

ANE PATRÍCIA CACIQUE

**DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM UVA E
PRODUTOS PROCESSADOS POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientadora: Gevany Paulino de Pinho

Montes Claros

2012

Cacique, Ane Patrícia.

C118d
2013 Determinação de ocratoxina A em uva e produtos processados por cromatografia líquida de alta eficiência / Ane Patrícia Cacique. Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2013.

56 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

Orientadora: Prof.^a Gevany Paulino de Pinho.

Banca examinadora: Paulo Henrique Fidêncio, Anna Christina de Almeida, Charles Martins Aguilhar, Gevany Paulino de Pinho.

Inclui bibliografia: f. 50-56.

1. Ocratoxina A – Amostra uva. 2. Química analítica – Agroquímica. 3. CLAE-UV - OTA derivatizada. I. Pinho, Gevany Paulino de. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 543

ANE PATRÍCIA CACIQUE

DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM UVA E PRODUTOS PROCESSADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Prof. Paulo Henrique Fidêncio
(UFVJM)

Prof.^a Anna Christina de Almeida
(ICA/UFMG)

Prof. Charles Martins Aguiar
(ICA/UFMG)

Prof. Flaviano Oliveira Silvério
Co-orientador (ICA/UFMG)

Prof.^a Gevany Paulino de Pinho
Orientadora (ICA/UFMG)

Aprovada em 30 de novembro de 2012

Montes Claros

2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de concluir mais esta etapa.

À minha família meu eterno respeito e gratidão pelo apoio e amor incondicional durante toda a jornada decorrida. À mamãe (Luíza), eterno exemplo de força e dedicação; ao papai (Alencar), que agora como um anjo roga por mim, guiando e iluminando meus caminhos. Aos meus irmãos Henrique e Maurício, que mesmo à distância se fazem presentes.

À Universidade Federal de Minas Gerais pelo custeio e pela infraestrutura disponibilizada para desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e também pela liberação para cursar o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

À professora Gevany Paulino de Pinho pela orientação, apoio e incentivo a prosseguir.

Ao professor Flaviano Oliveira Silvério pelos ensinamentos, compreensão e confiança depositada ao longo deste projeto.

Às companheiras de laboratório e de mestrado, Gabriela e Érica, meu agradecimento pela amizade, companheirismo e suporte dispensados em todos os momentos. Aos demais colegas de laboratório meu obrigado pela convivência agradável e disponibilidade na execução das atividades.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

- | | |
|---|----|
| 1 - Limites máximos tolerados (LMT) para ocratoxina A em diversos produtos alimentares..... | 17 |
| 2 - Compilação dos métodos usados para determinação de OTA em uva e produtos processados..... | 20 |

CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM UVA E PRODUTOS PROCESSADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

- | | |
|---|----|
| 1 - Otimização univariada das técnicas de extração (ESL-PBT/ELL-PBT) de OTA em amostras de uva rosada, uva passa escura sem semente, suco de uva integral e vinho tinto seco..... | 33 |
| 2 - Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ) e linearidade do método para OTA quantificada indiretamente na forma de ocratoxina A derivatizada nas quatro matrizes..... | 47 |
| 3 - Porcentagem de recuperação da OTA, quantificada na forma de ocratoxina A derivatizada, após extração das amostras de suco, uva passa, rosada e vinho tinto fortificadas em três concentrações diferentes..... | 48 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1 - Representação das estruturas químicas das ocratoxinas
A: Ocratoxina A. **B:** Ocratoxina B. **C:** Ocratoxina C..... 14
- Figura 2 - Representação esquemática da reação de derivatização
para obtenção da ocratoxina A derivatizada..... 23

CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM UVA E PRODUTOS PROCESSADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

- Figura 1 - Espectro de absorção de ocratoxina A na região do UV-
VIS..... 36
- Figura 2 - Representação das estruturas químicas da ocratoxina A
em diferentes pH..... 37
- Gráfico 1 - Cromatogramas da solução padrão de ocratoxina A
(1 mg L⁻¹) em diferentes condições de fase móvel
(acetonitrila:tampão fosfato, 70:30, v/v). a) eluição em
pH 2,0 e 3,0; b) eluição em força iônica de 50 e 70
mmol L⁻¹..... 38
- Gráfico 2 - Comparação da influência da força iônica, pH e modo
de homogeneização sobre a porcentagem de
recuperação de ocratoxina A em quatro matrizes: uva
passa, uva rosada, suco e vinho..... 40

Gráfico 3 - Representação da percentagem de variação da resposta cromatográfica da ocratoxina A derivatizada preparada em extratos (suco, vinho, uva passa e rosada) em relação às preparadas em fase móvel nas concentrações de 350 a 1200 $\mu\text{g L}^{-1}$	44
Gráfico 4 - Cromatograma comparativo entre a solução padrão de ocratoxina A derivatizada (1 mg L^{-1}) preparada na fase móvel e os extratos brancos obtidos a partir da ESL-PBT e ELL-PBT das quatro matrizes analisadas.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C-18	Octadecil
CE	Comissão Europeia
CIA	Coluna de imunoafinidade
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de fotodiodeo
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de ultravioleta
DPR	Desvio padrão relativo
ELL-PBT	Extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura
EM	Espectrômetro de massas
ESL-PBT	Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de detecção
LMT	Limite máximo tolerado
LQ	Limite de quantificação
OTA	Ocratoxina A
UV-VIS	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1	Cultura da uva e micotoxinas.....	12
2.2	Ocratoxina A.....	13
2.2.1	Limites máximos permitidos de ocratoxina A em alimentos.....	16
2.2.2	Ocorrência de ocratoxina A em uvas e produtos processados...	18
2.2.3	Métodos de detecção de ocratoxina A em uva e produtos processados.....	19
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
4	OBJETIVOS.....	26
4.1	Objetivo geral.....	26
4.2	Objetivos específicos.....	26
	CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM UVA E PRODUTOS PROCESSADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	27
	Resumo.....	27
	Abstract.....	28
1	INTRODUÇÃO.....	29
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1	Reagentes.....	31
2.2	Análises.....	31
2.3	Amostras.....	32

