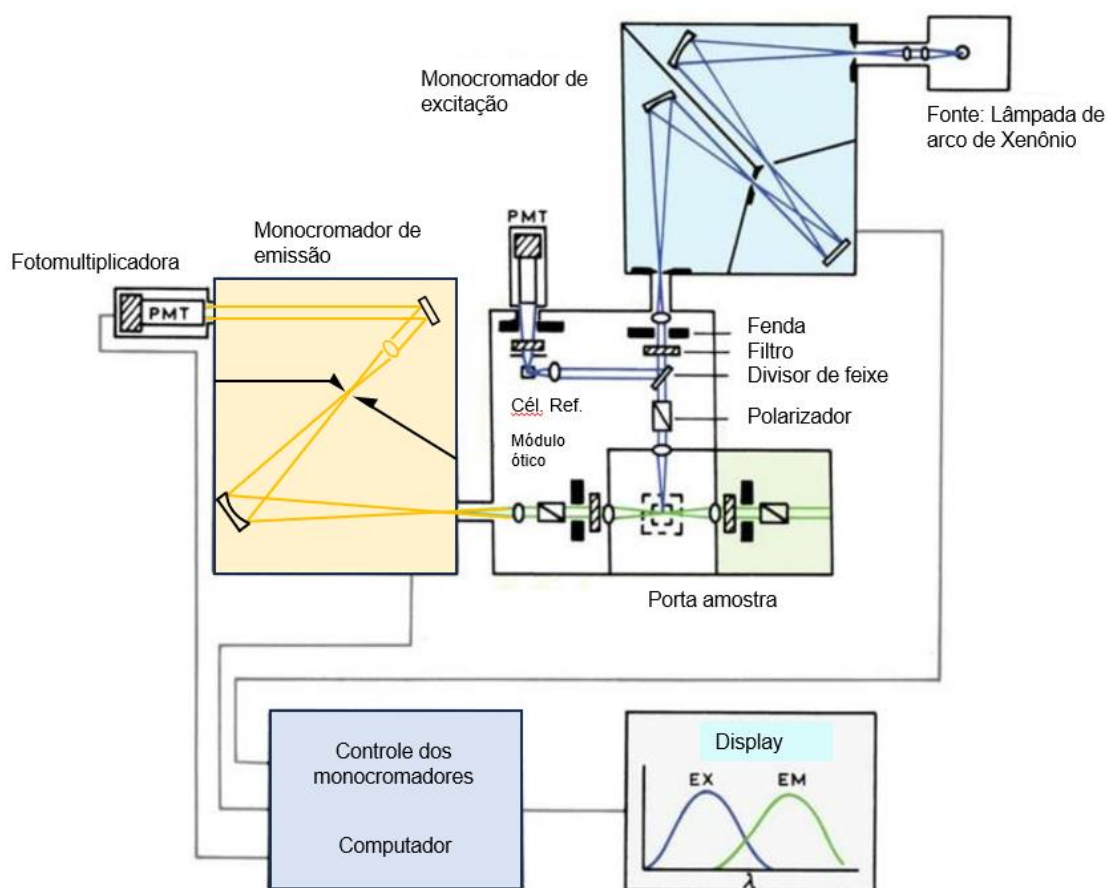


Figura 2. Esquematização de um espectrofluorímetro. Fonte: Adaptado de Lacowicz, 2006.

A HPLC-FLD é outra técnica avançada para medir fluorescência, que combina a separação de compostos por cromatografia com a detecção de fluorescência. Diferentemente da medição direta de fluorescência realizada com um espectrofluorômetro, onde a fluorescência de uma amostra é medida como um todo, o HPLC-FLD permite a separação de misturas antes de detectar os compostos

fluorescentes individualmente. Essa combinação possibilita a quantificação altamente específica de compostos fluorescentes em concentrações baixas, mesmo em amostras complexas. A abordagem de espectroscopia de fluorescência adotada neste trabalho é a análise direta utilizando espectrofluorímetro, também conhecida como espectrofluorimetria. Esta metodologia oferece diversas vantagens, como menor complexidade no preparo da amostra, instrumentação mais simples, redução no tempo de obtenção dos resultados e menor custo, especialmente quando se considera o uso de colunas cromatográficas e o consumo de solventes. Além disso, a análise geralmente é não destrutiva, permitindo a reutilização da amostra após a medição (Valeur, 2012).

Na análise direta por fluorescência, o modo de aquisição de dados é escolhido de acordo com o tipo de amostra e nas informações desejadas sobre os fenômenos de fluorescência. A medição convencional é obtida quando a amostra é excitada por uma luz de comprimento de onda específico. A fluorescência emitida pela amostra é então medida em diferentes comprimentos de onda, para criar um espectro de emissão (**Figura 3**). O respectivo espectro de excitação é estruturado de forma análoga, mantendo-se um comprimento de emissão fixo, sob o qual é feita a varredura para determinados intervalos de comprimentos de onda de excitação (Valeur, 2012).

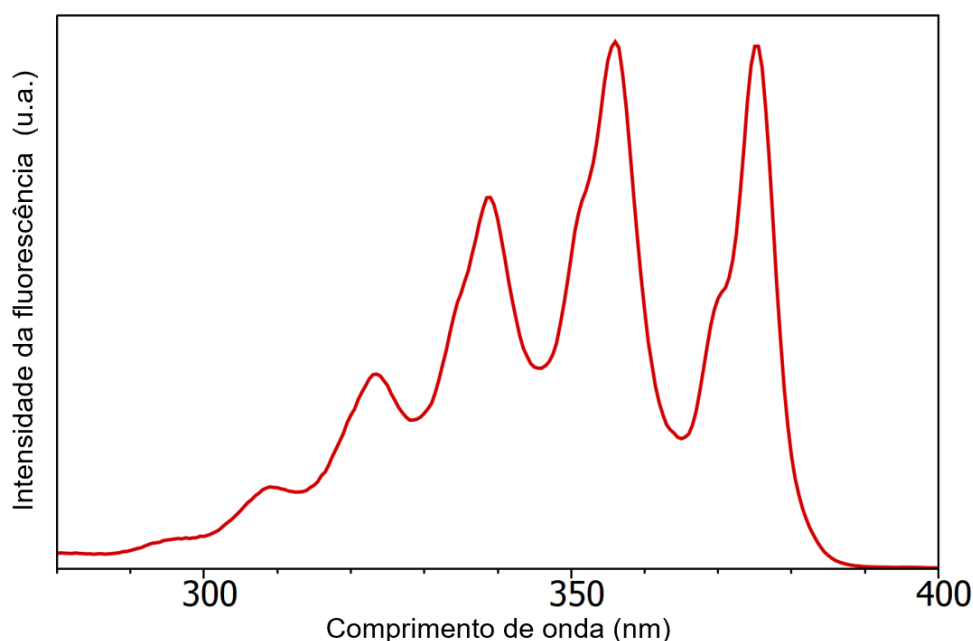


Figura 3. Espectro de emissão convencional do antraceno em ciclohexano. Fonte: Adaptado de Valeur, 2012.

A espectroscopia de fluorescência convencional apresenta limitações na análise de amostras multicomponentes devido à possível sobreposição das bandas nos espectros de excitação e emissão. A espectroscopia de fluorescência sincronizada é uma técnica que aprimora a detecção desses compostos, proporcionando maior resolução espectral. Essa configuração instrumental é baseada na varredura simultânea dos monocromadores de excitação e emissão. Um dos modos dessa configuração é a fluorescência sincronizada a comprimento de onda constante, na qual uma variação do comprimento de onda (nm) ou número de onda (cm^{-1}) é mantida fixa entre os monocromadores durante toda a varredura. Dessa forma, obtém-se um espectro que evidencia as transições eletrônicas geradas por esse valor específico de $\Delta\lambda$, tornando a fluorescência mais seletiva. Este processo reduz a complexidade espectral, estreitando as bandas e minimizando a interferência causada pelo espalhamento da luz. É conveniente que o valor de $\Delta\lambda$ selecionado corresponda ao deslocamento Stokes do fluoróforo, ou seja, à diferença entre os comprimentos de onda máximos de emissão e excitação (**Figura 4**) (Pacheco & Bruzzone, 2013).

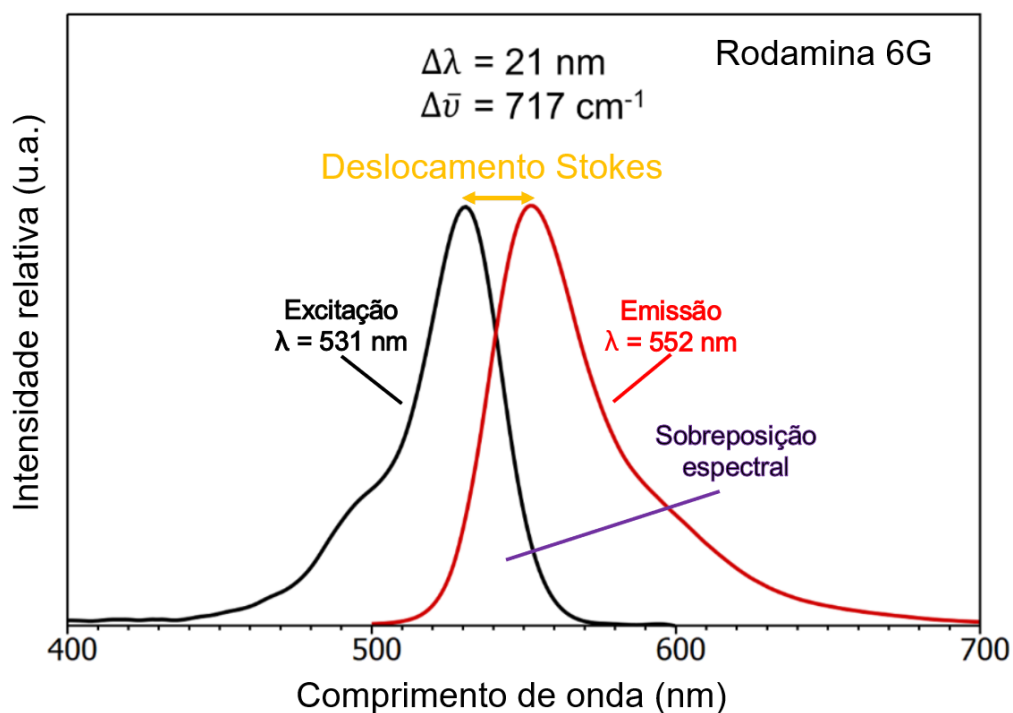


Figura 4. Espectros de excitação e emissão da rodamina 6G, destacando-se o deslocamento de Stokes. Fonte: Adaptado de Valeur, 2012.

A relação que representa a equação da fluorescência sincronizada é:

$$I_S(\lambda, \lambda') = kcbE_X(\lambda')E_M(\lambda) \quad (10)$$

Onde I_S é a intensidade da luminescência sincronizada, λ e λ' são os comprimentos de emissão e excitação, respectivamente, o fator k é uma constante, b é o caminho ótico da cubeta, c é a concentração do analito e E_X e E_M são as intensidades máximas dos espectros de excitação e emissão, respectivamente. Logo, na técnica sincronizada, a expressão da intensidade é uma função de λ e λ' . O aprimoramento da sensibilidade é refletido nesta equação que envolve duas funções ao invés de uma única no método de fluorescência convencional. A alteração da seletividade é introduzida pelo parâmetro $\Delta\lambda$ a ser selecionado (Pacheco & Bruzzone, 2013).

Considerando as limitações da análise convencional na avaliação de amostras contendo múltiplos fluoróforos, as técnicas multidimensionais de medição também podem ser utilizadas (Huang *et al.*, 2025; Geng *et al.*, 2024). Nesses sistemas, é adequado obter um conjunto de espectros de emissão gerados individualmente por diferentes comprimentos de onda de excitação. Dessa forma, obtém-se uma visão completa da fluorescência proveniente de uma faixa específica de comprimentos de onda de excitação, formando uma superfície espectral conhecida como matriz de emissão e excitação (*Excitation-Emission Matrix* - EEM). O mapa de contorno resultante (**Figura 5**) constitui um *fingerprint* exclusivo da amostra analisada (Fang *et al.*, 2021). A análise dos dados da EEM é aprimorada quando associada a algoritmos avançados de análise multivariada que serão discutidos posteriormente.

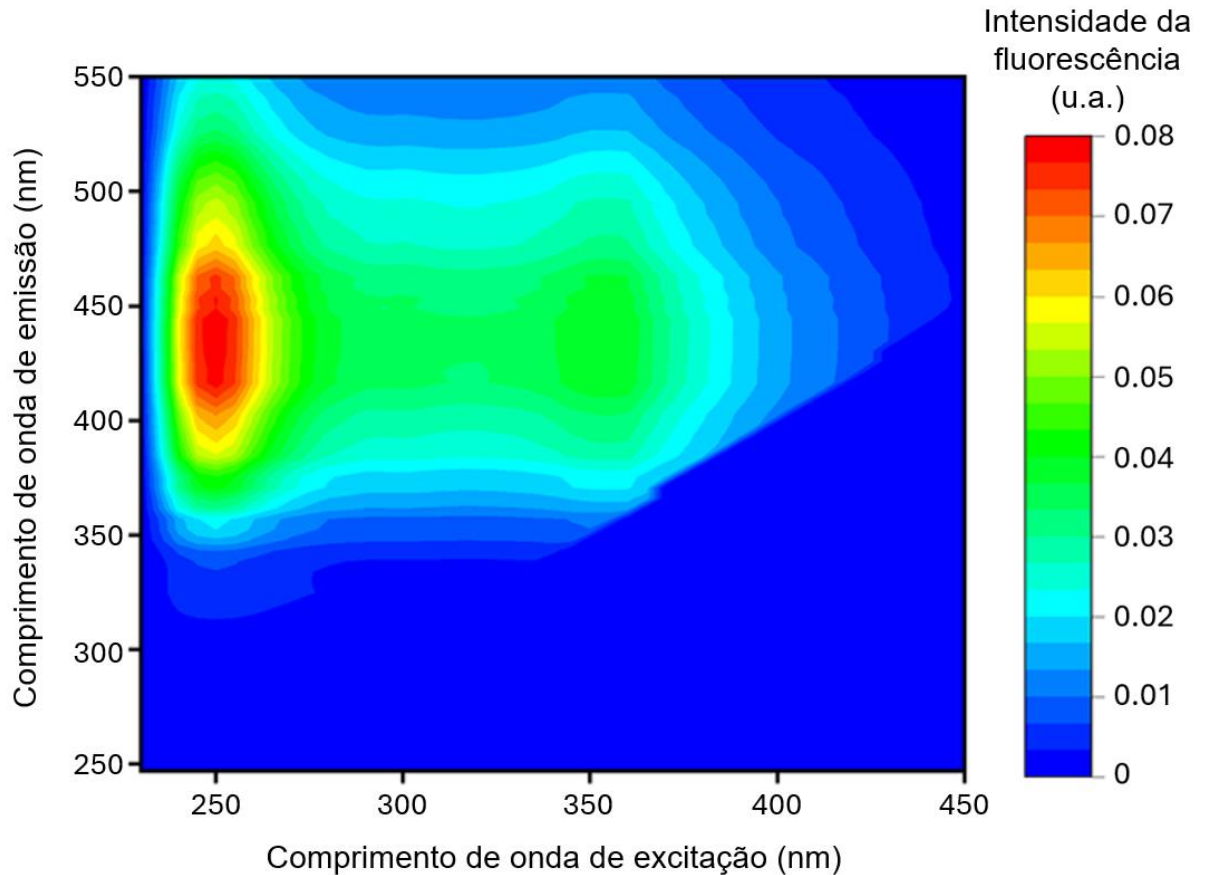


Figura 5. Matriz de excitação e emissão de fluorescência de amostras de aerossóis. Fonte: adaptado de Cao *et al.*, 2023.

A aquisição multidimensional de dados fluorimétricos também pode ser aplicada ao escaneamento sincronizado. Um conjunto de espectros sincronizados registrados sob diferentes intervalos de comprimentos de onda ($\Delta\lambda$) são agrupados em um espectro de fluorescência sincronizada total. Para tal, a intensidade da fluorescência nos espectros é plotada como uma função do comprimento de onda de excitação e do intervalo entre os comprimentos de onda (Sirorska, 2016).

3.2. Contaminantes em alimentos

A presença de contaminantes em alimentos é uma das principais preocupações no campo da segurança alimentar e da saúde pública. Contaminantes são substâncias indesejadas que não são adicionadas intencionalmente aos alimentos e que podem estar presentes como resultado de práticas inadequadas durante a produção,

processamento, armazenamento, transporte ou comercialização. De acordo com o Comitê Conjunto de Especialistas sobre Aditivos Alimentares (*Joint Expert Committee on Food Additives* - JECFA) e a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO), os contaminantes alimentares podem ser classificados em três grandes categorias: biológicos, físicos e químicos. Embora todos representem riscos à saúde, os contaminantes químicos têm recebido atenção especial devido à sua persistência no ambiente, potencial bioacumulativo e efeitos tóxicos crônicos, muitas vezes silenciosos (FAO, 2023)

Os contaminantes químicos podem ser subdivididos em várias classes, incluindo contaminantes orgânicos persistentes, metais pesados, resíduos de pesticidas, fármacos veterinários, micotoxinas, contaminantes processados (como acrilamida e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), além de contaminantes industriais como dioxinas e bifenilos policlorados. Muitos desses compostos têm propriedades lipofílicas e são resistentes à degradação, o que favorece sua acumulação na cadeia alimentar e, conseqüentemente, a exposição humana por meio do consumo de alimentos de origem animal e vegetal (Liu *et al.*, 2024; Khan *et al.*, 2024; Colopi *et al.*, 2024)

O monitoramento e controle dos contaminantes químicos em alimentos requerem uma abordagem multidisciplinar que envolve toxicologia, química analítica, microbiologia e regulação sanitária. O desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e específicos, a vigilância baseada em risco e a definição de limites máximos toleráveis são fundamentais para garantir a segurança dos alimentos e proteger a saúde do consumidor.

3.2.1. *Análise de contaminantes*

Com o intuito de assegurar a conformidade com os limites máximos tolerados estabelecidos por órgãos reguladores, como a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority* - EFSA) e o Codex Alimentarius, a detecção confiável desses contaminantes exige o uso de metodologias analíticas altamente sensíveis e seletivas. Entre as técnicas instrumentais mais empregadas destacam-se LC-MS/MS, GC-MS, GC-MS/MS, AAS, a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado

indutivamente (ICP-OES), imunoenaios, dentre outras (Ramos *et al.*, 2024; Tsiasioti, & Paraskevas, 2024; Sun *et al.*, 2023).

Apesar da robustez analítica dessas abordagens, sua aplicação em larga escala enfrenta diversas limitações práticas. O alto custo dos equipamentos e insumos, a complexidade dos protocolos de preparo de amostras e a necessidade de operadores altamente capacitados tornam esses métodos restritos a laboratórios especializados. Além disso, o tempo de resposta analítica, frequentemente incompatível com as necessidades operacionais de sistemas de monitoramento em tempo real, dificulta sua integração em programas de vigilância alimentar mais amplos. (Ling *et al.*, 2024)

Diante desse cenário, cresce a demanda por metodologias analíticas alternativas que conciliem acessibilidade, rapidez, portabilidade e precisão. O desenvolvimento de biossensores baseados em princípios eletroquímicos e ópticos ou tem se destacado como uma estratégia promissora, permitindo a detecção seletiva de contaminantes com resposta rápida e aplicabilidade *in loco*. Além disso, técnicas espectroscópicas de baixo custo, como a espectroscopia no UV-Vis, imagem hiperespectral, infravermelho próximo (NIR) espectroscopia Raman portátil, vêm sendo exploradas para análises não destrutivas e sem necessidade de preparo de amostras (Inês & Cosme, 2025; Xie & Zhou, 2023)

Assim, a modernização da análise de contaminantes em alimentos exige não apenas o aprimoramento das técnicas clássicas, mas também o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento de métodos inovadores que atendam às necessidades de um sistema alimentar global cada vez mais complexo, interconectado e demandante de respostas rápidas e seguras.

3.2.1. *Fluorescência aplicada à análise de contaminantes*

A fluorescência é uma técnica bastante relevante para a ciência dos alimentos. A extensão da seletividade e sensibilidade viabiliza a análise de fluoróforos em matrizes complexas, como é o caso dos alimentos. O estudo da presença e concentração de compostos fluorescentes compreende diversos propósitos, como o controle de qualidade (expiração e armazenamento), a detecção de contaminações, a análise de nutrientes e aditivos (corantes), a autenticação, a adulteração, a avaliação sensorial (cor e textura), a detecção de proteínas, dentre outros. É possível classificar

as substâncias fluorescentes presentes em alimentos em dois grupos: intrínsecas e exógenas. De maneira geral, os componentes intrínsecos são proteínas, peptídeos, aminoácidos, vitaminas, aminas biogênicas, antioxidantes e espécies inorgânicas. Os componentes exógenos são os aditivos, os adulterantes e os contaminantes. Considerando os diversos grupos de alimentos que estas substâncias exógenas podem se inserir como contaminantes, é relevante apontar que os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são o grupo de moléculas que apresentam a maior fluorescência natural, o que torna a sua detecção altamente compatível com esta técnica (Fernández-Romero, 2019).

O emprego desta espectroscopia na análise de alimentos tem crescido ao longo dos anos, impulsionado pelo desenvolvimento de métodos de derivatização que permitem transformar analitos originalmente não fluorescentes em compostos capazes de emitir sinal analítico. Essas reações químicas expandiram significativamente o campo de aplicação da detecção fluorimétrica, que inicialmente se limitava à identificação de substâncias com fluorescência nativa (Siorska, 2019).

Em matrizes alimentares complexas, a emissão fluorescente convencional ou os espectros de excitação isolados podem não ser suficientes para caracterizar com precisão os padrões de fluorescência da amostra e, conseqüentemente, para identificar contaminantes presentes em níveis traço. Essa limitação ocorre devido à sobreposição espectral entre compostos naturais do alimento e os analitos de interesse, bem como à possível atenuação do sinal por efeitos de matriz, como absorção interna ou dispersão da luz. Para superar essas barreiras, é fundamental o uso de estratégias que aumentem a seletividade e a sensibilidade da técnica, como a EEM, com sondas fluorescentes específicas, ou ainda o acoplamento com métodos quimiométricos multivariados, como o PARAFAC. Essas abordagens permitem a resolução de sinais sobrepostos e a extração de informações latentes, mesmo na presença de ruído. Além disso, devido à sua alta sensibilidade analítica, a fluorescência é particularmente adequada para o monitoramento de contaminantes que apresentam toxicidade mesmo em níveis ultratraço, como micotoxinas, pesticidas organoclorados e metais pesados complexados, podendo realizar a quantificação em valores inferiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$, dependendo do sistema e do fluoróforo. Dessa forma, o aprimoramento dos sinais fluorescentes não só amplia a capacidade de detecção, como também assegura maior confiabilidade na identificação de riscos potenciais à saúde pública presentes em alimentos (Karoui, 2025)

3.2.2.1. Modificação química e supramolecular

Diversas estratégias têm sido desenvolvidas para otimizar tanto a geração quanto a análise de sinais fluorescentes. Dentre elas, a derivatização química se destaca como abordagem pré-analítica eficaz, ao introduzir grupos funcionalmente fluorescentes em moléculas naturalmente pouco ou não fluorescentes. Isso amplia a gama de compostos detectáveis e melhora a eficiência quântica da fluorescência (Valeur, 2012).

Modificações estruturais específicas são amplamente empregadas para ajustar as propriedades eletrônicas e fotofísicas das moléculas. Uma das estratégias centrais é a extensão da conjugação π , com a adição de duplas ligações conjugadas ou sistemas aromáticos que aumentam a deslocalização eletrônica. Essa modificação reduz a diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO, resultando em maior intensidade de fluorescência. A introdução de grupos doadores como OH, OCH₃ ou NR₂, também pode estabilizar o estado excitado e elevar o rendimento quântico. Além disso, a incorporação de heteroátomos, a coordenação com metais e a rigidificação da estrutura molecular por fechamento de anéis, fusão de sistemas aromáticos ou bloqueio de rotações contribui significativamente para aumentar a fluorescência (Yamaguchi *et al.*, 2008).

Além das modificações na estrutura das moléculas, estratégias não estruturais também desempenham papel importante. O controle do ambiente, como ajustes na polaridade do solvente, pH ou temperatura, pode modular os estados eletrônicos dos fluoróforos, influenciando sua emissão. A emissão induzida por agregação, por exemplo, ocorre quando moléculas inicialmente não fluorescentes se tornam emissoras ao formar agregados, devido à restrição de movimentos intramoleculares. Técnicas de encapsulamento, como o uso de micelas, nanopartículas ou complexos de inclusão, também têm se mostrado eficazes em proteger os fluoróforos e aumentar sua emissão (Zhao *et al.*, 2020).

Dentre os agentes encapsulantes, a β -ciclodextrina (β -CD) se destaca. Trata-se de um oligossacarídeo composto por sete unidades de glicose ligadas por ligações α -1,4-glicosídicas, formando uma cavidade interna hidrofóbica (**Figura 6**). Essa estrutura permite a formação de complexos de inclusão com compostos hidrofóbicos ou anfífilicos, aumentando sua solubilidade e estabilidade. A β -CD é amplamente utilizada em setores como o alimentício, farmacêutico e cosmético, sendo valorizada

por seu baixo custo, baixa toxicidade e alta versatilidade como agente de inclusão (Crini, 2014).

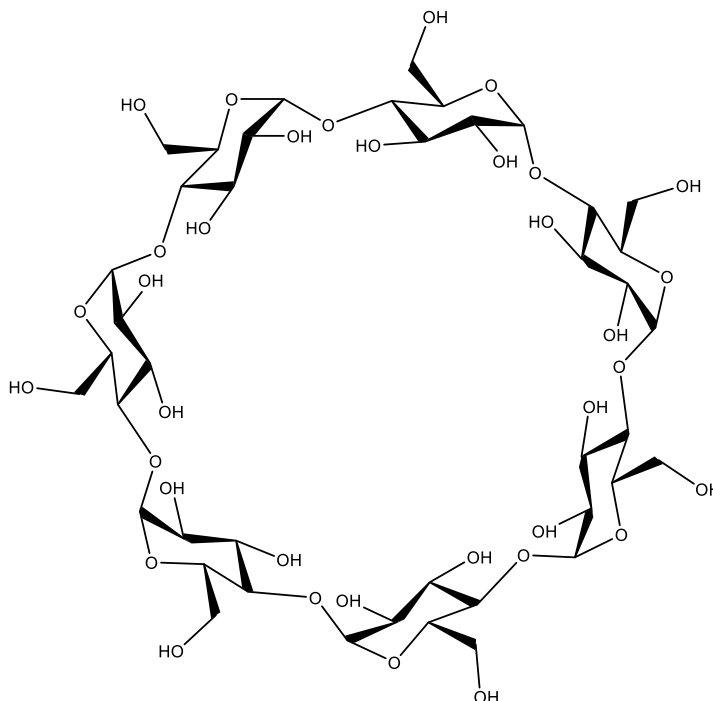


Figura 6. Fórmula estrutural da β -ciclodextrina. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software ChemDraw.

A complexação com β -CD pode impactar significativamente a fluorescência dos analitos. Entre os principais efeitos observados estão: aumento da intensidade de emissão pela restrição de movimentos rotacionais e vibracionais; proteção contra agentes extintores presentes na matriz; deslocamentos nos comprimentos de onda de excitação e emissão; e diminuição de efeitos de supressão por agregação molecular. Compostos fenólicos, fármacos e diversos contaminantes ambientais, como pesticidas, HPAs e micotoxinas, têm sua fluorescência potencializada na presença da β -CD, devido à interação de suas estruturas aromáticas com a cavidade hidrofóbica da ciclodextrina. A incorporação da β -ciclodextrina em sistemas fluorescentes não apenas melhora a intensidade do sinal, como também contribui para uma maior seletividade analítica, sendo especialmente útil na mitigação de interferências comuns em matrizes complexas (Nicolaescu *et al.*, 2025).

3.2.2.2. Análise multivariada

A análise multivariada constitui um conjunto de métodos estatísticos que permitem explorar dados de alta dimensionalidade, revelando estruturas que não seriam perceptíveis por meio de abordagens univariadas. Ao contrário da análise univariada, que considera uma única variável de resposta por vez, a análise multivariada estabelece interações e correlações entre múltiplas variáveis simultaneamente (Mardia *et al.*, 2024)

A aplicação de métodos multivariados tem se mostrado relevante na área de segurança alimentar, onde há uma crescente demanda por técnicas analíticas sensíveis, seletivas e rápidas para a detecção de contaminantes químicos e biológicos. A espectroscopia de fluorescência, oferece por meio da EEM, uma ferramenta versátil e não destrutiva para análise de alimentos. No entanto, os dados gerados pela superfície espectral são mais complexos, organizando-se em estruturas tridimensionais, que exigem métodos estatísticos compatíveis com essa dimensionalidade (Ziani *et al.*, 2025).

Nesse contexto, a PARAFAC, uma técnica multivariada, surge como uma solução robusta para a deconvolução de sinais fluorescentes em misturas complexas. A PARAFAC é um modelo de deconvolução tensorial que permite a separação de sinais individuais presentes em dados trilineares, como os produzidos na EEM, sem a necessidade de separação física dos componentes. Diferentemente da Análise de Componentes Principais, que é limitada a matrizes bidimensionais, a PARAFAC preserva a estrutura trilinear dos dados, proporcionando interpretações mais precisas e permitindo a identificação e quantificação simultânea de múltiplos compostos fluorescentes em uma única medida espectral. A PARAFAC decompõe o cubo de dados EEM em um número determinado de componentes fluorescentes, modelando cada componente como o produto de três vetores: o perfil espectral de excitação, o perfil espectral de emissão e o perfil de concentração relativa por amostra. Por meio desta decomposição matemática, cada componente identificada representa um fluoróforo, com seus respectivos espectros de excitação e de emissão e sua abundância relativa nas amostras analisadas.

Diversos estudos apontam para a eficácia da aplicação combinada da EEM com modelos PARAFAC, demonstrando elevado potencial na detecção e

quantificação de contaminantes em alimentos, discriminando amostras adulteradas e não adulteradas, bem como na determinação de contaminantes em níveis traço, mesmo em matrizes alimentares complexas. A capacidade do PARAFAC de decompor os espectros em perfis espectrais e de concentração específicos para cada componente facilita não apenas a detecção qualitativa, mas também a quantificação direta de contaminantes sem a necessidade de calibração externa extensa (Sciscenko *et al.*, 2022; Sousa *et al.*, 2025; Cui *et al.*, 2023).

Assim como as técnicas de aprimoramento químico e instrumental mencionados para a fluorescência, a incorporação de técnicas multivariadas, como o PARAFAC, também permite superar limitações associadas a variabilidade instrumental e interferências da matriz alimentar, promovendo maior robustez analítica. Em conjunto, essas abordagens contribuem significativamente para o desenvolvimento de métodos analíticos mais rápidos, econômicos, sustentáveis e eficientes, alinhados com os princípios da química verde e com as exigências regulatórias internacionais para segurança alimentar.

4. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE BENZO[A]PIRENO EM MALTE PILSEN

4.1. Aspectos gerais

4.1.1 *Malte*

O malte é um grão de cereal submetido a um processo de germinação intencionalmente interrompido. Os cereais maltados são provenientes de cevada, arroz, trigo, centeio, milho, dentre outros. O malte é a matéria-prima para a produção de cerveja e whisky. A farinha de malte é utilizada como componente de produtos de panificação devido à sua atividade enzimática e a capacidade de intensificar a cor. (Euromalt, 2023)

A obtenção do malte se inicia pela hidratação do grão, que estimula a ativação da enzima amilase, responsável pela quebra de polissacarídeos de amido em carboidratos simples. A função do amido nas plantas é atuar como substrato para a formação das folhas, que possibilitam a realização da fotossíntese. O vegetal no estágio de grão é incapaz de assimilar o amido, sendo necessária a amilase para que haja a conversão de amido em maltose (majoritariamente), um dissacarídeo constituído por duas moléculas de glicose. Desta forma, por meio de moléculas menores de carboidratos, ocorre a produção de energia por respiração celular, ocasionando o crescimento da planta (Palmer, 2017).

Entretanto, em determinado instante, o contato do grão com a água é cessado, desseca-se o cereal sob aquecimento controlado, inibindo o desenvolvimento da planta, gerando-se então, o malte base (malte verde). Deseja-se que o processo ocorra por tempo o suficiente para que se tenha uma quantidade abundante de enzimas ativadas, porém não longo o bastante para que o amido seja completamente consumido (Palmer, 2017).

A cevada é o cereal mais comum para o processo de maltagem por conta da alta atividade enzimática da amilase, a alta razão amido-proteína e pela sua estrutura vegetal. O malte de baixo teor de proteína em relação ao alto teor de amido maximiza o rendimento do extrato na manufatura de cerveja e whisky. Este extrato contém os açúcares fermentáveis, cuja quantidade é diretamente proporcional ao nível de álcool produzido, ou seja, o valor da bebida fabricada. Contudo, o teor de proteína não deve ser muito baixo, pois além da ação catalítica das enzimas, são necessárias para a

nutrição da levedura; contribuem para a estabilidade da espuma e estão envolvidas na composição do sabor que o malte promove para a cerveja e o whisky (MacLeod, 2016).

As vantagens econômicas decorrentes do uso da cevada também se relacionam ao fato do grão possuir menor concentração de glúten e ser capaz de manter a sua casca durante a colheita e maltagem. Além disto, o seu cultivo é o mais simples, sendo efetivo mesmo em climas frios, tornando o processamento da cerveja mais barato em comparação a outros cereais (Mallet, 2021).

O malte de cevada transmite características únicas e desejáveis de aroma e sabor para a cerveja e o whisky, variando-se do doce e maltado até o amendoado e torrado, dependendo do processo de maltagem utilizado. A história do uso da cevada para o processamento de cerveja e destilação é longa e, em diversas regiões, foram estabelecidas regulamentações e tradições acerca da sua aplicação na indústria. Todos estes fatores consolidaram o status da cevada como o grão primário para a realização da maltagem (Mallet, 2021).

Especialistas do âmbito de agronegócios preveem uma demanda global de malte de 23,1 milhões de toneladas até 2030, um crescimento de 1,3 milhão de toneladas (6%) em relação aos níveis anteriores à pandemia do Covid-19. Segundo relatos, o principal fator que impacta esta demanda é o mercado emergente de cerveja artesanal, que visa suprir uma busca do consumidor por produtos mais diversificados e de qualidade superior, requerendo uma maior quantidade de malte (Rabobank, 2021).

A busca por diferentes estilos de cerveja, implica na existência de diferentes tipos de malte, que são resultados da temperatura aplicada durante a secagem, etapa que confere complexidade de cor, sabor e aroma ao malte. Estas alterações são elucidadas pela reação de Maillard que produz pigmentos escuros denominados melanoidina, além de substâncias de baixo peso molecular que demarcam o aroma específico do malte. Como consequência, as proteínas são desnaturadas quando o malte é submetido às temperaturas mais elevadas, reduzindo a ação enzimática da amilase (Mallet, 2021). A **Tabela 1** descreve algumas características dos tipos de malte mais comuns.

Tabela 1. Características de alguns tipos de malte

Nome	Tipo	°EBC	Temperatura (°C)
Pilsen	Tradicional	2,4 – 3,9	70 – 80
Cristal	Caramelizado	19,7 – 394	100
Amber	Torrado	39,4 – 70,9	100 – 150
Black	Torrado	857 – 1083,5	250

A unidade °EBC (*European Brewery Convention*) é uma medida que expressa a cor da cerveja ou do malte. O seu valor representa a intensidade da cor, determinada pela medição da absorvância da luz em 430 nm ao atravessar uma amostra de cerveja ou extrato de malte. Valores mais baixos indicam maltes pálidos e de cores mais leves e os valores maiores são referentes aos maltes escuros, como indica a **Figura 7**. É interessante destacar que visualmente, a escala EBC tem valor máximo de 40, mas quando medido por via instrumental valores mais altos podem ser alcançados, através da diluição da amostra antes da leitura.

**Figura 7.** Escala de cor para os diferentes tipos de malte

O tipo de malte mais utilizado na fabricação de cervejas é o malte base (pálido ou tradicional). Este grão possui cor relativamente clara e é o ponto de partida para diversas receitas de cerveja e para a construção do perfil de sabor da bebida. Uma das variedades mais conhecidas do malte base é o Pilsen que apresenta um sabor suave e sutilmente doce (Mallet, 2021).

4.1.2 Contaminação de malte

As fontes de contaminação do malte por compostos químicos abrangem a presença de pesticidas, herbicidas, metais pesados, micotoxinas, adulterantes e substâncias produzidas mediante a sua obtenção. Tais substâncias estão relacionadas principalmente à etapa de secagem do malte, pois o aquecimento favorece a formação de HPAs, acrilamidas, N-nitrosaminas, furanos e 3-monocloropropano-1,2-diol (King *et al.*, 2024, He & Bayen, 2020, Pflaum *et al.*, 2016)

Os HPAs destacam-se como poluentes orgânicos persistentes, difundidos em todos os compartimentos do ecossistema: água, ar, solo, sedimentos e alimentos. Os efeitos adversos que os HPAs representam à saúde humana incluem o câncer, problemas dermatológicos, distúrbios nos sistemas respiratório, endócrino, cardiovascular e imunológico (Venkatraman *et al.*, 2024).

Os HPAs são um grupo de compostos orgânicos constituídos por dois ou mais anéis aromáticos condensados, em alguns casos possuindo grupos substituintes. São originados pela queima incompleta de matéria orgânica, como por exemplo: queimadas espontâneas, queima de carvão, combustíveis, óleos lubrificantes, destilação de petróleo, incineração de resíduos e fumaça de cigarro (Sun, 2021). Devido à sua prevalência, 16 HPAs foram registrados como contaminantes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*Environmental Protection Agency - EPA*) (Keith, 2015).

A formação dos HPAs é determinada por uma combinação complexa de quantidade de calor fornecido ao sistema, a quantidade de oxigênio disponível e a pressão. As condições de secagem e a torragem do malte fazem uso de uma ampla faixa de temperatura aplicada que propiciam a geração dos HPAs. É esperado que o malte apresente níveis superiores de HPAs em comparação a grãos comuns cujos processamentos não se utilizam de aquecimento. Estas incidências são atribuídas em

grande parte à forma tradicional de se utilizar chamas abertas que expõem os grãos às transformações químicas mais intensas e ao contato dos grãos com combustíveis fósseis que possam conter HPAs. Em menor escala, a inserção destes poluentes no malte advém da poluição atmosférica, o armazenamento e o transporte das embalagens (Habschied *et al*, 2023).

O Codex Alimentarius recomenda condições apropriadas de queima, visando evitar ou reduzir contaminações de alimentos por HPAs. Estas modificações têm sido implementadas ao se utilizar calor indireto ou combustíveis alternativos, como gás natural e óleos minerais, ao invés de óleo diesel e óleo residual; resultando em índices mais baixos de contaminação (Codex Alimentarius, 2009).

Embora seja intuitivo esperar que o malte submetido às temperaturas mais brandas, como o Pilsen, exiba concentrações mais baixas de HPAs, este não é necessariamente o caso. Em determinado estudo, o malte torrado Ambar apresenta menores valores de benzo[a]pireno em relação ao malte mais claro, possivelmente devido ao fato de que o malte Ambar é aquecido brevemente ao final do processo apenas para adquirir cor, enquanto o malte base é aquecido por um longo período, aumentando a probabilidade de contaminação (Mastanjević *et al*, 2021).

4.1.3 Benzo[a]pireno em malte

O potencial carcinogênico e mutanogênico de alguns HPAs tem sido elucidado pela Agência internacional de pesquisas sobre o câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*). Estes estudos são focados no benzo[a]pireno (B[a]P), o único HPA classificado no grupo 1, que o categoriza como carcinogênico para humanos. Dentre os HPAs prioritários, o benzo[a]pireno é o composto mais avaliado (IARC, 2021). Na **Figura 8** é apresentada a fórmula estrutural desta molécula.