2.4	Otimização da ELL-PBT e ESL-PBT.....	32
2.5	Limpeza dos extratos.....	33
2.6	Derivatização da ocratoxina A.....	34
2.7	Equipamentos.....	34
2.8	Validação do método.....	35
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1	Análise espectrofotométrica.....	36
3.1.1	Análise por CLAE-UV.....	37
3.2	Otimização das técnicas de extração (ESL-PBT e ELL-PBT)....	39
3.2.1	Força iônica.....	39
3.2.2	pH.....	40
3.2.3	Modo de homogeneização.....	41
3.2.4	Limpeza dos extratos.....	41
3.2.5	Derivatização da ocratoxina A.....	42
3.3	Método otimizado.....	43
3.4	Validação do método.....	43
3.4.1	Efeito de matriz.....	43
3.4.2	Seletividade.....	45
3.4.3	Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade.....	46
3.4.4	Exatidão e precisão do método.....	48
4	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

Os fungos em determinadas condições ambientais podem produzir metabólitos secundários (SHWAB; KELLER, 2008). Esses compostos não são essenciais para o crescimento, desenvolvimento ou reprodução dessas espécies (KHALDI *et al.*, 2010). Entretanto, podem ser utilizados como uma forma de defesa, aumentando a resistência desses microrganismos (ROHLFS; CHURCHILL, 2011). Dessa forma, essas substâncias podem apresentar propriedades antibióticas (RANČIĆ *et al.*, 2006), fitotóxicas (PEDRAS *et al.*, 2009) e, quando tóxicas para animais e humanos, são zootóxicas e denominadas de micotoxinas (MAGAN *et al.*, 2011).

As micotoxinas geralmente apresentam baixa massa molecular e são contaminantes naturais de produtos agrícolas (ZAIN, 2011). Além disso, geram prejuízos econômicos, pois podem deteriorar a qualidade dos produtos e, por isso, se apresentam como uma barreira na comercialização (LEUNG *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2010).

O grupo das ocratoxinas é composto, principalmente, pela ocratoxina A, B e C. A ocratoxina A (OTA) apresenta maior propriedade tóxica e ocorrência em diversas matrizes alimentares (REMIRO *et al.*, 2010). A contaminação de uvas e produtos processados por diferentes níveis dessa micotoxina desperta grande interesse, pois a cultura da uva apresenta elevada importância econômica, podendo ser comercializada em sua forma *in natura* ou processada (uvas passas, suco e vinho). Uvas passas e suco de uva são exemplos de produtos com alta taxa de consumo por adultos e crianças que, por consequência, se apresentam como rota de entrada desta micotoxina na cadeia alimentar humana.

As análises de OTA, em diferentes matrizes, envolvem etapas de extração, limpeza dos extratos e quantificação. Nesse sentido, os métodos tradicionais de extração demandam alto tempo de execução e gasto de solventes. Na limpeza dos extratos têm sido utilizadas as colunas de

imunoafinidade (GHALI *et al.*, 2009), que apresentam custo elevado. A quantificação é realizada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores de fluorescência (ARESTA *et al.*, 2006) ou espectrômetro de massas (LEITNER *et al.*, 2002). Embora o uso desses detectores garanta boa sensibilidade, é pouco acessível devido ao elevado custo de obtenção e manutenção do equipamento.

Dessa forma, no presente trabalho, foi desenvolvido um método alternativo de extração de OTA em uva e produtos processados (suco de uva, vinho e uvas passas). Esse método consistiu na otimização e validação da técnica de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) para análises de amostras sólidas e extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) de amostras líquidas. A etapa de quantificação de OTA foi otimizada utilizando CLAE acoplada ao detector de ultravioleta.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cultura da uva e micotoxinas

O Brasil ocupa o 12º lugar no ranking mundial de produção de uvas (FAO, 2010). As uvas verdes e rosadas apresentam grande importância nutricional e são comercializadas como produtos frescos ou processados. A uva é composta por aproximadamente 88% de água, 10% de carboidratos e outros constituintes minoritários, dependendo do tipo de uva (USDA, 2010). A casca da uva apresenta-se revestida por uma cera denominada pruína, composta principalmente por ácido oleoico, que a protege contra ataque de microrganismos (SHIN *et al.*, 2009).

Entretanto, a cultura da uva é susceptível a várias doenças que podem se manifestar nas raízes, troncos, ramos, folhas, brotos e cachos (NAVES *et al.*, 2006). Entre as doenças fúngicas, destaca-se a podridão ácida que ocorre em condições de clima com altas temperaturas e umidade (CALDAS *et al.*, 2008). Essa doença é causada pelo crescimento de fungos e bactérias de maneira simultânea nos frutos (LOUREIRO; MALFEITO-FERREIRA, 2003).

Um dos gêneros fúngicos responsáveis por esta doença é o *Penicillium* spp, estirpe fúngica que é potencialmente produtora de micotoxinas em uvas (CALDAS *et al.*, 2008). As micotoxinas geram prejuízos econômicos, pois se apresentam como barreira na comercialização de produtos agrícolas. Além disso, pode oferecer risco à saúde humana (LEUNG *et al.*, 2006).

As micotoxinas são compostos produzidos durante o metabolismo secundário de algumas espécies fúngicas e que apresentam toxicidade para humanos e animais (BENNETT; KLICH, 2003; CAST, 2003; AYDOGDU; GUCER, 2009). Em alguns casos, causam graves problemas de saúde pública (BENNETT; KLICH, 2003).

Aproximadamente 400 micotoxinas já foram isoladas (ZINEDINE *et al.*, 2009). Contudo, as toxinas de maior risco e ocorrência em alimentos são as aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, tricotocenos, fumonisinas, patulina, ácido ciclopiazônico e micotoxinas tremorgênicas (RODRÍGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002). As micotoxinas são produzidas principalmente por quatro gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Claviceps* (PETZINGER; WEIDENBACH, 2002; RODRÍGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002).