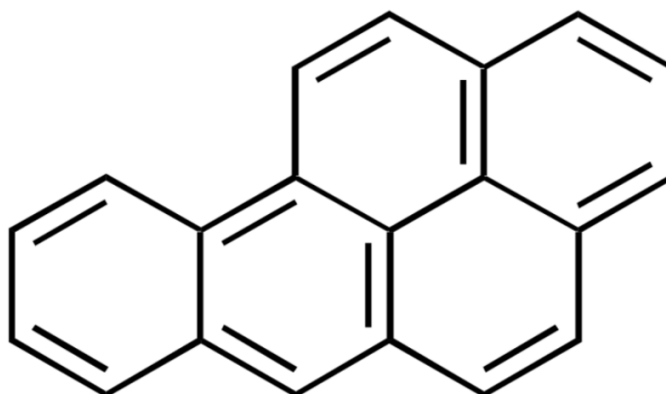


Figura 8. Fórmula estrutural do benzo[a]pireno. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* ChemDraw.

É utilizado como o principal marcador da presença de HPAs em alimentos, assim como os efeitos destes hidrocarbonetos na indução do câncer. As pesquisas relacionadas a estes poluentes originaram-se através do isolamento do B[a]P. Atualmente, é reconhecido com um dos agentes carcinogênicos mais potentes em animais, além da atividade embriotóxica e teratogênica. Peixes e mamíferos que sofrem exposição ao B[a]P manifestam nitidamente a neoplasia apenas 6 horas após terem sido contaminados por uma dose de aproximadamente 250 partes por bilhão ($\mu\text{g kg}^{-1}$) (Abdel-Shafy, 2015).

Através da ingestão, o B[a]P é assimilado pelas células epiteliais do intestino por difusão, onde a intoxicação pode ser propagada. Caso seja transformado no organismo, as moléculas adquirem caráter eletrofílico na forma de epóxidos e compostos poli-hidroxilados, o que permite a formação de ligações covalentes com centros nucleófilos, tais como o DNA, cessando a sua replicação. Esta mutação estimula principalmente o processo de desenvolvimento do câncer de pulmão, de pele e gastrointestinal. Alguns dos efeitos a curto prazos notificados são a náusea, vômitos, inflamações, irritação da pele e dos olhos. Porém, como os intermediários de B[a]P produzidos metabolicamente são solúveis em água, esta substância pode simplesmente ser eliminada pela urina (Bukowska *et al.*, 2022, Baird *et al.*, 2005). Na **Tabela 2** constam-se as principais características do B[a]P.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas do benzo[a]pireno

Aparência	Cristais amarelo pálido
Fórmula molecular	C ₂₀ H ₁₂
Peso molecular	252,3 g mol ⁻¹
Densidade	1,24 g cm ⁻³
Volatilidade	Baixa
Ponto de fusão	178,1 °C
Ponto de ebulição	310 °C
Coeficiente de partição	log K _{ow} = 6,04 (lipossolúvel)
Solubilidade em água	3,8 µg L ⁻¹

Não há normas legislativas acerca da incidência de B[a]P e outros HPAs em malte, especificamente. Porém, a Comissão da União Europeia (EC – *European Commission*) estabelece na regulamentação 835/2011, a concentração de 1,0 µg kg⁻¹, como o limite máximo permitido de B[a]P em alimentos derivados de cereais (European Commission, 2011).

4.1.4 Métodos de análise de benzo[a]pireno

A análise de B[a]P e outros HPAs em alimentos geralmente consiste em uma extração, uma ou mais etapas de *cleanup* e a detecção. Dependendo da matriz, a técnica de preparo de amostras que mais tem sido utilizada é o QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged, and Safe*), visando-se obter resultados mais eficientes que os métodos tradicionais. Dados sobre a ocorrência de B[a]P em malte e produtos relacionados são escassos, o que indica a necessidade iminente de procedimentos confiáveis para que esta investigação seja mais abrangente, estabelecendo-se novas legislações (Duehdal-Olesen *et al*, 2021).

Os métodos baseados em QuEChERS predominam no estudo do malte e derivados de cereais. De acordo com o método oficial 2007.01 da AOAC (*Association*

of *Analytical Communities*) para extração e *cleanup* aplicado para múltiplos contaminantes, uma adaptação foi realizada utilizando-se GC-MS para a análise de HPAs em diferentes tipos de malte (Habschied *et al*, 2023). Métodos semelhantes que buscam otimizar as condições experimentais do QuEChERS com incorporação de etapas de extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* – SPE) foram empregados na verificação de B[a]P em malte e cereais, associando-se à GC-MS e HPLC-FLD (Belešová *et al*, 2022). Um estudo envolvendo derivados de cereais utiliza extração com líquido pressurizado (*Pressurized Liquid Extraction* - PLE) e GC-MS por diluição isotópica (Kacmaz, 2016). Todas estas pesquisas (**Tabela 3**) apresentam valores de limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) de mesma ordem e que se aproximam das concentrações encontradas em algumas amostras reais.

Tabela 3: Publicações sobre métodos de análise de benzo[a]pireno em malte e derivados

Autor	Ano	Preparo de amostras	Técnica analítica	LD e LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Habschied, K.	2023	QuEChERS / SPE	GC-MS	0,53 e 2,00
Belešová, K.	2022	QuEChERS / SPE	HPLC-FLD	0,20 e 0,60
Duedahl-Olesen, L.	2021	QuEChERS / SPE	GC-MS	0,06 e 0,20
Mastanjević, K.	2020	QuEChERS / SPE	GC-MS	0,53 e 2,00
Kacmaz, S.	2016	PLE / SPE	GC-MS	0,02 e 0,03

4.2. Materiais e reagentes

O padrão de B[a]P $\geq 96\%$ (HPLC) foi obtido da Sigma Aldrich (St Louis MO, EUA). Os solventes dimetissulfóxido e clorofórmio foram obtidos da J T Baker (Center Valley, PA, EUA), a acetonitrila da Merck (Darmstadt, HE, Alemanha) e o acetato de etila da Synth (Diadema, SP, Brasil). As amostras de malte de cevada foram adquiridas comercialmente na região de Belo Horizonte.

4.3. Equipamentos e software

Balança analítica Shimadzu ATX 224, agitador vórtex Velp Scientifica ZX Class, chapa aquecedora Corning PC420D, centrífuga Kasvi Digital, agitador rotativo Kacil HM01. As análises foram realizadas no espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse. A aquisição de dados foi realizada nos *softwares*: Microsoft Excel, OriginLab e Scan.

4.4. Metodologia

4.4.1. *Preparo da solução estoque do analito*

A solução estoque de B[a]P foi preparada à 98 mg L^{-1} . Para tal, pesou-se 0,0049 g do padrão original. A massa foi solubilizada em 2,00 mL de clorofórmio e foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50,00 mL onde preencheu-se o menisco com acetonitrila. As micropipetas e balões volumétricos utilizados foram previamente calibrados segundo as especificações da RBC 159. A solução estoque foi mantida a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sob proteção da luz. A partir dela foi preparada uma solução intermediária à $98 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila para ser utilizada nos experimentos.

4.4.2 *Avaliação do espectro de fluorescência sincronizada do extrato de malte*

Neste trabalho, foi empregada uma simplificação do método de preparo de amostra do procedimento descrito na publicação “Validation of QuEChERS for screening of 4 marker polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and malt (Duedahl-Olesen, 2021)”, cuja esquematização está descrita na **Figura 9**.

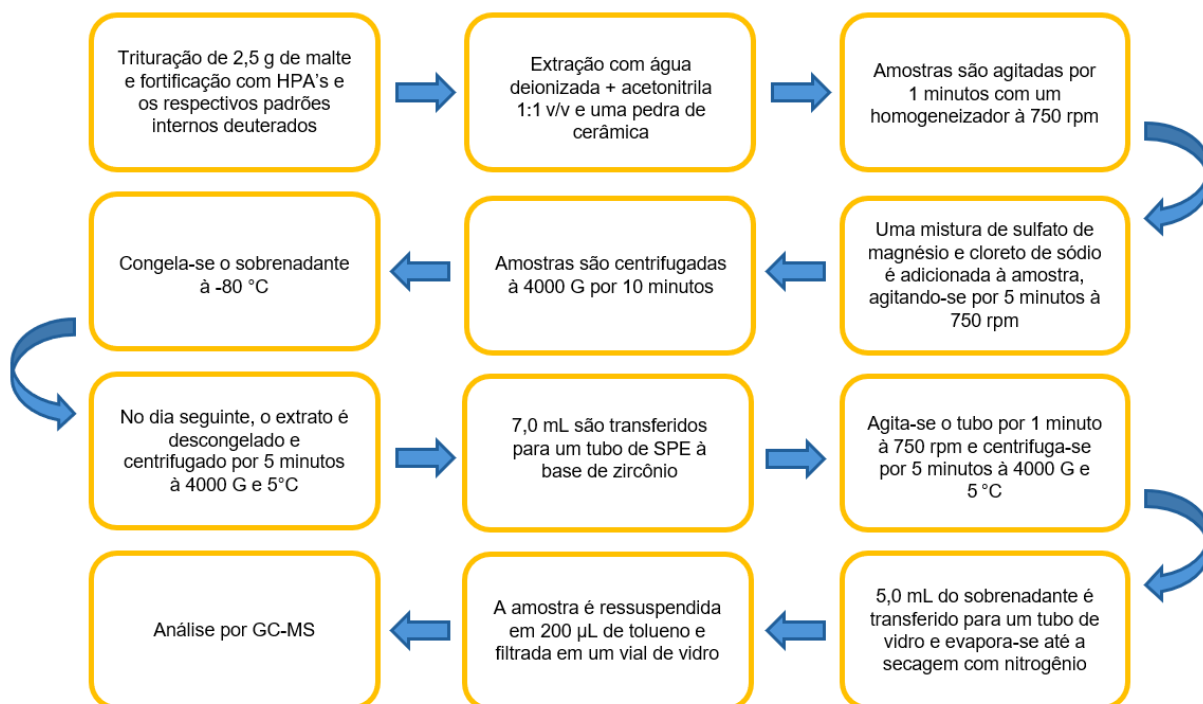


Figura 9. Esquemática do método de referência para a detreminação de benzo[a]pireno em malte

Por meio da exclusão da SPE e *cleanup*, estabeleceu-se a seguinte sequência experimental (**Figura 10**): Em um tubo de vidro de 15 mL, inseriu-se 1 g de malte triturado. Fortificou-se a amostra com determinada concentração de B[a]P. Adicionou-se 4,0 mL de uma solução de acetonitrila e água 1:1 v/v. Agitou-se o tubo no vórtex à 1400 rpm por 5 minutos. Centrifugou-se a mistura à 2500 rpm por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um béquer e o extrato foi aquecido a 85 °C até a secagem. Ressuspendeu-se o extrato em 2,5 mL de dimetilsfóxido (DMSO).

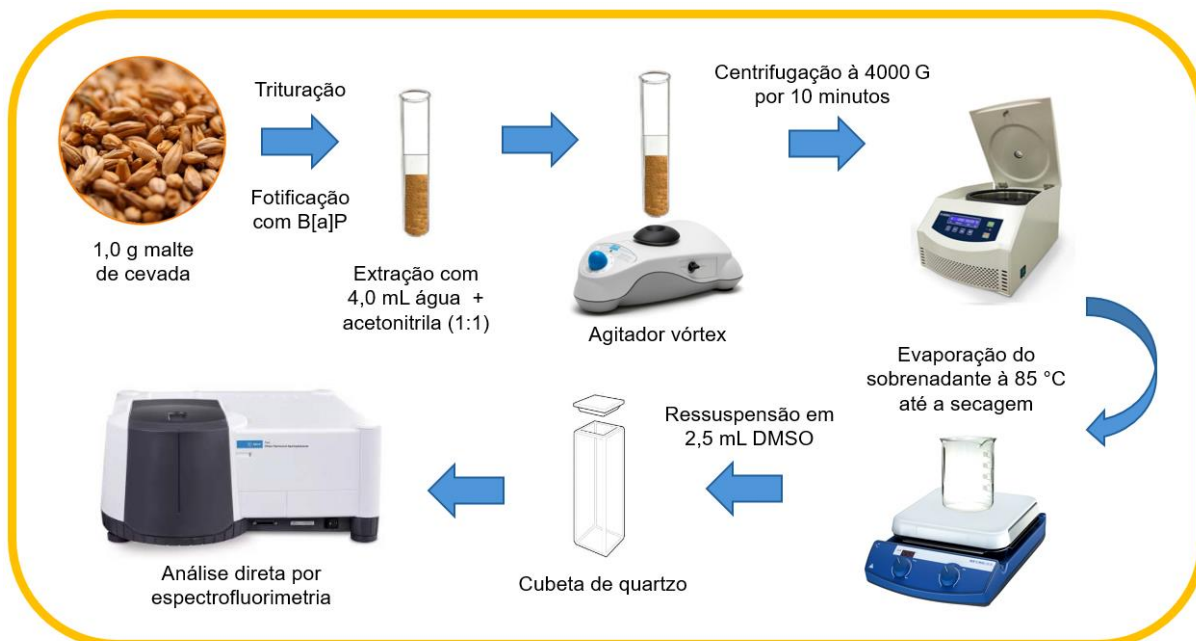


Figura 10. Esquematização do método adaptado para a determinação de benzo[a]pireno em malte.

Neste experimento inicial, as amostras não foram fortificadas, pois verificou-se o perfil espectral da matriz de forma a evidenciar possíveis interferentes na região de fluorescência do B[a]P. O malte testado foi o Pilsen de $^{\circ}\text{EBC} = 4,7$. Também se testou uma alíquota da solução estoque de B[a]P em acetoneitrila diluída ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) para constatar as propriedades do padrão.

As análises no espectrofluorímetro foram realizadas em triplicata com a obtenção do espectro sincronizado à energia constante na faixa de 300 a 450 nm para $\Delta\lambda = 19 \text{ nm}$. As demais condições ajustadas foram: temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, largura das fendas de excitação e emissão em $5,0 \text{ nm}$.

4.4.3 Avaliação da eficiência da extração de benzo[a]pireno

Segundo o método de referência, a primeira solução extratora consiste de água e acetoneitrila. Será verificada a viabilidade do uso de água, uma vez que a etapa de partição de fases por salting out será removida do método proposto, além de que o B[a]P possui baixa solubilidade neste solvente. A eficiência da extração foi determinada pela comparação do sinal analítico do B[a]P entre amostras de malte fortificadas antes da extração e amostras fortificadas na ressuspensão. Em ambas as

condições, a concentração de analito testada foi de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

4.4.4 Avaliação da influência da água na detecção de benzo[a]pireno no extrato de malte

Após não ter sido possível detectar o analito e verificar a eficiência da extração, repetiu-se o procedimento sem a utilização da água: Em um tubo de vidro de 15 mL, inseriu-se 1 g de malte triturado. Fortificou-se a amostra com 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de B[a]P. Adicionou-se 4,0 mL de acetonitrila. Agitou-se o tubo no vórtex à 1400 rpm por 5 minutos. Centrifugou-se a mistura à 2500 rpm por 5 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um béquer e a amostra foi aquecida à 85 °C até a secagem. Ressuspendeu-se o extrato em 2,5 mL de DMSO.

4.4.5 Avaliação da intensidade do aquecimento na eficiência da extração de benzo[a]pireno

Após verificar a influência da água na detecção do B[a]P, optou-se por reduzir a temperatura de aquecimento do extrato em função da temperatura de ebulição da acetonitrila ser inferior à sua mistura com água. Outra hipótese é que temperaturas mais brandas podem impedir que o processo de caramelização ocorra. O procedimento modificado consiste em: Em um tubo de vidro de 15 mL, inseriu-se 1 g de malte triturado. Fortificou-se a amostra com 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de B[a]P. Adicionou-se 4,0 mL de acetonitrila. Agitou-se o tubo no vórtex à 1400 rpm por 5 minutos. Centrifugou-se a mistura à 2500 rpm por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um béquer e a amostra foi aquecida à 45 °C até a secagem. Ressuspendeu-se o extrato em 2,5 mL de DMSO.

4.4.6 Avaliação da detecção de benzo[a]pireno em extrato de malte obtido sem aquecimento

Com o intuito de reduzir o tempo para efetuar o preparo de amostras, não se realizou a secagem e ressuspensão do extrato. O procedimento modificado consiste

em: Em um tubo de vidro de 15 mL, inseriu-se 1 g de malte triturado. Fortificou-se a amostra com $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de B[a]P. Adicionou-se 4,0 mL de acetonitrila. Agitou-se o tubo no vórtex à 1400 rpm por 5 minutos. Centrifugou-se a mistura à 2500 rpm por 10 minutos. Diluiu-se o extrato com DMSO para o volume final de 5,0 mL. Analogamente aos testes anteriores, comparou-se a resposta das amostras fortificadas antes e após a extração.

4.4.7 Otimização de parâmetros da extração por planejamento fatorial

Por meio de um planejamento fatorial 2^2 com ponto central foi avaliado se as variáveis tempo de agitação e a inclusão do acetato de etila como solvente de extração são significativas. Estes fatores foram selecionados baseando-se na substituição do agitador vórtex pelo agitador vertical, o que permite que todas as amostras sejam extraídas simultaneamente (aumento da frequência analítica) e pela alta solubilidade do B[a]P no acetato de etila. A **Tabela 4** descreve os valores dos parâmetros relacionados aos níveis testados.

Tabela 4. Níveis testados no planejamento fatorial

Variável	(-)	(0)	(+)
Tempo (min)	5	10	15
Acetato de etila (% v/v)	0	10	20

Em seguida, definiu-se pela **Tabela 5**, o delineamento experimental com triplicata no ponto central. A resposta (variável dependente) correspondente à cada experimento é a eficiência da extração. O procedimento executado em todos os experimentos baseado na sequência de 4.5.4., no qual a maior eficiência de extração foi obtido.

Tabela 5. Delineamento experimental do planejamento fatorial

Experimento	Tempo	% Acetato de etila
I	-	-
II	-	+
III	+	-
IV	+	+
V	0	0
VI	0	0
VII	0	0

4.4.8 Avaliação da extração na concentração alvo de benzo[a]pireno

O método otimizado foi aplicado na detecção de B[a]P na concentração alvo de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, valor estabelecido pela EFSA como limite máximo da presença do HPA em cereais. O procedimento otimizado consiste em: Em um tubo de vidro de 15 mL, inseriu-se 1 g de malte triturado. Fortificou-se a amostra com $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de B[a]P. Adicionou-se 4,0 mL de acetonitrila. Agitou-se o tubo no agitador rotativo por 15 minutos. Centrifugou-se a mistura à 2500 rpm por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um béquer e a amostra foi aquecida à 85 °C até a secagem. Ressuspendeu-se o extrato em 2,5 mL de DMSO. Preparou-se também amostras branco em triplicata.

4.4.9 Avaliação da viabilidade do método para massas superiores de malte

A massa de malte estabelecida como 5,0 g iria inviabilizar o preparo de amostras proposto, pois seria necessário utilizar outros tipos de tubo e de agitador vertical. Visando evitar maiores alterações como o volume dos frascos, centrífuga e agitador de maiores capacidades, analisou-se qual é a menor concentração de analito possível de se detectar a partir de 1,0 g de amostras nas quais os extratos foram

fortificados. Neste teste, ampliou-se a abertura da fenda do monocromador de excitação para 10 nm, visando intensificação do sinal analítico.

4.4.10 *Deteção de benzo[a]pireno na concentração alvo*

Verificou-se a possibilidade de detectar o sinal analítico do B[a]P na concentração alvo ao introduzir uma massa mais elevada de malte no procedimento. A sequência experimental consiste em: Em um tubo de vidro de 15 mL, inseriu-se 2,5 g de malte triturado. Fortificou-se a amostra com 1 µg kg⁻¹ de B[a]P. Adicionou-se 10,0 mL de acetonitrila. Agitou-se o tubo no agitador rotativo por 15 minutos. Centrifugou-se a mistura à 2500 rpm por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um béquer e a amostra foi aquecida à 85 °C até a secagem. Ressuspendeu-se o extrato em 2,5 mL de DMSO. Preparou-se também amostras branco em triplicata.

4.4.11 *Validação analítica*

As figuras de mérito para a validação do método desenvolvido foram conduzidas de acordo com as especificações do guia da AOAC (AOAC, 2016). A seletividade foi avaliada pela análise do espectro sincronizado de diferentes amostras branco de malte e pela construção de uma curva analítica do B[a]P em DMSO nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 µg kg⁻¹.

A linearidade e o efeito de matriz foram demonstrados pela construção de uma curva analítica do B[a]P na matriz (malte Pilsen) nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 µg kg⁻¹ e avaliou-se a linearidade.

Para LD e LQ, foram analisadas 10 amostras brancos das quais os sinais analíticos adquiridos foram convertidos em concentração de acordo com a equação da curva analítica. Calculou-se então o respectivo desvio padrão e o valor obtido foi corrigido pelo fator:

$$s'_0 = s_0 / \sqrt{n} \quad (11)$$

onde n é o número de replicatas convencionalmente utilizado nas análises de rotina.

Os limites foram determinados por:

$$LD = 3 \times s'_0 \quad \text{e} \quad LQ = 10 \times s'_0 \quad (12)$$

A veracidade foi estabelecida em termos de recuperação. O ensaio foi realizado pela análise de amostras fortificadas em três níveis de concentração (0,5, 1,0 e 1,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) em seis replicatas independentes. Os percentuais de recuperação em cada nível são determinados por:

$$R'(\%) = \frac{x' - \bar{x}}{x_{spike}} \quad (13)$$

Onde \bar{x}' é a média das concentrações obtidas pelas fortificações, \bar{x} é a média das amostras branco e x_{spike} é a concentração teórica em cada nível testado.

A precisão intradia (repetibilidade) foi avaliada por meio do desvio padrão relativo (DPR) das seis replicatas fortificadas dos ensaios de recuperação. A precisão interdias (precisão intermediária) foi avaliada por meio do desvio padrão entre as replicatas fortificadas de amostras preparadas em diferentes dias.

4.5. Resultados e discussão

4.5.1 Avaliação do espectro de fluorescência sincronizada do extrato de malte

O B[a]P possui comprimentos de onda de excitação em 295 nm e 388 nm. Este último, produz um sinal analítico mais intenso na fluorescência sincronizada, considerando a emissão em 407 nm, o deslocamento Stokes para esta transição é de 19 nm. Os parâmetros de fluorescência foram selecionados segundo otimização realizada em outro trabalho do grupo para determinar B[a]P em azeite de oliva (Soares *et al.*, 2024). Desta forma, o solvente mais apropriado para se realizar a detecção é o DMSO, pois a sua alta constante dielétrica acentua a emissão do analito. Neste caso, a análise foi feita pela diluição da solução estoque apenas para averiguar a estabilidade do espectrofluorímetro. O espectro sincronizado representa a excitação.

Como foi evidenciado na **Figura 11**, a banda referente ao analito demonstra $\lambda_{\text{máx}}$ em 388 nm.

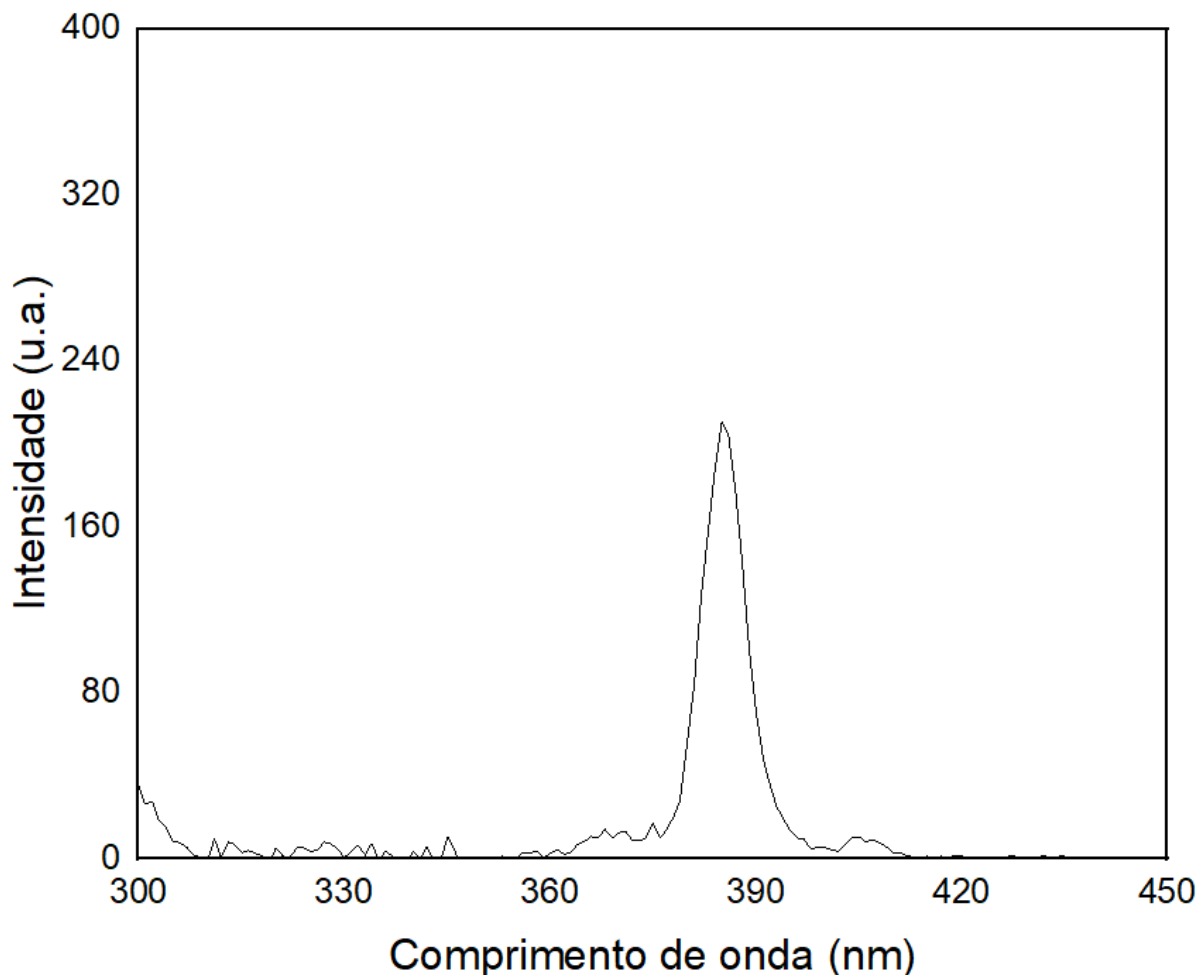


Figura 11. Espectro sincronizado do benzo[a]pireno em acetonitrila ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) sob $\Delta\lambda = 19$ nm. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

Os espectros sincronizados obtidos na matriz (**Figura 12**) não demonstram interferência na região de excitação do B[a]P, indicando seletividade na detecção do analito, o que a princípio viabiliza a aplicação deste método para a amostra selecionada.

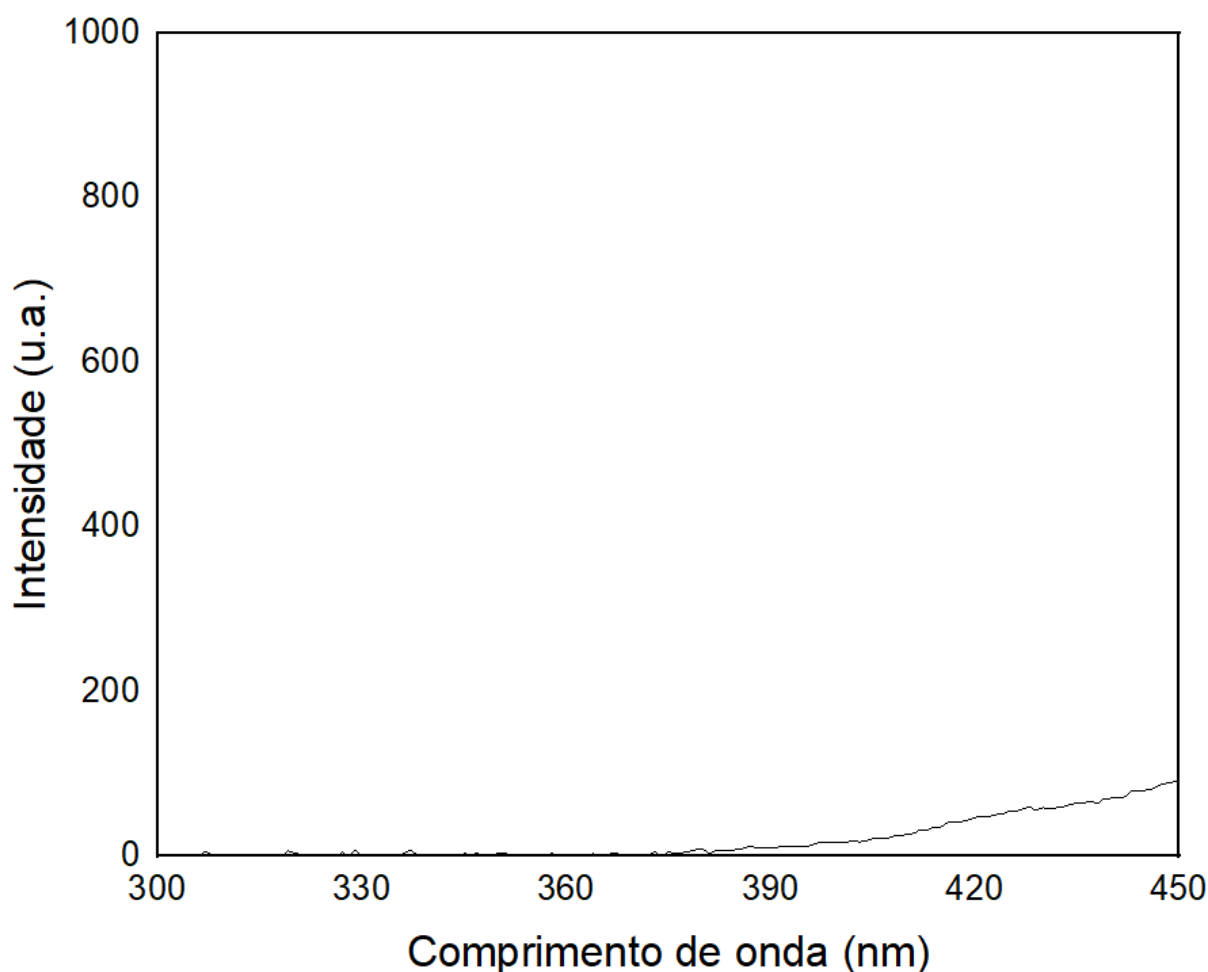


Figura 12: Espectro sincronizado do extrato do malte Pilsen. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin..

4.5.2 Avaliação da eficiência da extração de benzo[a]pireno

Ao empregar o procedimento do teste anterior, não se observou sinal analítico em qualquer replicata das amostras (incluindo as fortificadas após a extração), logo não foi possível calcular a porcentagem de B[a]P extraído. Considerando as alterações que devem ser feitas na extração, a água é possivelmente o fator mais determinante. Além da baixa solubilidade do analito em água, é possível que, durante o aquecimento do extrato, a água presente estimule a formação de produtos de caramelização que extinguem a fluorescência do B[a]P por supressão (*quenching*). Este processo reduz a intensidade da fluorescência de uma molécula por diferentes mecanismos, incluindo o *quenching* dinâmico, que ocorre por colisões entre o fluoróforo excitado e o agente supressor (*quencher*), levando à dissipação não-

radiativa da energia, sendo intensificado com o aumento da temperatura e da concentração do *quencher*. Já o *quenching* estático resulta da formação de um complexo estável e não fluorescente entre o fluoróforo e o quencher no estado fundamental, antes da excitação, sendo geralmente menos sensível à variação de temperatura. Ambos os tipos de supressão são descritos pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \kappa_q \tau_0 [Q] \quad (14)$$

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do agente de supressão, κ_q é a constante de *quenching*, τ_0 é o tempo de vida da fluorescência na ausência do supressor, e $[Q]$ é a concentração do supressor.

4.5.3 Avaliação da influência da água na detecção de benzo[a]pireno no extrato de malte

Nota-se pela **Figura 13** que a ausência da água possibilitou a detecção do B[a]P. Desta forma, a água deve ser excluída permanentemente do procedimento. Observou-se, neste experimento, que apesar de o extrato obtido com acetonitrila ser menos turvo e incolor, os espectros correspondentes apresentaram maior interferência em comparação à extração com água. Isso indica que a acetonitrila pode ter extraído fluoróforos presentes na amostra ou que o ambiente aquoso atuou suprimindo a fluorescência de possíveis interferentes presentes no extrato. Calculou-se então a eficiência da extração pela comparação das intensidades das bandas de B[a]P nas duas condições estudadas, obtendo-se um valor médio ($n = 3$) de $(54,5 \pm 0,3) \%$. Este resultado é relativamente alto, considerando que o método proposto até então é executado em apenas uma etapa de extração.

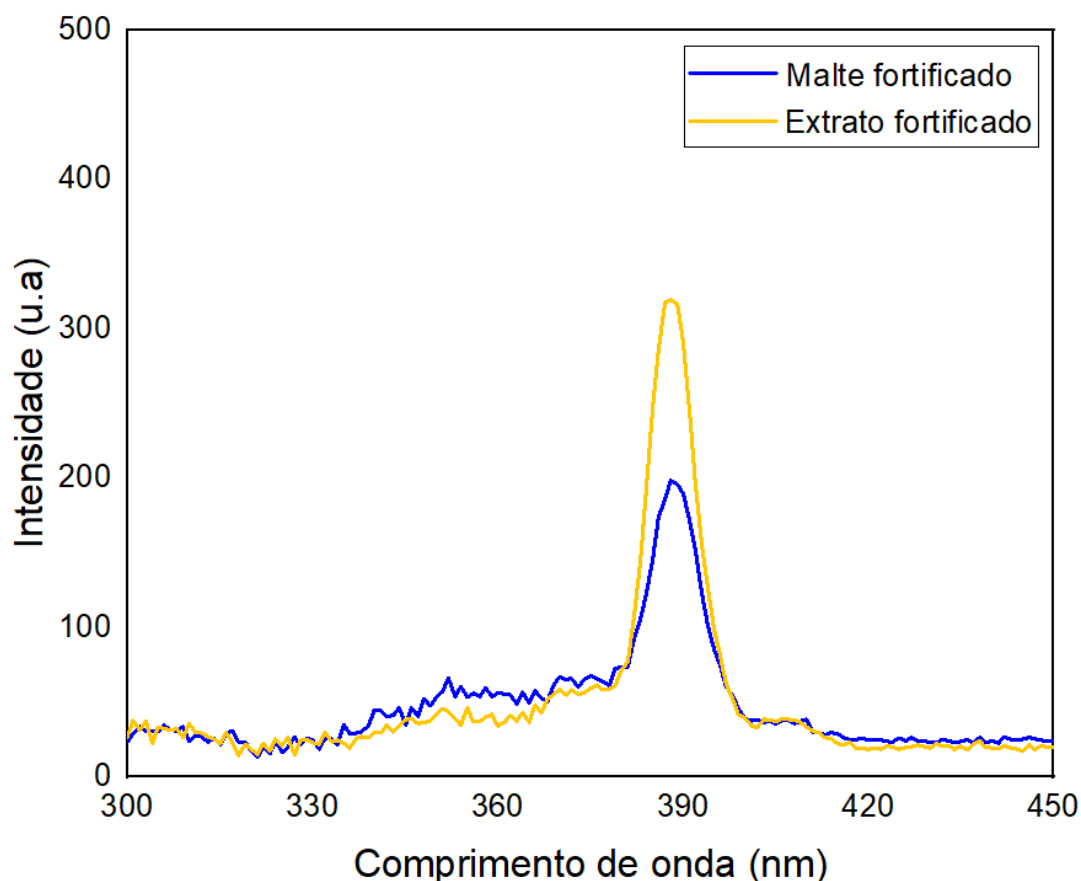


Figura 13. Eficiência da extração de benzo[a]pireno para o método isento de água (n = 3).
Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

4.5.4 Avaliação da intensidade do aquecimento na eficiência da extração de benzo[a]pireno

Enquanto o processo de caramelização geralmente envolve a água, é possível que haja degradação dos carboidratos e o escurecimento mesmo na sua ausência. Porém, observou-se pelos espectros obtidos (**Figura 14**) que o aquecimento do extrato em temperaturas inferiores resulta em uma eficiência menor ($48,9 \pm 1,1$) % em relação ao teste anterior. Embora os valores médios obtidos sejam próximos entre si, os resultados são significativamente diferentes, segundo os teste-t e o teste-F realizados à 95% de confiança. É razoável concluir que o aquecimento mais intenso não provoca alterações no extrato que prejudique a detecção do analito. Assim, o valor de 85°C foi mantido.

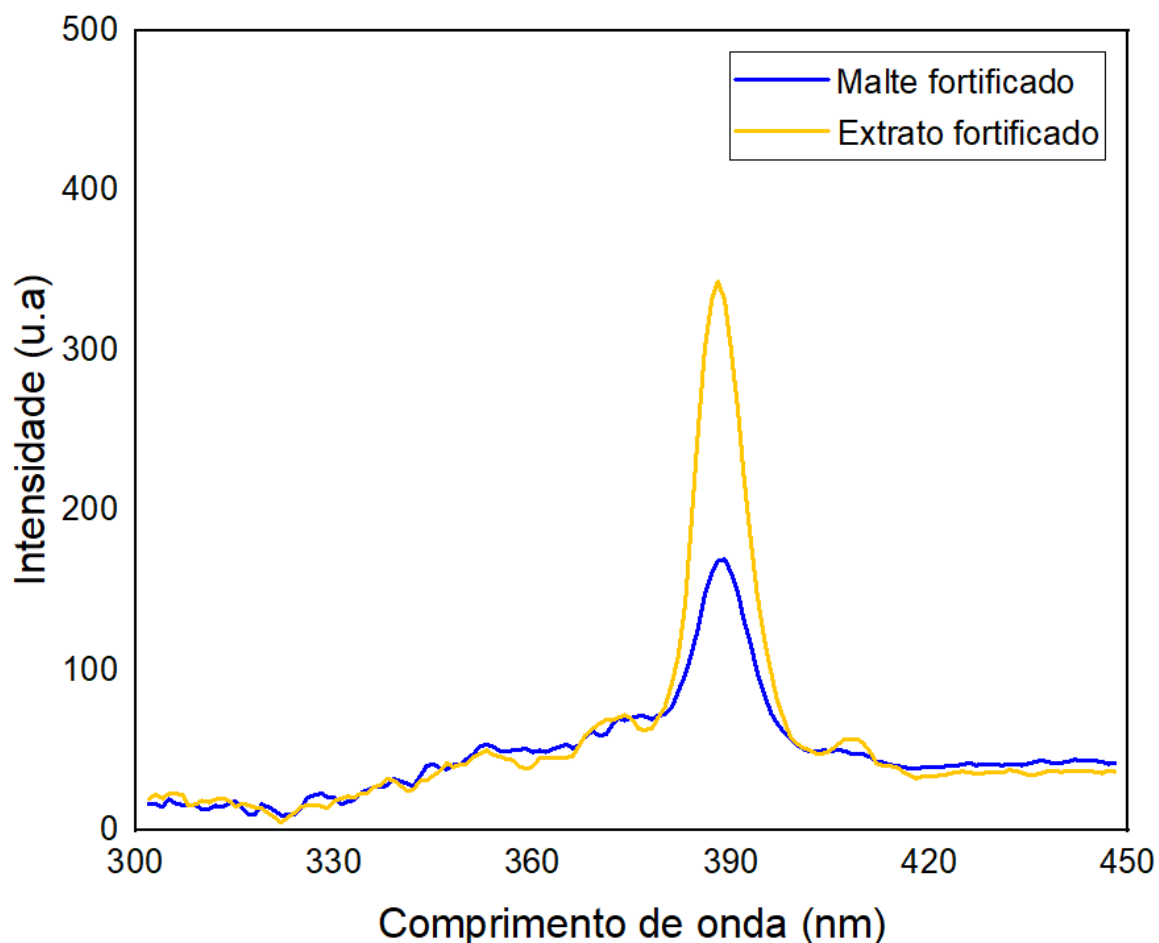


Figura 14. Eficiência da extração de benzo[a]pireno para o método com aquecimento brando ($n = 3$). Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin..

4.5.5 Avaliação da detecção de benzo[a]pireno em extrato de malte obtido sem aquecimento

O percentual médio de extração calculado foi de $(32,8 \pm 0,9) \%$, valor inferior ao alcançado anteriormente. Considerando que futuramente a fluorescência será analisada em concentrações mais baixas do analito, conclui-se que é necessário empregar o aquecimento. Isso se deve ao fato de que o rendimento quântico de fluorescência do B[a]P é maior em DMSO puro do que em uma mistura de DMSO e acetonitrila, tornando a redução na taxa de extração mais significativa. A **Figura 15** contém os espectros dos dois tipos de amostras analisadas (extrato fortificado e malte fortificado). Com estes resultados, conclui-se que mesmo sob temperaturas mais elevadas, tem-se a condição mais favorável para se realizar a extração.

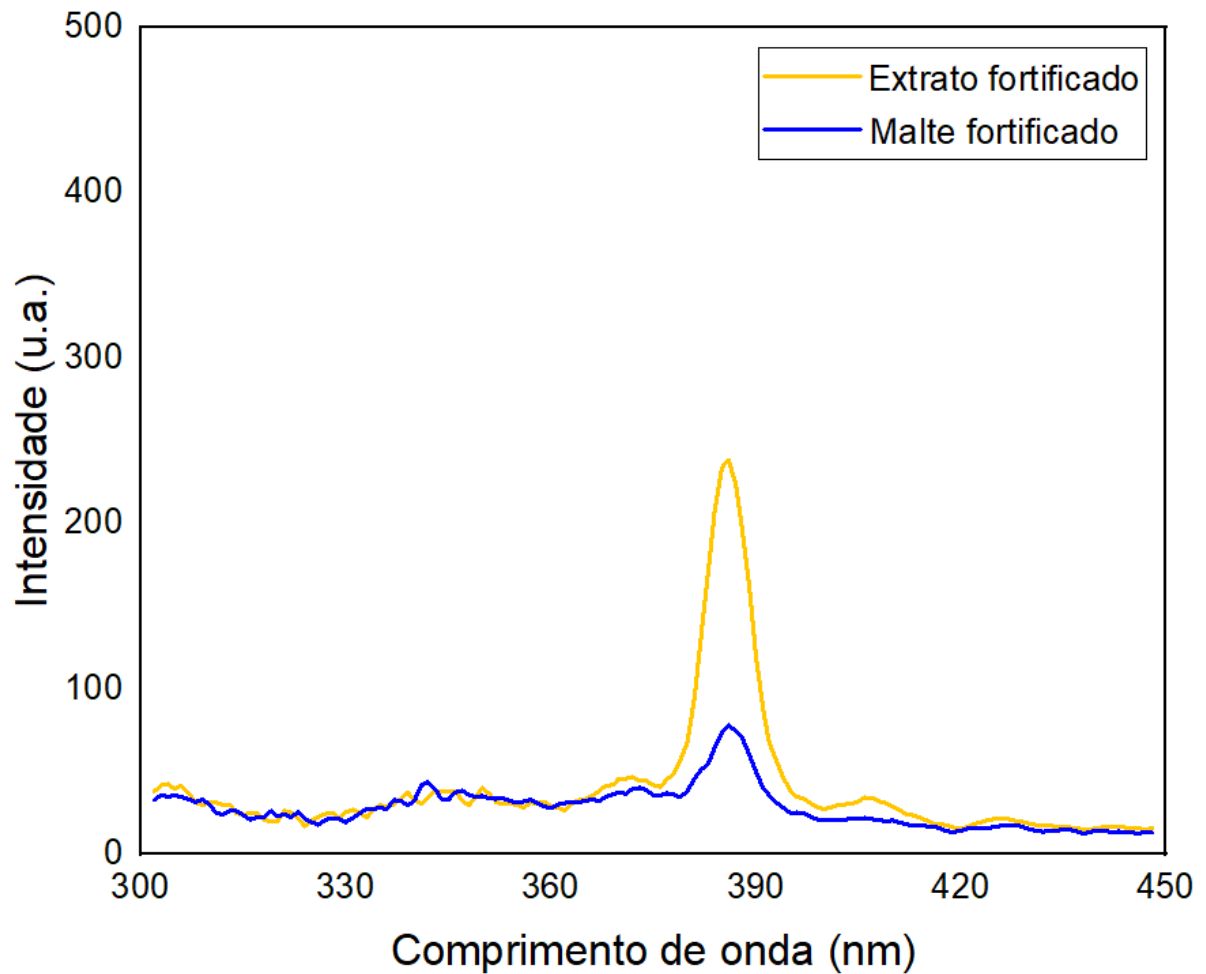


Figura 15: Eficiência da extração de benzo[a]pireno para o método sem aquecimento ($n = 3$).
 Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin..

4.5.6 Otimização de parâmetros da extração por planejamento fatorial

A partir dos resultados, calculou-se a variância experimental, a variância dos fatores, o intervalo de confiança e definiu-se que o tempo de agitação e o percentual de acetato de etila são significativos para a resposta, assim como a interação entre as variáveis.

O modelo experimental é representado pela equação abaixo:

$$y = 49,209 + 3,954 \times (t) + 4,788 \times (\%) - 3,299 \times (t) \times (\%) \quad (15)$$

Onde (t) é a variável tempo de agitação e $(\%)$ é o percentual de acetato de etila na

solução extratora. O modelo foi validado pela análise de variância ANOVA apresentando uma variância explicada de 79%, sendo o modelo linear adequado e a regressão significativa à 95% de confiança. Os dados da análise estatísticas do modelo podem ser visualizados no **Apêndice A**.

Analisando-se a superfície de resposta gerada (**Figura 16**), nota-se que os coeficientes dos dois fatores individuais são positivos, o que indica que um aumento nos valores das variáveis, resulta em maior eficiência de extração. O coeficiente negativo da interação dos efeitos indica uma relação antagônica entre eles, que se manifesta na distorção do plano que representa o gráfico do modelo. Observa-se que é possível trabalhar em qualquer ponto da região de amarelo mais intenso, pois tem-se condições nas quais a eficiência da extração atinge valores superiores. Logo, o ponto da figura correspondente ao experimento III (maior tempo de agitação e ausência de acetato de etila na extração) é uma combinação que proporciona resultados satisfatórios, além de ser mais simples. Logo, é viável substituir o agitador vórtex pelo agitador vertical, aumentando a frequência analítica.

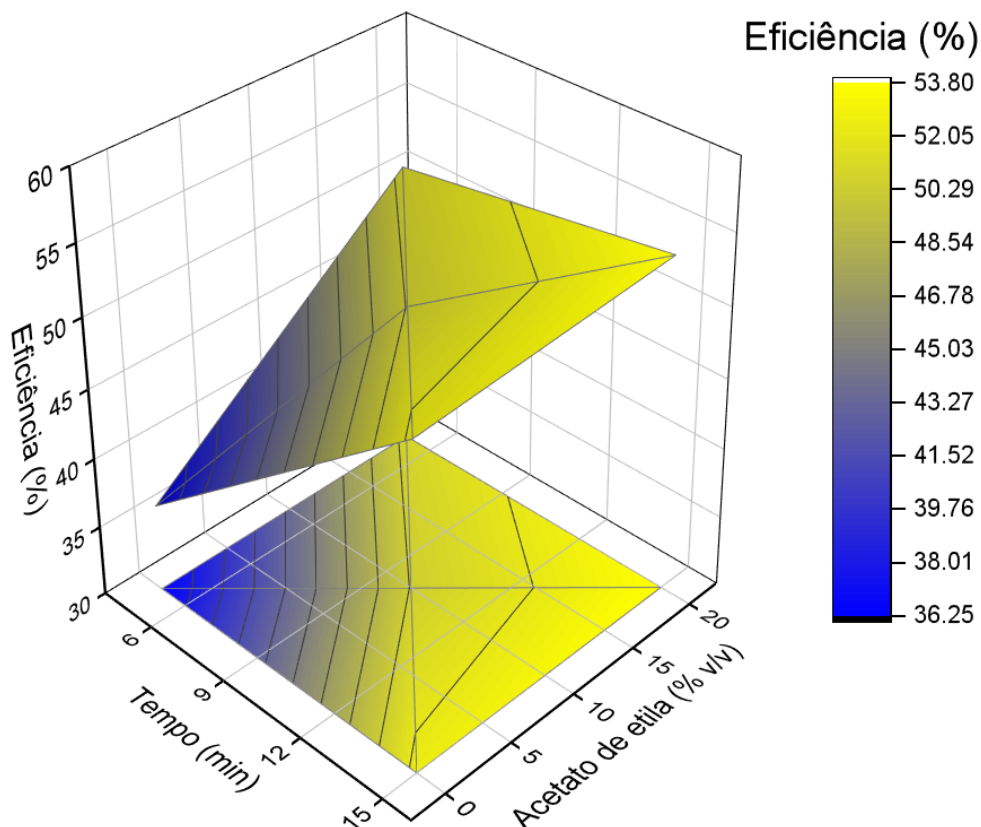


Figura 16. Planejamento fatorial 2^2 com ponto central. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando

o software Origin.

4.5.7 Avaliação da extração na concentração alvo de benzo[a]pireno

Não se obteve o sinal analítico do B[a]P nas amostras de malte fortificado. Isto indica que a quantidade de matéria do analito na matriz resulta em uma massa de B[a]P no extrato abaixo do limite de detecção do método.

Como foi possível detectar o B[a]P nas amostras em que o extrato foi fortificado na concentração de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, criou-se uma condição na qual haja no malte a mesma quantidade de analito correspondente ao extrato final analisado: A concentração de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de B[a]P em 2,5 mL de extrato equivale à massa de $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ de B[a]P. Logo, para que se tenha 2,5 ng de B[a]P no extrato final, considerando uma eficiência de extração de aproximadamente 50%, a massa inicial de B[a]P na amostra de malte deve ser 5,0 ng.

$$\text{Concentração de B[a]P no malte} = \frac{\text{massa de B[a]P}}{\text{massa de malte}}$$

$$1,0 \mu\text{g kg}^{-1} = \frac{5,0 \times 10^{-3} \mu\text{g}}{\text{massa de malte}}$$

$$\text{massa de malte} = 5,0 \text{ g}$$

4.5.8 Avaliação da viabilidade do método para massas superiores de malte

Observando-se os espectros na **Figura 17**, dentre os valores testados, o menor sinal de B[a]P evidente é referente à concentração de $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Portanto, utilizando o mesmo raciocínio do teste anterior, foi estabelecida a massa correspondente de 2,5 g de malte, o que permitiria que o método fosse executado nas mesmas condições experimentais. Desta forma, foi necessário configurar as aberturas das fendas dos monocromadores de excitação e emissão em 10,0 nm e 5,0 nm, respectivamente.

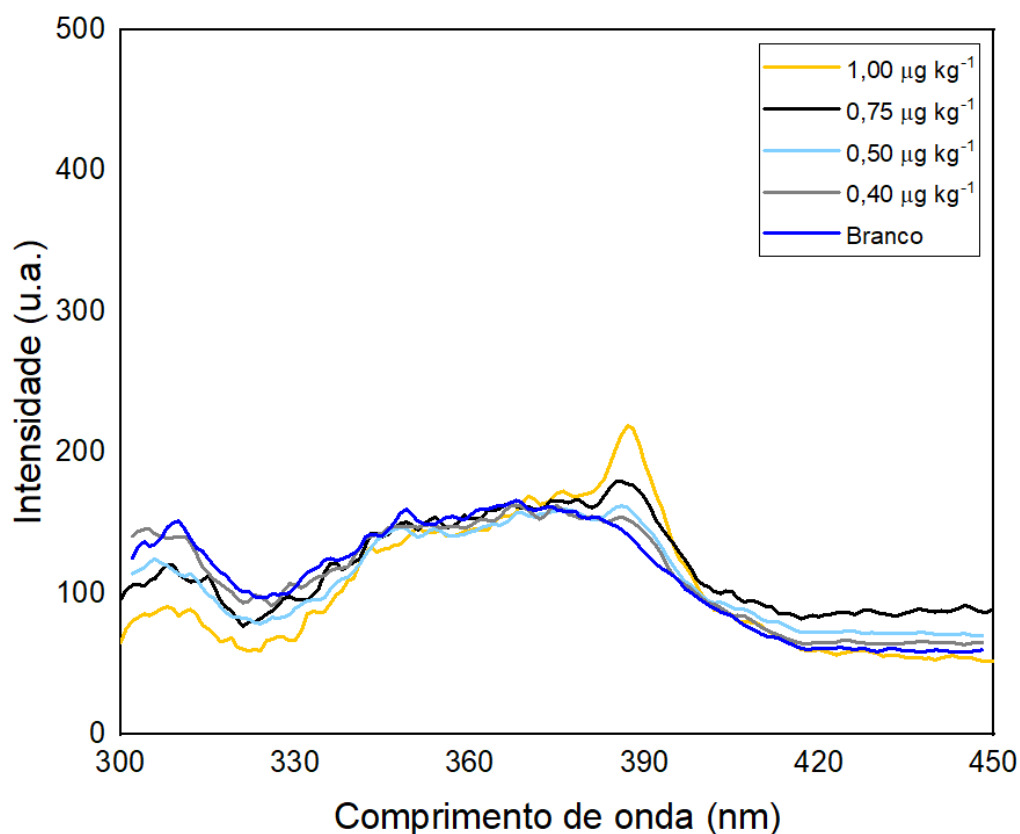


Figura 17. Espectros sincronizados do benzo[a]pireno no extrato em diferentes concentrações obtidas para diferentes massas de malte. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

4.5.9 Detecção de benzo[a]pireno na concentração alvo

Foi possível observar a presença de B[a]P no extrato (**Figura 18**), consolidando-se por este resultado a proposta de determinar o analito na concentração alvo. O aumento da abertura da fenda do monocromador de excitação também intensifica a emissão por fluorescência das interferências.

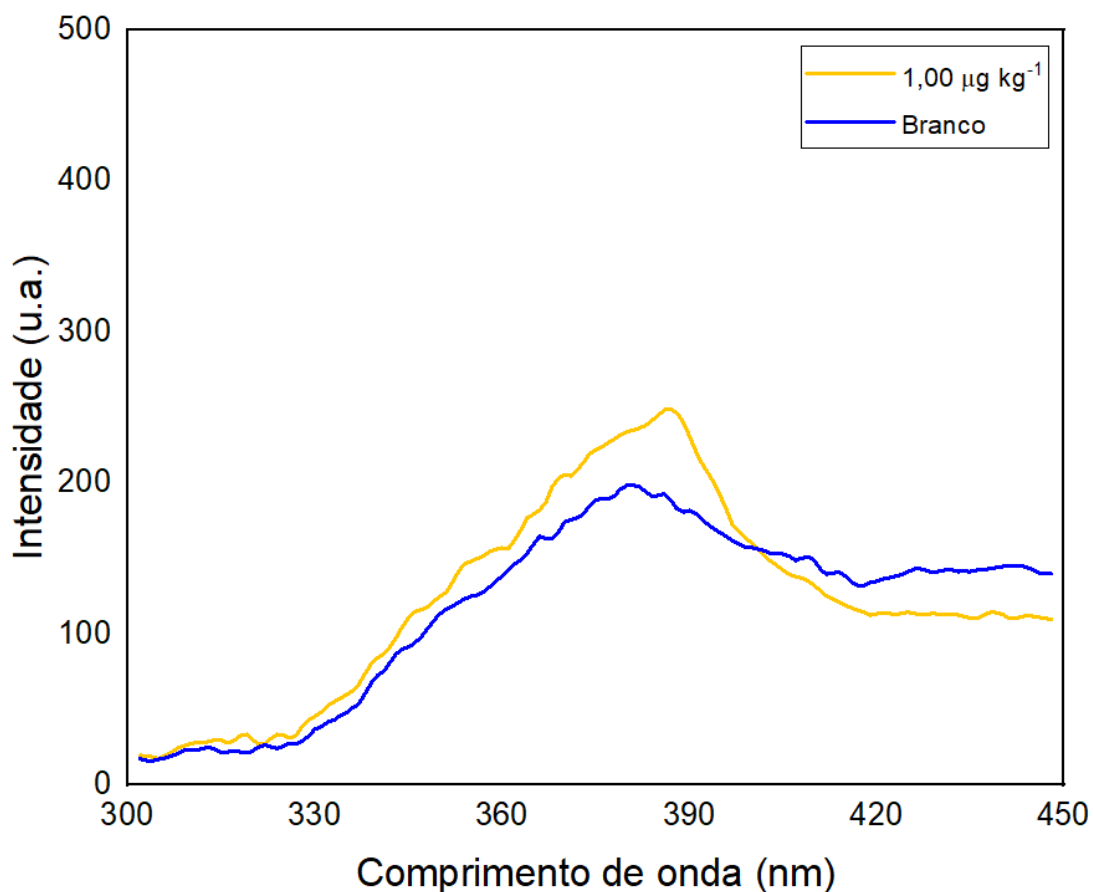


Figura 18. Espectro sincronizado do benzo[a]pireno no extrato na concentração alvo ($n = 3$).

Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

Avaliou-se também o perfil espectral de amostras que continham concentrações de B[a]P inferiores a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$. Como foi evidenciada a presença do analito nas amostras examinadas (**Figura 19**), é plausível construir uma curva analítica do B[a]P na matriz em torno da concentração alvo.

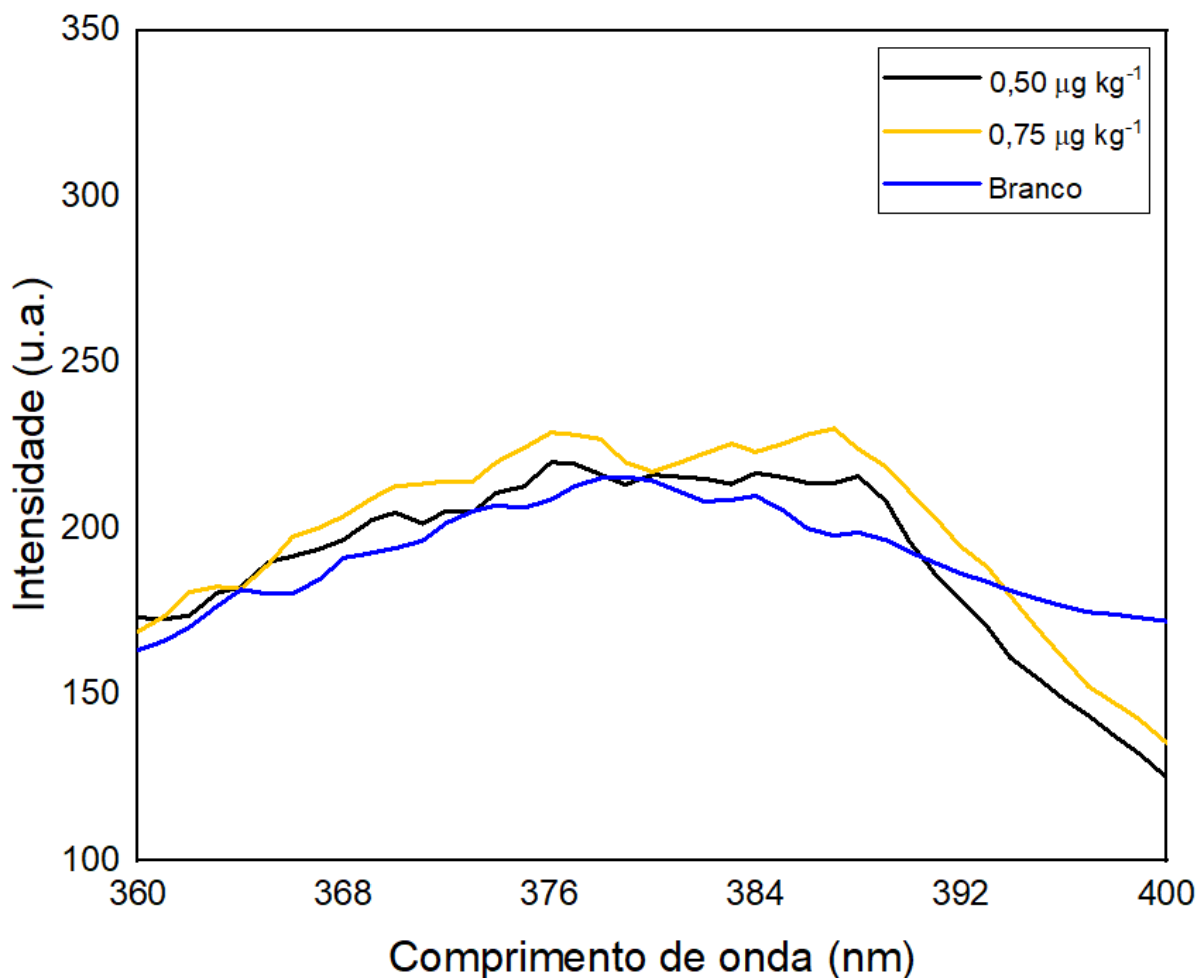


Figura 19. Espectros sincronizados do benzo[a]pireno no extrato em concentrações inferiores ao alvo ($n = 3$). Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

4.5.10 Validação analítica

Ao realizar a regressão linear para a curva do B[a]P em DMSO (**Figura 20**), não foram detectados *outliers*. Por meio dos testes de Ryan-Joiner ($p > 0,10$), Brown-Forsythe ($p > 0,05$) e Durbin-Watson ($p > 0,10$), as exigências foram atendidas e os resíduos assumem a distribuição normal, apresentam homoscedasticidade e são ausentes de autocorrelação.

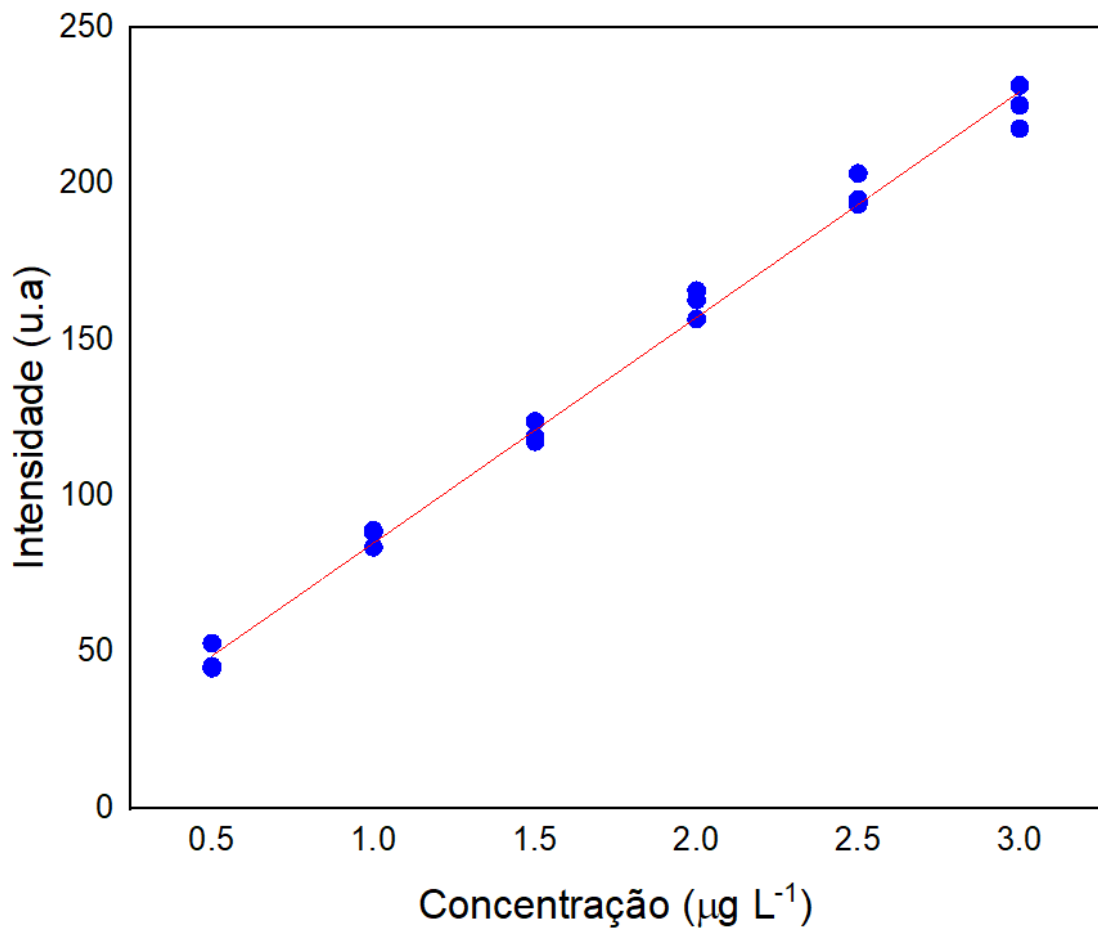


Figura 20. Curva de calibração do benzo[a]pireno em DMSO ($n = 3$). Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

Analogamente, a regressão linear referente ao analito na matriz também obedece a todos os critérios estatísticos. Comparando-se os coeficientes angulares da curva do solvente e da curva matrizada construídas (**Figura 21**), concluiu-se que há efeito matriz. Portanto, as figuras de mérito remanescentes devem ser avaliadas de acordo com as amostras da matriz.

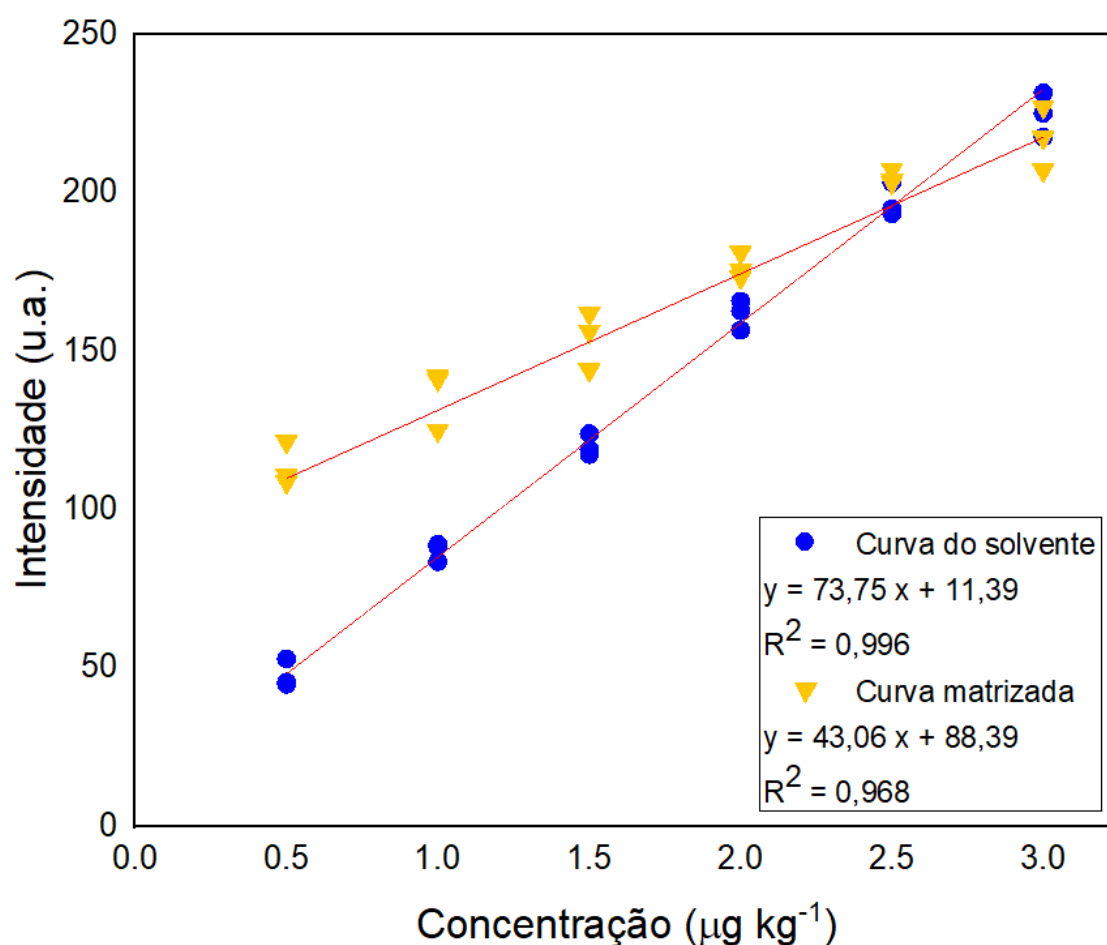


Figura 21. Comparação entre a curva no solvente e a curva matrizada para avaliação do efeito de matriz ($n = 3$) na determinação de benzo[a]pireno. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

A seletividade é constatada pelo conjunto de espectros expostos anteriormente que garantiram a capacidade de detectar o analito na concentração alvo, mesmo diante de interferentes da matriz, o que garantiu a capacidade de detectar o analito na concentração alvo utilizando o comprimento de onda de excitação de 388 nm. Embora a fluorescência sincronizada seja uma técnica rápida, sensível e econômica para a quantificação de B[a]P, sua principal limitação reside na ausência de separação cromatográfica, o que pode levar à uma sobreposição espectral com outros compostos de HPA presentes na matriz. No entanto, estudos anteriores mostraram que, com configurações otimizadas de $\Delta\lambda$ e uma seleção espectral cuidadosa, é possível alcançar um bom nível de especificidade para o B[a]P (Caruso e Alaburda, 2009; Pacheco e Bruzzone, 2013). Considerando que o B[a]P é amplamente aceito como

composto marcador da presença de HPAs cancerígenos em alimentos, o método aqui apresentado é adequado como ferramenta de triagem e monitoramento em programas de controle de qualidade e vigilância sanitária de alimentos. Essa abordagem está de acordo com as recomendações da EFSA, da WHO e do JECFA, que apoiam o uso do B[a]P como indicador de exposição a HPAs cancerígenos em alimentos e matrizes ambientais (EFSA, 2008; WHO, 2000; JECFA, 2006). No entanto, para fins de fiscalização regulatória ou em casos em que forem detectados níveis elevados, recomenda-se análises confirmatórias utilizando técnicas cromatográficas como HPLC-FLD ou GC-MS (Duedahl-Olesen *et al.*, 2020; Belešová *et al.*, 2023).

O valor de LD calculado para o método proposto foi de $0,24 \mu\text{g kg}^{-1}$. Esse resultado está abaixo do limite máximo exigido pelo regulamento europeu EC 2016/582, que estabelece um LD de $0,30 \mu\text{g kg}^{-1}$ (European Commission, 2016), e também é compatível com a ordem de grandeza obtida em outros estudos da literatura sobre a determinação de B[a]P em malte (**Tabela 3**). O LQ calculado para o método proposto foi de $0,81 \mu\text{g kg}^{-1}$. Como a primeira concentração da curva apresentou exatidão e precisão satisfatórias, o LQ experimental foi estabelecido em $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Os percentuais de recuperação encontram-se na faixa 97,9 % - 114,6 %. Estes resultados são aceitáveis de acordo com os limites estabelecidos (40% - 120%) pela AOAC para a ordem de concentração de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de B[a]P.

O DPR para a repetibilidade aceitável é menor que 30%. Os valores calculados encontram-se na faixa de 4,5% - 8,7%, sendo apropriados. O DPR para a precisão intermediária aceitável é menor que 45%. Os valores calculados encontram-se na faixa de 6,3% - 9,6%, sendo apropriados. Os resultados da validação estão sintetizados na **Tabela 6**.

Tabela 6: Figuras de mérito de validação do método de determinação de benzo[a]pireno em malte

Concentração B[a]P ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Repetibilidade		Precisão intermediária		Recuperação média	
	DPR (%)	Limite (%)	DPR (%)	Limite (%)	R' (%)	Limite (%)
0,5	8,7	30	9,6	45	97,9	40 – 120
1,0	4,5	30	6,3	45	114,6	40 – 120
1,5	6,3	30	7,8	45	101,6	40 – 120
Faixa linear ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0,5 – 3,0					
Linearidade	Inclinação	Intercepto	(R²)			
	43,06	88,39	0,968			
LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0,24					
LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0,81					

Este método oferece um tempo de análise significativamente reduzido em relação ao método de referência e evita procedimentos complexos de *cleanup* ou o uso de instrumentação de alto custo, tornando-o atrativo para aplicações rotineiras no controle de segurança alimentar. Embora a aplicação do método QuEChERS apresente várias vantagens, ela exige materiais e equipamentos de alto custo, conforme descrito na **Tabela 7**.

É importante destacar que a sensibilidade e a seletividade do método desenvolvido podem ser ainda mais aprimoradas com a integração de ferramentas quimiométricas multivariadas, como a PARAFAC, para expandir o escopo a outros HPAs prioritários e outros tipos de malte. O método proposto é baseado em dados de primeira ordem e não explora a vantagem de segunda ordem proporcionada pelo PARAFAC. Embora abordagens de segunda ordem ofereçam melhor resolução de interferentes desconhecidos, elas exigem EEM e ferramentas de modelagem mais complexas. Para melhorar ainda mais a seletividade do método e avaliar de forma mais abrangente misturas de HPAs, a fluorescência sincronizada também pode ser combinada com algoritmos de aprendizado de máquina, como redes neurais com retropropagação, que também permitem quantificação sem pré-separação (Wei *et al.*,

2024). A escolha por utilizar uma estratégia de fluorescência síncrona com deslocamento fixo de comprimento de onda foi feita para garantir simplicidade metodológica, baixo custo e adequação para uso rotineiro em laboratórios de controle de qualidade de alimentos.

Tabela 7. Comparação entre o método de referência e o proposto

Parâmetros	Método de referência	Método proposto
Padrão interno	HPAs deuterados	-----
Método de <i>cleanup</i>	SPE com incorporação de zircônio Congelamento à -80 °C	-----
Consumo de gases	Nitrogênio pressurizado e hélio (~44 mL por amostra)	-----
Tempo	2 dias	2,5 horas
Equipamento	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas	Espectrofluorímetro

4.5.11 Aplicação do método validado

O método validado foi aplicado para monitorar a concentração de B[a]P em três amostras de malte de cevada tipo Pilsen comercialmente disponíveis, produzidas em diferentes países. O valor °EBC para as três amostras analisadas é 3,0, com coloração palha, adequada para cervejas tipo Pilsen, como o malte utilizado na otimização e validação do método, cujo °EBC é 4,7. Os espectros obtidos mostram características de fluorescência semelhantes (**Figura 22**). Os resultados indicam que o teor do analito em todas essas amostras está abaixo do LD do método proposto (0,24 µg kg⁻¹). Como mencionado anteriormente, não existe legislação específica sobre a concentração de B[a]P em malte, mas produtos elaborados com essas amostras estariam de acordo com a legislação da União Europeia, que define uma concentração de B[a]P inferior a 1 µg.kg⁻¹ em alimentos derivados de cereais.

Os principais trabalhos publicados nessa área de pesquisa indicam o seguinte: amostras de malte claro de cevada tipo Pilsen da República Tcheca não apresentaram níveis quantificáveis de B[a]P (Belešová *et al.*, 2023). Grãos de cevada adquiridos comercialmente na Croácia foram submetidos a diferentes temperaturas de secagem, apresentando concentrações de B[a]P abaixo do limite de detecção (Habschied *et al.*,

2023; Mastanjević *et al.*, 2021). Na Dinamarca, nove amostras de malte foram analisadas, revelando duas com níveis de B[a]P de 3,65 e 2,31 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Duehdal-Olesen *et al.*, 2020).

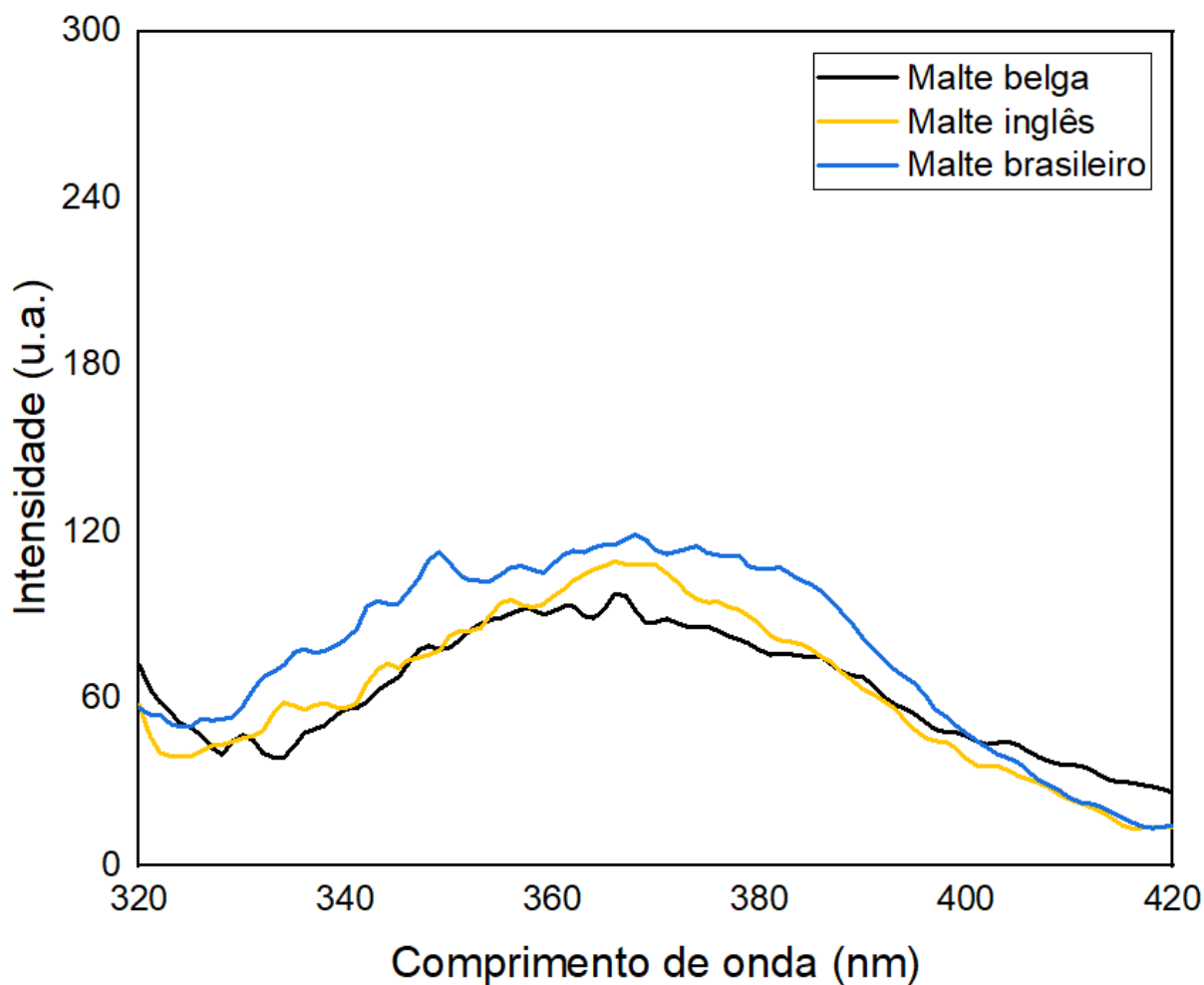


Figura 22. Espectros sincronizados obtidos para amostras de malte analisadas pelo método validado. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

4.6. Conclusões

Um método adaptado de extração com solvente foi proposto e executado pela incorporação da análise direta por fluorescência sincronizada à energia constante. Esta técnica demonstrou-se apropriada para a determinação de benzo[a]pireno em malte Pilsen de cevada. Durante o desenvolvimento do método, parâmetros do preparo de amostra foram investigados, incluindo o aquecimento do extrato, o tempo de agitação e a interferência da água. Os resultados obtidos são consistentes à literatura, demonstrando seletividade, veracidade, linearidade e limites de detecção e quantificação aceitáveis. A simplicidade experimental é uma vantagem que torna a aplicação deste método uma alternativa eficiente para a realização de métodos de rotina que exijam alta frequência analítica. As propriedades da espectrofluorimetria indicaram compatibilidade para se determinar o analito diante das interferências de uma matriz complexa, havendo possibilidade de expandir o escopo do método para outros tipos de malte.

5. DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM VINHO

5.1. Aspectos gerais

5.1.1 Vinho

O vinho é uma bebida alcoólica obtida a partir da fermentação do mosto da uva (espécie *Vitis vinifera*), sendo considerado um dos produtos fermentados mais antigos e de significativa relevância histórica e cultural. A fermentação alcoólica é um processo bioquímico conduzido, predominantemente, por leveduras do gênero *Saccharomyces*, que metabolizam os monossacarídeos presentes na polpa da uva, como a glicose e a frutose, convertendo-os em etanol e dióxido de carbono. Embora a vinificação (produção de vinho) esteja tradicionalmente associada à uva, a definição legal e comercial da bebida pode variar conforme a legislação vigente em cada país. Em termos gerais, o vinho apresenta um teor alcoólico compreendido entre 8% e 15% em volume, sendo classificado em diferentes categorias com base na variedade da uva utilizada, no método de vinificação empregado, no teor de açúcar residual e no período de envelhecimento. (Jackson, 2020).

A composição do vinho é complexa e influencia diretamente suas características sensoriais e nutricionais. O vinho é composto por água (cerca de 80% a 90%), etanol, ácidos orgânicos (como ácido tartárico, málico e cítrico), compostos fenólicos (como taninos e antocianinas), açúcares residuais (principalmente glicose e frutose, quando não totalmente fermentados), além de vitaminas, minerais e uma variedade de compostos voláteis responsáveis pelos aromas e sabores. Os compostos fenólicos, além de influenciarem na cor e no sabor, também têm sido estudados por seus potenciais benefícios à saúde, devido à sua ação antioxidante (Waterhouse *et al.*, 2024).

O consumo de vinho apresenta uma distribuição global desigual, com destaque para os países europeus, como França, Itália, Espanha e Portugal, que lideram tanto em produção quanto em consumo per capita. Nas últimas décadas, entretanto, houve uma expansão significativa do interesse por vinho em regiões fora da Europa, especialmente nos Estados Unidos, China e Austrália, refletindo mudanças no perfil dos consumidores, que passaram a demandar produtos de maior qualidade e apelo sustentável, segundo a Organização Internacional da Vinha e do Vinho. No Brasil,

embora o consumo per capita ainda seja baixo em comparação aos padrões internacionais, observa-se um crescimento contínuo, impulsionado por jovens adultos e classes médias urbanas. A indústria vinícola nacional, concentrada principalmente na região Sul, tem investido em modernização tecnológica, valorização de uvas viníferas e exploração de novos terroirs em estados como Minas Gerais, Bahia e Pernambuco, fatores que, juntamente com a maior oferta de rótulos e o aumento do conhecimento do consumidor, têm contribuído para a consolidação do vinho na cultura alimentar brasileira (Mercer, 2025; Cardoso, 2023; Cella *et al.*, 2021).

As principais classificações dos vinhos se relacionam à cor e ao tipo de uva utilizada, bem como o processo de vinificação, que determinam as suas propriedades organolépticas (**Figura 23**). Os vinhos tintos são produzidos a partir de uvas de casca escura, como a *Cabernet Sauvignon* e a *Merlot*, e sua coloração intensa provém da fermentação do mosto juntamente com as cascas, o que também contribui para a presença de taninos mais pronunciados. Já os vinhos brancos geralmente utilizam uvas de casca clara, como a *Chardonnay* e a *Sauvignon Blanc*, e são elaborados com a separação imediata das cascas, resultando em bebidas de sabor mais leve e acidez acentuada. O vinho rosé, por sua vez, é obtido por um breve contato do mosto com as cascas de uvas tintas, conferindo-lhe a coloração rosada característica e um perfil sensorial que equilibra frescor e leveza (Puckette, 2015)



Figura 23. Características visuais dos diferentes tipos de vinho.

5.1.2 Contaminação de vinho

Diversos contaminantes de origem agrícola têm sido identificados em vinhos, com destaque para resíduos de metais como arsênio e cobre, frequentemente associados ao uso de fungicidas e bactericidas aplicados nos vinhedos (EFSA, 2018; Moreira *et al.*, 2011). Além disso, análises laboratoriais identificaram traços de múltiplos fungicidas e outros pesticidas comumente empregados na viticultura (IARC, 2010). Nesse contexto, o vinho tem se consolidado como um dos produtos alimentares mais investigados quanto à presença de resíduos de pesticidas. Apesar de os processos envolvidos na vinificação (maceração, prensagem, fermentação, clarificação e filtração) poderem reduzir significativamente o conteúdo residual de pesticidas, diversos estudos apontam a permanência de resíduos em amostras tanto experimentais quanto comercializadas. Pesticidas como azoxistrobina, dimetoato e pirimetanil demonstram, inclusive, baixa redução ao longo do processo de vinificação, apresentando concentrações finais no vinho semelhantes às encontradas nas uvas (Liviz *et al.*, 2024; He *et al.*, 2019; Čuš *et al.*, 2010; González-Rodríguez *et al.*, 2009; Cabras & Angioni, 2000).

Embora os resíduos de pesticidas agrícolas em vinhos tenham sido amplamente estudados, as micotoxinas representam uma ameaça igualmente relevante, mas frequentemente subestimada no contexto da viticultura. As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos durante a fermentação dos alimentos. Ao contrário dos pesticidas, cujo uso é controlado e regulado em praticamente todas as etapas da produção agrícola, as micotoxinas resultam de contaminações fúngicas naturais, muitas vezes imprevisíveis, que podem ocorrer no campo, durante a colheita ou no armazenamento das uvas, dificultando tanto a sua prevenção quanto o monitoramento da sua presença. Além disso, diferentemente de muitos pesticidas que são significativamente reduzidos durante a vinificação ou completamente eliminados na destilação, micotoxinas são termoestáveis e mais resistentes à degradação, podendo persistir até o produto final (Ubeda *et al.*, 2020; Kochman *et al.*, 2021). Entre as micotoxinas já identificadas em vinhos estão: ocratoxina A, aflatoxinas, desoxinivalenol, fumonisina B1, toxina HT-2 e patulina (He *et al.*, 2019; IARC, 2010; Pang *et al.*, 2017; Pflaum *et al.*, 2016). Apesar disto, a pesquisa científica e a vigilância regulatória sobre micotoxinas em vinhos permanecem limitadas em comparação aos resíduos de pesticidas, evidenciando uma

lacuna que demanda investigação mais aprofundada (Kochman *et al.*, 2021).

Além dos já mencionados, os vinhos podem conter outras classes de contaminantes, incluindo aqueles originados durante o processamento, como os produtos da reação de Maillard (Lago & Welke, 2019); substâncias que migram dos materiais de embalagem, como os ftalatos (Chatonnet, 2014); aditivos ilegais, como o monoetilenoglicol; e compostos adicionados como conservantes, como os sulfitos (Comissão Europeia, 2020).

5.1.3 Ocratoxina A em vinho

Dentre as micotoxinas, a ocratoxina A (OTA) é a mais significativa associada às uvas e seus derivados, devido à sua elevada prevalência, toxicidade e às condições envolvidas na produção do vinho. Esta molécula pertence ao grupo das ocratoxinas e sua formação é atribuída a fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, cuja metabolização é favorecida por temperaturas elevadas (~30 °C), alta umidade relativa (> 85%) e atividade de água superior a 0,95. Esses fatores são frequentemente observados na fase final da maturação das uvas ou quando há danos mecânicos causados por insetos, chuvas ou práticas inadequadas de colheita. A contaminação também pode ocorrer durante a colheita e o pós-colheita, devido ao contato com frutos infectados, o que favorece o acúmulo e a propagação da OTA, além de condições inadequadas de armazenamento, que estimulam sua biossíntese (Ben Miri *et al.*, 2024; Ortiz-Villeda *et al.*, 2021). É importante enfatizar que as alterações climáticas têm contribuído para o aumento da incidência de OTA em vinhos, principalmente devido à elevação das temperaturas e à maior frequência de eventos climáticos extremos, como secas seguidas de chuvas intensas, exigindo maior atenção aos métodos de cultivo, colheita e armazenamento para garantir a qualidade e a segurança do vinho (Paterson *et al.*, 2018).

Vinhos tintos são mais suscetíveis à contaminação por OTA devido ao contato prolongado com as cascas durante a fermentação, ao contrário dos vinhos brancos e *rosé*, que geralmente apresentam níveis mais baixos da toxina. Isso se deve ao fato de que, nos tintos, a maceração ocorre por um período mais longo, facilitando a transferência de até 20% da OTA presente nas cascas para a bebida. Além disso, essa etapa costuma ser realizada em temperaturas elevadas e em condições aeróbicas, o que favorece significativamente o crescimento de fungos produtores de

OTA (Gil-Serna *et al.*, 2018).

A OTA é um derivado dihidroisocumarínico cíclico e clorado do pentacetídeo, ligado à L-β-fenilalanina por uma ligação amídica. A sua fórmula estrutural está representada na **Figura 24**. Em meio aquoso, atua como ácido fraco e possui dois valores de pKa, 4,4 e 7,3 (El Khoury & Atoui, 2010)

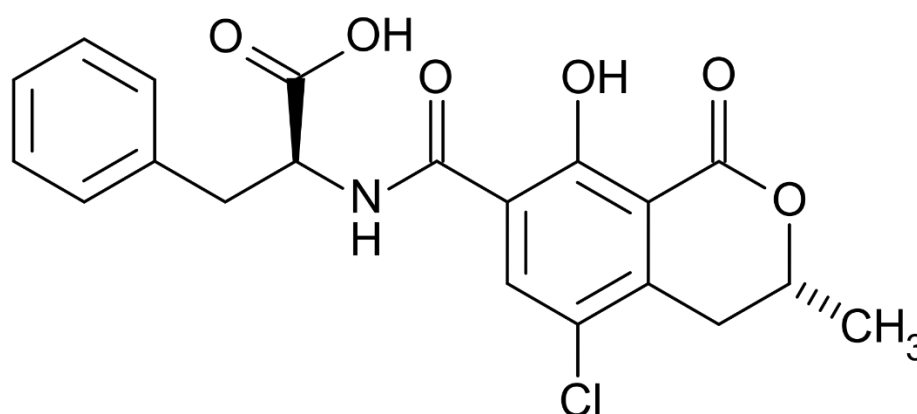


Figura 24. Fórmula estrutural de ocratoxina A. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software ChemDraw.

A OTA possui uma estrutura química singular que a diferencia das demais micotoxinas. Embora contenha grupos funcionais polares, a presença de um átomo de cloro ligado à cadeia aromática contribui para sua baixa polarizabilidade e limita a formação de ligações de hidrogênio com moléculas de água. Essas características conferem à OTA um caráter lipofílico pronunciado, favorecendo sua distribuição em membranas biológicas e sua bioacumulação em tecidos adiposos. Esse comportamento lipofílico também prolonga sua permanência no organismo, especialmente nos rins e no fígado, onde se liga a lipoproteínas e à albumina plasmática (Malir *et al.* 2016; El Khoury & Atoui, 2010)..

A elevada estabilidade da molécula pode ser atribuída à presença de ligações de hidrogênio intramoleculares e ao sistema de conjugação eletrônica que inclui o grupo amida. Essa conjugação exige maior energia para a clivagem das ligações π , o que reduz sua suscetibilidade à hidrólise e aumenta sua estabilidade térmica. A degradação térmica da OTA inicia-se a partir de 170 °C, sendo que mesmo a 250 °C a molécula encontra-se apenas parcialmente decomposta. Essa resistência térmica

torna a OTA uma substância persistente em alimentos, ao contrário de outras micotoxinas que se degradam mais facilmente sob as mesmas condições. Além disso, a estrutura altamente conjugada da OTA está relacionada às suas propriedades fluorescentes relativamente intensas (Kőszegi & Miklós, 2016) Na **Tabela 8** constam-se as principais características da OTA.

Tabela 8. Propriedades físico-químicas da ocratoxina A

Aparência	Sólido branco
Fórmula molecular	$C_{20}H_{18}ClNO_6$
Peso molecular	403,8 g mol ⁻¹
Densidade	1,25 g cm ⁻³
Volatilidade	Baixa
Ponto de fusão	169 °C
Ponto de ebulição	Não se aplica
Coefficiente de partição	log k_{ow} = 4,7 (lipossolúvel)
Solubilidade em água	1 mg L ⁻¹ (função do pH)

Em consequência de suas propriedades moleculares, a OTA representa um alto risco à saúde humana, destacando-se como uma das micotoxinas de maior toxicidade. É classificada como um possível agente carcinogênico para humanos (grupo 2B da IARC) e está associada a efeitos nefrotóxicos, teratogênicos, hepatotóxicos, genotóxicos e imunossupressores. Devido à sua persistência no vinho e a capacidade de bioacumulação, mesmo em baixas concentrações, a exposição crônica à OTA pode causar danos ao DNA por meio de estresse oxidativo e inibição da síntese proteica. (Banahene *et al.*, 2024; Tao *et al.*, 2018; Ostry *et al.*, 2017). Com base em avaliações toxicológicas, a EFSA estabeleceu um limite provisório de ingestão semanal tolerável para a OTA de 100 ng kg⁻¹ de massa corporal (EFSA, 2006). Paralelamente, a EC fixou o limite máximo permitido de OTA em vinhos em 2,0 µg L⁻¹, sendo a única micotoxina regulamentada para esta bebida (European Commission, 2023).

No grupo das ocratoxinas, também encontram-se a ocratoxina B (OTB) e a ocratoxina C (OTC). Apesar de serem quimicamente semelhantes à OTA (**Figura 25**), essas substâncias não são reguladas por órgãos internacionais, devido à sua contribuição considerada insignificante para a toxicidade geral e para a exposição humana (Heussner & Bingle, 2015).

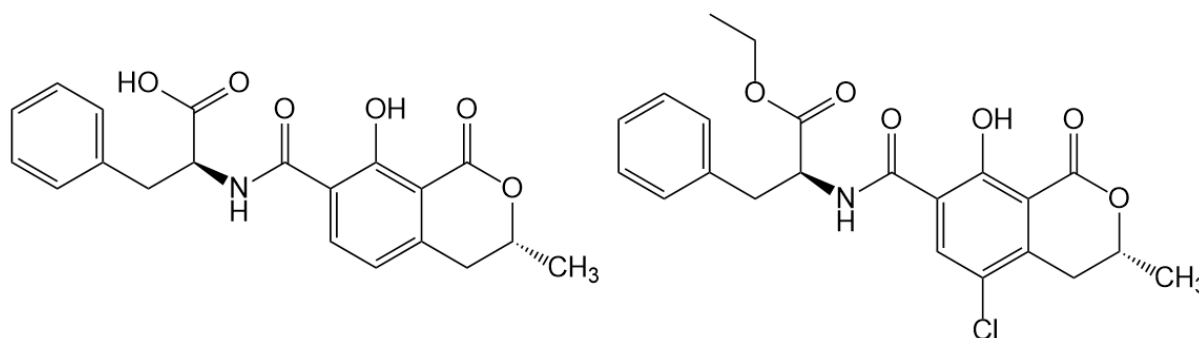


Figura 25. Fórmulas estruturais da ocratoxina B (à esquerda) e ocratoxina C (à direita).

A OTB é raramente encontrada em vinhos, pois é produzida em pequenas quantidades por fungos associados à contaminação da bebida. Apresenta menor estabilidade em comparação à OTA por conta da ausência do átomo de cloro em sua estrutura, o que aumenta sua reatividade em condições ácidas, oxidativas e fotolíticas (típicas da fermentação e do armazenamento do vinho). Conseqüentemente, a OTB tende a se degradar com facilidade durante esse processo. A ausência do átomo de cloro também confere à OTB maior hidrossolubilidade, reduzindo sua retenção nas cascas das uvas e tornando-a mais suscetível à remoção durante o processamento. Além disso, seu caráter mais hidrofílico contribui para uma menor toxicidade e biodisponibilidade, uma vez que diminui sua capacidade de atravessar membranas celulares, ligar-se a proteínas e acumular-se nos rins. Por esses motivos, a OTB não é considerada carcinogênica. Já a OTC não é um metabólito natural produzido por fungos, sendo formada exclusivamente por vias artificiais, como a esterificação da OTA (processo inviável nas condições típicas de fermentação do vinho) ou por mecanismos enzimáticos. Em meio ácido, a OTC pode ser hidrolisada, regenerando a OTA. A toxicidade da OTC está relacionada justamente à sua capacidade de conversão em OTA (Heussner & Bingle, 2015).

5.1.4 Métodos de análise da ocratoxina A

A análise de OTA em alimentos geralmente envolve etapas de extração, *clean-up*, concentração (quando necessária), detecção e quantificação. A determinação da ocratoxina OTA em vinhos é comumente realizada por meio de técnicas analíticas avançadas, que combinam alta sensibilidade, seletividade e conformidade com os requisitos regulatórios (Kizis *et al.*, 2021).

A HPLC-FLD é o método mais bem estabelecido e empregado. Mais recentemente, técnicas como a UHPLC e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (MS/MS) têm ganhado destaque, por oferecerem maior especificidade e possibilitarem a determinação simultânea de múltiplas micotoxinas (Li *et al.*, 2022; Louppis & Constantinou, 2022; Kholová *et al.*, 2020). Tecnologias como os ensaios imunoenzimáticos (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e os testes de fluxo lateral (LFIA - *Lateral Flow Immunoassay*), vêm sendo utilizadas como ferramentas de triagem rápida, embora geralmente necessitem de confirmação por métodos cromatográficos reconhecidos por autoridades reguladoras (López-Puertollano *et al.*, 2021).

No preparo de amostras, embora os métodos convencionais de extração líquida sejam comumente utilizados para o preparo de amostras para a determinação de OTA, a SPE e suas variações, além do método QuECHERS, tem sido aplicados (Yulia & Martin, 2024; He *et al.*, 2019; Huertas-Pérez *et al.*, 2017). As colunas de imunoafinidade tornaram-se ferramentas amplamente utilizadas, aprimorando significativamente a análise de OTA ao oferecerem diversas vantagens, como extratos mais limpos, maior precisão e exatidão, além de um processamento mais rápido. No entanto, apesar desses benefícios, essas colunas apresentam um custo elevado, a sua reutilização é bastante limitada, e o protocolo de uso requer um tempo considerável, o que pode representar uma restrição para sua aplicação em larga escala (Boshra *et al.*, 2023). Alternativas como biossensores, nanopartículas e aptâmeros baseados em detecção espectroscópica e eletroquímica têm se apresentado como soluções promissoras para a detecção de OTA, especialmente em vinhos. Essas abordagens ressaltam a importância de desenvolver e aprimorar métodos que conciliem eficiência analítica à viabilidade econômica (Meira *et al.*, 2025; Zhang *et al.*, 2023; Karachaliou *et al.*, 2022; Nekrasov *et al.*, 2022; Zangheri *et al.*, 2021). Trabalhos recentes que fazem uso de algumas das técnicas citas de preparo

de amostra e análise instrumental estão expostos na **Tabela 9**.

Tabela 9: Publicações recentes sobre métodos de análise de ocratoxina A em vinhos

Autor	Ano	Preparo de amostras	Técnica analítica	LD e LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Meira, D.	2025	Não tem	SERS	0,007 e 0,05
Yulia, E.	2024	QuECHERS	UHPLC-FLD	0,03 e 0,10
Nekrasov, N.	2022	Não tem	GFET	0.0005 e n.i.
Karachaliou, C.	2022	Não tem	WLRS	0,30 e n.i.
Louppis, A.	2022	LLE	UPLC-MS/MS	0,27 e 0,81
Zangheri, M.	2021	Não tem	LFIA/Quimioluminescência	0,30 e n.i.
Kholová, A.	2020	SPE <i>on-line</i>	HPLC-FLD	0,03 e 0,10

GFET: *Graphene Field Effect Transistors* - Transistores de efeito de campo de grafeno; SERS: *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* - Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície; WLRS: *White Light Reflectance Spectroscopy* - Espectroscopia de reflectância da luz branca; n.i.: não informado.

A CE estabeleceu algumas exigências para os métodos de análise de toxinas em relação à sua recuperação e reprodutibilidade (European Commission, 2004). A AOAC recomenda que o método validado para a determinação de OTA em vinho faça uso de *clean-up* por coluna de imunoafinidade seguida de análise por HPLC-FLD (Visconti *et al.*, 2001).

Considerando a demanda por métodos analíticos mais acessíveis e os desafios relacionados à confecção e manuseio de aptâmeros e biossensores, o potencial da β -CD como adsorvente e absorvente para a OTA em alimentos pode ser uma alternativa promissora, principalmente ao ser associada à espectroscopia de fluorescência direta (Shi *et al.*, 2024). Essa abordagem permite a detecção rápida e sensível de quantidades traço, sem a necessidade de preparação complexa de amostras ou procedimentos prolongados. A interação entre a OTA e a β -CD altera as propriedades de fluorescência da toxina, facilitando sua detecção e quantificação. O foco deste estudo é explorar e otimizar o uso da espectroscopia de fluorescência, em conjunto com a β -CD, como ferramenta eficaz para a determinação de OTA no vinho.

5.2. Materiais e reagentes

O padrões de OTA e β -CD foram obtidos da Sigma Aldrich (St Louis, EUA). Os solventes acetato de etila, clorofórmio e diclorometano foram obtidos da JT Baker (Center Valley, EUA), o ácido fosfórico da marca Merck (Darmstadt, Alemanha), o hidróxido de amônio, cloreto de amônio da marca Synth (Diadema, Brasil) e o ácido cítrico e citrato de sódio e cloreto de sódio da Vetec (Duque de Caxias, Brasil). As amostras de vinho foram adquiridas comercialmente na região de Belo Horizonte.

5.3. Equipamentos e softwares

Balança analítica Shimadzu ATX 224, agitador vórtex Velp Scientifica ZX Class, chapa aquecedora Corning PC420D, centrífuga Kasvi Digital. As análises foram realizadas no espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse. A aquisição de dados foi realizada nos *softwares*: Microsoft Excel, OriginLab e Scan.

5.4. Metodologia

5.4.1. Preparo das soluções

A solução estoque de OTA foi preparada a $4,97 \text{ mg L}^{-1}$ em tolueno:acetonitrila (99:1) e foi mantida a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ sob proteção da luz.

A solução estoque de β -CD foi preparada a 9994 mg L^{-1} . A massa foi solubilizada em água e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50,00 mL com o mesmo solvente. A solução estoque foi mantida a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ sob proteção da luz. A partir dela foi preparada uma solução intermediária à 50 mg L^{-1} em tampão amoniacal pH 9,3 para ser utilizada posteriormente nos experimentos.

Preparou-se uma solução de 3,4% v/v de ácido fosfórico 85% e 11,8% m/v de cloreto de sódio. Para tal, pipetou-se 1,70 mL de ácido fosfórico 85% e transferiu-se o volume para um balão volumétrico de 50,00 mL contendo água destilada. Em seguida, pesou-se 5,9000 g de cloreto de sódio. A massa foi solubilizada em água e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50,00 mL, onde completou-se o volume com água e após o repouso a solução tornou-se límpida.

Preparou-se uma solução tampão pH 9,3 constituída de 1,0698 g de cloreto de

amônio e 1,37 mL de hidróxido de amônio.

Preparou-se uma solução tampão pH 3,0 constituída de 0,2840 g de citrato de sódio e 3,842 g de ácido cítrico.

5.4.2 Avaliação da influência do pH na superfície espectral de fluorescência da ocratoxina A

A partir da solução estoque de OTA, preparou-se soluções diluídas à $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em tampão amoniacal pH 9,3, em tampão citrato pH 3,0 e em água pura. Construiu-se a EEM pela varredura dos comprimentos de onda de excitação no intervalo de 300 a 400 nm em um passo de 2 nm e emissão no intervalo de 400 a 550 nm em um passo de 1 nm. Ajustou-se a abertura da fenda dos monocromadores de excitação e emissão para 10,0 nm e 5,0 nm, respectivamente. Os espectros de fluorescência registrados neste experimento e nos subsequentes foram adquiridos a 25 °C.

5.4.3 Avaliação da influência da β -ciclodextrina na superfície espectral de fluorescência da ocratoxina A

A partir da solução estoque, preparou-se soluções diluídas à $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em tampão amoniacal pH 9,3, em tampão citrato pH 3,0 e em água pura. Em cada uma destas soluções, adicionou-se $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de β -CD. Construiu-se a EEM pela varredura dos comprimentos de onda de excitação no intervalo de 300 a 400 nm em um passo de 2 nm e emissão no intervalo de 400 a 550 nm em um passo de 1 nm. Ajustou-se a abertura da fenda dos monocromadores de excitação e emissão para 10,0 nm e 5,0 nm, respectivamente.

5.4.4 Avaliação da extração da ocratoxina A

Avaliou-se entre dois métodos de referência (Rojas *et al.*, 2021), qual permite uma extração e detecção mais eficientes de OTA em vinho tinto *Merlot* Realizou-se adaptações deste trabalho da literatura científica para a análise direta por fluorescência.

Método 1 (M1): Em um tubo de vidro de 15 mL adicionou-se 1,0 mL de vinho e,

em seguida, adicionou-se 2,0 mL de uma solução de ácido fosfórico 3,4% v/v + cloreto de sódio 11,8% m/v e 1,0 mL de clorofórmio. Agitou-se o tubo durante 1 minuto no vórtex e centrifugou-se a mistura por 15 minutos à 2500 rpm. Cuidadosamente, coletou-se a fase orgânica inferior utilizando-se uma pipeta Pasteur e o conteúdo foi introduzido em um béquer e evaporando-se a 50 °C pela chapa aquecedora. Ressuspendeu-se o extrato em 2,5 mL de tampão amoniacal pH 9,3 com adição de β -CD na concentração de 10^{-4} mol L⁻¹.

Método 2 (M2): Em um tubo de vidro adicionou-se 1,0 mL de vinho e, em seguida, adicionou-se 1,5 mL de acetato de etila. Agitou-se o tubo durante 1 minuto no vórtex e manteve-se a mistura sob repouso por 15 minutos. Coletou-se a fase orgânica utilizando-se uma pipeta de vidro e o conteúdo foi introduzido em um béquer e evaporou-se a 50 °C pela chapa aquecedora. Ressuspendeu-se o extrato em 2,5 mL de tampão amoniacal pH 9,3 com adição de β -CD na concentração de 10^{-4} mol L⁻¹.

A concentração de OTA fortificada foi 20 μ g L⁻¹ em ambos os métodos, comparando-se a intensidade do analito entre amostras de vinho fortificado e extrato fortificado. As respectivas amostras branco também foram preparadas. Obteve-se as superfícies espectrais nos intervalos de excitação de 300 a 400 nm e emissão em 400 e 550 nm. As fendas dos monocromadores de excitação e emissão foram ajustadas em 10 nm e 5 nm, respectivamente..

5.4.5 Avaliação da eficiência da extração da ocratoxina A por fluorescência sincronizada

Utilizando o método de extração com clorofórmio (**Figura 26**) em amostras de vinho fortificadas a 20 μ g L⁻¹, comparou-se o perfil da banda espectral da OTA entre a aquisição do espectro nos modos convencional e sincronizado. O espectro de fluorescência convencional foi obtido no intervalo de 400 a 500 nm, sob excitação em 378 nm; e o espectro de fluorescência sincronizada foi obtido no intervalo de 340 a 440 nm, sob um valor fixo de $\Delta\lambda$ de 61 nm (deslocamento Stokes calculado para $\lambda_{exc} = 378$ nm e $\lambda_{em} = 439$ nm). Foi calculada a eficiência da extração do analito no vinho, por meio da comparação da intensidade de fluorescência entre amostras de vinho fortificadas e amostras nas quais a fortificação foi realizada no extrato, mantendo-se o mesmo valor de quantidade de matéria do analito em ambas. Em todos os ensaios, as fendas dos monocromadores de excitação e emissão foram ajustadas

em 10 nm e 5 nm, respectivamente.

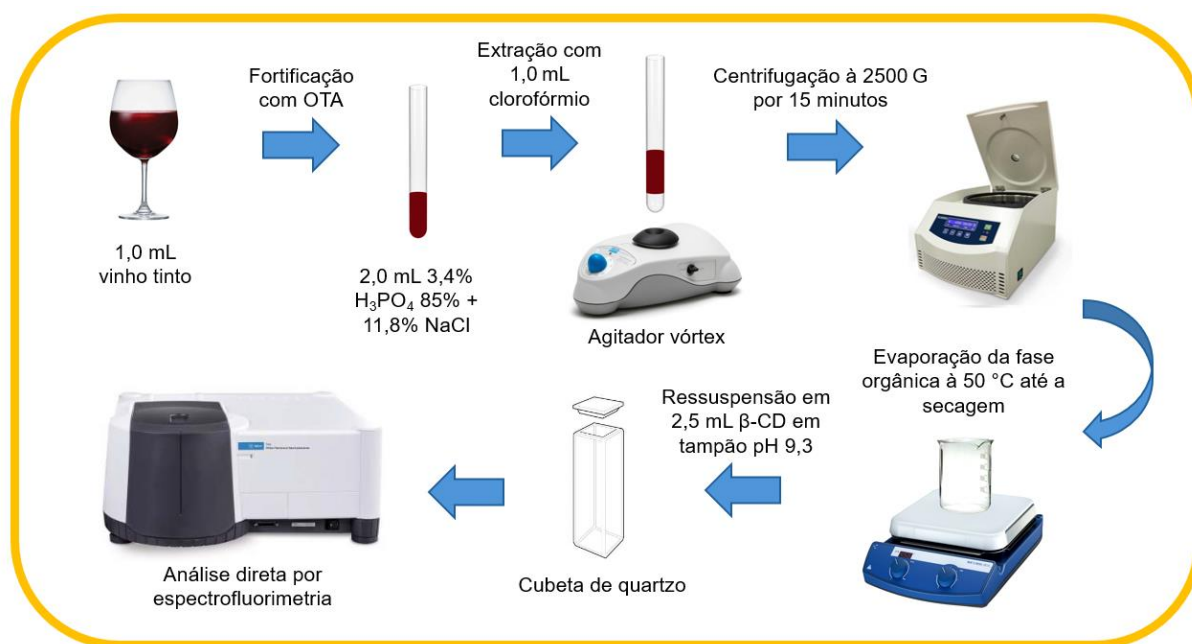


Figura 26. Esquematização do do método adaptado para a determinação de ocratoxina A em vinho.

5.4.6 Avaliação do efeito do solvente na eficiência da extração da ocratoxina A

Neste experimento, foi testada a possibilidade de substituir o clorofórmio por solventes menos tóxicos, como o diclorometano e o acetato de etila. As extrações foram realizadas de maneira análoga à condição experimental estabelecida nos últimos experimentos, com o uso de 1,0 mL destes solventes, ao invés de clorofórmio. Os espectro de fluorescência sincronizada foram obtidos no intervalo de 340 a 440 nm, sob um valor fixo de $\Delta\lambda$ de 61 nm. Foi calculada a eficiência da extração do analito no vinho. As fendas dos monocromadores de excitação e emissão foram ajustadas em 10 nm e 5 nm, respectivamente.

5.4.7 Avaliação da influência da proporção molar de β -ciclodextrina e ocratoxina A no extrato vinho

Avaliou-se a capacidade do complexo de inclusão em intensificar o sinal fluorescente da OTA no extrato de vinho na concentração de $20,00 \mu\text{g L}^{-1}$, sob diferentes concentrações de β -CD. Buscou-se estabelecer uma relação entre a intensidade da fluorescência e a concentração de complexante, além de um valor otimizado da proporção molar entre OTA e β -CD. As razões das concentrações testadas ($[\beta\text{-CD}]/[\text{OTA}]$), foram: 1, 50, 400, 600, 1400, 3000, 15000 e 40000. Os dados coletados referem-se ao espectro sincronizado no intervalo de 340 a 440 nm ($\Delta\lambda = 61 \text{ nm}$). Ambas as aberturas das fendas dos monocromadores de excitação e emissão foram ajustadas para 10,0 nm, respectivamente

5.4.8 Avaliação da extração na concentração alvo de ocratoxina A

Aplicou-se o procedimento de extração proposto para a determinação de OTA na matriz na concentração alvo ($2,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Avaliou-se a alteração na intensidade da emissão pelo ajuste das aberturas de fenda dos monocromadores, visando a otimização do sinal analítico em relação aos interferentes do vinho. Os espectros sincronizados foram obtidos sob os valores de fenda de excitação e emissão em 10 nm e 5 nm; e 10 nm e 10 nm, respectivamente. O extrato foi ressuspendido em 2,5 mL de tampão amoniacal pH 9,3 com adição de β -CD na concentração de $1,98 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Preparou-se também amostras branco em triplicata.

Neste experimento, também avaliou-se como o aumento de volume de amostra e, conseqüentemente, a quantidade de matéria de OTA, contribui para o aperfeiçoamento da detecção. Mantendo-se a proporção 1:2:1 entre os volumes de vinho, solução salina de ácido fosfórico e clorofórmio, respectivamente, aumentou-se as quantidades em 2; 2,5 e 3 vezes.

5.4.9 Detecção de ocratoxina A em concentração inferior ao alvo

Verificou-se a possibilidade de detectar o sinal analítico da OTA detecção da OTA em amostras de vinho fortificadas na concentração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. A sequência experimental consiste em: Em um tubo de vidro de 15 mL adicionou-se 2,0 mL de vinho e, em seguida, adicionou-se 4,0 mL de uma solução de ácido fosfórico 3,4% v/v + cloreto de sódio 11,8% m/v e 2,0 mL de clorofórmio. Agitou-se o tubo durante 1 minuto no vórtex e centrifugou-se a mistura por 15 minutos à 2500 rpm. Cuidadosamente, coletou-se a fase orgânica inferior utilizando-se uma pipeta Pasteur e o conteúdo foi introduzido em um béquer e evaporando-se a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ pela chapa aquecedora. Ressuspendeu-se o extrato em 2,5 mL de tampão amoniacal pH 9,3 com adição de β -CD na concentração de $1,98 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Preparou-se também amostras branco em triplicata.

5.4.10 Validação analítica

As figuras de mérito para a validação do método desenvolvido foram conduzidas de acordo com as especificações do guia da AOAC (AOAC, 2016). A seletividade foi avaliada pela análise do espectro sincronizado de diferentes amostras branco vinho e pela construção de uma curva analítica do OTA em tampão amoniacal pH 9,3 nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

A linearidade e o efeito de matriz foram demonstrados pela construção de uma curva analítica do OTA na matriz (vinho tinto) nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e avaliou-se a linearidade.

Para LD e LQ, foram analisadas 10 amostras brancos das quais os sinais analíticos adquiridos foram convertidos em concentração de acordo com a equação da curva analítica. Calculou-se então o respectivo desvio padrão corrigido (s'_0), LD e LQ, segundo as equações 11 e 12.

A veracidade foi estabelecida em termos de recuperação. O ensaio foi realizado pela análise de amostras fortificadas em três níveis de concentração ($0,5$, $2,0$ e $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$) em seis replicatas independentes. Os percentuais de recuperação foram determinados por $R'(\%)$, segundo a equação 13.

A precisão intradia (repetibilidade) foi avaliada por meio do DPR das seis

replicatas fortificadas dos ensaios de recuperação. A precisão interdias (precisão intermediária) foi avaliada por meio do desvio padrão entre as replicatas fortificadas de amostras preparadas em diferentes dias.

5.5. Resultados e discussão

5.5.1 Avaliação da influência do pH na superfície espectral de fluorescência da ocratoxina A

A superfície obtida pela EEM pode ser representada em duas ou três dimensões (**Figura 27**).

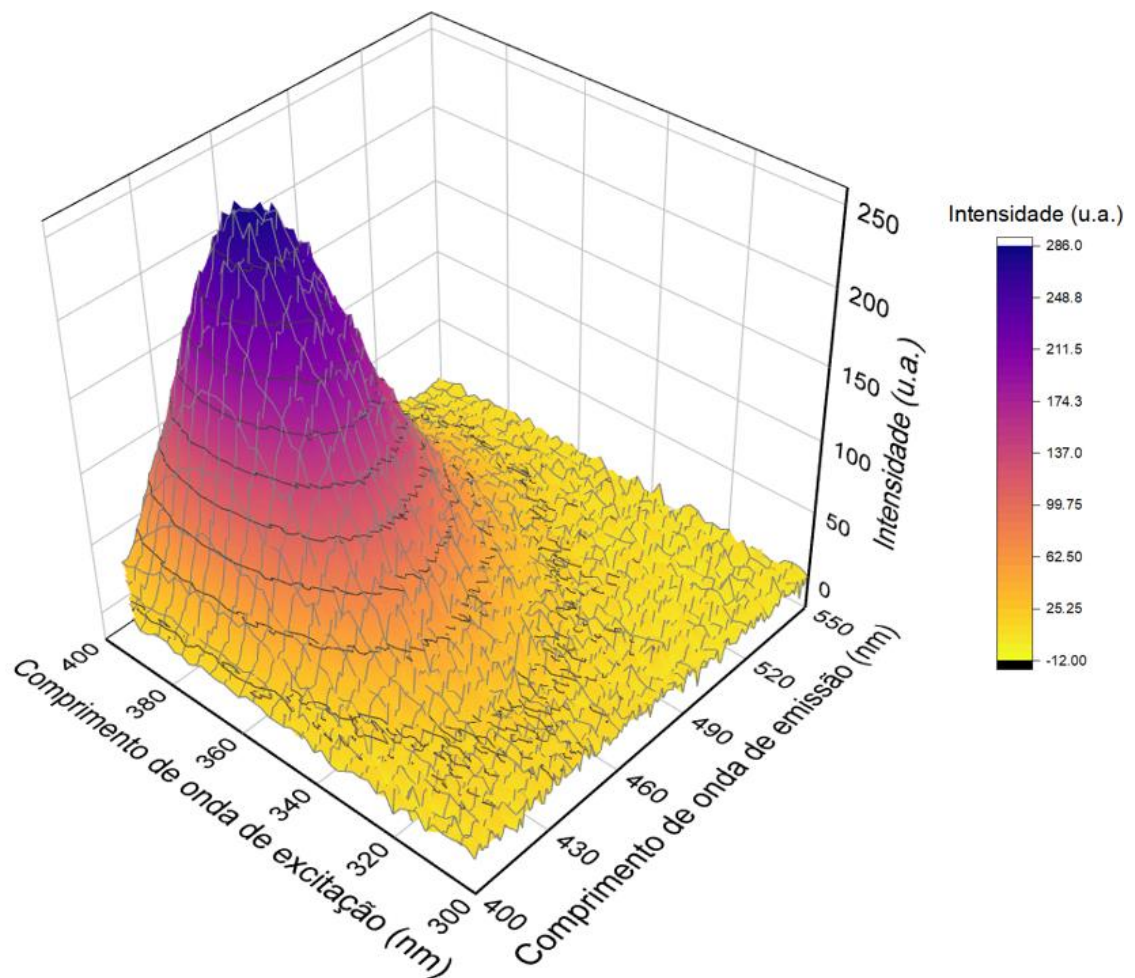


Figura 27. Superfície espectral de fluorescência da ocratoxina A ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) em pH 9,3, representada em três dimensões, Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

A fluorescência da OTA em solução aquosa é caracterizada por duas bandas espectrais associadas às formas neutra, monoaniônica e dianiônica da molécula. As superfícies de fluorescência obtidas para soluções de OTA a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em água mostram, nos pHs 3,0 e 7,0, uma banda com emissão máxima em 464 nm, originada pela excitação em 334 nm, correspondente às espécies neutra e monoaniônica. Entretanto, em pH 9,3, a banda evidenciada ocorre sob excitação em 378 nm e se refere à forma dianiônica, que é a forma predominante da OTA em meio alcalino, exibindo emissão em 439 nm (**Figura 28**).