A contaminação de alimentos por micotoxinas pode ocorrer no campo, durante a colheita, no armazenamento, no transporte e no processamento (SERRA, 2005). Os níveis de micotoxinas podem variar a cada ano de acordo com as condições ambientais estabelecidas para o crescimento fúngico (DUARTE *et al.*, 2010).

As culturas que permanecem mais tempo no campo são mais susceptíveis ao ataque fúngico e, por isso, podem apresentar maiores níveis de micotoxinas (CAST, 2003; SERRA, 2005). Durante e após a colheita, procedimentos específicos de manuseio e processamento são adotados, a fim de reduzir a contaminação dos alimentos (CAST, 2003).

A limpeza do material no qual o produto é armazenado, bem como o controle da umidade, reduzem as fontes de contaminação (SERRA, 2005). Normalmente, nessa etapa é feita a aplicação de fungicidas como medida complementar de controle (CAST, 2003). No caso das uvas, alguns fungicidas como ciprodinil e fludioxonil têm sido utilizados no controle de colonização e produção de micotoxinas como a ocratoxina A (OTA) por espécies ocratoxigênicas (VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

2.2 Ocratoxina A

As ocratoxinas compreendem um grupo de micotoxinas que compartilham semelhanças quanto à estrutura química (REMIRO *et al.*, 2010). Desse modo, apresentam uma β -fenilalanina ligada a uma isocumarina por ligação amida (STEYN, 1995). Dentro desse grupo a ocratoxina A (OTA) apresenta propriedades tóxicas acentuadas e ampla distribuição nos alimentos e na natureza (BELLÍ *et al.*, 2002). A OTA possui

um átomo de cloro como grupo substituinte em sua estrutura química, contribuindo para a característica tóxica (SCUSSEL, 1998). A ocratoxina B é a menos tóxica e não ocorre de maneira natural. A ocratoxina C também não possui ocorrência natural e apesar de ter um átomo de cloro em sua estrutura é menos tóxica do que a OTA (JAY, 2005). As estruturas químicas das ocratoxinas (A, B e C) estão representadas na FIG. 1.

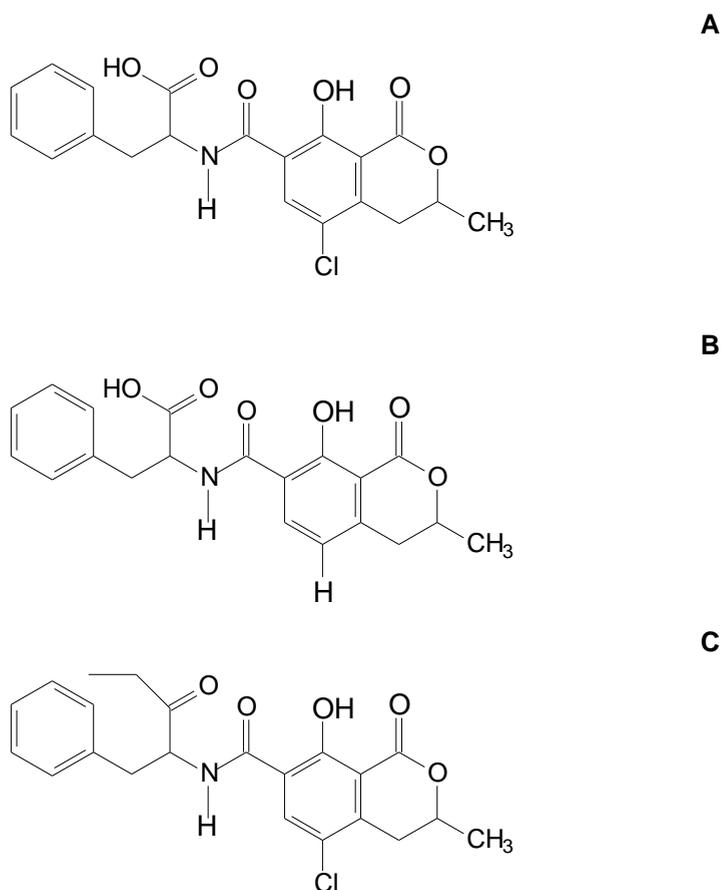


Figura 1 – Representação das estruturas químicas das ocratoxinas. **A:** Ochratoxina A. **B:** Ochratoxina B. **C:** Ochratoxina C

Fonte: ChemSpider (<http://www.chemspider.com>)

A OTA é um composto cristalino incolor que apresenta o nome IUPAC (*R*)-N-[(5-cloro-3,4-diidro-8-idroxi-3-metil-1-oxo-1(*H*)-2-benzopiran-7-il) carbonil] -L-fenilalanina e cuja estrutura química é representada na FIG. 1A. Devido a essa estrutura, a OTA apresenta solubilidade moderada em solventes orgânicos polares (VALENTA, 1998), como o metanol e a acetonitrila. Apresenta caráter de ácido fraco, com valores de pKa de 4,2 - 4,4 para o grupo carboxila da fenilalanina e 7,0 - 7,3 para o grupo hidroxila da isocumarina (GONZÁLEZ-PEÑA *et al.*, 2004).

A OTA é uma micotoxina nefrotóxica, com potencial carcinogênico e que tem sido encontrada em vários alimentos (BATILLANI; PIETRI, 2002; ZAIN, 2011). Essa micotoxina tem sido relacionada à Nefropatia Endêmica dos Balcãs (Bulgária, Iugoslávia e Romênia), devido à frequência e o nível elevado de ocorrência nos alimentos daquela região (BATILLANI; PIETRI, 2002).

Além da nefrotoxicidade evidente, a OTA apresenta propriedades carcinogênicas, imunotóxicas e teratogênicas em diversas espécies estudadas (ABRUNHOSA *et al.*, 2001; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006). A OTA é considerada um composto tóxico cumulativo de fácil absorção e lenta eliminação e, portanto, pode ser transmitida ao longo da cadeia alimentar (CLOUVEL *et al.*, 2008; DUARTE *et al.*, 2010).