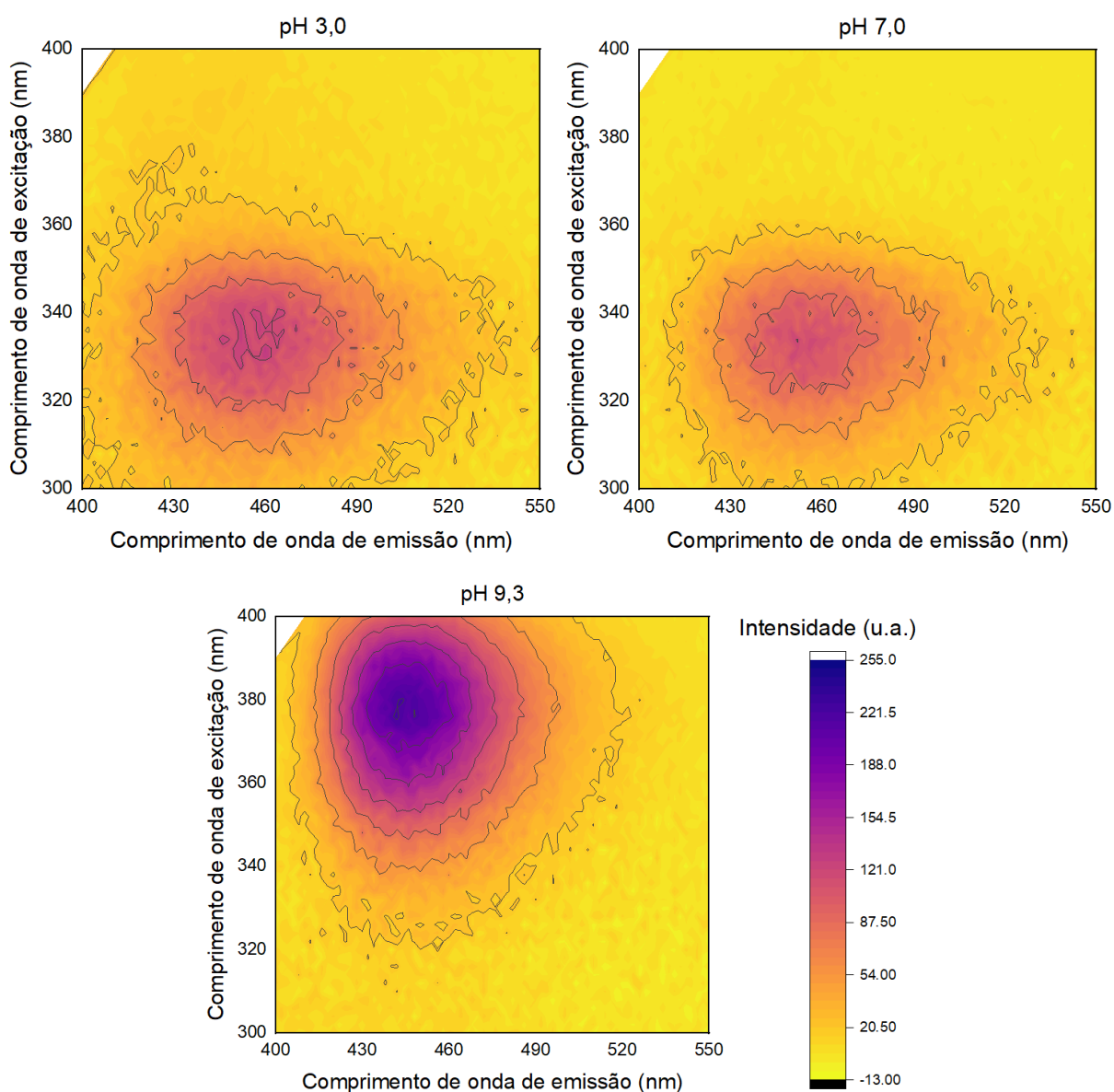


Figura 28. EEMs obtidas para soluções de ocratoxina A ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes condições: pH 3,0; água pura e pH 9,3. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

A alteração do pH para valores superiores desloca o equilíbrio químico no

sentido da desprotonação do grupo fenólico, responsável pelo efeito batocrômico, desviando o comprimento de excitação máxima para o vermelho. O grupo carboxílico da OTA não exerce influência sobre o espectro de excitação ao sofrer desprotonação (**Figura 29**). A fluorescência da forma desprotonada da OTA é mais intensa porque possui uma deslocalização maior dos elétrons, e é menos afetada por interações com o ambiente ao redor, como ligações de hidrogênio, que podem causar a supressão da fluorescência.

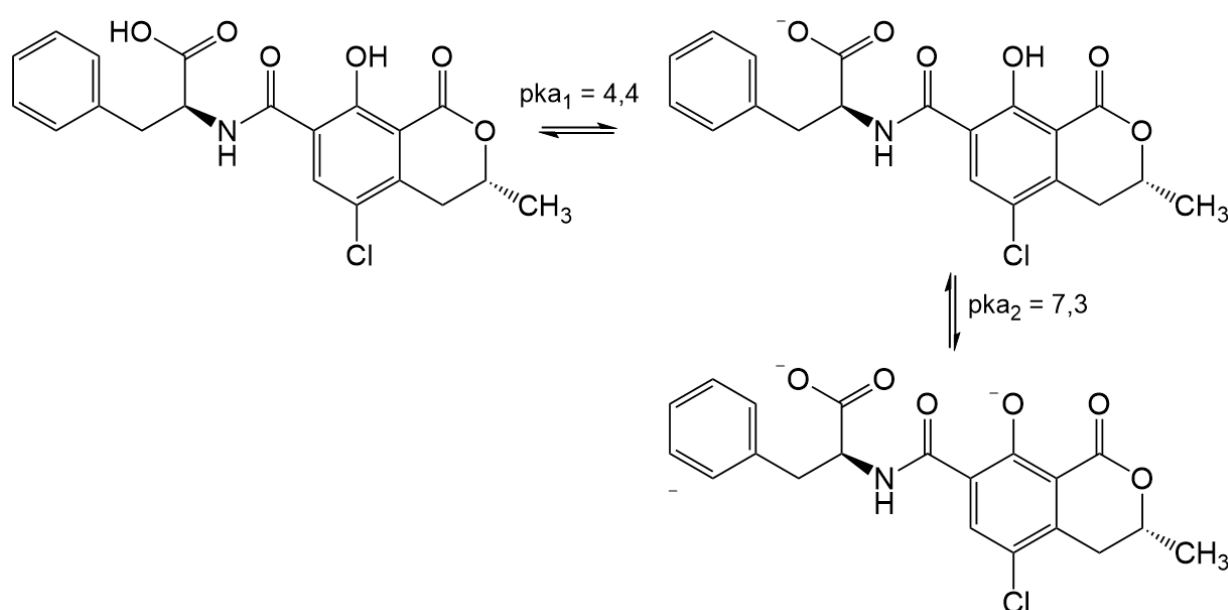


Figura 29. Equilíbrios ácido-base da ocratoxina A em função do pH. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* ChemDraw.

5.5.2 Avaliação da influência da β -ciclodextrina na superfície espectral de fluorescência da ocratoxina A

Espera-se que a formação de um complexo de inclusão na estequiometria 1:1 entre o OTA e a β -CD intensifique o sinal fluorescente. Essa alteração ocorre devido ao aumento da rigidez molecular, o que diminui a taxa de conversão da energia eletrônica em vibração e calor (Hashemi & Alizadeh, 2009). Para este experimento, a concentração de 10^{-4} mol L⁻¹ de β -CD corresponde a uma proporção 400 vezes maior que a concentração de OTA ($[\beta\text{-CD}]/[\text{OTA}] = 400$), valor definido arbitrariamente para garantir o excesso do agente de inclusão. A representação do complexo de inclusão

formado está ilustrada na **Figura 30**.

A formação do complexo de inclusão em meio aquoso é um processo espontâneo ($\Delta G < 0$). Quando a OTA, lipofílica, se insere na cavidade hidrofóbica da β -CD, moléculas de água são liberadas para o exterior, resultando em uma interação energeticamente favorável ($\Delta H < 0$). As interações não covalentes, como as forças de van der Waals, entre a β -CD e a OTA, contribuem para a diminuição da entalpia do sistema. Além disso, a inserção da OTA quebra a camada de solvatação da β -CD, desorganizando as moléculas de solvente na superfície da cavidade e induzindo alterações conformacionais em ambos, o que favorece a entropia do processo ($\Delta S > 0$) (Amadasi *et al*, 2007).

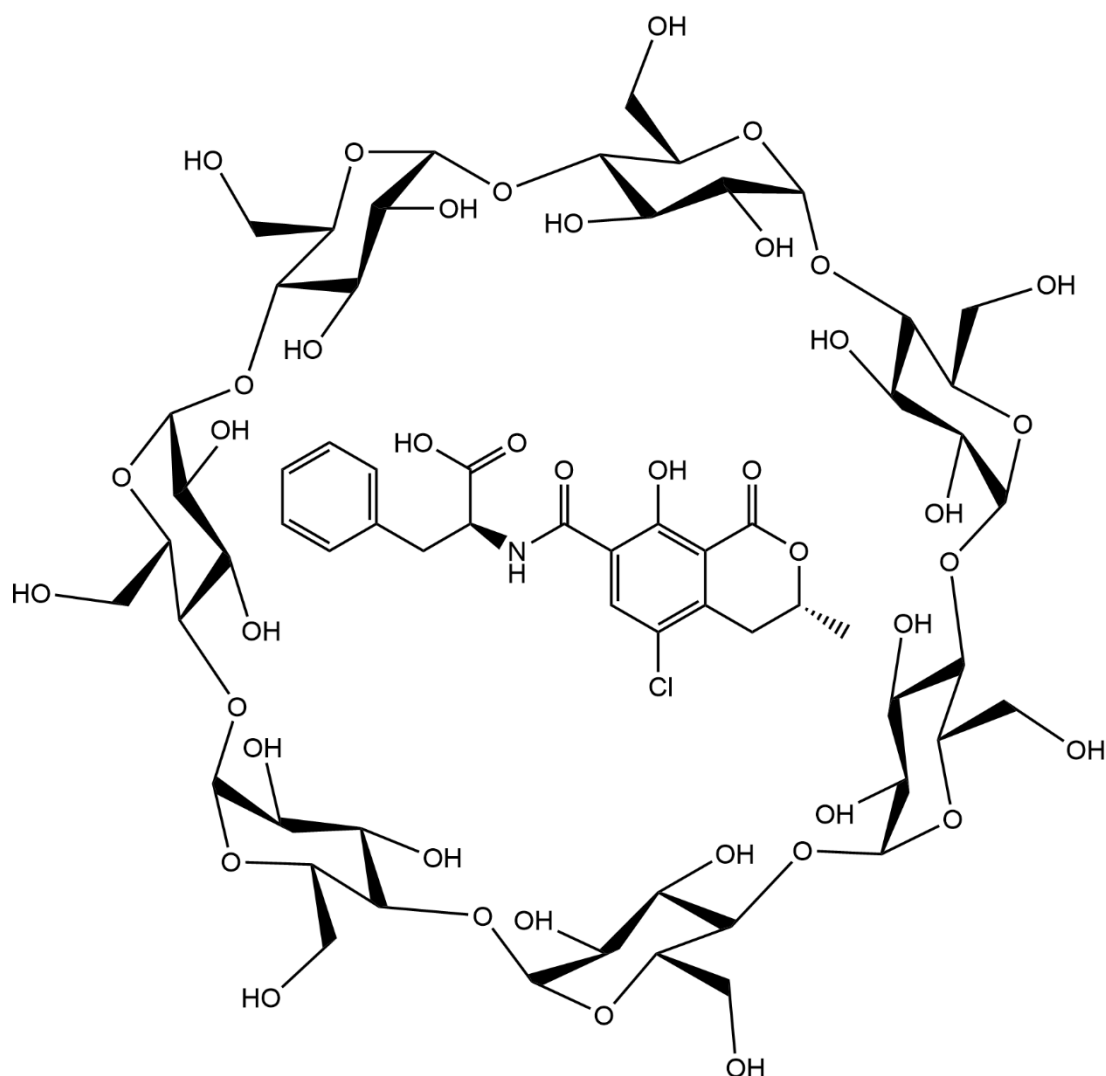


Figura 30. Representação do complexo de inclusão formado entre a β -ciclodextrina e a ocratoxina A. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* ChemDraw.

Observou-se que o perfil espectral das EEM apresentadas na **Figura 31** são

semelhantes às expressadas na ausência de β -CD (experimento anterior), ajustadas na mesma escala de intensidade. Isso constata que a formação do complexo não modifica os comprimentos de onda máximos de excitação e emissão da OTA nas condições de pH testadas.

Observou-se que o perfil espectral das superfícies da **Figura 31** é semelhante ao expressado na ausência de β -CD (no experimento anterior), quando ajustados à mesma escala de intensidade. Isso indica que a formação do complexo não altera os comprimentos de onda máximos de excitação e emissão da OTA nas condições de pH testadas.

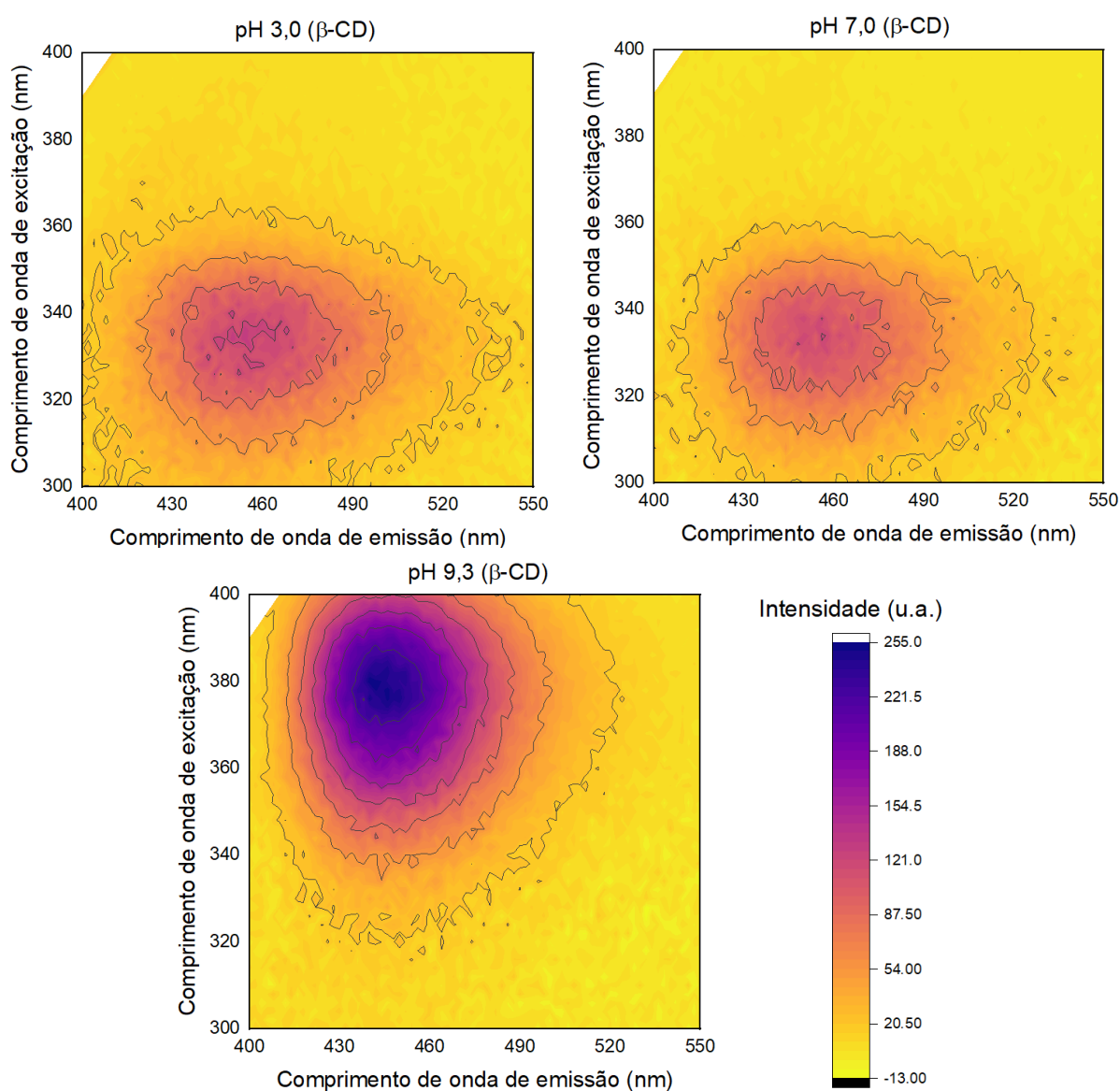


Figura 31. EEMs obtidas para soluções de ocratoxina A (20 mg L^{-1}) com adição de β -ciclodextrina ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes condições: pH 3,0; água pura e pH 9,3. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

Portanto, comparou-se os espectros de emissão extraídos sob o comprimento

de onda de excitação máxima da OTA, a fim de avaliar a intensificação da fluorescência provocada pela adição de β -CD (**Figura 32**). Os resultados indicaram que a β -CD aprimora a fluorescência da OTA de maneira mais eficaz em meio alcalino. Em pH 9,3, a predominância da forma dianiônica da OTA modifica a sua interação com a β -CD. A OTA torna-se menos lipofílica devido à localização mais concentrada das cargas negativas nos grupos carboxila e fenólico, que, quando desprotonados, realizam menos interações intermoleculares com a água, facilitando sua inserção na cavidade hidrofóbica da β -CD. O aumento da complexação eleva a probabilidade de desativação radiativa da OTA a partir do estado excitado, estimulando a fluorescência. Em pH 3,0 e 7,0, a OTA permanece mais solvatada, e os grupos protonados das formas neutra e monoânionica aumentam a solubilidade do analito em água, o que diminui a estabilização do complexo e resulta em uma intensificação praticamente insignificante da emissão (Verrome *et al.*, 2007).

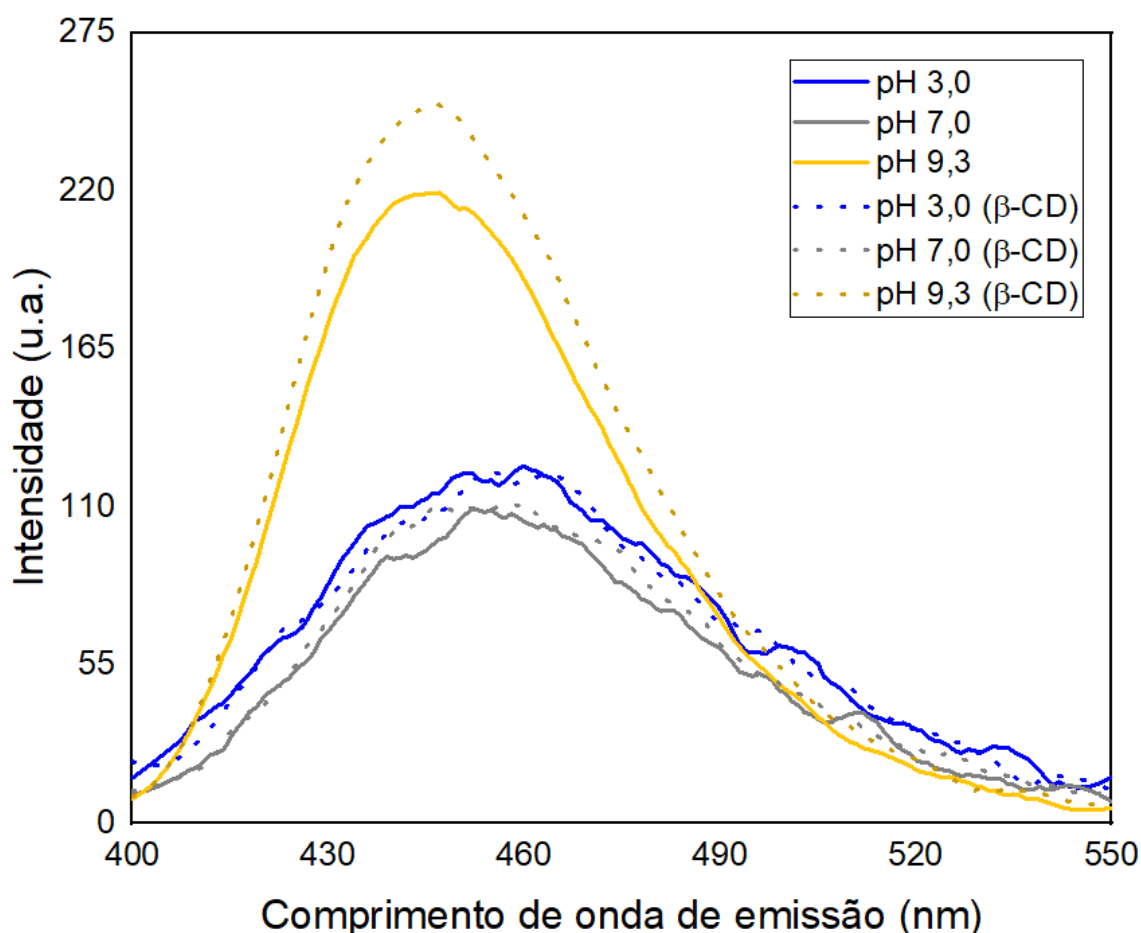


Figura 32. Espectros de fluorescência de soluções de ocratoxina A ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) sob a presença e ausência de β -ciclodextrina ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes condições: pH 3,0; água pura e pH 9,3. $\lambda_{\text{exc}} = 332 \text{ nm}$ (pH 3,0 e água pura); $\lambda_{\text{exc}} = 378 \text{ nm}$ (pH 9,3). Fonte: Elaborado pelo

autor utilizando o *software* Origin.

Desta forma, ao constatar que o uso da β -CD em tampão amoniacal pH 9,3 potencializam a detecção da OTA, esta condição foi estabelecida para a realização dos próximos experimentos, assim como o comprimento de excitação em 378 nm (Tabela 10). Porém, é necessário compreender a extensão que a formação do complexo altera a intensidade da emissão em função da proporção de OTA e β -CD.

Tabela 10. Comprimentos de onda máximos para a ocratoxina A na presença e ausência de β -ciclodextrina sob diferentes valores de pH. Fonte: Autor.

Condição	λ excitação (nm)	λ emissão (nm)	Intensidade (u.a.)	Aumento da intensidade (%)
pH 3,0	332	463	140,06	0
pH 3,0 + β -CD			139,68	
Água pura	332	458	120,04	1,25
Água pura + β -CD			121,55	
pH 9,3	378	439	220,72	15,13
pH 9,3 + β -CD			254,12	

5.5.3 Avaliação da extração de ocratoxina A

Ao comparar os dois métodos testados, observou-se uma diferença perceptível na coloração dos extratos obtidos pelos dois métodos avaliados, sendo que o uso de acetato de etila (M2) resultou em um extrato com tonalidade marrom, indicativa da presença de antocianinas (**Figura 33**). Esses pigmentos, responsáveis pela coloração característica do vinho tinto, estão localizados principalmente na casca da uva e pertencem à classe dos compostos fenólicos polares. Devido à sua polaridade, as antocianinas apresentam maior solubilidade em solventes com o acetato de etila, que possui maior constante dielétrica em comparação ao clorofórmio. Além disso, é

plausível que a adição de ácido fosfórico e cloreto de sódio no M1 tenha contribuído para a degradação parcial ou total desses pigmentos, resultando em um extrato incolor, isento de partículas sólidas em suspensão.



Figura 33. Aspecto visual dos extratos obtidos a partir dos métodos adaptados. M1: clorofórmio como solvente de extração; M2: acetato de etila como solvente de extração. Fonte: Autor.

A absorção da radiação de excitação por soluções coloridas pode dificultar a detecção do analito fluorescente. A presença da cor implica que a solução absorve luz nas regiões visível e ultravioleta, podendo interferir na quantidade de radiação que incide sob a amostra, ocasionado em uma redução da fluorescência produzida. Também deve-se considerar que, apesar de as antocianinas não serem fluorescentes, estas moléculas podem absorver radiação nos comprimentos de onda semelhantes ao fluoróforo ou reabsorver a emissão da fluorescência.

Como observado no extrato obtido pelo método 2, soluções turvas contém partículas suspensas, que podem dispersar a luz, afetando a readiação de excitação e a emissão de fluorescência, ocasionando distorções ou enfraquecimento do sinal de fluorescência. Desta forma, não foi possível detectar a OTA nas amostras submetidas à extração com acetato de etila, pois não há distinção entre as superfícies espectrais das amostras de vinho não fortificada e as que continham o analito na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (**Figura 34**). É possível que tenha ocorrido supressão da fluorescência da OTA por transferência da energia eletrônica para moléculas dispersas no extrato, causando a desativação não-radiativa do estado excitado. Além disto, fluoróforos presentes no vinho, como compostos fenólicos, clorofila e taninos podem ter sido

extraídos pelo acetato de etila, impedido a visualização da fluorescência do analito via *quenching*. A primeira hipótese é a mais provável, uma vez que não se observou bandas significativas, de maneira geral, nos intervalos de comprimento de onda analisados.

O método 1 demonstrou-se eficaz para detectar a OTA nas amostras de vinho testadas (**Figura 34**). A adição de ácido fosfórico e cloreto de sódio combina a variação de pH do sistema e o efeito *salting out*, com o objetivo de aprimorar a extração da OTA. O sal aumenta a força iônica da matriz, tornando-a saturada. A elevada concentração de íons Na^+ e Cl^- na fase aquosa compete com outras substâncias pelas interações com as moléculas de água, o que diminui a solubilidade da OTA e favorece sua migração para a fase orgânica. O ácido fosfórico, por sua vez, ajusta o pH do vinho para valores mais baixos, predominando-se então a forma não ionizada da OTA, tornando-a mais solúvel em solventes orgânicos polares, como clorofórmio e cetonas, e menos solúvel em água, facilitando sua extração (El Khoury & Atoui, 2010). Apesar de ter sido evidenciada uma banda espectral expressiva e referente à matriz, este sinal não se manifesta na região de excitação e emissão da OTA em meio alcalino (**Figura 34**). Este método foi estabelecido como o mais apropriado para efetuar a extração e foram feitas subseqüentes modificações, a fim de otimizar a determinação da OTA.

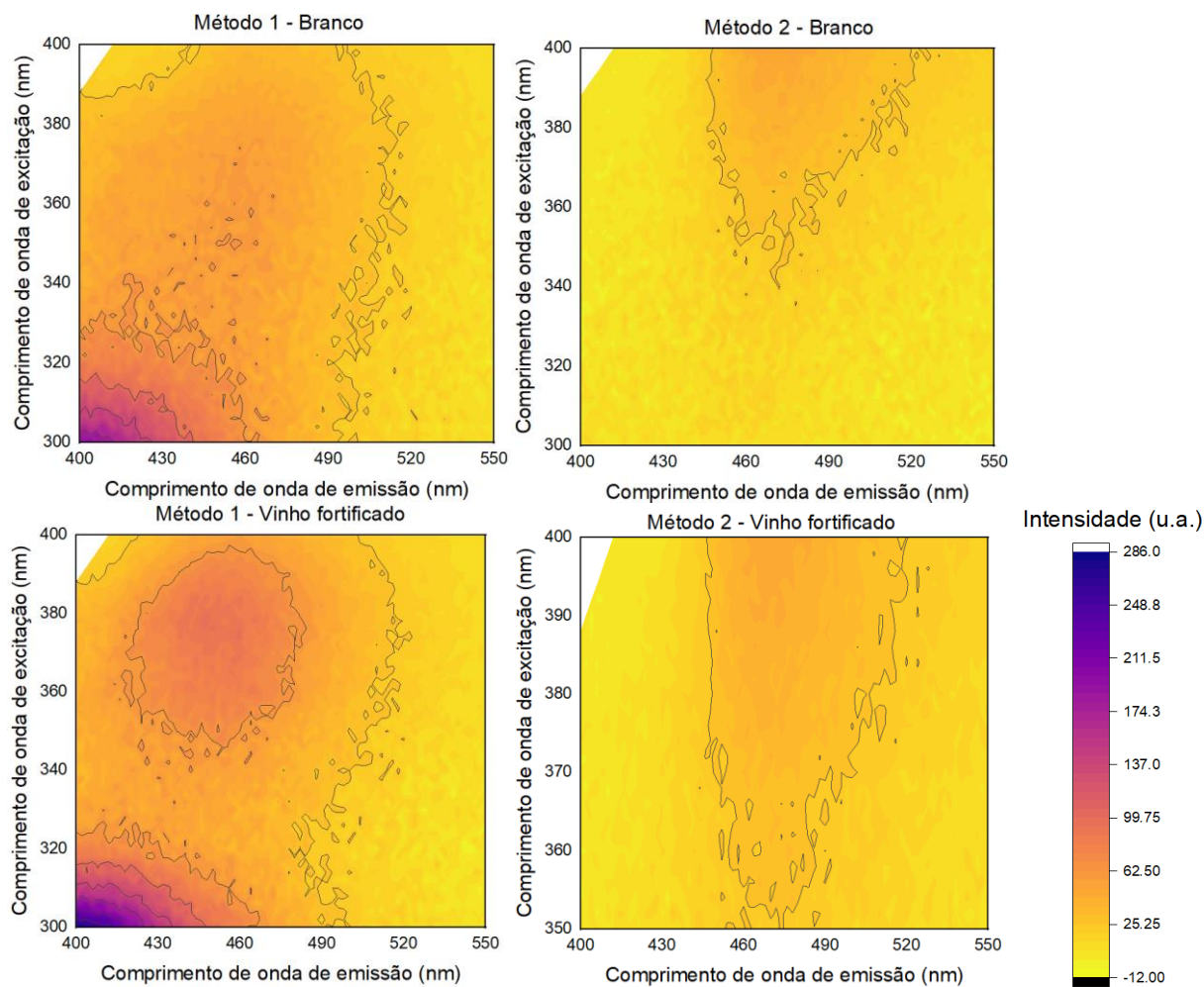


Figura 34. EEMs dos extratos de amostras de vinho fortificadas ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) e não fortificadas obtidas a partir dos métodos M1 e M2. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

5.5.4. Avaliação da eficiência da extração da ocratoxina A por fluorescência sincronizada

Para a determinação de OTA em extrato de vinho, a aquisição dos dados no modo sincronizado não apresentou uma intensificação sutil em comparação ao modo convencional. No entanto, o estreitamento da banda no modo sincronizado favorece a seletividade da análise, o que é um fator relevante para a posterior determinação do analito em concentrações mais baixas.

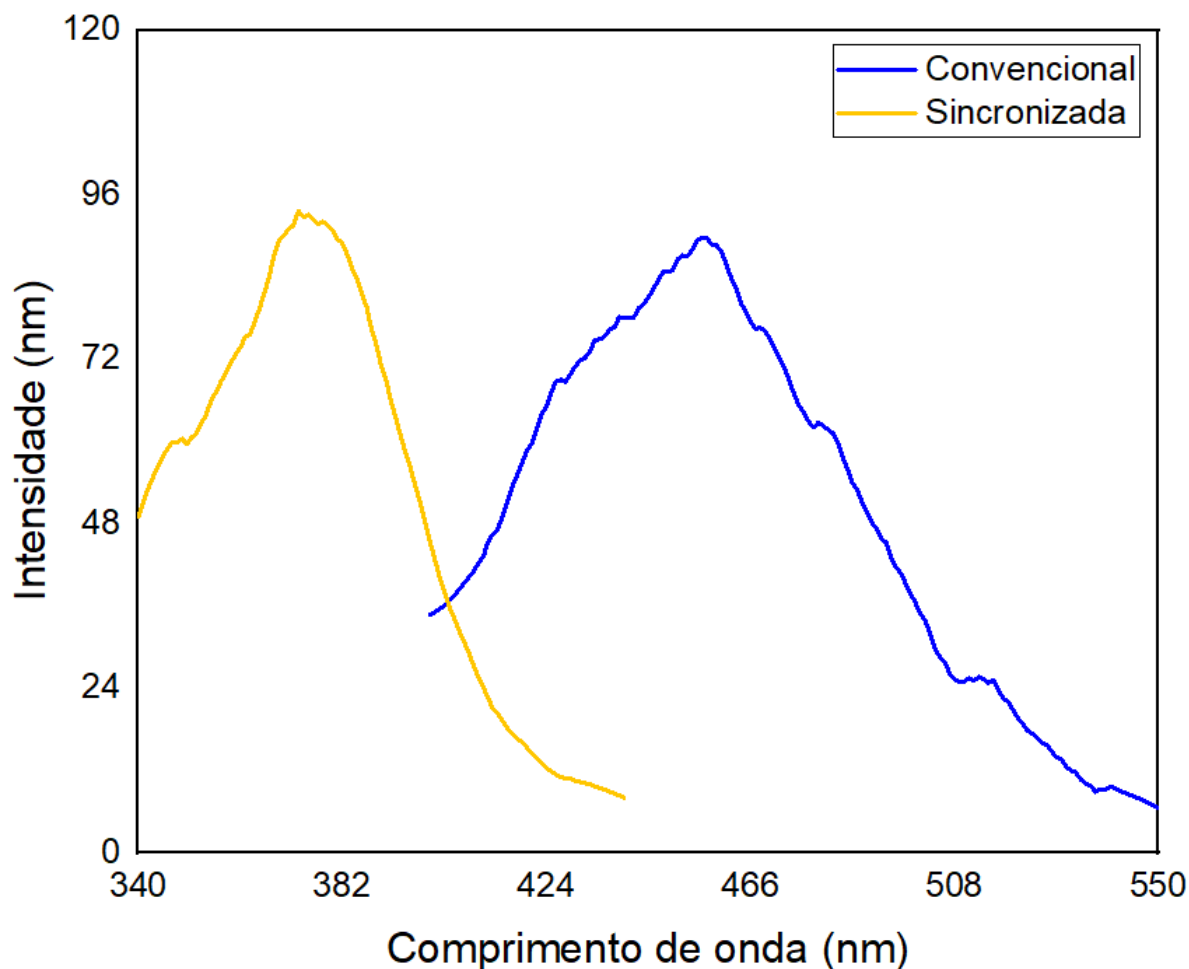


Figura 35. Comparação dos espectros de fluorescência convencional ($\lambda_{exc} = 378$ nm) representada pela emissão e sincronizada ($\Delta\lambda = 61$ nm) representada pela excitação, obtidos a partir de extratos de amostras de vinho fortificada ($20 \mu\text{g L}^{-1}$). Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

Sob as condições experimentais testadas no modo sincronizado ($\Delta\lambda = 61$ nm), foi possível obter uma eficiência média de $88,0 \pm 3,4$ %, calculada pela razão entre as intensidades máximas das amostras de vinho fortificado e extrato de vinho fortificado. Este valor é satisfatório para um procedimento executado em uma única etapa de extração. Os respectivos espectros estão representados na **Figura 36**.

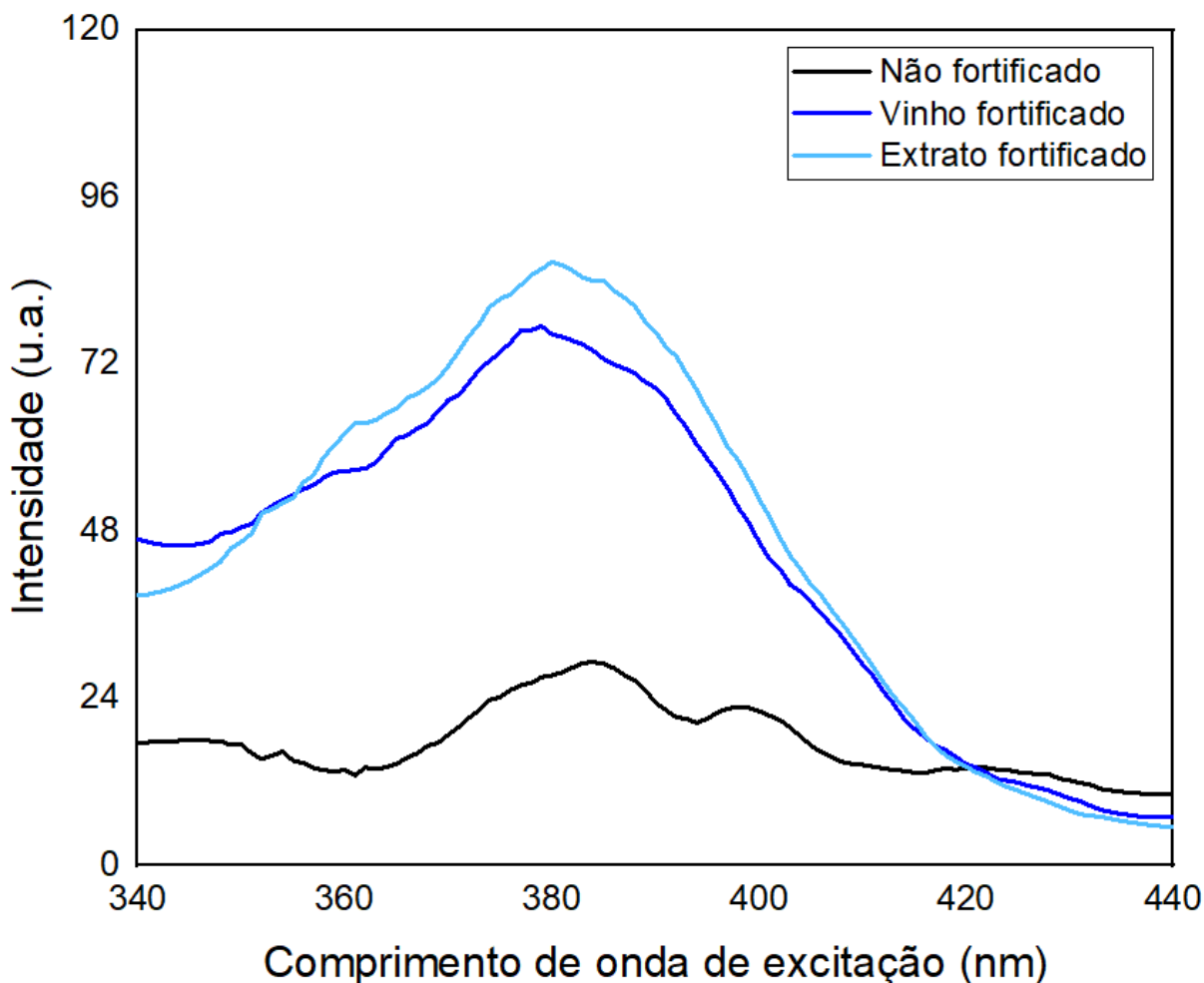


Figura 36. Espectros de fluorescência sincronizada obtidos para vinho fortificado, vinho não fortificado e extrato fortificado ($20 \mu\text{g L}^{-1}$), empregando clorofórmio como solvente de extração. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

5.5.5. Avaliação do efeito do solvente na eficiência da extração da ocratoxina A

Os solventes diclorometano e acetato de etila foram selecionados com base em seu menor grau de toxicidade e em seus respectivos valores de constante dielétrica (8,93 e 6,02). Assim como o clorofórmio ($\epsilon = 4,81$), esses solventes apresentam polaridade moderada e são apróticos. Dessa forma, espera-se que a substituição não comprometa a eficiência de extração anteriormente observada com o uso do clorofórmio.