2.2.1 Limites máximos permitidos de ocratoxina A em alimentos

A OTA pode ocorrer em vários gêneros alimentícios como, por exemplo, cereais, frutos secos, café, cerveja, suco de uva e vinho (ZAIN, 2011). No cenário mundial, os limites máximos para OTA em alimentos têm sido de 2 a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e para alimentos de consumo infantil, esse limite é de 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (EC 1881/2006). De um modo geral, os países europeus estão à frente nos estudos e regulamentações dos níveis de OTA em alimentos como café, vinho, uvas passas e, principalmente, dos alimentos consumidos por crianças (ABRUNHOSA *et al.*, 2001).

No Brasil, em 18 de fevereiro de 2011, foi publicada no Diário Oficial da União (DOU) por meio da Portaria nº 354 a Resolução - RDC Nº 7 da Anvisa os limites máximos toleráveis de várias micotoxinas, dentre estas a OTA, em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas, conforme apresentado na TAB. 1 (ANVISA, 2011).

TABELA 1

Limites máximos tolerados (LMT) para ocratoxina A em diversos produtos alimentares

Micotoxina	Alimento	LMT ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Ocratoxina A	Cereais e derivados, incluindo cevada malteada	10,0
	Feijão	10,0
	Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel	10,0
	Vinho e seus derivados	2,00
	Suco de uva e polpa de uva	2,00
	Especiarias: <i>Capsicum</i> spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); <i>Piper</i> spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e preta); <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada); <i>Zingiber officinale</i> (gengibre); <i>Curcuma longa</i> (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas.	30,0
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância).	2,00
	Produtos de cacau e chocolate	5,00
	Amêndoa de cacau	10,0
	Frutas secas e desidratadas	10,0

Fonte: ANVISA, 2011.

2.2.2 Ocorrência de ocratoxina A em uvas e produtos processados

A OTA ocorre em produtos naturais e em produtos processados incluindo suco de uva, vinho e uvas passas (BATILLANI; PIETRI 2002). Estudos relacionados à produção de OTA em uvas apontam as espécies do gênero *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius* como as principais produtoras dessa micotoxina (ABRUNHOSA *et al.*, 2001; AMÉZQUETA *et al.*, 2009), principalmente, durante o amadurecimento de bagas danificadas (SERRA *et al.*, 2006).

Em relação aos produtos derivados da uva, a ocorrência dessas duas espécies fúngicas é comum em uvas passas escuras (TANIWAKIL *et al.*, 2004). Em virtude desta colonização, este produto apresenta elevados níveis de contaminação por OTA e, por ser um produto de alto consumo entre crianças e adultos constituem uma importante rota de entrada desta micotoxina na cadeia alimentar humana (BATILLANI *et al.*, 2006). A contaminação com OTA em uvas passas é maior do que a contaminação em vinhos e suco de uva (VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

Nos produtos processados, a contaminação por micotoxinas ocorre em virtude do crescimento fúngico e produção desses compostos na matéria-prima, ainda no campo ou nas distintas fases do processamento (BATILLANI; PIETRI, 2002; SHUNDO *et al.*, 2006). A OTA possui elevada estabilidade química às etapas de processamento dos alimentos (PRIETO-SIMÓN *et al.*, 2012). Desse modo, tem sido detectada em bebidas como vinho e suco de uva (SHUNDO *et al.*, 2006).

O vinho é a segunda maior fonte de OTA em alimentos e, em virtude disso, o monitoramento da ocorrência de OTA em uvas representa uma preocupação mundial (FABIANI *et al.*, 2010; PENA *et al.*, 2010). A União Europeia - (CE) N. 123/2005, estabelece limites de OTA em $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para mostos de uvas e derivados. Nos vinhos europeus, pesquisas demonstram que os níveis detectáveis de OTA variam entre 0,01 e $3,4 \text{ mg L}^{-1}$ (BATILLANI; PIETRI, 2002). As análises nessas amostras mostraram que há um gradiente

na concentração de OTA, que decresce do vinho tinto, para o rosê e, por fim, para o branco (BATILLANI *et al.*, 2006).

2.2.3 Métodos de detecção de ocratoxina A em uvas e produtos processados

Para a determinação de OTA são necessárias etapas de extração com solvente, *clean up* (limpeza), identificação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os principais métodos de extração consistem na extração em fase sólida utilizando diversos adsorventes (sílica, florisil, C18) e a partição líquido-líquido usando solução aquosa de bicarbonato de sódio (VALENTA; 1998; BELLÍ *et al.*, 2002; GHALI *et al.*, 2009).

O rendimento e a eficiência da etapa de *clean up* variam de acordo com a complexidade das matrizes analisadas (FABIANI *et al.*, 2010), além disso, os baixos níveis de OTA esperados nos diversos alimentos requer métodos rápidos e de alta sensibilidade para detecção desta toxina (REMIRO *et al.*, 2010). Para o *clean up* dos extratos, normalmente, é utilizada a extração em fase sólida, entretanto essa técnica apresenta sensibilidade limitada e alto consumo de solventes. Como alternativa foi desenvolvida a metodologia de *clean up* em colunas de imunoafinidades (CIAs) (DALL'ASTA *et al.*, 2004; GIRAUDI *et al.*, 2007; FABIANI *et al.*, 2010).

Essa técnica possui alta sensibilidade e especificidade, na qual a OTA é adsorvida ao anticorpo e os interferentes da matriz podem ser removidos (BELLÍ *et al.*, 2002). Além disso, as CIAs reduzem significativamente o uso de solventes tóxicos (VISCONTI, 1999; BELLÍ *et al.*, 2002). Entretanto, as colunas de imunoafinidades apresentam elevados custos (SÁEZ *et al.*, 2004; REINSH *et al.*, 2005).

A detecção de OTA tem sido realizada frequentemente pela combinação de CLAE com detector de massas (EM) (TIMPERIO *et al.*, 2006). Contudo, CLAE acoplado ao detector de fluorescência (CLAE-FL) constitui o conjunto de técnicas de análises mais comumente utilizadas (VISCONTI *et al.*, 1999; LEITNER *et al.*, 2002; BLESA *et al.*, 2004).

A TAB. 2 apresenta diferentes metodologias utilizadas na extração, detecção e quantificação de OTA em uvas e produtos derivados em alguns trabalhos.

TABELA 2

Compilação dos métodos usados para determinação de OTA em uva e produtos processados

Extração	Clean up	Método de Análise	Referência
MgCl ₂ + tolueno	EFS (sílica)	CLAE-EM Água/ácido trifluoroacético 0,05 % + metanol	BECKER <i>et al.</i> , 1998
5% NaHCO ₃ + 1 % PEG 8000	CIA	CLAE-FL Acetonitrila/água/ácido acético (99:99:2, v/v/v)	VISCONTI <i>et al.</i> , 1999
5% NaHCO ₃ + 1 % PEG 8000	CIA	CLAE- FL Acetonitrila/água/ácido acético (99:99:2, v/v/v)	
ELL (clorofórmio)	CIA	CLAE- FL Acetonitrila/água/ácido acético (99:99:2, v/v/v)	SÁEZ <i>et al.</i> , 2004
EFS (C18)	-	CLAE- FL Acetonitrila/água/ácido acético (99:99:2, v/v/v)	
EFS (fenilsilano)	-	CLAE- FL	

		Acetonitrila/água/ácido acético (99:99:2, v/v/v)	
Microextração em fase sólida	-	CLAE-FL Acetonitrila/água/ácido acético (111/87/2, v/v/v)	ARESTA <i>et al.</i> , 2006
EFS (C18)	-	CLAE-FL Acetonitrila/água/ácido acético (49,5:49,5:1, v/v/v)	HÉRNANDEZ <i>et al.</i> , 2006
Clorofórmio	-	CLAE-FL Acetonitrila/água/ácido acético 0,05 %	TIMPERIO <i>et al.</i> , 2006
Clorofórmio + PEG 1% + NaHCO ₃	CIA	CLAE-EM Acetonitrila/tampão de amônia (15:85, v/v)	

PEG = polietilenoglicol; EFS = extração em fase sólida; ELL = extração líquido-líquido; CIA = colunas de imunoafinidade; CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência; FL = detector de fluorescência; EM = espectrômetro de massas

A extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) tem sido empregada com sucesso na análise de agrotóxicos em matrizes como mel (PINHO *et al.*, 2010). A ELL-PBT consiste no contato efetivo entre solvente (fase orgânica) e amostra (fase aquosa), que em virtude da miscibilidade de modo característico forma-se um sistema de fase única com separação dessas fases apenas após o congelamento. Essa técnica combina extração e *clean up*, reduzindo o número de etapas. Além de ser uma técnica simples, apresenta menor gasto de solventes (GOULART *et al.*, 2012). Considerando a escolha adequada do solvente essa técnica mostra-se promissora para extração de ocratoxina A em diferentes matrizes.

Em diferentes trabalhos, que utilizam a CLAE acoplada a detectores “cegos” como o de fluorescência, a presença de OTA nos extratos tem sido confirmada por meio da derivatização do composto (SKAUG *et al.*, 2000; JUAN *et al.*, 2007; PENA *et al.*, 2010). Nesse caso, a OTA é submetida a uma reação de esterificação, que se dá em meio ácido, entre o agente derivatizante (metanol) e o grupo carboxílico da ocratoxina A, com obtenção da ocratoxina A derivatizada (FIG. 2). Desta forma, o sinal de OTA é convertido no sinal ocratoxina A derivatizada, com maior tempo de retenção (SKAUG *et al.*, 2000).

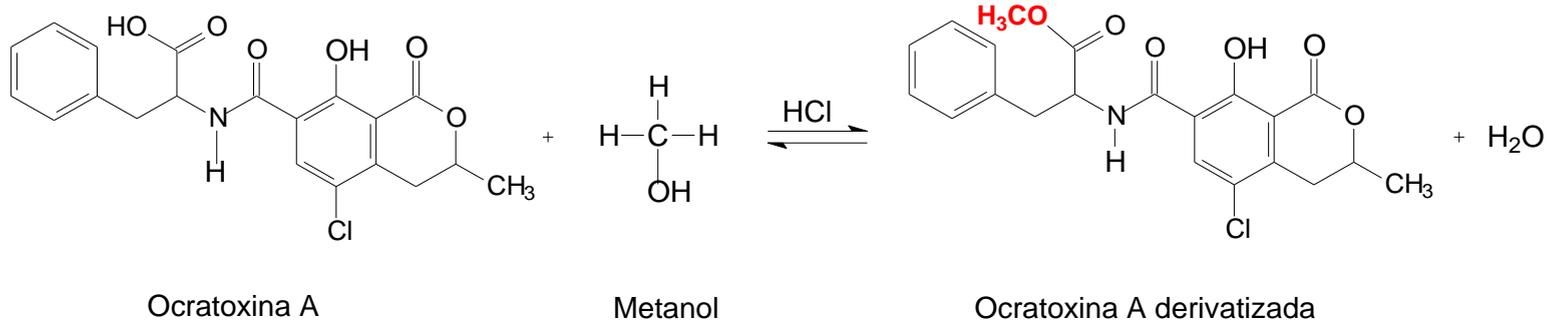


Figura 2 – Representação esquemática da reação de derivatização para obtenção da ocratoxina A derivativada.

Fonte: Elaborada pela autora.

De um modo geral, as reações de derivatização podem ser utilizadas para confirmar a presença do analito (JUAN *et al.*, 2007), aumentar a sensibilidade do detector (LINO *et al.*, 2006) e garantir a seletividade do método. Em nenhum dos trabalhos pesquisados na literatura foi verificado o uso dessa reação de derivatização como método de quantificação da OTA.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, tanto a extração em fase sólida quanto a extração líquido-líquido são técnicas simples, no entanto, apresentam alto consumo de solventes, normalmente, tóxicos o que coloca em risco a saúde do analista bem como do meio ambiente com o descarte desses resíduos. Desse modo, estudos no sentido de propor metodologias alternativas para extração de OTA em uva e produtos processados são necessários.