Como indica a **Figura 37**, utilizando-se o diclorometano, a eficiência da extração é aprimorada, registrando-se o valor de $94,18 \pm 6,21 \%$. Apesar do índice superior ao observado para o clorofórmio, este solvente produz um extrato que contém interferentes mais expressivos. A fluorescência do vinho surge principalmente de compostos fenólicos, como os estilbenos, flavonóis e flavan-3-óis, juntamente com a

riboflavina e o triptofano (Airado-Rodríguez *et al.*, 2011). Os compostos fenólicos são polihidroxilados e compreendem um grupo bastante diversificado de moléculas, o que os tornam mais suscetíveis de serem extraídos pelo diclorometano, que apresenta maior polaridade que o clorofórmio.

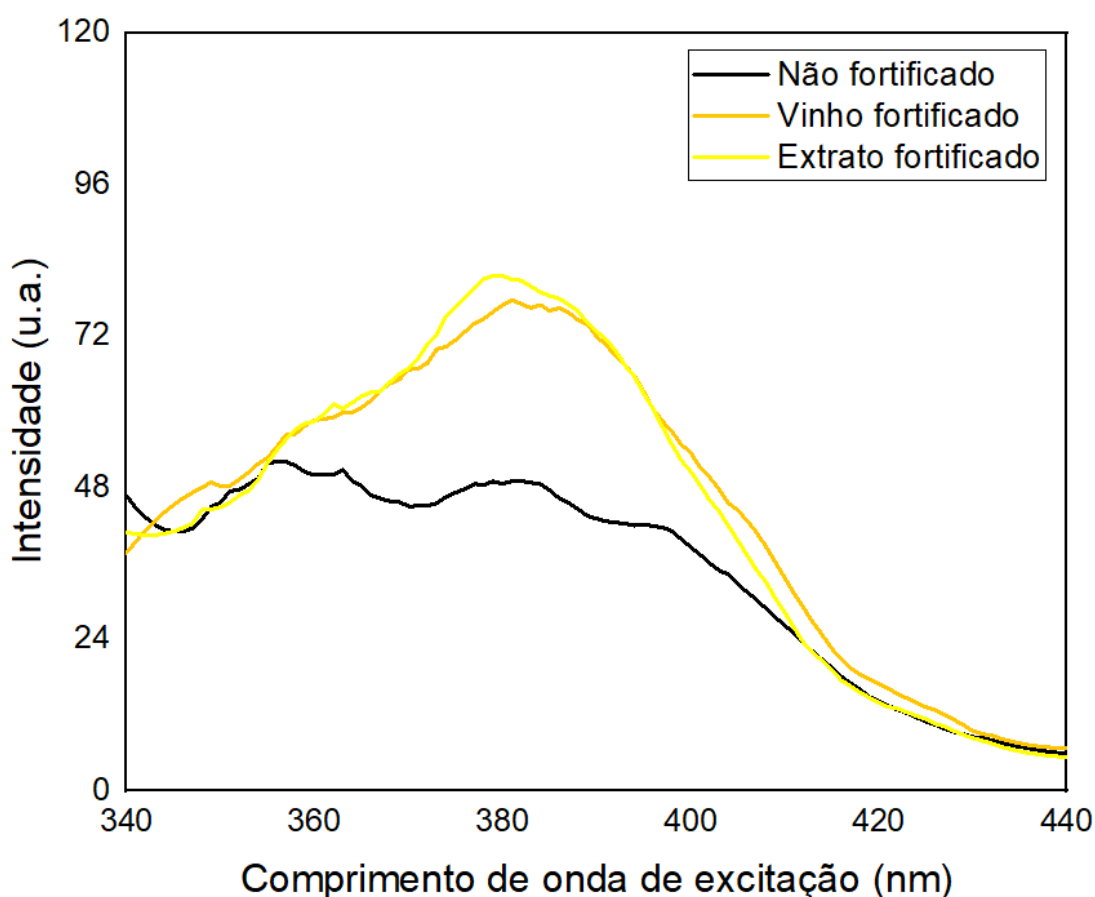


Figura 37. Espectros de fluorescência sincronizada obtidos para vinho fortificado, vinho não fortificado e extrato fortificado ($20 \mu\text{g L}^{-1}$), empregando diclorometano como solvente de extração. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

Não foi possível calcular a eficiência da extração ao empregar o acetato de etila, pois não detectou-se o sinal analítico característico da OTA nos espectros sincronizados. Ao comparar os espectros de amostras não fortificadas de vinho obtidos para os três solventes considerados para a extração, tem-se um panorama das interferências advindas de cada extrato (**Figura 38**).

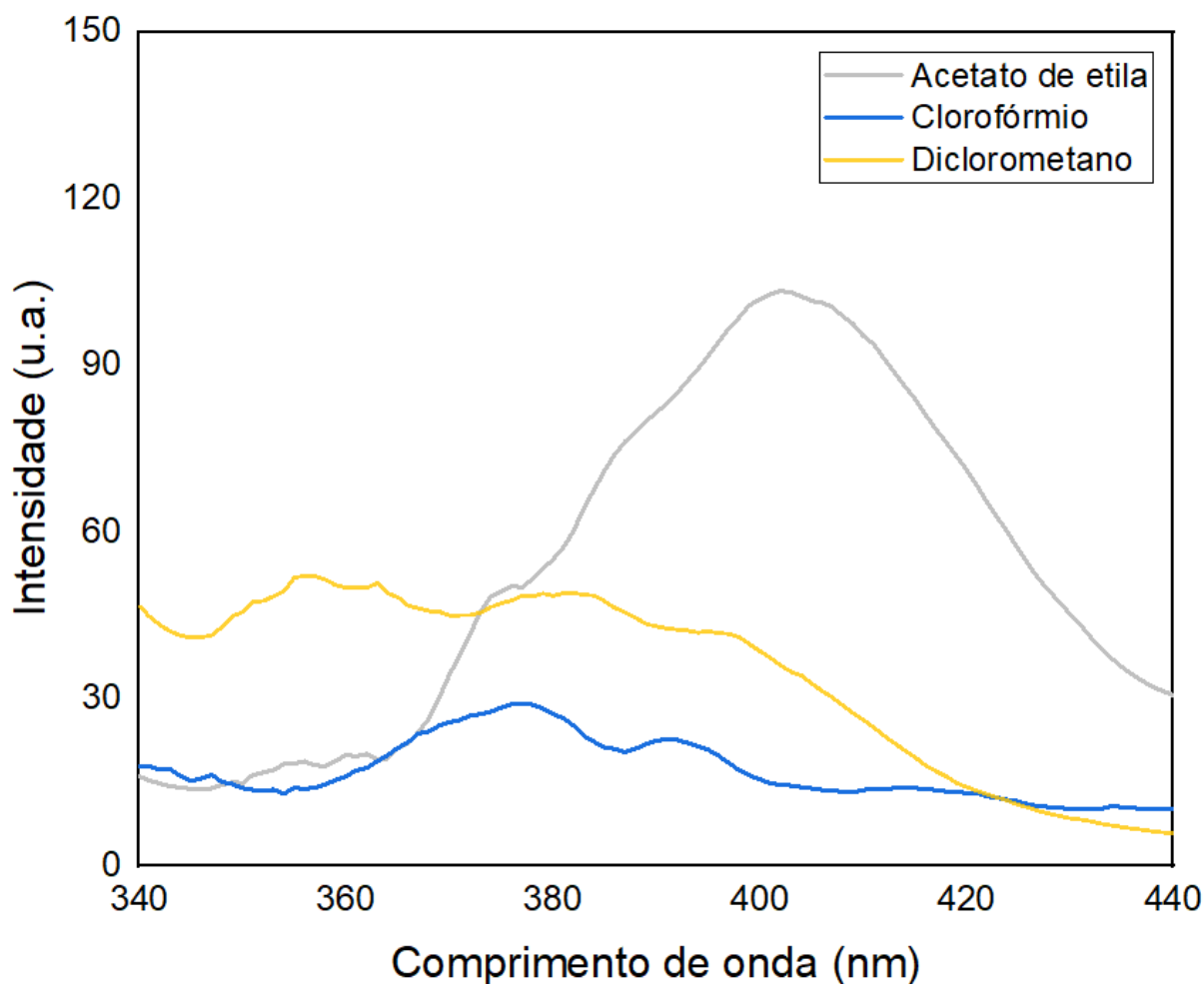


Figura 38. Comparação dos espectros de fluorescência sincronizada de amostras de vinho não fortificadas, obtidos com diferentes solventes de extração. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

Diferentemente do método de referência anterior, baseado na extração com acetato de etila, neste estudo o solvente foi testado em associação ao ácido fosfórico e ao cloreto de etila. Contudo, o efeito *salting out* não foi suficientemente eficaz para promover a extração da OTA, além de ter sido evidenciada uma banda de alta intensidade na região próxima à excitação máxima do analito. Para o diclorometano, a escolha como solvente extrator foi mais criteriosa, considerando-se o balanço entre o aumento da eficiência da extração e o grau de interferência espectral da matriz. O gráfico apresentado na **Figura 39** foi construído para avaliar a relação entre as intensidades de fluorescência atribuídas à matriz e à fortificação do analito. Embora, o diclorometano proporcione uma extração mais eficiente da OTA, o extrato obtido possui maior complexidade, podendo comprometer a sensibilidade analítica em menores concentrações. extraia um maior percentual do analito, o seu extrato é mais

impuro, de forma a inviabilizar a detecção em concentrações inferiores de OTA. Desta forma, optou-se por manter o clorofórmio como o solvente extrator, afim de minimizar os efeitos de matriz, ainda que com menor eficiência de extração.

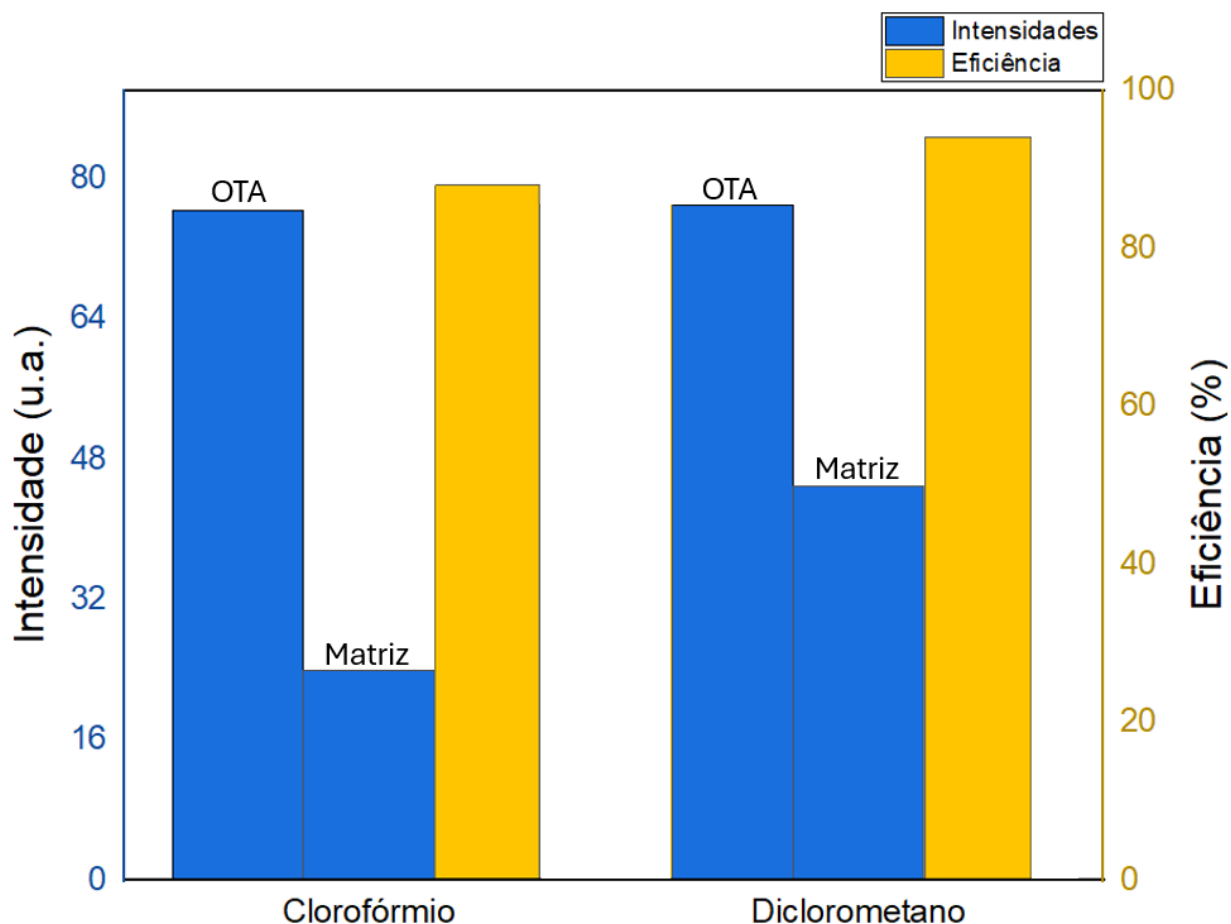


Figura 39. Comparação entre as intensidades de fluorescência da ocratoxina A, dos compostos interferentes presentes no vinho e da eficiência de extração utilizando clorofórmio ou diclorometano como solventes extratores. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

5.5.6 Avaliação da influência da proporção molar de β -ciclodextrina e ocratoxina A no extrato vinho

De acordo com os espectros sincronizados obtidos e ilustrados na Figura 40, para cada valor crescente de $[\beta\text{-CD}]/[\text{OTA}]$, observou-se um aumento da intensidade da fluorescência, como esperado.

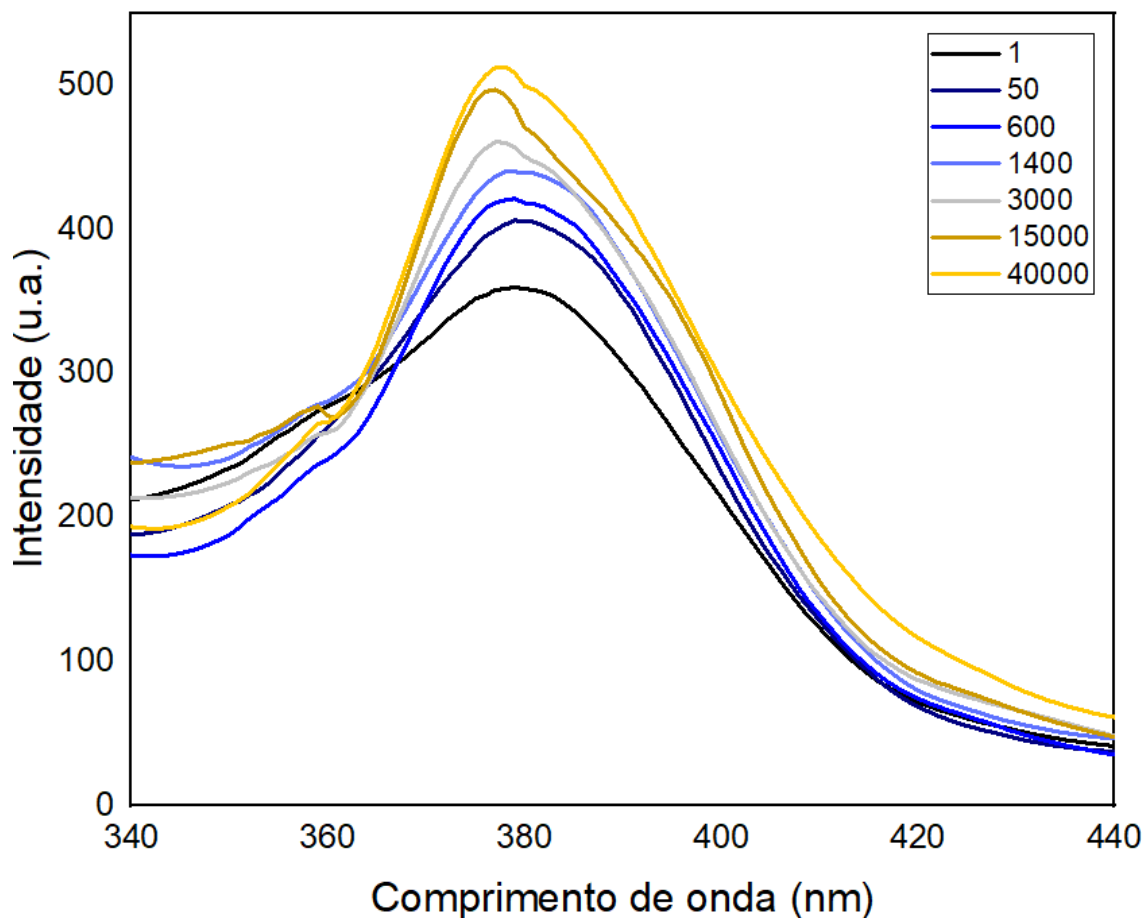


Figura 40. Espectros sincronizados da ocratoxina A ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) obtidos em diferentes proporções molares de β -ciclodextrina ($[\beta\text{-CD}]/[\text{OTA}]$) no extrato de vinho. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

Coletando-se o valor de intensidade máxima para cada proporção molar, elaborou-se uma regressão não linear. A distribuição dos dados apresentados na **Figura 41** aparentou-se compatível à uma função exponencial que se assemelha à equação de uma isotérmica de Freundlich, modelo empírico usado para alguns mecanismos de adsorção (Appell & Jackson, 2012). A calibração representa a relação entre a concentração do agente de inclusão e a fração de sítios de ligação ocupados na formação do complexo de inclusão:

$$Q = kC^{1/n}$$

Onde Q é a capacidade adsortiva, que representa a quantidade de OTA complexada à β -CD, C é a concentração de β -CD na solução, k é a constante de Freundlich, e n é o fator de heterogeneidade, que expressa a afinidade de associação entre OTA e

β -CD.

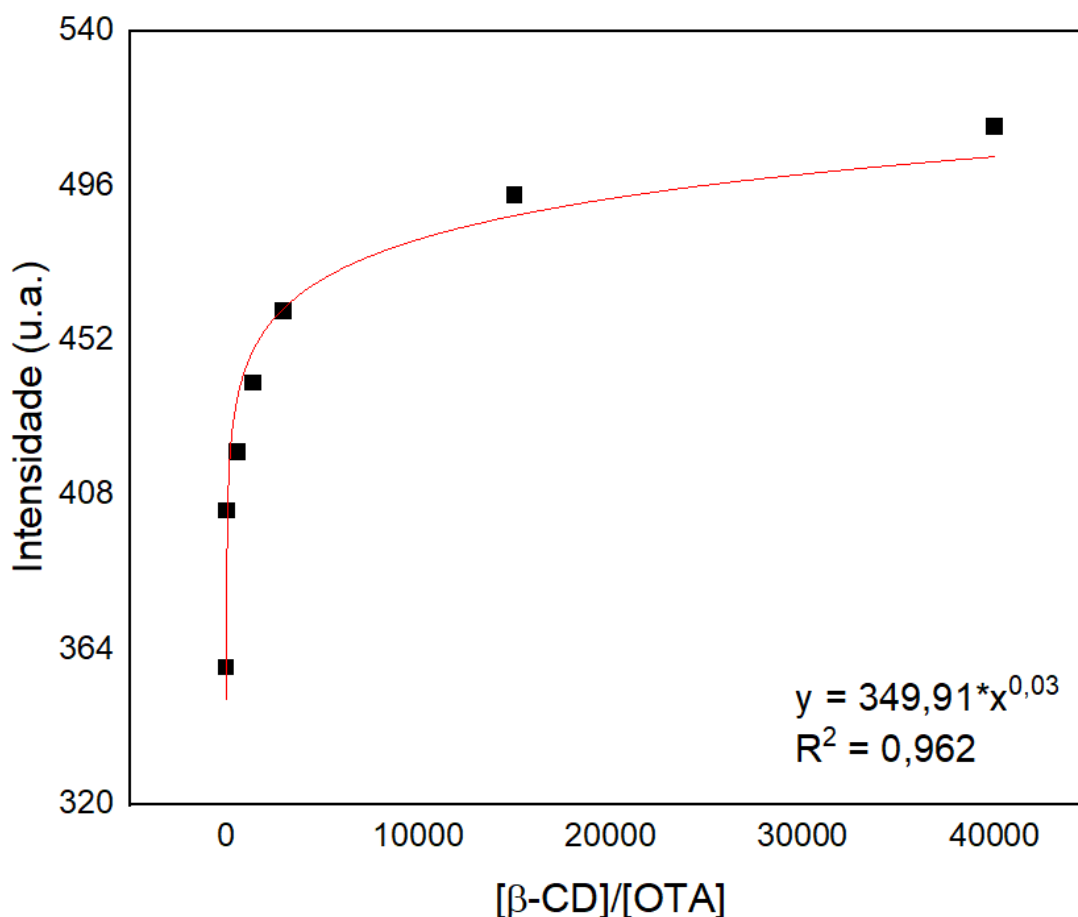


Figura 41. Variação da intensidade máxima de fluorescência da ocratoxina A ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) em função da razão molar $[\beta\text{-CD}]/[\text{OTA}]$. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

Em baixas concentrações, β -CD complexa-se fortemente à OTA, ocasionando inicialmente em um aumento acentuado na intensidade. A partir de $[\beta\text{-CD}]/[\text{OTA}] = 15000$, a taxa de formação de complexos diminui significativamente, devido a impedimentos estéricos e à menor disponibilidade das cavidades. O sistema não apresenta um ponto de saturação estrito, mas ocorre um efeito platô onde o aumento da quantidade de complexante tem impacto relativamente baixo na fluorescência. Limitou-se a proporção máxima testada em 40000, pois este valor corresponde à concentração de $2,25 \text{ g L}^{-1}$, que se aproxima da solubilidade da β -CD água ($18,5 \text{ g L}^{-1}$).

Assim, a proporção molar de $[\beta\text{-CD}]/[\text{OTA}]$ a ser utilizada nos experimentos

subsequentes, será de 40000.

5.5.7 Determinação de ocratoxina A na concentração alvo

Foi possível observar a presença de OTA no extrato como indica a **Figura 42**, Observou-se que embora a interferência espectral de matriz se intensifique significativamente ao ampliar a abertura da fenda de emissão de 5 nm para 10 nm, este ajuste é conveniente, uma vez que o sinal analítico da OTA se torna mais discrepante em relação à matriz. Eventualmente, esse modificação pode se demonstrar crucial ao relaizar a quantificação do analito em níveis ainda inferiores durante a validação analítica. Desta forma, os valores das aberturas das fendas serão estabelecidos como 10 nm para ambos os monocromadores de excitação e emissão nos experimentos subsequentes.

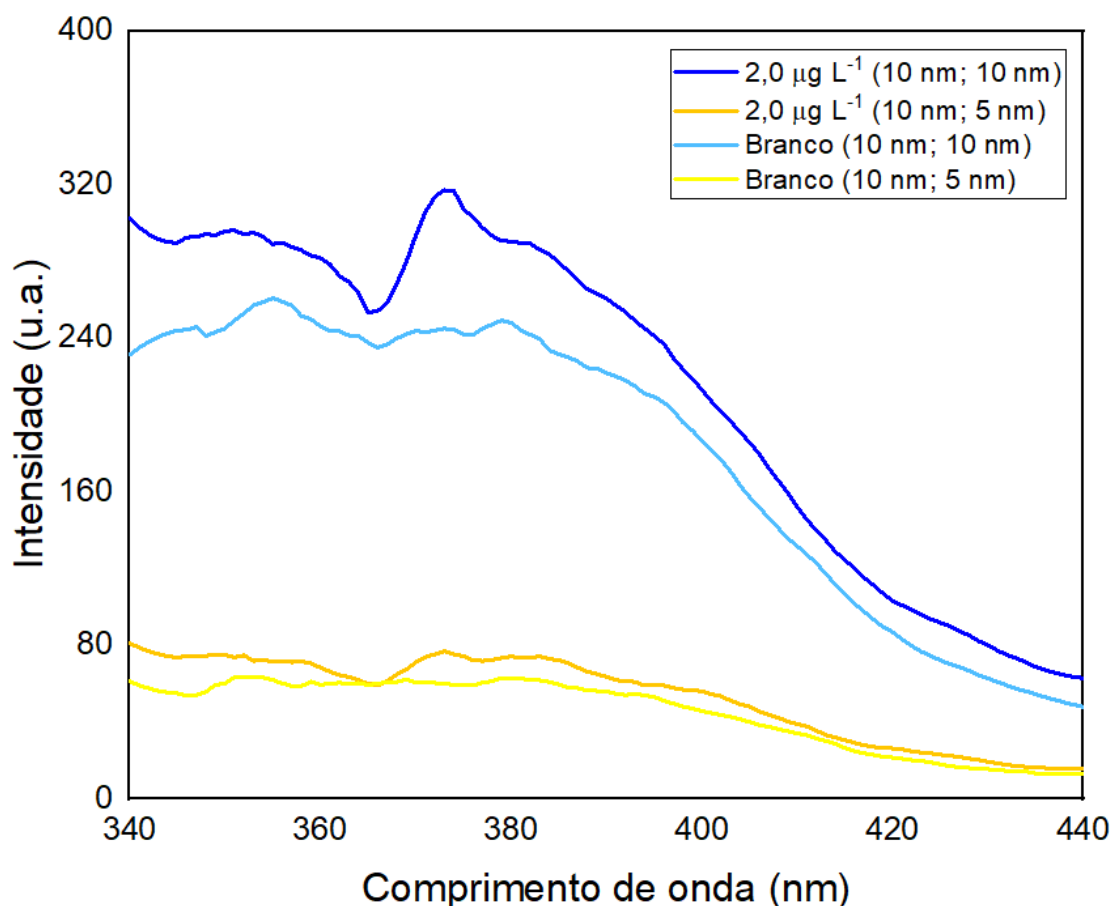


Figura 42. Comparação dos espectros sincronizados da ocratoxina A na concentração alvo ($2,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e da amostra branca obtidos com diferentes aberturas de fenda nos monocromadores (10 nm/10 nm e 10 nm/5 nm). Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software Origin.

Para verificar o efeito do volume de amostra empregado, a **Figura 43** indica que ao aumentar o volume de vinho de 1,0 mL para 2,0 mL, o sinal analítico se intensifica consideravelmente. Entretanto, não há uma melhora para os volumes de 2,5 e 3,0 mL, possivelmente devido à perda da eficiência da extração pelo excesso de volume da mistura no tubo de vidro de 15 mL. Durante a execução do experimento, observou-se que a formação do vórtex durante a agitação é dificultada, o que pode desfavorecer a migração na OTA entre as fases. Visando conciliar a minimização do volume de clorofórmio utilizado no preparo da amostra com a melhora da sensibilidade analítica, optou-se por utilizar 2,0 mL do solvente na extração, assim como 2,0 mL de vinho.

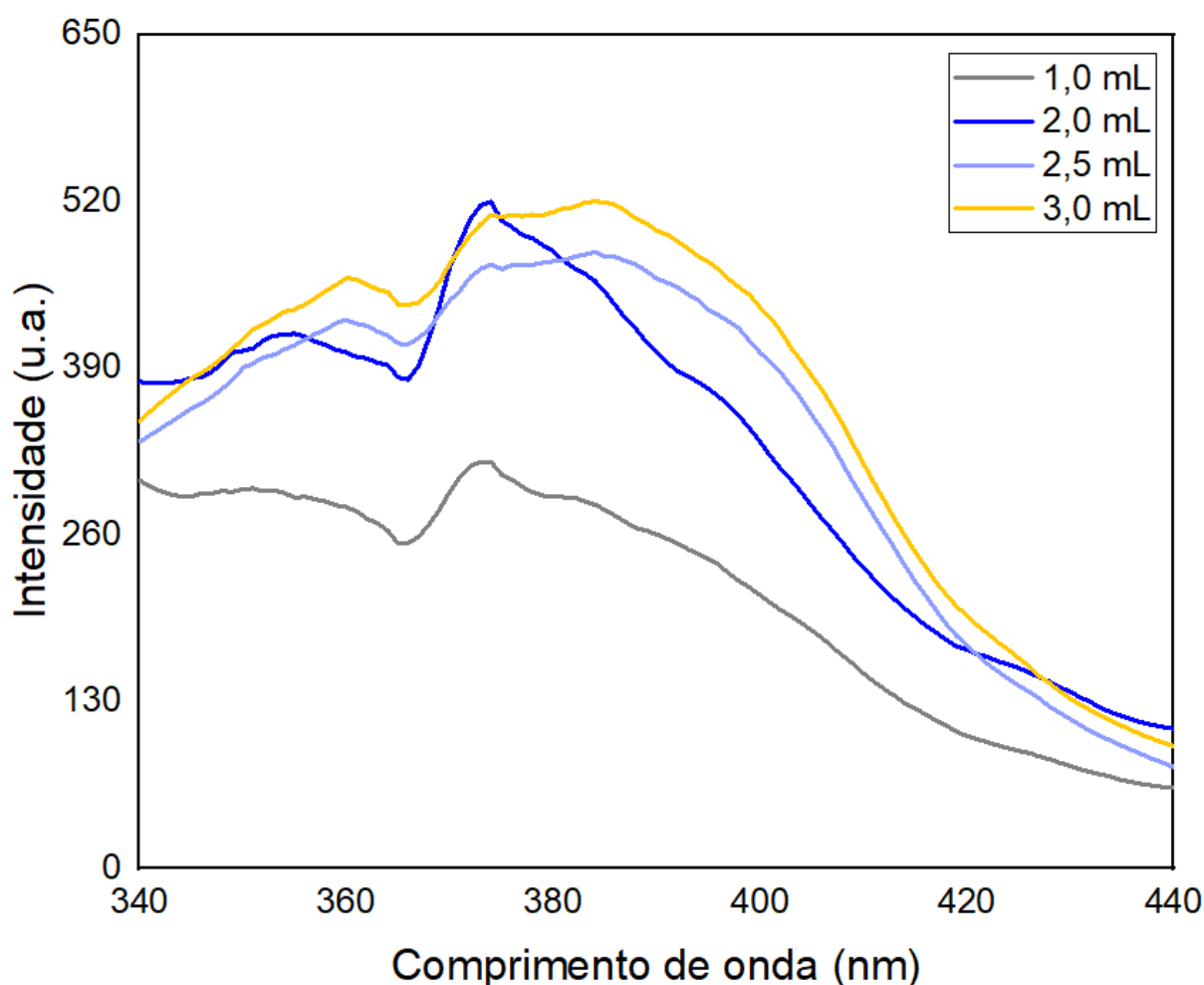


Figura 43. Comparação dos espectros sincronizados da ocratoxina A na concentração alvo ($2,0 \mu\text{g L}^{-1}$) obtidos a partir de diferentes volumes de amostra de vinho. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

5.5.8 Detecção de ocratoxina A em concentração inferior à concentração alvo

Avaliou-se a detecção da OTA em amostras de vinho fortificadas na concentração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, inferior à concentração alvo. Como foi evidenciada a presença do analito em relação às amostras que não foram fortificadas, (**Figura 44**), consolidou-se então a otimização do método analítico.

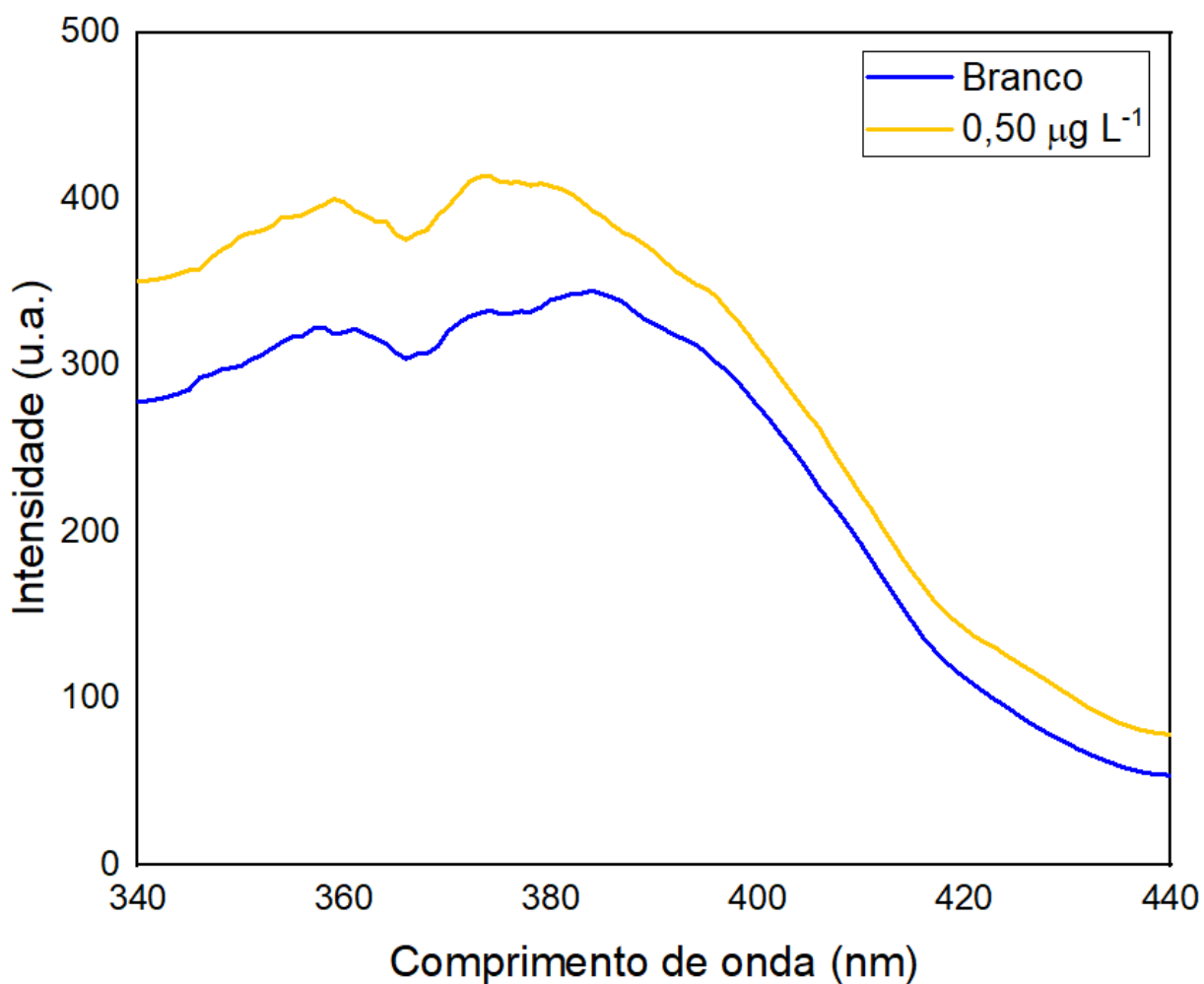


Figura 44. Comparação dos espectros sincronizados da ocratoxina A na concentração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ em vinho e da amostra branco. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

5.5.9 Validação analítica

Ao realizar a regressão linear para a curva da OTA em tampão pH 9,3 com

adição de $1,98 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ β -CD (**Figura 45**), quatro *outliers* foram detectados e removidos. Por meio dos testes de Ryan-Joiner ($p > 0,10$), Brown-Forsythe ($p > 0,05$) e Durbin-Watson ($p > 0,10$), as exigências foram atendidas e os resíduos assumem a distribuição normal, apresentam homoscedasticidade e são ausentes de autocorrelação.

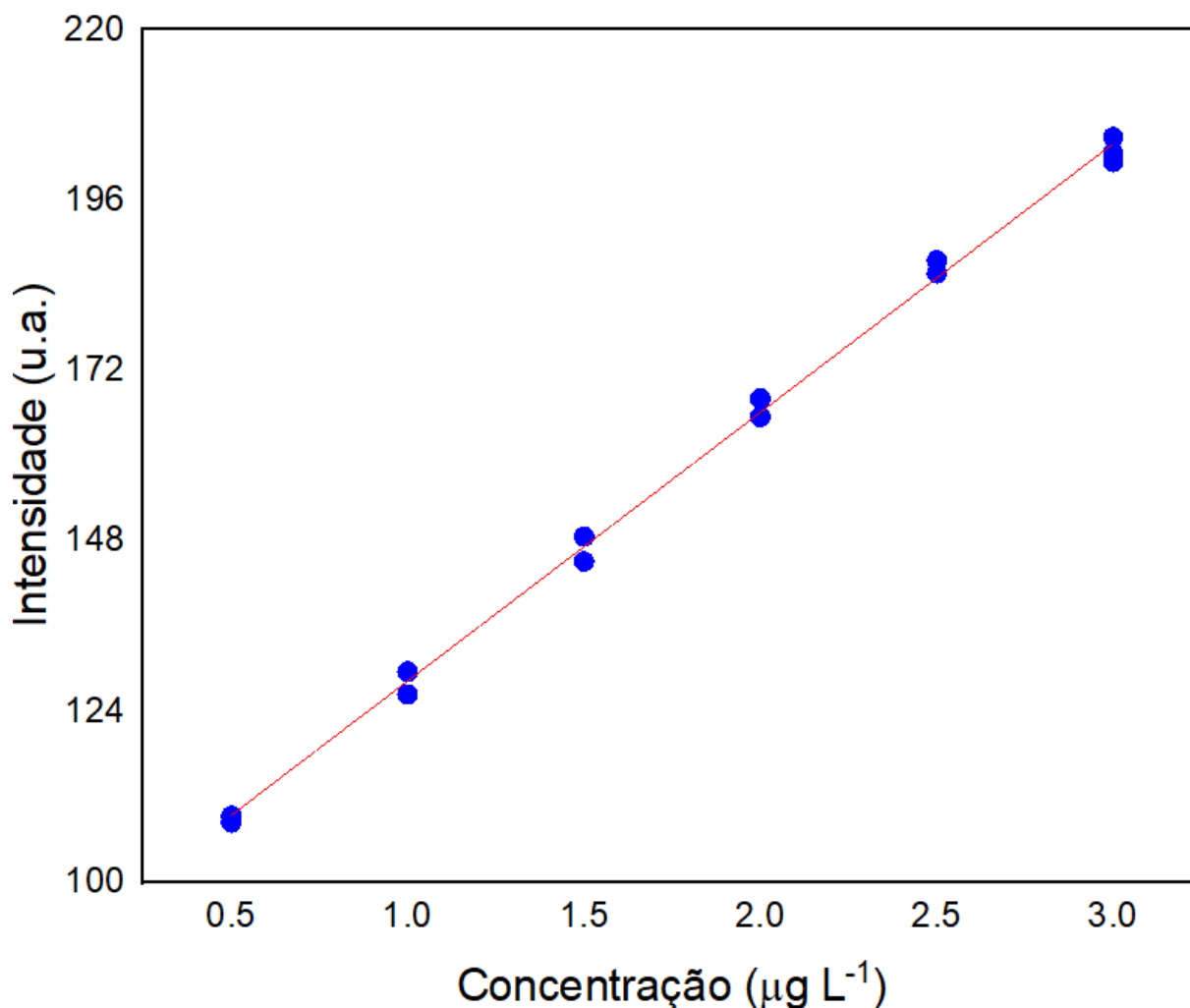


Figura 45. Curva de calibração da ocratoxina A em tampão pH 9,3 com adição de β -ciclodextrina ($1,98 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

Analogamente, a regressão linear referente ao analito na matriz também obedece a todos os critérios estatísticos, sob os quais identificou-se e removeu-se um valor de *outlier*. Comparando-se os coeficientes angulares da curva do solvente e da curva matrizada construídas (**Figura 46**), concluiu-se que há efeito matriz. Portanto, as figuras de mérito remanescentes devem ser avaliadas de acordo com as amostras da matriz.