Nesse sentido, no presente trabalho, foram propostas a otimização e validação da extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) e a extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) de OTA em amostras de uva e produtos processados. Além disso, foi utilizado o sistema de CLAE acoplado ao detector de ultravioleta como método alternativo na detecção de OTA nessas matrizes. Para garantir a seletividade dos métodos otimizados, foi realizada a quantificação indireta da OTA na forma derivatizada.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Otimizar e validar um método analítico alternativo para análise de ocratoxina A em uvas e produtos processados.

4.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições de análise de ocratoxina A por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção na região do ultravioleta (CLAE-UV);
- Otimizar e validar a extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura (ELL-PBT) de ocratoxina A em amostras de vinho e suco de uva;
- Otimizar e validar a extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) de ocratoxina A em amostras de uvas rosadas e uvas passas escura.

CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM UVA E PRODUTOS PROCESSADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

RESUMO

A ocratoxina A é uma micotoxina encontrada em alimentos como uvas rosadas e produtos processados industrialmente. Neste trabalho foram otimizadas e validadas duas técnicas de extração (líquido-líquido com partição em baixa temperatura e sólido-líquido com purificação em baixa temperatura) para identificação e quantificação de ocratoxina A em amostras de suco de uva, vinho, uvas passas e rosada. Foram avaliadas a influência da força iônica, pH e do modo de homogeneização nas porcentagens de extração de ocratoxina A. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE-UV). As técnicas apresentaram porcentagens de extração superiores a 66%, e desvio padrão inferior a 10 %. A ocratoxina A foi quantificada na forma derivatizada com limites de detecção inferiores a $12,5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para as matrizes sólidas e de $6,25 \mu\text{g L}^{-1}$ para as matrizes líquidas. Os limites de quantificação foram de $41,63 \mu\text{g Kg}^{-1}$ e iguais a $20,88 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A resposta cromatográfica foi linear para a ocratoxina A derivatizada, com coeficiente de determinação superior a 0,99 nas quatro matrizes analisadas.

Palavras-chave: OTA. CLAE-UV. OTA derivatizada.

CAPÍTULO 2 - DEVELOPMENT OF A NEW METHOD FOR DETERMINATION OF OCHRATOXIN A IN GRAPE AND PROCESSED PRODUCTS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

ABSTRACT

Ochratoxin A is a mycotoxin found in food such as pink grapes and industrially processed products. In this work, two extraction techniques (liquid-liquid partition at low temperature and solid-liquid purification at low temperature) were optimized and validated for identification and quantification of ochratoxin A in samples of grape juice, wine, pink grapes and raisins. The influence of ionic strength, pH and mode of homogenization on the percentages of extraction of ochratoxin A was evaluated. The analyses were performed by high performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detector (HPLC-UV). The techniques showed extraction percentages higher than 66%, and standard deviation of less than 10%. Ochratoxin A was quantified as derivatized with detection limits lower than $12.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ for solid matrices and $6.25 \mu\text{g L}^{-1}$ for liquid matrices. The limits of quantification were $41.63 \mu\text{g kg}^{-1}$ and equal to $20.88 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The chromatographic response was linear for ochratoxin A derivatized, with coefficient of determination higher than 0.99 in all four matrices analyzed.

Keywords: OTA. HPLC-UV. OTA derivatized.

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos fúngicos com propriedades tóxicas para o organismo humano (FERNÁNDEZ-CRUZ *et al.*, 2010). A produção desses compostos está associada a fatores ambientais como temperatura e umidade (ARESTA *et al.*, 2006; AMÉZQUETA *et al.*, 2012) e às condições de plantio, colheita e armazenamento da cultura (DUARTE *et al.*, 2010; FERNÁNDEZ-CRUZ *et al.*, 2010).

As ocratoxinas são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* (CABAÑES *et al.*, 2002). Dentre essas, a ocratoxina A (OTA) é considerada a mais tóxica apresentando ações nefrotóxicas, teratogênica e imunotóxica (VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006). A OTA pode ser detectada em diversos alimentos (GIANCARLO *et al.*, 2011) como cereais, café e uva (CORONEL *et al.*, 2009). Essa micotoxina apresenta estabilidade moderada às etapas de processamento dos alimentos (ARAGUÁS *et al.*, 2005; PRIETO-SIMÓN *et al.*, 2012). Dessa forma, é comum sua ocorrência em produtos derivados como frutas secas, vinho, cerveja e suco de uva (ARAGUÁS *et al.*, 2005).

No intuito de controlar os limites aceitáveis de OTA, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu em 2011 os limites máximos de ocratoxina A em vários alimentos. Em uva, esse limite é de 2,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e, em frutas secas, como as uvas passas é de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. No âmbito internacional, a legislação europeia por meio do regulamento nº 1881 adota o limite de 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para suco de uva e vinho (COMMISSION REGULATION, 2006).

A análise de OTA em alimentos pode ser feita por diferentes métodos de extração, purificação e quantificação (AMÉZQUETA *et al.*, 2012). A extração líquido-líquido e *clean up* em fase sólida têm sido utilizadas (SÁEZ *et al.*, 2004). Entretanto, apresenta maior tempo de execução e gasto de solventes tóxicos, como clorofórmio (AMÉZQUETA *et al.*, 2012). As colunas de imunoafinidade (CIAs) também têm sido utilizadas frequentemente como método de *clean up* dos extratos contendo OTA (TIMPERIO *et al.*, 2006;

FABIANI *et al.*, 2010). Porém, essas colunas apresentam elevados custos e torna-se uma técnica de acesso mais limitado (SÁEZ *et al.*, 2004).

Uma variação da técnica de extração líquido-líquido que tem sido empregada para análise de agrotóxicos em água (VIEIRA *et al.*, 2007) é a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT). A característica principal da ELL-PBT é a formação de fase única envolvendo a amostra e solvente orgânico, seguido pela partição apenas pelo abaixamento da temperatura (GOULART *et al.*, 2012). A ELL-PBT é uma técnica simples, rápida e com baixo consumo de solventes, que promove relativa limpeza dos extratos sem a necessidade de instrumentos ou técnicas sofisticadas (VIEIRA *et al.*, 2007). Quando empregada em matrizes sólidas, essa técnica é denominada extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT).

Em relação aos métodos de detecção de OTA, tem sido utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência (VALENTA, 1998; ARESTA *et al.*, 2006; AFSAH-HEJRI *et al.*, 2012). Para confirmação de OTA, normalmente, é utilizado o sistema de cromatografia líquida com espectrômetro de massas (TIMPERIO *et al.*, 2006). Raros trabalhos na literatura têm utilizado técnicas alternativas para detecção da ocratoxina A em amostras complexas, como por exemplo, detector por arranjo de fotodiodo ou ultravioleta (SOLEAS *et al.*, 2001; ARESTA *et al.*, 2003).

O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar as técnicas de ELL-PBT e ESL-PBT de ocratoxina A em amostras de suco de uva, vinho, uvas rosada e passa. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE-UV).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Solução-padrão estoque de ocratoxina A (99,5% m/m) obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) foi preparada em acetonitrila na concentração de 200 mg L⁻¹ e armazenada em frasco âmbar em temperatura de -18 °C. A partir da solução estoque foram preparadas diariamente soluções de trabalho na concentração de 10,0 mg L⁻¹ em acetonitrila e 1,00 mg L⁻¹ na fase móvel. Foram utilizados como solventes acetonitrila e metanol obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) grau CLAE. Cloreto de sódio da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e diidrogenofosfato de sódio adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) ambos com grau de pureza superiores a 99%. Ácidos clorídrico e fosfórico foram obtidos da Vetec e Sigma-Aldrich, respectivamente.

2.2 Análises

O comprimento de onda de absorbância máxima da ocratoxina A foi determinado a partir da leitura da solução padrão na concentração de 10,00 mg L⁻¹ em acetonitrila, utilizando espectrofotômetro (Cary 60) da Agilent Technologies (Mulgrave, Austrália) operando na região de 190 até 450 nm.

A ocratoxina A foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em aparelho Varian ProStar 325 LC, equipado com detector UV-VIS, operando em comprimento de onda de 213 nm e injetor com alça de amostragem de 20 µL. Utilizou-se coluna analítica de fase reversa da Varian C-18 (15 cm x 4,60 mm, 5 µm) e fase móvel acetonitrila/tampão fosfato (diidrogenofosfato de sódio/ácido fosfórico) com força iônica de 50 mmol L⁻¹ e pH 2,1, (60:40 v/v). A temperatura foi mantida a 22 °C e o fluxo da fase móvel seguiu gradiente de 0,50 mL min⁻¹ (0-6 minutos), 1,40 mL min⁻¹ (7,5-10 minutos) e 0,50 mL min⁻¹ (12-15 minutos).

2.3 Amostras

Para otimização das técnicas de extração foram utilizadas amostras de uva rosada, suco de uva integral sem adição de açúcares, uva passa sem sementes e vinho tinto seco com teor alcoólico de 10,4% (v/v). As amostras isentas de ocratoxina A foram adquiridas em supermercados de Montes Claros (Minas Gerais – Brasil). As amostras de uvas passas e rosada foram trituradas em liquidificador até obter uma pasta homogênea.

2.4 Otimização da ELL-PBT e ESL-PBT

Uma massa de 4,00 g de amostras de uva rosada e passa foram transferidas para frascos de vidro transparente com capacidade de 22,0 mL. Cada amostra foi fortificada com 100 μL de solução padrão de ocratoxina A 10,0 mg L⁻¹. As amostras fortificadas foram deixadas em repouso por três horas. O volume de 8,00 mL de fase extratora (acetonitrila) foi adicionado às amostras e, em seguida, 3,60 mL e 0,600 mL de água destilada foram adicionados às amostras de uva passa e rosada, respectivamente. Posteriormente, os sistemas obtidos foram homogeneizados e levados ao freezer a -18 °C por uma hora para congelamento da fase aquosa.

Para as amostras líquidas, 4,00 mL de vinho e suco foram fortificadas com 100 μL de solução-padrão de ocratoxina A 10,0 mg L⁻¹. Posteriormente, 8,00 mL de acetoneitrila foram adicionados em todas as amostras, as quais foram homogeneizadas e congeladas a -18 °C por uma hora.

Os extratos obtidos (7,00 mL) tanto na ESL-PBT ou ELL-PBT foram transferidos para balões de destilação de 250 mL e concentrados em evaporador rotatório com temperatura de 63-65 °C sob vácuo reduzido à pressão de 400 mmHg até a secura. Os extratos foram ressuspensos em 0,500 mL de fase móvel.

Na otimização de ambas as técnicas, foi realizado estudo univariado da influência da força iônica, pH e do modo de homogeneização na porcentagem de recuperação da ocratoxina A nos extratos das quatro matrizes (TAB. 1). A concentração do analito nos extratos foi determinada

utilizando os dados da curva analítica obtida a partir das análises de soluções padrão de OTA preparadas no extrato branco das matrizes (200 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$).

TABELA 1

Otimização univariada das técnicas de extração (ESL-PBT / ELL-PBT) de OTA em amostras de uva rosada, uva passa escura sem semente, suco de uva integral e vinho tinto seco

Variáveis	Níveis
pH	1 e 3
Força iônica	Sem adição de NaCl Com adição de 0,0100 g NaCl
Homogeneização	Banho ultrassônico (60 Hz / 10 min) Mesa agitadora (28 °C a 140 rpm / 30 min) Vórtex (60 s)
<i>Clean up</i>	C-18, carvão ativo, florisil e sílica

Fonte: Elaborada pela autora.

2.5 Limpeza dos extratos

Extratos orgânicos obtidos pela ESL-PBT e ELL-PBT das quatro matrizes isentas de OTA (branco) foram submetidos à etapa de limpeza (*clean up*). Para isso, após o congelamento da fase aquosa, o sobrenadante foi transferido para uma coluna de vidro (20 cm de comprimento x 1,5 cm diâmetro interno) contendo 0,500 g de adsorvente (TAB. 1). Os componentes da matriz foram eluídos com acetonitrila e recolhidos em balão de 10,0 mL. Os eluentes obtidos foram analisados por espectrofotometria na região do UV-VIS.