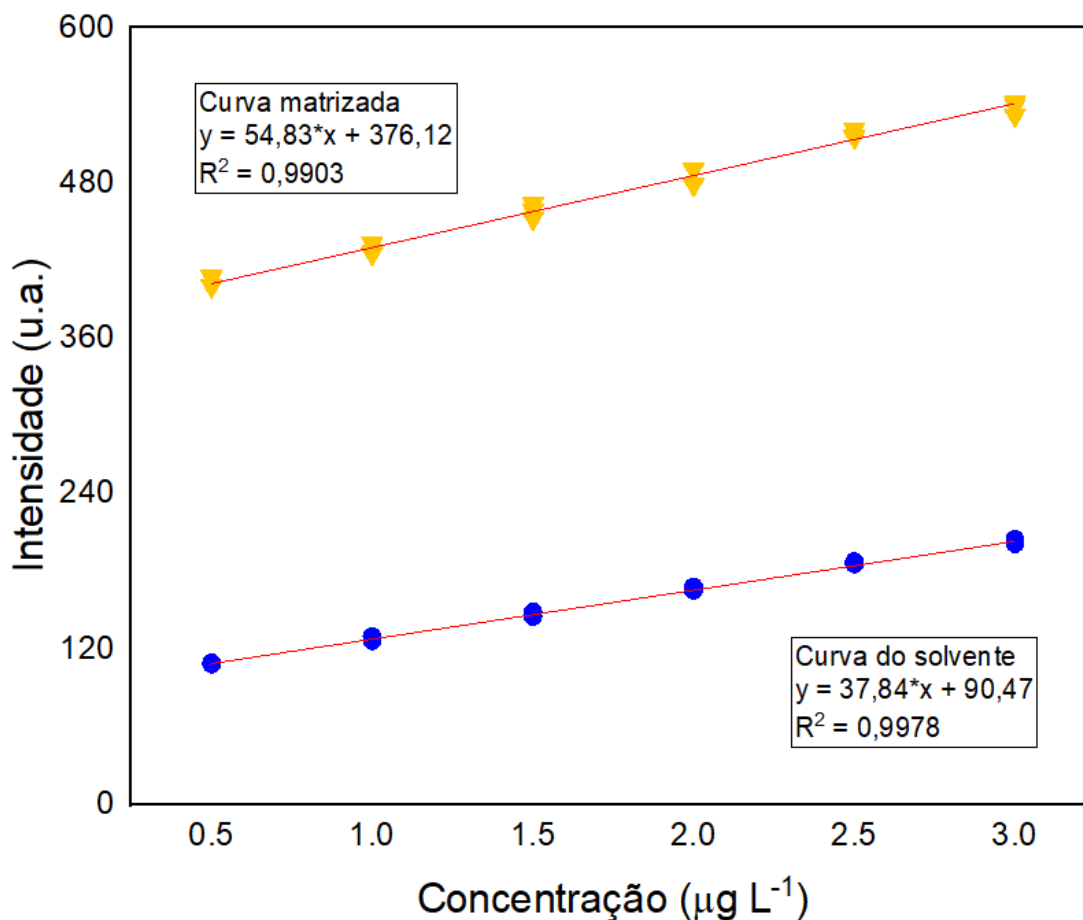


Figura 46. Comparação entre a curva no solvente e a curva matrizada para avaliação do efeito de matriz ($n = 3$) na determinação de ocratoxina A. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software Origin.

A seletividade foi demonstrada pelo conjunto de espectros expostos anteriormente, os quais evidenciaram a capacidade de detectar o analito na concentração alvo, mesmo diante de interferentes da matriz. Embora a análise direta apresente limitações, é razoável considerar que a sobreposição espectral provocada pela presença de OTB e OTC é desprezível para fins de quantificação, conforme os aspectos moleculares previamente discutidos. Métodos baseados em HPLC-FLD geralmente indicam que os parâmetros instrumentais e as otimizações são mais compatíveis para a detecção da OTA (Yamamoto, *et al.*, 2018; Remiro *et al.*, 2010). Ainda assim, LC-MS/MS pode ser empregada como técnica confirmatória (Louppis & Constantinou, 2022).

O valores de LD e LQ calculados para o método proposto foram de $0,20 \mu\text{g L}^{-1}$ e o $0,60 \mu\text{g L}^{-1}$. Como a primeira concentração da curva apresentou exatidão e precisão satisfatórias, o LOQ experimental foi estabelecido em $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Apesar de

não haver critérios específicos para a performance de métodos de determinação de OTA em termos de detecção e quantificação, a recomendação geral é que LD e LQ sejam, no mínimo, 0,5 vezes inferiores ao limite máximo permitido. Portanto, ambos devem ser inferiores a $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (European Commission, 2023). As concentrações obtidas são comparáveis às reportadas em estudos recentes da literatura científica que investigaram a presença de OTA em vinho, inclusive utilizando UPLC-MS/MS como técnica analítica (Karachaliou *et al.*, 2022; Louppis & Constantinou, 2022; Zangheri *et al.*, 2021).

Os percentuais de recuperação encontram-se na faixa de 84,9% - 95,0%. Estes resultados são aceitáveis de acordo com os limites estabelecidos (40% - 120%) pela AOAC para a ordem de concentração de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de B[a]P.

O DPR para a repetibilidade aceitável é menor que 30%. Os valores calculados encontram-se na faixa de 7,7% - 28,4%, sendo apropriados. O DPR para a precisão intermediária aceitável é menor que 45%. Os valores calculados encontram-se na faixa de 8,1% - 22,3%, sendo apropriados. Os resultados da validação estão sintetizados na **Tabela 11**.

Tabela 11: Figuras de mérito de validação do método de determinação de ocratoxina A em vinho. Fonte: Autor.

Concentração OTA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetibilidade		Precisão intermediária		Recuperação média	
	DPR (%)	Limite (%)	DPR (%)	Limite (%)	R' (%)	Limite (%)
0,5	28,4	30	22,3	45	84,9	40 – 120
2,0	6,2	30	8,3	45	94,9	40 – 120
3,0	5,1	30	8,1	45	95,1	40 – 120
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,5 – 3,0					
Linearidade	Inclinação	Intercepto	(R²)			
	37,84	90,47	0.9903			
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,20					
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,60					

O método desenvolvido para a determinação de OTA em vinho apresenta características marcantes conforme descrito na **Tabela 12**. O processo envolve apenas uma etapa de preparo de amostra e não requer colunas de imunoafinidade ou outros procedimentos de *cleanup*, reduzindo significativamente o tempo e os custos associados. Embora o protocolo inclua o uso de clorofórmio, emprega-se um volume baixo (2,0 mL), o que minimiza os riscos ambientais e de manipulação. A combinação de reagentes acessíveis, como ácido fosfórico, cloreto de sódio, β -CD e tampão básico, possibilita a formação de um sistema eficiente de extração seletiva. Além disso, o tempo total do procedimento é reduzido (cerca de 2 horas) e a determinação é realizada em espectrofluorímetro, equipamento amplamente disponível em laboratórios analíticos. Embora apresente menor sensibilidade em relação a técnicas cromatográficas avançadas e abordagens baseadas em biossensores e aptâmeros (Meira, *et al.*, 2025; Yuila *et al.*, 2024; Nekrasov *et al.*, 2022), é relevante destacar que técnicas cromatográficas sofisticadas e colunas de imunoafinidade geralmente demandam elevados custos operacionais e equipamentos especializados, o que pode restringir sua aplicação em determinados contextos. Por sua vez, biossensores e aptâmeros, apesar de sua alta especificidade, apresentam limitações relacionadas à estabilidade ao longo do tempo, comprometendo a reprodutibilidade e a vida útil dos ensaios, além de requererem nanotecnologia avançada. Esses fatores reforçam o potencial do método como uma alternativa viável para laboratórios com infraestrutura limitada, mantendo sensibilidade adequada para quantificação de OTA em níveis compatíveis com as exigências regulatórias.

Tabela 12: Características experimentais do método desenvolvido para a determinação de ocratoxina A em vinho. Fonte: Autor.

Parâmetros	Método proposto
Preparo de amostra	LLE (1 etapa)
Método de <i>cleanup</i>	---
Consumo de reagentes e solventes	2 mL clorofórmio, H ₃ PO ₄ , NaCl, β -CD, tampão pH 9,3
Tempo	2 horas
Equipamento	Espectrofluorímetro

5.5.10 Aplicação do método validado

O método validado foi aplicado para monitorar a concentração de OTA em três amostras de de vinho tinto comercialmente disponíveis, produzidas em diferentes países. Os vinhos analisados são das variedades *Cabernet Sauvignon*, *Merlot* e suave. Os espectros obtidos mostram características de fluorescência semelhantes (**Figura 47**). Os resultados indicam que o teor do analito na amostra de vinho *Merlot* e *Cabernet* está abaixo do LD do método proposto ($0,20 \mu\text{g L}^{-1}$), enquanto para o vinho suave, quantificou-se a concentração de $0,79 \mu\text{g L}^{-1}$.

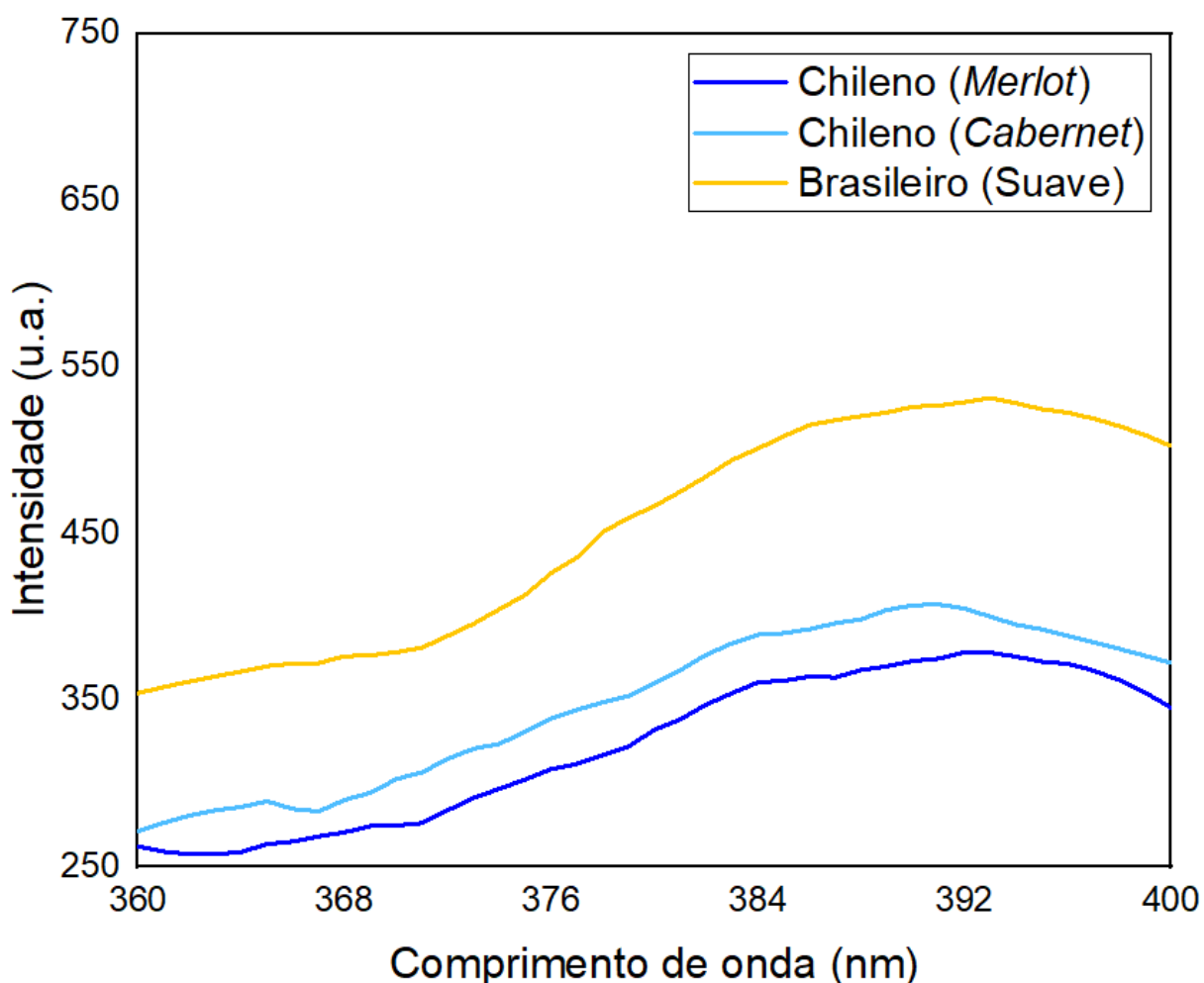


Figura 47. Espectros sincronizados obtidos para amostras de vinho analisadas pelo método validado. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

Entre os vinhos tintos, os suaves, que geralmente são adoçados e produzidos em larga escala, tendem a apresentar menor controle e uso de uvas de qualidades inferiores, o que favorece a presença de fungos produtores de OTA, sob armazenamento inadequado. Além disso, vinhos doces cuja fermentação é interrompida pela adição de álcool, dificultam a degradação natural da toxina. Assim, a combinação de técnicas que favorecem o crescimento fúngico e a redução da fermentação contribui para os elevados teores de OTA nesses vinhos (Gil-Serna *et al.*, 2018). Na literatura científica, os níveis médios de OTA em vinhos tintos costumam variar entre 20 e 30 ng L⁻¹, valores que, embora inferiores ao limite legal estabelecido pela EC (2,0 µg L⁻¹), ainda representam um risco potencial à saúde, especialmente com o consumo frequente em países como Argentina, Espanha e Itália. Neste último, especificamente na região sul, foi registrada uma concentração de 9,2 µg L⁻¹, valor significativamente acima do permitido (Zjalic *et al.*, 2024)

5.6 CONCLUSÃO

Um método adaptado de extração clorofórmio foi proposto e executado pela incorporação da análise direta por fluorescência sincronizada à energia constante. Esta técnica demonstrou-se apropriada para a determinação de ocratoxina A em vinho tinto. Durante o desenvolvimento do método, parâmetros do preparo de amostra foram investigados, o uso de tampão adequado para modular o pH, solvente de extração e a proporção molar de β-ciclodextrina em relação ao analito. Os resultados obtidos são consistentes à literatura, demonstrando seletividade, veracidade, linearidade e limites de detecção e quantificação aceitáveis. A simplicidade experimental é uma vantagem que torna a aplicação deste método uma alternativa eficiente para a realização de métodos de rotina que exijam alta frequência analítica. As propriedades da espectrofluorimetria indicaram compatibilidade para se determinar o analito diante das interferências de uma matriz complexa, havendo possibilidade de expandir o escopo do método para os vinhos brancos e rosé.

6. ANÁLISE EXPLORATÓRIA MULTIVARIADA DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL EM HIDROMEL

6.1. Aspectos gerais

6.1.1 *Hidromel*

O hidromel é uma bebida alcoólica resultante da fermentação do mel diluído em água. Considerado uma das bebidas fermentadas mais antigas da história, foi consumida por diversas civilizações ao longo do tempo e permanece presente em contextos contemporâneos. Sua composição química básica inclui açúcares fermentáveis, principalmente frutose e glicose, aminoácidos, vitaminas, compostos fenólicos, minerais traços e leveduras do gênero *Saccharomyces*. A variabilidade na composição do mel, que depende da origem floral, geografia e do clima, afeta diretamente as propriedades sensoriais e nutricionais do produto final (Starowicz & Granvogl, 2020).

O processo de fabricação do hidromel envolve, geralmente, a preparação do mosto, fermentação e maturação. O mosto, solução de mel e água (frequentemente na proporção de 1:3 a 1:5), pode ser aquecido ou mantido cru, dependendo das técnicas tradicionais ou modernas empregadas. Nesta fase, é comum a adição de ingredientes auxiliares, como frutas, ervas, especiarias ou materiais vegetais ricos em taninos, com o objetivo de modular a complexidade do sabor e a estabilidade microbiana. A fermentação é conduzida sob condições controladas, ocorrendo a conversão dos açúcares em etanol e dióxido de carbono ao longo de semanas ou meses. Após esta etapa, o hidromel passa por clarificação e envelhecimento, etapas que podem durar de alguns meses a mais de um ano (Webster *et al.*, 2025)

Existem diversos tipos de hidromel, que se diferenciam pela inclusão de ingredientes, métodos fermentativos e práticas de processamento (**Figura 48**). O hidromel pode ser frisante, seco ou doce, com teor alcoólico variando, em geral, entre 5% e 20% em volume. As classificações mais comuns são o hidromel tradicional (produzido apenas com mel, água e leveduras), melomel (hidromel com frutas), *metheglin* (hidromel com ervas ou especiarias), além de estilos experimentais e híbridos, como *braggot*, (hidromel com malte ou lúpulo) e *bochet* (elaborado com mel caramelizado). Cada variação apresenta perfis químicos e sensoriais distintos, influenciados pela composição de polifenóis, açúcares e ácidos dos ingredientes

adicionados (Iglesias *et al.*, 2014).



Figura 48. Diferentes estilos de hidromel.

No que diz respeito ao consumo, o hidromel ocupa um nicho singular no mercado global de bebidas alcoólicas, sendo apreciado tanto como patrimônio cultural, quanto como bebida artesanal contemporânea. A bebida tem passado por um ressurgimento global, impulsionado pelo crescente interesse por bebidas artesanais, pelo resgate de tradições históricas e pela demanda das fermentações naturais. Inovações no controle da fermentação, na seleção de cepas microbianas e nas técnicas de envelhecimento têm ampliado ainda mais a diversificação de produtos derivados do hidromel, possibilitando sua adaptação de acodro com perfis sensoriais específicos e funcionalidades nutricionais desejadas (Gorman *et al.*, 2024).

6.1.2 Contaminação de hidromel

Ao longo do processo produtivo do hidromel, os contaminantes químicos podem ter origem nas matérias-primas, nos equipamentos de processamento, ou surgir como subprodutos indesejáveis de reações ocorridas durante o processamento. Entre os contaminantes mais relevantes estão aqueles já presentes no mel, como resíduos de pesticidas, como organofosforados e neonicotinóides; antimicrobianos, como sulfonamidas e tetraciclina; e metais pesados como chumbo, cádmio e arsênio, que ocorrem devido à exposição ambiental das abelhas ou à contaminação das fontes florais. Esses contaminantes podem resistir ao processo de fermentação e, em alguns casos, tornar-se mais biodisponíveis devido a alterações de pH ou à presença de etanol como solvente (Morariu *et al.*, 2024; Bargańska *et al.*, 2016).

. A formação de produtos da reação de Maillard pode ocorrer quando o mel é aquecido antes da fermentação ou durante processos de pasteurização. Essa reação não enzimática entre açúcares redutores e aminoácidos resulta na geração de compostos orgânicos, como furfural, 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) e melanoidinas. Embora alguns desses compostos possam contribuir positivamente para o perfil sensorial do hidromel, outros podem apresentar implicações toxicológicas (Nagai *et al.*, 2018).

Apesar das múltiplas fontes potenciais de contaminação, a pesquisa científica focada especificamente em hidromel é bastante limitada. A maior parte da literatura existente concentra-se na qualidade e segurança do mel como matéria-prima, ao invés do produto fermentado. Essa defasagem se deve, em grande parte, ao interesse relativamente mais restrito pelo hidromel no mercado de bebidas e no meio acadêmico, sobretudo quando comparado com cervejas e vinhos. Embora em alguns casos haja correspondência entre os modelos científicos aplicados ao hidromel baseados no mel, as transformações físico-químicas que ocorrem durante a fermentação, como alterações no potencial redox, no pH e na polaridade do meio, podem modificar o comportamento, a toxicidade e a detectabilidade de certos contaminantes, destacando a necessidade de estudos específicos voltados ao hidromel.

6.1.3 5-Hidroximetilfurfural em hidromel

O 5-hidroximetilfurfural (HMF) forma-se predominantemente a partir da degradação térmica da frutose, em meio ácido, estando associado tanto à reação de Maillard quanto à caramelização. No caso do mel, que pH naturalmente ácido (3,4 - 6,1) e é rico em frutose, o HMF destaca-se como um dos principais produtos da deterioração térmica, sendo amplamente utilizado como marcador químico da qualidade e integridade de bebidas fermentadas à base de mel. A presença de HMF no mel pode decorrer tanto de sua formação prévia durante o armazenamento prolongado ou exposição a processos térmicos intensos, quanto de etapas como a pasteurização, o aquecimento para esterilização, ou a fervura do mel na preparação do mosto para hidromel. Além disso, a acidez natural do mosto fermentativo favorece a degradação de açúcares, intensificando a formação do composto mesmo sob temperaturas moderadas.

O HMF é um composto orgânico heterocíclico, pertencente à classe dos aldeídos furanóicos, caracterizado por um anel de furano substituído por um grupo hidroxila e um grupo formil (**Figura 49**). Essas características conferem-lhe elevada reatividade química, especialmente em ambientes aquosos e ácidos. É solúvel em água, etanol e outros solventes orgânicos polares (**Tabela 13**).

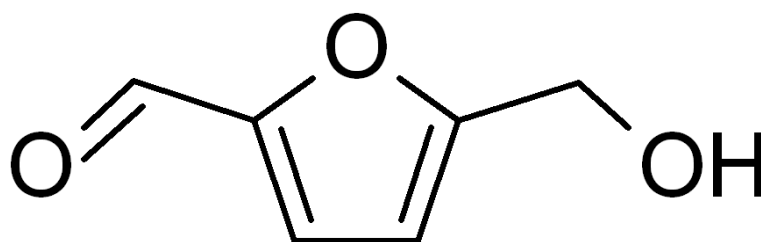


Figura 49. Fórmula estrutural do 5-hidroximetilfurfural. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* ChemDraw.

Devido à sua sensibilidade às condições de processamento e armazenamento, os teores de HMF no mel são regulados por normas internacionais de qualidade, como o Codex Alimentarius, que estabelece um limite máximo de 40 mg kg⁻¹ para méis em

geral, podendo chegar a 80 mg kg^{-1} em regiões tropicais, onde o armazenamento sob altas temperaturas é mais comum (Codex Alimentarius, 2001).

Tabela 13. Propriedades físico-químicas do 5-hidroxiacetilfurfural. Fonte: Autor.

Aparência	Sólido amarelo
Fórmula molecular	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$
Peso molecular	$126,11 \text{ g mol}^{-1}$
Densidade	$1,29 \text{ g cm}^{-3}$
Volatilidade	Baixa
Ponto de fusão	$30 - 34 \text{ }^\circ\text{C}$
Ponto de ebulição	$114 - 116 \text{ }^\circ\text{C}$
Coefficiente de partição	$\log k_{ow} = 0,1 - 0,3$ (hidroossolúvel)
Solubilidade em água	Não informada

Além de ser um indicador de envelhecimento ou tratamento térmico inadequado, o HMF também é motivo de preocupação do ponto de vista toxicológico. Estudos experimentais indicam que, em concentrações elevadas, o HMF pode apresentar citotoxicidade, genotoxicidade e potencial mutagênico, especialmente após sua biotransformação em 5-sulfoximetilfurfural, um metabólito reativo com capacidade de interação com o DNA celular. Embora a exposição dietética ao HMF seja geralmente considerada segura em baixos níveis, sua concentração pode se tornar significativa em méis aquecidos ou em hidroméis elaborados com méis de baixa qualidade (Shapla *et al.*, 2018).

No contexto da produção de hidromel, a presença de HMF adquire relevância adicional, pois pode afetar negativamente o processo de fermentação alcoólica. Concentrações elevadas do composto podem interferir no metabolismo das leveduras, resultando em fermentações lentas, incompletas ou com perfis sensoriais indesejáveis. Além disso, o HMF pode contribuir com sabores amargos ou fenólicos residuais na bebida final, comprometendo sua aceitabilidade sensorial.

6.1.4 Métodos de análise de 5-Hidroximetilfurfural

As técnicas cromatográficas, espectroscópicas e eletroanalíticas têm sido utilizadas para a determinação de HMF em diferentes alimentos, sendo o mel a matriz mais estudada. A HPLC-UV é um dos métodos mais empregados; no entanto, seu limite de detecção é frequentemente 2 a 3 ordens de magnitude maior do que os encontrados para LC-MS e HPLC-FLD. Embora as técnicas cromatográficas predominem, observa-se um aumento no número de aplicações envolvendo espectrometria nos últimos anos, devido a aspectos práticos (Martins *et al.*, 2022).

A estrutura química do HMF possui cromóforos e fluoróforos que permitem a utilização de técnicas de absorção e fluorescência, o que justifica seu destaque como indicador de qualidade do mel, dada a possibilidade de quantificação bem estabelecida. No entanto, técnicas espectroscópicas mais simples são frequentemente prejudicadas por efeitos da matriz e pela seletividade insuficiente. Procedimentos de derivatização química têm sido explorados para melhorar a seletividade, embora esse recurso também seja comumente associado à análise cromatográfica (Sun *et al.*, 2017; Donnarumma *et al.*, 2013).

A análise de hidromel é menos consolidada em comparação a outras matrizes nas quais há ocorrência de HMF. No entanto, estudos da literatura científica que empregam HPLC-UV reportaram concentrações de HMF em amostras de hidromel nas faixas de 2,7 a 158 mg L⁻¹ e de 27 a 209 mg L⁻¹ (Švecová *et al.*, 2015; Kahoun *et al.*, 2008). Observou-se também que a quantidade de HMF produzida nessa bebida, em amostras submetidas ao aquecimento a 90 °C durante 60 minutos, foi superior em relação aos hidromeis não aquecidos (Kahoun *et al.*, 2017).

Não foram encontrados, até o momento, trabalhos na literatura científica que empreguem a fluorescência como técnica de análise direta para a determinação de HMF em amostras de hidromel. No entanto, há publicações que utilizam a análise multivariada por PARAFAC aplicada à EEM, principalmente na caracterização da composição do mel. Nesses estudos, os compostos oriundos da reação de Maillard, entre eles o HMF, surgem como uma das componentes relevantes dos modelos PARAFAC, refletindo alterações na composição associadas ao processamento térmico, ao envelhecimento e adulterações (Dramićanin *et al.*, 2018; Lenhardt *et al.*, 2015). Esse tipo tem se mostrado eficiente para o monitoramento de marcadores

químicos de degradação e qualidade em matrizes alimentares complexas. Assim, pretende-se explorar esta abordagem para avaliar o desempenho destas técnicas e ampliar as alternativas metodológicas disponíveis de menor complexidade instrumental.

6.2 Materiais e reagentes

As amostras de hidromel de diferentes estilos foram adquiridas comercialmente na região de Belo Horizonte (**Tabela 14**).

Tabela 14. Descrição dos etilos de hidromel analisados. Fonte: Autor.

Amostra	Estilo
H1	Tradicional
H2	<i>Bouchet</i>
H3	Tradicional
H4	Tradicional
H5	Tradicional
H6	Tradicional
H7	Tradicional
H8	<i>Metheglin</i>
H9	<i>Metheglin</i>
H10	<i>Metheglin</i>
H11	Tradicional
H12	Melomel
H13	Tradicional
H14	Tradicional
H15	Tradicional

6.3 Equipamentos e softwares

As análises foram realizadas no espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse. A aquisição de dados foi realizada nos *softwares*: Microsoft Excel, OriginLab e Scan. O modelo quimiométrico foi construído no *software* MATLAB.

6.4 Metodologia

6.4.1 Análise das amostras de hidromel

As amostras foram analisadas diretamente, não havendo quaisquer preparos, como diluição e filtração. As EEM foram obtidas na faixa de excitação de 300 a 450 nm com um passo de 3 nm e na faixa de emissão de 360 a 540 nm com intervalos de 1 nm. Ambas larguras das fendas de excitação e emissão foram de 5 nm e 5 nm, respectivamente. As regiões de espalhamento de Rayleigh de primeira ordem ($\lambda_{exc} = 2\lambda_{em}$) nas EEM não seguem a estrutura trilinear e foram removidas para evitar a interferência na modelagem matemática.

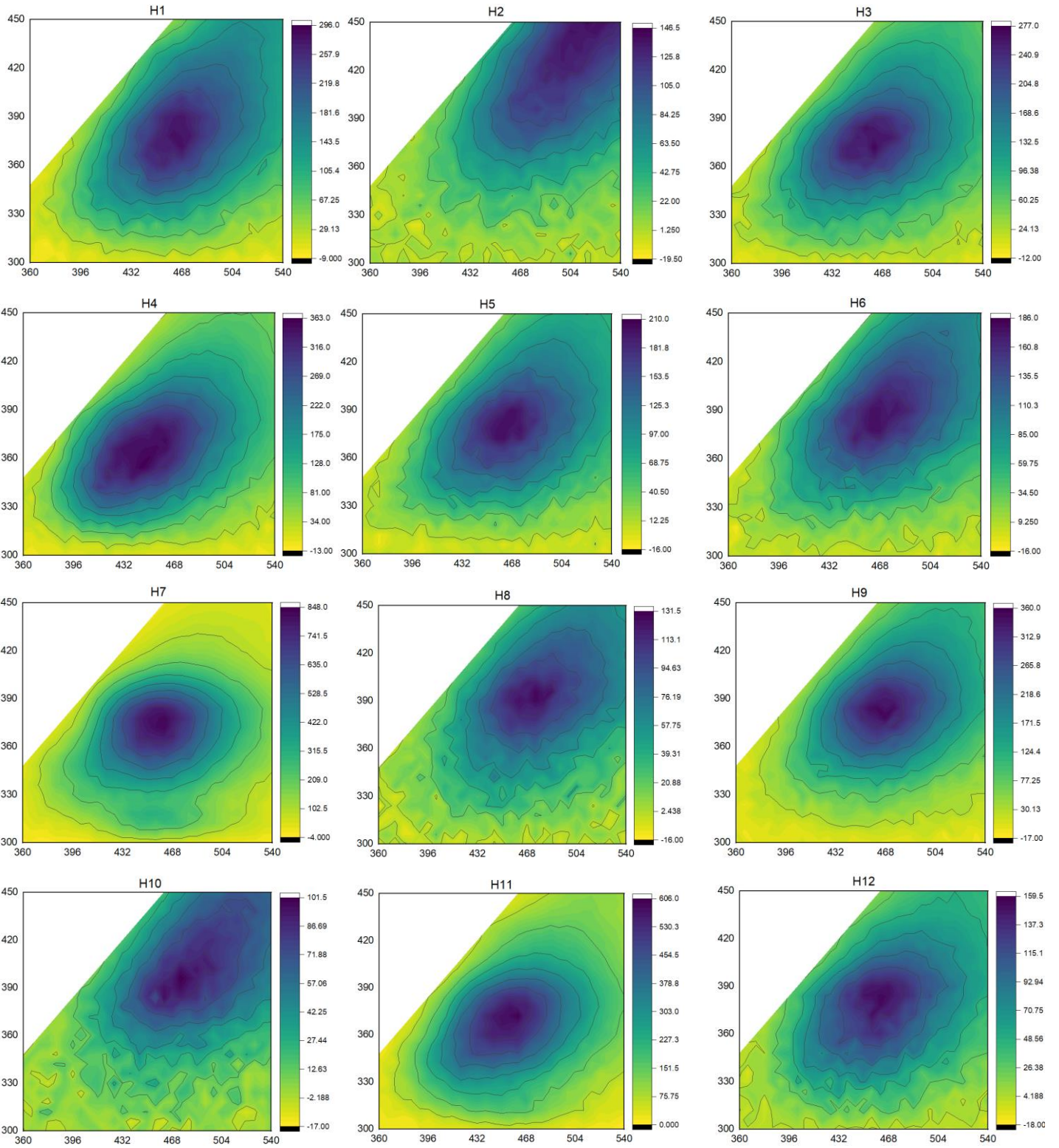
6.4.2 Construção do modelo PARAFAC

Os modelos PARAFAC foram processados no software MATLAB (MathWorks, Natick, EUA) com a extensão PLS Toolbox, 6.71 (Eigenvector Technologies, Manson, USA). Aplicou-se a restrição de não negatividade nos modos de excitação e emissão. Diferentes modelos foram construídos utilizando diferentes números de componentes, com o objetivo de maximizar a obtenção de informações químicas.

6.5 Resultados e discussão

6.5.1 Modelo PARAFAC

A **Figura 50** apresenta as EEM das amostras de hidroméis. As intensidades dos padrões de emissão variam entre as amostras, refletindo diferenças nas concentrações dos compostos fluorescentes. A banda espectral mais expressiva, presente em todas as amostras, está associada a compostos fenólicos, vitamina B2 e produtos da reação de Maillard presentes no mel. As intensidades das superfícies não foram ajustadas à mesma escala entre as amostras, pois, devido à grande discrepância nos valores de intensidade, a normalização dificultaria a visualização das bandas menos intensas. Além das variações de intensidade, observa-se também uma diferença nos comprimentos de onda máximos de excitação e emissão. No entanto, para a maioria das amostras, os sinais mais pronunciados concentram-se na região central da EEM.



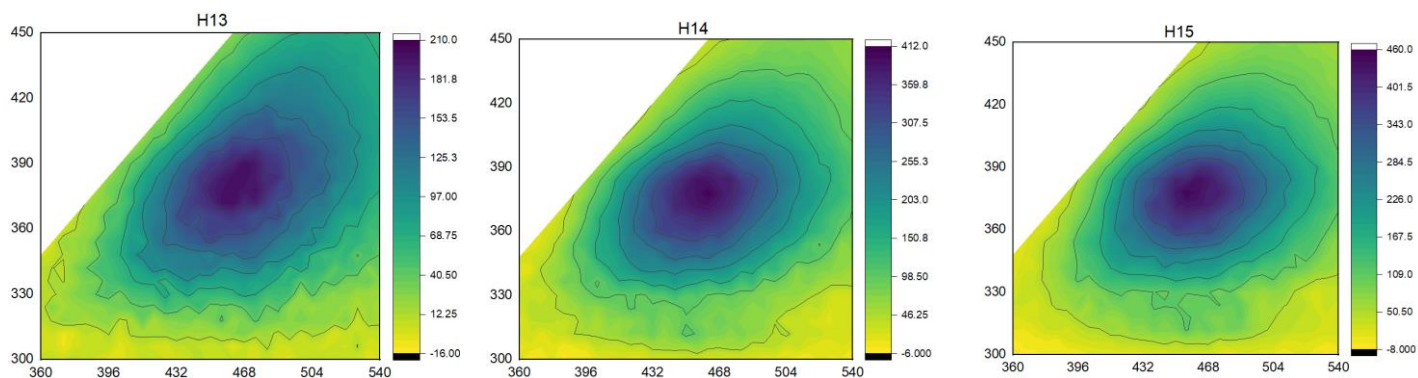


Figura 50. EEM obtidas para as amostras de hidromel analisadas. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *software* Origin.

Modelos PARAFAC foram então construídos para determinar o perfil fluorescente subjacente nas EEM. Para determinar o número apropriado de componentes, modelos PARAFAC foram criados variando o número de fatores de 1 a 4. Os critérios utilizados para avaliar a melhor condição de deconvolução foram os valores do Diagnóstico de Consistência do Núcleo (CORCONDIA), a variância espectral explicada dos dados e informações prévias sobre a presença de compostos fluorescentes no mel (Dramićanin *et al.*, 2018; Lenhardt *et al.*, 2015; Karoui *et al.*, 2007). O cálculo dos espectros puros foi realizado com 3 e 4 componentes, obtendo-se os respectivos dados associados à cada condição testada. O CORCONDIA é projetado para avaliar a consistência trilinear de uma solução PARAFAC. Tipicamente, valores em torno de 50% ou inferiores indicam ausência de trilinearidade, enquanto valores acima de 90% indicam um bom ajuste do modelo e trilinearidade consistente (Bro & Kiers, 2003). A Tabela 15 apresenta a variância explicada e os valores de CORCONDIA com base no número de componentes.

Tabela 15. Parâmetros de ajuste do modelo PARAFAC obtidos por diferentes números de componentes. Fonte: Autor

Número de componentes	Variância explicada (%)	CONCORDIA (%)
4	97,776	85
3	94,097	90

O número apropriado de componentes foi determinado de modo a equilibrar a extração de informações não redundantes com o ajuste estatístico. Ambos os modelos com 3 e 4 componentes apresentam bom ajuste. Optou-se pelo modelo com 3 componentes, pois apesar de apresentar valor inferior de variância explicada, há maior índice percentual de CORCONDIA. Além disto, o modelo de 4 componentes apresenta dois espectros idênticos em termos de comprimentos de onda máximos, não contribuindo significativamente para a variabilidade dos dados.

A primeira componente explica 52,23% da variância espectral e está relacionada aos produtos da reação de Maillard. Os valores máximos de excitação e emissão em 372 nm e 455 nm, respectivamente. Embora o HMF apresente fluorescência intrinsecamente fraca, esses valores espectrais sugerem uma possível contribuição do composto ao sinal modelado, principalmente devido ao seu papel como precursor de produtos avançados da reação de Maillard, que são altamente fluorescentes. Tal associação é coerente com estudos anteriores que indicam a excitação do HMF em torno de 360 nm quando este interage com aminoácidos presentes em matrizes como o mel, resultando em complexos com maior emissão. Portanto, mesmo que o HMF não seja um fluoróforo predominante isoladamente, sua presença pode influenciar significativamente o perfil espectral das amostras, seja por emissão direta em interações moleculares, seja como marcador indireto de modificações térmicas da matriz (Karoui *et al.*, 2007; Birlouez-Aragon *et al.*, 1998).

A segunda componente contém 35,15% da variância espectral e representa os compostos fenólicos, que constituem os ácidos fenólicos e flavonoides, cuja composição no mel é bastante diversificada. Foram registram os valores máximos de 348 nm para a excitação e 420 nm para a emissão. A terceira componente demonstra uma variância espectral de 7,91%, com máximos de excitação e emissão em 438 e 501 nm, respectivamente, apontando para uma semelhança com os comprimentos de onda típicos da riboflavina (vitamina B2), cuja excitação ocorre em 450 nm e emissão em 525 nm (Dramićanin *et al.*, 2018; Lenhardt *et al.*, 2015).

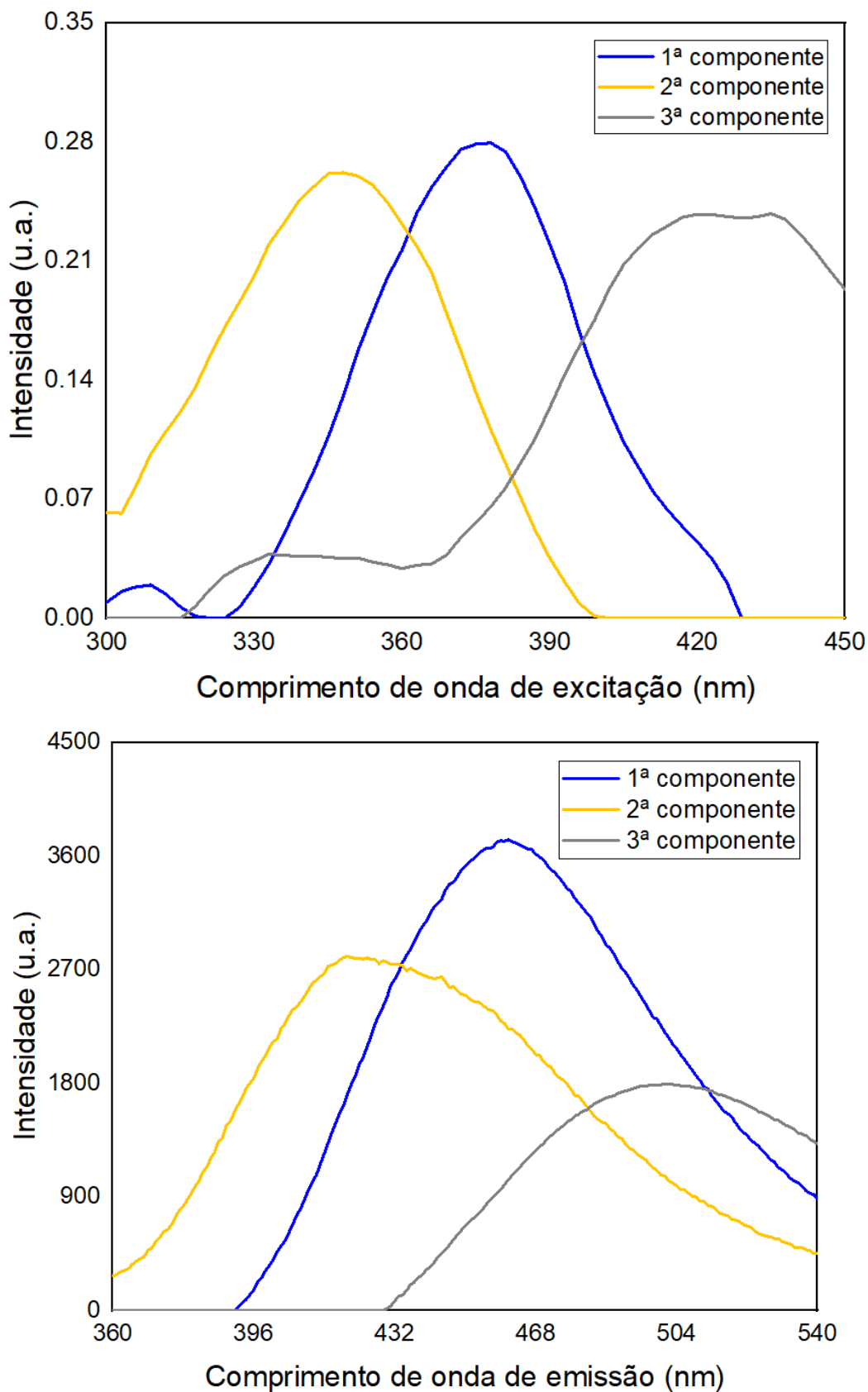


Figura 51. Espectros puros gerados pelo modelo PARAFAC representando os modos de excitação e emissão. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o *softwares* MATLAB e Origin.

A análise de resíduos constitui uma etapa importante na avaliação da qualidade

do ajuste do modelo PARAFAC, permitindo identificar amostras que não são bem representadas pelo modelo trilinear proposto. Na **Figura 52**, a soma dos quadrados dos resíduos foi utilizada como métrica para quantificar a discrepância entre os dados experimentais e os valores estimados para cada amostra. Amostras com valores residuais elevados indicam maior erro de ajuste, podendo refletir características espectrais atípicas, comportamentos não trilineares ou compostos fluorescentes não capturados adequadamente pelo modelo. As linhas horizontais de corte foram estabelecidas com base na distribuição estatística dos resíduos: a primeira, em amarelo, indica o ponto a partir do qual os resíduos já se encontram acima da média da população, embora ainda dentro de um intervalo considerado aceitável; a segunda, em laranja, delimita o limite superior esperado para os resíduos, sendo utilizada como critério para identificação de *outliers* estatísticos (Andersen & Bro, 2003). Com base nesses limites, observou-se que as amostras H2, H8 e H10 apresentam resíduos consideravelmente superiores às demais amostras. Essa discrepância sugere que essas três amostras sejam *outliers* e serão excluídas do modelo para assegurar uma modelagem mais apropriada.

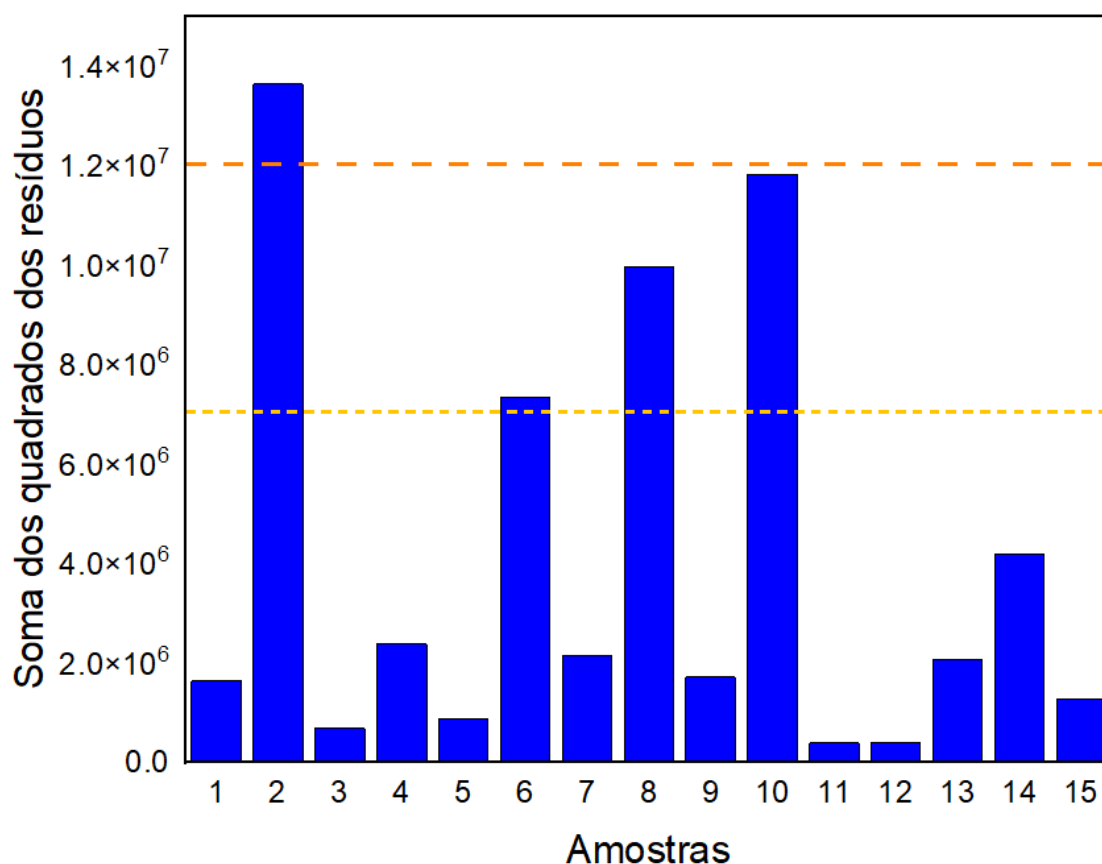


Figura 52. Gráfico da soma dos quadrados dos resíduos das amostras de hidromel para avaliação de *outliers*. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando os *softwares* MATLAB e Origin.

De acordo com a **Tabela 14**, essas amostras correspondem a estilos de hidromel não tradicionais: H2 é do tipo *Bouchet*, enquanto H8 e H10 são do tipo *Metheglin*. Essas classificações são relevantes, uma vez que diferentes estilos de hidromel resultam de variações significativas na formulação e no processo de produção, que impactam diretamente a composição química, incluindo os compostos fluorescentes detectados no modelo PARAFAC. O hidromel *Bouchet* é produzido a partir de mosto aquecido até a caramelização do mel antes da fermentação, processo que intensifica as reações de Maillard. Como consequência, o perfil de compostos formados, incluindo HMF, pode ser distinto do observado em hidroméis tradicionais, tanto em termos de quantidade quanto de proporção entre precursores e produtos de degradação térmica. Essa característica pode explicar o alto valor residual da amostra H2: embora presente HMF, sua fluorescência pode ser sobreposta por outros produtos da reação de Maillard, prejudicando a relação entre o escore e a concentração de HMF (Starowicz & Granvogl, 2020).

Já os hidroméis do tipo *Metheglin* (H9 e H10) são elaborados com a adição de ervas e especiarias durante a produção. Esses aditivos introduzem uma série de compostos fenólicos e voláteis com características fluorescentes próprias, que podem interferir na emissão espectral e modificar o padrão de fluorescência associado ao HMF. Como observou-se na **Figura 51**, a sobreposição intensa entre os espectros da 1ª e 2ª componentes, indica que a presença desses interferentes pode afetar a resposta modelada pelo PARAFAC, resultando em escores que não representam adequadamente a concentração real de HMF nessas amostras. Além disso, algumas ervas podem conter antioxidantes naturais que inibem ou redirecionam as reações de degradação térmica e formação de HMF, alterando ainda mais a relação entre os dados espectrais e a análise cromatográfica (Starowicz & Granvogl, 2020).

6.5.3 Análise de correlação

A terceira informação extraída do modelo PARAFAC refere-se à concentração relativa dos componentes fluorescentes nas diferentes amostras, representada pelos valores de escores obtidos para cada componente ao longo da dimensão das amostras. No caso da primeira componente, atribuída aos produtos da reação de Maillard, os valores de escores foram utilizados como estimativa relativa da presença desses compostos. Para verificar a validade dessa atribuição, foi realizada uma

análise de regressão utilizando os valores de escore da 1ª componente em conjunto com os teores de HMF quantificados previamente por GC-FID (*Flame Ionization Detector* – Detector de chamas) nas respectivas amostras (**Tabela 16**).

Tabela 16. Valores de escores fornecidos pelo modelo PARAFAC e concentrações de referência de 5-hidroxiacetilfurfural nas amostras analisadas. Fonte: Autor.

Amostra	Escore PARAFAC 1ª componente (u.a.)	Concentração HMF GC-FID (mg L⁻¹)
H1	0,21414	5,648
H3	0,20219	4,306
H4	0,23932	37,436
H5	0,32356	45,268
H6	0,15818	27,476
H7	0,13787	3,128
H9	0,28109	57,772
H11	0,40131	107,412
H12	0,12141	2,264
H13	0,31288	37,654
H14	0,33636	53,508
H15	0,35327	62,217

A relação entre essas duas variáveis foi avaliada por meio da correlação de Pearson, desconsiderando os *outliers* (**Figura 53**).

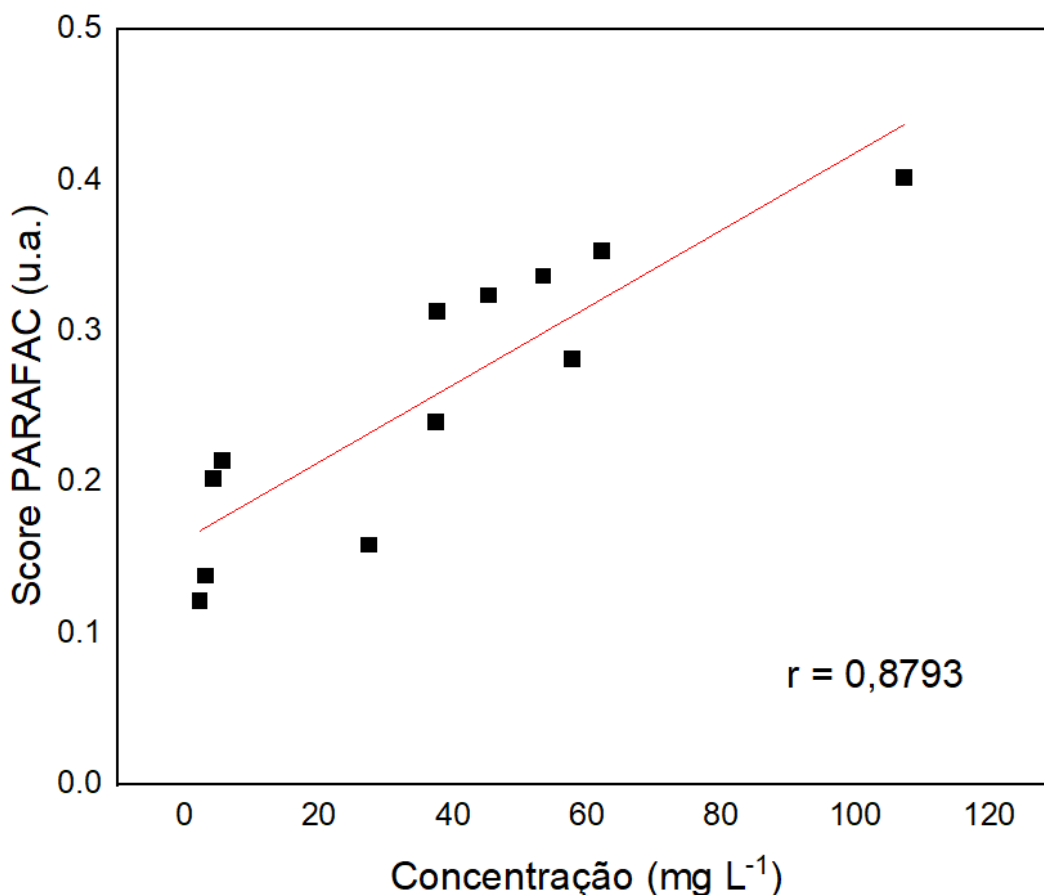


Figura 53. Correlação de Pearson entre a concentração de HMF e os escores do modelo PARAFAC. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando os *softwares* MATLAB e Origin.

O coeficiente obtido indica uma correlação linear positiva entre as variáveis. Isso significa que, à medida que a concentração de HMF aumenta nas amostras, também ocorre um aumento correspondente nos escores extraídos pelo modelo PARAFAC para a primeira componente. Esse resultado sugere que o modelo foi eficiente em identificar um sinal espectral relacionado ao HMF, indicando que parte significativa da variabilidade nos escores pode ser explicada pela concentração de HMF. Esta abordagem permitirá explorar as vantagens da segunda ordem inerentes à modelagem PARAFAC, como a capacidade de realizar calibração multivariada mesmo na presença de interferências não modeladas explicitamente, aumentando a robustez e a seletividade do método em matrizes complexas.

6.5 CONCLUSÃO

Uma abordagem exploratória foi desenvolvida com base na análise de matrizes de excitação e emissão por fluorescência, combinada à modelagem por PARAFAC, com o objetivo de identificar e avaliar a presença de 5-hidroximetilfurfural em amostras de hidromel. Os resultados preliminares demonstraram o potencial da técnica em discriminar componentes fluorescentes associados ao HMF, mesmo em uma matriz complexa como o hidromel. A significativa correlação observada entre os escores extraídos pelo modelo PARAFAC e as concentrações experimentais de HMF reforça a interpretação espectral atribuída ao componente e evidencia a viabilidade do uso da modelagem quimiométrica como ferramenta para estimativas indiretas de compostos específicos. Estes resultados preliminares sugerem que a integração entre EEM e PARAFAC pode ser uma alternativa promissora, não destrutiva e eficiente para o monitoramento de marcadores químicos em bebidas fermentadas.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Conclui-se que a espectroscopia de fluorescência se mostrou uma ferramenta analítica eficiente para a detecção e quantificação de contaminantes de elevada toxicidade, mesmo em concentrações traço, em diferentes tipos de matrizes alimentares. A combinação do modo de varredura sincronizada com modificações supramoleculares e técnicas de análise multivariada revelou-se fundamental para alcançar níveis adequados de seletividade e sensibilidade nas análises realizadas. Além disto, a simplicidade instrumental e o baixo custo dos métodos de preparo de amostras propostos destacam a viabilidade da fluorescência direta como alternativa promissora ou abordagem complementar aos procedimentos analíticos convencionalmente empregados na literatura científica.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SHAFY, H., & MANSOUR, M. **A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation.** *Egyptian Journal of Petroleum* 25.1 (2016): 107-123.
- AIRADO-RODRÍGUEZ, D., *et al.* **Front-face fluorescence spectroscopy: A new tool for control in the wine industry.** *Journal of Food Composition and Analysis* 24.2 (2011): 257-264.
- AMADASI, A., *et al.* **Explaining cyclodextrin–mycotoxin interactions using a ‘natural’ force field.** *Bioorganic & medicinal chemistry* 15.13 (2007): 4585-4594.
- ANDERSEN, C. M., & BRO, R. **Practical aspects of PARAFAC modeling of fluorescence excitation-emission data.** *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society* 17.4 (2003): 200-215.
- AOAC. **Guidelines for Standard Method Performance Requirements: Appendix F.** (2016).
- AOAC. **Regulation 2016/582 - Amendment of Regulation (EC) No 333/2007 as regards the analysis of inorganic arsenic, lead and polycyclic aromatic hydrocarbons and certain performance criteria for analysis.** (2016).
- APPELL, M., & JACKSON, M. A. **Sorption of ochratoxin A from aqueous solutions using β -cyclodextrin-polyurethane polymer.** *Toxins* 4.2 (2012): 98-109.
- BAIRD, W., *et al.* **Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts and mechanism of action.** *Environmental and molecular mutagenesis* 45.2-3 (2005): 106-114.
- BANAHENE, J. *et al.* **Ochratoxin A in food commodities: A review of occurrence, toxicity, and management strategies.** *Heliyon* 10.20 (2024).
- BARGAŃSKA, Ż., *et al.* **Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination.** *Critical reviews in environmental science and technology* 46.3 (2016): 235-248.
- BELEŠOVÁ, K. *et al.* **Optimizing the Extraction and Clean-up Step for Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Malt Using HPLC-FLD.** *Food Analytical Methods* 16.1 (2023): 168-176.
- BEN MIRI, Y., *et al.* **Comprehensive insights into ochratoxin a: occurrence, analysis, and control strategies.** *Foods* 13.8 (2024): 1184.
- BIRLOUEZ-ARAGON, I. *et al.* **A rapid fluorimetric method to estimate the heat treatment of liquid milk.** *International Dairy Journal* 8.9 (1998): 771-777.

- Boshra, Marina H., *et al.* **Evaluation of ELISA and immunoaffinity fluorometric analytical tools of four mycotoxins in various food categories.** *AMB Express* 13.1 (2023): 123.
- BRO, R., & KIERS, H. A. **A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models.** *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society* 17.5 (2003): 274-286.
- BUKOWKSA, B., *et al.* **Benzo[a]pyrene - Environmental occurrence, human exposure, and mechanisms of toxicity.** *International journal of molecular sciences* 23.11 (2022): 6348.
- CAO, T., *et al.* **Chemical composition and source identification of fluorescent components in atmospheric water-soluble brown carbon by excitation–emission matrix spectroscopy with parallel factor analysis–potential limitations and applications.** *Atmospheric Chemistry and Physics* 23.4 (2023): 2613-2625.
- CARDOSO, S. **Tendências para o mercado consumidor de vinho no Brasil.** (2023).
- CARUSO, M., & ALABURDA, J. **Optimization of the benzo (A) pyrene determination procedure in cachaça.** *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20 (2009): 502-508.
- CELLA, D., *et al.* **A vitivinicultura brasileira e suas dificuldades com a concorrência dos vinhos estrangeiros.** *Revista Brasileira Multidisciplinar* 24.1 (2021): 225-241.
- CHATONNET, P., *et al.* **Contamination of wines and spirits by phthalates: Types of contaminants present, contamination sources and means of prevention.** *Food Additives & Contaminants: Part A* 31.9 (2014): 1605-1615.
- CLÉMENT, F., *et al.* **Long-term exposure to bisphenol A or benzo(a)pyrene alters the fate of human mammary epithelial stem cells in response to BMP2 and BMP4, by pre-activating BMP signaling.** *Cell Death & Differentiation* 24.1 (2017): 155-166.
- CABRAS, P., & ANGIONI, A. **Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products.** *Journal of agricultural and food chemistry* 48.4 (2000): 967-973.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Code of practice for the reduction of contamination of food with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from smoking and direct drying processes.** *CAC/RCP* 68 (2009).
- CODEX ALIMENTARIUS. **Codex standard for honey.** (2001): 159-164.
- COLOPI, A., *et al.* **Dietary exposure to pesticide and veterinary drug residues and their effects on human fertility and embryo development: A global overview.** *International Journal of Molecular Sciences* 25.16 (2024): 9116.

- CRINI, G. **A history of cyclodextrins.** *Chemical reviews* 114.21 (2014): 10940-10975.
- CUI, S., *et al.* **Identification and Quantification of the Main Psychoactive Ingredients of Cannabis in Urine Using Excitation–Emission Matrix Fluorescence Coupled with Parallel Factor Analysis.** *ACS omega* 8.39 (2023): 36302-36310.
- ČUŠ, F., *et al.* **Pesticide residues and microbiological quality of bottled wines.** *Food control* 21.2 (2010): 150-154.
- DONNARUMMA, F., *et al.* **Simultaneous quantitation of alpha-ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural in plasma by HPLC with UV and fluorescence detection.** *Analytical Sciences* 29.12 (2013): 1177-1182.
- DRAMICANIN, T., *et al.* **Detection of Adulterated Honey by Fluorescence Excitation-Emission Matrices.** *Journal of Spectroscopy* 2018.1 (2018): 8395212.
- DUEDAL-OLESEN, L., *et al.* **Validation of QuEChERS for screening of 4 marker polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and malt.** *Food Control* 108 (2020): 106434.
- EL KHOURY, A., & ATOUI, A. **Ochratoxin A: General overview and actual molecular status.** *Toxins* 2.4 (2010): 461-493.
- EUROPEAN COMMISSION. **Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on Maximum Levels for Certain Contaminants in Food and Repealing Regulation (EC) No 1881/2006.** *Official Journal of the European Union* 119 (2023): 103-157.
- EUROPEAN COMMISSION. **Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) portal.** *Notifications list: Alcoholic beverages* (2020).
- EUROPEAN COMMISSION. **Regulation 2016/582 - Amendment of Regulation (EC) No 333/2007 as regards the analysis of inorganic arsenic, lead and polycyclic aromatic hydrocarbons and certain performance criteria for analysis.** *Official Journal of the European Union* (2016).
- EUROPEAN COMMISSION. **Commission Regulation (EC) n° 835/2011 amending Regulation (EC) n° 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs.** *Official Journal of the European Union* (2011).
- EUROPEAN COMMISSION. **Regulation (EC) No. 882/2004 on official controls to ensure the verification of compliance with food safety legislation.** *Official Journal of the European Union* (2004).
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Review of the existing maximum residue levels for copper compounds according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005.** *EFSA Journal* 16.3 (2018): e05212.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Polycyclic aromatic**

hydrocarbons in food-scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA journal* 6.8 (2008): 724

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to ochratoxin A in food.** *EFSA journal* 4.6 (2006): 365.

EUROMALT. **Malt production.** 2023. Disponível em: <https://www.euromalt.be/malt-1>. Acesso em: 22 set. 2023.

FANG, H., *et al.* **Excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy coupled with multi-way chemometric techniques for characterization and classification of Chinese lager beers.** *Food chemistry* 342 (2021): 128235.

FAO, WHO. **Contaminants in food.** 2023. Codex Alimentarius – Contaminants. FAO & WHO. Disponível em: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/thematic-areas/contaminants/en/>. Acesso em: 15 jul. 2025.

FERNÁNDEZ-ROMERO, J., & AGUILLAR-CABALLOS, M. **Fluorescence: Food Applications** *Encyclopedia of Analytical Science* (2019).

GENG, T., *et al.* **A comprehensive review on the excitation-emission matrix fluorescence spectroscopic characterization of petroleum-containing substances: principles, methods, and applications.** *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 54.8 (2024): 2827-2849.

GIL-SERNA, J., *et al.* **Wine contamination with ochratoxins: A review.** *Beverages* 4.1 (2018): 6.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R. **Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid–liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry.** *Journal of chromatography A* 1216.32 (2009): 6033-6042.

GORMAN, M., *et al.* **An analysis of consumer perception, emotional responses, and beliefs about mead.** *International Journal of Food Science and Technology* 59.10 (2024): 7426-7435.

HABSCHIED, K., *et al.* **Effect of Temperature Range and Kilning Time on the Occurrence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Malt.** *Foods* 12.3 (2023): 454.

HASHEMI, J., & ALIZADEH, N. **Investigation of solvent effect and cyclodextrins on fluorescence properties of ochratoxin A.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 73.1 (2009): 121-126.

HE, J., *et al.* **Monitoring of 49 pesticides and 17 mycotoxins in wine by QuEChERS and UHPLC–MS/MS analysis.** *Journal of Food Science* (2019): 2688-2697.

HE, N., & BAYEN, S. **An overview of chemical contaminants and other undesirable chemicals in alcoholic beverages and strategies for**

- analysis.** *Comprehensive reviews in food science and food safety* 19.6 (2020): 3916-3950.
- HEUSSNER, A. H., & BINGLE, L. **Comparative ochratoxin toxicity: a review of the available data.** *Toxins* 7.10 (2015): 4253-4282.
- HUANG, Z., *et al.* **A review of fluorescence imaging system supported by excitation-emission matrix for fruit and vegetable quality estimation.** *Food Control* 169 (2025): 111040.
- HUERTAS-PÉREZ, J., *et al.* **Solid phase extraction as sample treatment for the determination of Ochratoxin A in foods: A review.** *Critical reviews in food science and nutrition* 57.16 (2017): 3405-3420.
- IGLESIAS, A., *et al.* **Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production.** *Molecules* 19.8 (2014): 12577-12590.
- INÊS, A., & COSME, F. **Biosensors for Detecting Food Contaminants—An Overview.** *Processes* 13.2 (2025).
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Alcohol consumption and ethyl carbamate.** *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 96 (2010): 3.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Agents Classified by the IARC Monographs: IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans.** *IARC Monographs* (2021).
- JACKSON, R. **Wine science: principles and applications.** Academic press. 2020.
- JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA). **Safety evaluation of certain contaminants in food.** WHO Press. 2006
- KACMAZ, S., *et al.* **Rapid and Sensitive Method for the Determination of Four EU Marker Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Cereal based Foods Using Isotope Dilution GC/MS.** *Food Additives & Contaminants: Part A* 33.4 (2016): 631-638.
- KAHOUN, D., *et al.* **Effect of heat treatment and storage conditions on mead composition.** *Food chemistry* 219 (2017): 357-363.
- KAHOUN, D., *et al.* **Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection.** *Journal of Chromatography A* 1202.1 (2008): 19-33.
- KAROUI, R. **Application of Fluorescence Spectroscopy in Food Quality and Control.** 2025.
- KAROUI, R. **Spectroscopic Technique: Fluorescence and Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopies.** *Modern techniques for food authentication.* Academic Press, 2018. 219-252.
- KAROUI, R., *et al.* **The use of front face fluorescence spectroscopy to classify**

- the botanical origin of honey samples produced in Switzerland.** *Food Chemistry* 101.1 (2007): 314-323.
- KEITH, L. **The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants.** *Polycyclic Aromatic Compounds* 35.2-4 (2015): 147-160.
- KHAN, R., *et al.* **A comprehensive review of mycotoxins: Toxicology, detection, and effective mitigation approaches.** *Heliyon* 10.8 (2024).
- KING, L., *et al.* **A state-of-the-science review of alcoholic beverages and polycyclic aromatic hydrocarbons.** *Environmental Health Perspectives* 132.1 (2024): 016001.
- KIZIS, D., *et al.* **Recent advances in mycotoxin analysis and detection of mycotoxigenic fungi in grapes and derived products.** *Sustainability* 13.5 (2021): 2537.
- KOCHMAN, J., *et al.* **Mycotoxins in red wine: Occurrence and risk assessment.** *Food Control* 129 (2021): 108229.
- KHOLOVÁ, A., *et al.* **Determination of ochratoxin A and ochratoxin B in archived Tokaj wines (vintage 1959–2017) using on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography.** *Toxins* 12.12 (2020): 739.
- KŐSZEGI, T., & MIKLÓS, P. **Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level.** *Toxins* 8.4 (2016): 111.
- LACOWICZ, J. **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** Springer. 2006.
- LAGO, L., & WELKE, J. **Carbonyl compounds in wine: Factors related to presence and toxic effects.** *Ciência Rural* 49.8 (2019): e20190349.
- LENHARDT, L., *et al.* **Fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and PLS DA for characterization and classification of honey.** *Food Chemistry* 175 (2015): 284-291.
- LI, X., *et al.* **Recent progress in determination of ochratoxin a in foods by chromatographic and mass spectrometry methods.** *Critical reviews in food science and nutrition* 62.20 (2022): 5444-5461.
- LING, Z., *et al.* **Detection of food contaminants: A review of established rapid analytical techniques and their applications and limitations.** *Food Safety and Health* 2.1 (2024): 72-95.
- LIU, T., *et al.* **Polycyclic aromatic hydrocarbons' impact on crops and occurrence, sources, and detection methods in food: A review.** *Foods* 13.13 (2024): 1977.
- LIVIZ, C., *et al.* **Pesticide residues in grapes and wine: An overview on detection, health risks, and regulatory challenges.** *Food Research International* (2025): 115771.

- LÓPEZ-PUERTOLLANO, D., *et al.* **Immunoanalytical methods for ochratoxin A monitoring in wine and must based on innovative immunoreagents.** *Food Chemistry* 345 (2021): 128828.
- LOUPPIS, A., & CONSTANTINO, M. **Application of a validated method for the identification and quantification of mycotoxins in wines using UPLC-MS/MS.** *Separations* 9.4 (2022): 102.
- MACLEOD, L., & EVANS, E. **Malting.** Reference Module in Food Science, 2016.
- MALLET, J. **Malte: Um guia prático do campo à cervejaria.** Brewing Elements Series, (2021).
- MALIR, F. **Ochratoxin A: 50 years of research.** *Toxins* 8.7 (2016): 191.
- MARDIA, K., *et al.* **Multivariate analysis.** John Wiley & Sons, (2024).
- MARTINS, F., *et al.* **The role of 5-hydroxymethylfurfural in food and recent advances in analytical methods.** *Food chemistry* 395 (2022): 133539.
- MASTANJEVIĆ, K., *et al.* **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Malt.** *Beverages* 7.3 (2021): 58.
- MEDANA, C **Analysis of Chemical Contaminants in Food.** *Toxics* 8.2 (2020): 27.
- MEIRA, D., *et al.* **Label-free localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensor, based on Au-Ag NPs embedded in TiO₂ matrix, for detection of Ochratoxin-A (OTA) in wine.** *Talanta* 284 (2025): 127238.
- MERCER, C. **Which countries drink the most wine?** Decanter. 2025. Disponível em: <https://www.decanter.com/wine-news/which-countries-drink-the-most-wine-ask-decanter-456922/>. Acesso em 16 jun. 2025.
- MORARIU, I., *et al.* **A comprehensive narrative review on the hazards of bee honey adulteration and contamination.** *Journal of Food Quality* 2024.1 (2024): 3512676.
- MOREIRA, C., *et al.* **Arsenic speciation in white wine by LC-ICP-MS.** *Food chemistry* 126.3 (2011): 1406-1411.
- NAGAI, T., *et al.* **Chemical properties of commercially available honey species and the functional properties of caramelization and Maillard reaction products derived from these honey species.** *Journal of food science and technology* 55.2 (2018): 586-597.
- NEKRASOV, N., *et al.* **Real-time detection of ochratoxin A in wine through insight of aptamer conformation in conjunction with graphene field-effect transistor.** *Biosensors and Bioelectronics* 200 (2022): 113890.
- NICOLAESCU, O., *et al.* **Advancements in Cyclodextrin Complexes with Bioactive Secondary Metabolites and Their Pharmaceutical Applications.** *Pharmaceutics* 17.4 (2025): 506.

- ORTIZ-VILLEDA, B., *et al.* **Ochratoxins in wines: A review of their occurrence in the last decade, toxicity, and exposure risk in humans.** *Toxins* 13.7 (2021): 478.
- OSTRY, V., *et al.* **Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification.** *Mycotoxin research* 33.1 (2017): 65-73.
- PACHECO, M., & BRUZZONE, L. **Synchronous fluorescence spectrometry: Conformational investigation or inner filter effect?** *Journal of Luminescence* 137 (2013): 138-142.
- PALMER, G. **Barley and malt. Handbook of Brewing.** CRC Press, 2017.
- PANG, X., *et al.* **A comprehensive review of spirit drink safety standards and regulations from an international perspective.** *Journal of food protection* 80.3 (2017): 431-442.
- PATERSON, R., *et al.* **Predominant mycotoxins, mycotoxigenic fungi and climate change related to wine.** *Food research international* 103 (2018): 478-491.
- PFLAUM, T., *et al.* **Carcinogenic compounds in alcoholic beverages: an update.** *Archives of toxicology* 90.10 (2016): 2349-2367.
- PUCKETTE, M. **Wine folly: The essential guide to wine.** Penguin, 2015.
- RABOBANK. **Malting Industry Outlook 2030: Structural Implications of Key Beer Trends on the Global Malt Industry.** Rabo Research. 2021. Disponível em: <https://research.rabobank.com/far/en/sectors/grains-oilseeds/malting-industry-outlook-2030.html>. Acesso em: 29 set. 2023.
- RAMOS, L., *et al.* **HPLC-MS/MS and ICP-MS for evaluation of mycotoxins and heavy metals in edible insects and their defatted cakes resulting from supercritical fluid extraction.** *Foods* 13.20 (2024): 3233.
- REMIRO, R., *et al.* **Validation of a liquid chromatography method for the simultaneous quantification of ochratoxin A and its analogues in red wines.** *Journal of Chromatography A* 1217.52 (2010): 8249-8256.
- RODRIGUEZ, R., *et al.* **Sensing Food Contaminants: Advances in Analytical Methods and Techniques.** *Analytical Chemistry* 93.1 (2020): 23-40.
- ROJAS, L., *et al.* **A facile solvent extraction method facilitating surface-enhanced Raman spectroscopic detection of ochratoxin A in wine and wheat.** *Talanta* 224 (2021): 121792.
- ROVINA, K. **Advanced Food Analysis Tools.** Academic Press. 2020.
- SCISCENKO, I., *et al.* **EEM-PARAFAC as a convenient methodology to study fluorescent emerging pollutants degradation:(fluoro) quinolones oxidation in different water matrices.** *Science of the Total Environment* 852 (2022): 158338.

- SHAPLA, U., *et al.* **5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health.** *Chemistry central journal* 12.1 (2018): 35.
- SHI, Y., *et al.* **An overview of cyclodextrin on the detection and removal of mycotoxin: Recent advances and future prospects.** *Food Control* 165 (2024): 110660.
- SIRORSKA, E., *et al.* **Fluorescence spectroscopy and imaging instruments for food quality evaluation.** *Evaluation technologies for food quality.* Woodhead Publishing, 2019. 491-533.
- SIRORSKA, E., & KHMELINSKII, I. **Glowing colours of foods: application of fluorescence and chemometrics in food studies.** *Spectroscopy Europe* 28.6 (2016): 10-13.
- SIRORSKA, E. **Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics in Analysis of Beverages.** *Quality Control in the Beverage Industry.* Academic Press, 2019. 161-203.
- SOARES, W., *et al.* **Enhanced Detection of Benzo [a] pyrene in Olive Oil through Low Temperature Liquid-Liquid Extraction Coupled with Constant Energy Synchronous Fluorescence Spectroscopy.** *Journal of the Brazilian Chemical Society* 35.6 (2024): e-20230200.
- SOUSA, L., *et al.* **Determination of PAHs in cachaça by nylon membrane extraction and PARAFAC-assisted excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy.** *Food Control* (2025): 111585.
- STAROWICZ, M., & GRANVOGL, M. **Trends in food science & technology an overview of mead production and the physicochemical, toxicological, and sensory characteristics of mead with a special emphasis on flavor.** *Trends in food science & Technology* 106 (2020): 402-416.
- SUN, Q., *et al.* **A review on recent advances in mass spectrometry analysis of harmful contaminants in food.** *Frontiers in Nutrition* 10 (2023): 1244459.
- SUN, Y., & WU, S. **Trends of Research on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food: A 20-year perspective from 1997 to 2017.** *Trends in food science & technology* 83 (2019): 86-98.
- SUN, Y., *et al.* **Highly sensitive method for aldehydes detection: Application to furfurals analysis in raisin and bovine milk powder.** *Analytica Chimica Acta* 987 (2017): 47-55.
- ŠVECOVÁ, B., *et al.* **Analysis of Czech meads: Sugar content, organic acids content and selected phenolic compounds content.** *Journal of Food Composition and Analysis* 38 (2015): 80-88.
- TAO, Y. *et al.* **Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism.** *Food and Chemical Toxicology* 112 (2018): 320-331.
- TSIASIOTI, A., & PARASKEVAS, D. **High performance liquid chromatography coupled with post–Column derivatization methods in food analysis:**

- Chemistries and applications in the last two decades.** *Food Chemistry* 443 (2024): 138577.
- UBEDA, C., *et al.* **Chemical hazards in grapes and wine, climate change and challenges to face.** *Food Chemistry* 314 (2020): 126222.
- VALOPPI, F., *et al.* **Insight on Current Advances in Food Science and Technology for Feeding the World Population.** *Frontiers in sustainable food systems* 5 (2021): 626227.
- VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications.** Wiley, 2012.
- VENKATRAMAN, G., *et al.* **Environmental impact and human health effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and remedial strategies: A detailed review.** *Chemosphere* 351 (2024): 141227.
- VERRONE, R., *et al.* **Effect of β -cyclodextrin on spectroscopic properties of ochratoxin A in aqueous solution.** *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 57.1 (2007): 475-479.
- VISCONTI, A., *et al.* **Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis with fluorometric detection: collaborative study.** *Journal of AOAC International* 84.6 (2001): 1818-1827.
- WATERHOUSE, A., *et al.* **Understanding wine chemistry.** John Wiley & Sons, 2024.
- WEBSTER, C., *et al.* **Mead production and quality: A review of chemical and sensory mead quality evaluation with a focus on analytical methods.** *Food Research International* (2025): 115655.
- WEI, J. *et al.* **Synchronous fluorescence spectra-based machine learning algorithm with quick and easy accessibility for simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils.** *Food Control* 158 (2024): 110205.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Air Quality Guidelines for Europe.** WHO Regional Office for Europe, 2000.
- XIE, C., & ZHOU, W. **A review of recent advances for the detection of biological, chemical, and physical hazards in foodstuffs using spectral imaging techniques.** *Foods* 12.11 (2023): 2266.
- YAMAGUCHI, Y., *et al.* **How the π conjugation length affects the fluorescence emission efficiency.** *Journal of the American Chemical Society* 130.42 (2008): 13867-13869.
- YAMAMOTO, R., *et al.* **High-performance liquid chromatography with fluorescence detection of ochratoxin A in cereal, coffee, and wine: Effective pretreatment with bovine serum albumin-immobilized adsorbent.** *Separation Science Plus* 1.3 (2018): 196-201.
- YULIA, E., & MARTIN, P. **Development of a rapid method for determination of**

Ochratoxin A in grape mash and wine. *Mycotoxin Research* 40.4 (2024): 605-613.

ZANGHERI, M., *et al.* **Smartphone biosensor for point-of-need chemiluminescence detection of ochratoxin A in wine and coffee.** *Analytica Chimica Acta* 1163 (2021): 338515.

ZHANG, S., *et al.* **Electrochemical aptasensor based on ZnO-Au nanocomposites for the determination of ochratoxin A in wine and beer.** *Processes* 11.3 (2023): 864.

ZHAO, E., *et al.* **Fluorescent materials with aggregation-induced emission characteristics for array-based sensing assay.** *Frontiers in chemistry* 8 (2020): 288.

ZIANI, I., *et al.* **Integrating AI and advanced spectroscopic techniques for precision food safety and quality control.** *Trends in Food Science & Technology* (2024): 104850.

ZJALIC, S., *et al.* **Biocontrol of occurrence Ochratoxin A in wine: A review.** *Toxins* 16.6 (2024): 277.

APÊNDICE A – MODELO ESTATÍSTICO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

Tabela A.1. Resultados da análise estatística do planejamento fatorial 2²

Experimento	Eficiência (%)	Efeito	Intervalo de confiança
I	36,284	Média	49,209
II	52,459	Fator 1	7,909
III	50,792	Fator 2	9,576
IV	53,769	Interação	-6,598
V	51,657	Teste independente de falta de ajuste	
VI	50,143	$ y_f - y_c $	
VII	49,358	Intervalo de confiança	
		Resultado: A curvatura não é significativa no modelo, pois $ y_f - y_c < IC$	

ANOVA

	SQ	GL	MQ
Regressão	197,793	3	65,931
Resíduo	10,004	3	3,335
Falta de ajuste	7,272	1	7,272
Erro puro	2,732	2	1,366
Total	250,357	6	41,726
% Variância explicada		79,005	

Significância da regressão

F calculado	19,771	Resultado: A regressão é significativa, pois F calculado > F tabelado
F tabelado	9,277	

Falta de ajuste

F calculado	5,324	Resultado: Não há falta de ajuste e o modelo linear é adequado, pois F calculado < F tabelado
F tabelado	18,513	

y_f : Valor médio observado nos pontos centrais; y_c : Valor previsto pelo modelo no ponto central; IC: intervalo de confiança.