Para avaliar a retenção da OTA nos adsorventes uma solução padrão a 5 mg L^{-1} também foi eluída pelos adsorventes com acetonitrila e analisados por espectrofotometria na região do UV-VIS.

2.6 Derivatização da ocratoxina A

Para obtenção da ocratoxina A derivatizada com metanol foi utilizado a reação de derivatização adaptada de SKAUG *et al.* (2000). Ao resíduo de ocratoxina A obtido no evaporador rotatório foi adicionado $100 \mu\text{L}$ de ácido clorídrico e $2,50 \text{ mL}$ de metanol. O balão foi recoberto com papel alumínio e deixado sob agitação a 100 rpm em mesa agitadora a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 h .

O volume de reação foi concentrado em evaporador rotatório e ressolubilizado em $0,500 \text{ mL}$ da fase móvel. Esses extratos foram filtrados em membrana de *nylon* de $0,450 \mu\text{m}$. O filtrado obtido foi analisado por CLAE-UV. A quantificação da OTA derivatizada foi realizada através das curvas analíticas preparadas em extratos das matrizes.

2.7 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: vórtex da Phoenix (São Paulo, Brasil); banho ultrassônico da Unique (São Paulo, Brasil), mesa agitadora da Nova Ética (São Paulo, Brasil), pHmetro micro processado da Quimis (São Paulo, Brasil) e evaporador rotatório da Quimis (São Paulo, Brasil).

2.8 Validação do método

Os métodos de extração otimizados foram validados em relação às principais figuras de mérito: seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão e exatidão conforme sugerido pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade (INMETRO, 2010). Para avaliar o efeito das matrizes estudadas na análise do ocratoxina A derivatizada, extratos obtidos de cada matriz, após concentração em evaporador rotatório, foram fortificados na faixa de concentração especificada para cada matriz e, em seguida, derivatizados. Uma nova série de soluções (167 a $1665 \mu\text{g L}^{-1}$) foi preparada em acetonitrila e, em seguida, submetido à derivatização.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise espectrofotométrica

Na FIG. 1 é apresentado o espectro de absorção da ocratoxina A na região do UV-VIS. Observam-se comprimentos de onda de máxima absorção em 213 e 333 nm. Análises cromatográficas de OTA em vinho e cerveja já foram realizadas no comprimento de onda de 333 nm por CLAE-DAD (SOLEAS *et al.*, 2001). Essa escolha pode estar relacionada ao fato de que, nesse comprimento de onda, não é detectado nenhum interferente no tempo de retenção da OTA, tornando a análise cromatográfica mais seletiva, porém menos sensível. No presente trabalho foi adotado o comprimento de onda de 213 nm nas análises por CLAE-UV da OTA, visando maior sensibilidade.

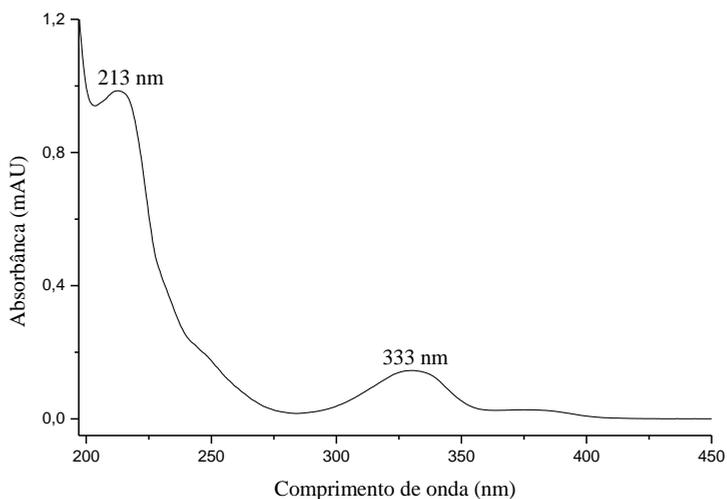


Figura 1 - Espectro de absorção da ocratoxina A na região do UV-VIS

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.1 Análise por CLAE-UV

A OTA é um ácido fraco com dois hidrogênios ionizáveis (FIG. 2). Dessa forma, as análises por cromatografia líquida com fase reversa mostraram-se dependentes do pH e força iônica da fase móvel

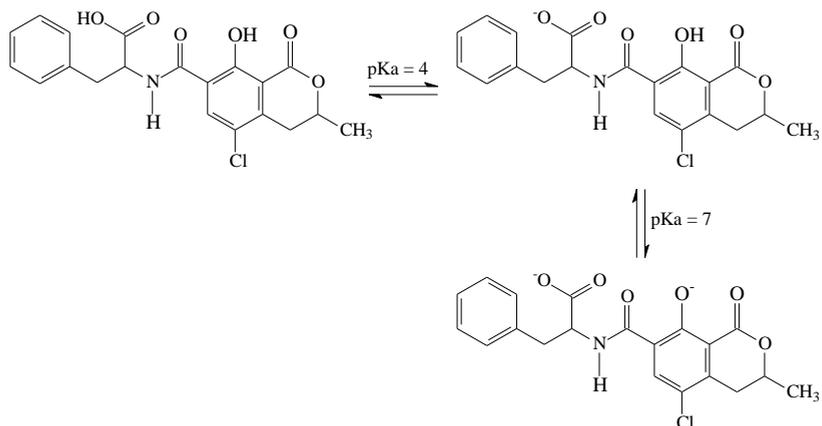


Figura 2 – Representação das estruturas químicas da ocratoxina A em diferentes pH

Fonte: Elaborada pela autora.

No GRÁF. 1a é apresentado o cromatograma da ocratoxina A em pH 2,1 e 3,0 da fase móvel. A faixa de pH estudada foi restrita, pois valores inferiores de pH degradam a coluna cromatográfica e, em valores superiores, a OTA não é eluída na coluna cromatográfica ($pH \sim pK_{a1}$). Melhor resolução e intensidade do sinal foram obtidos em pH 2,1.

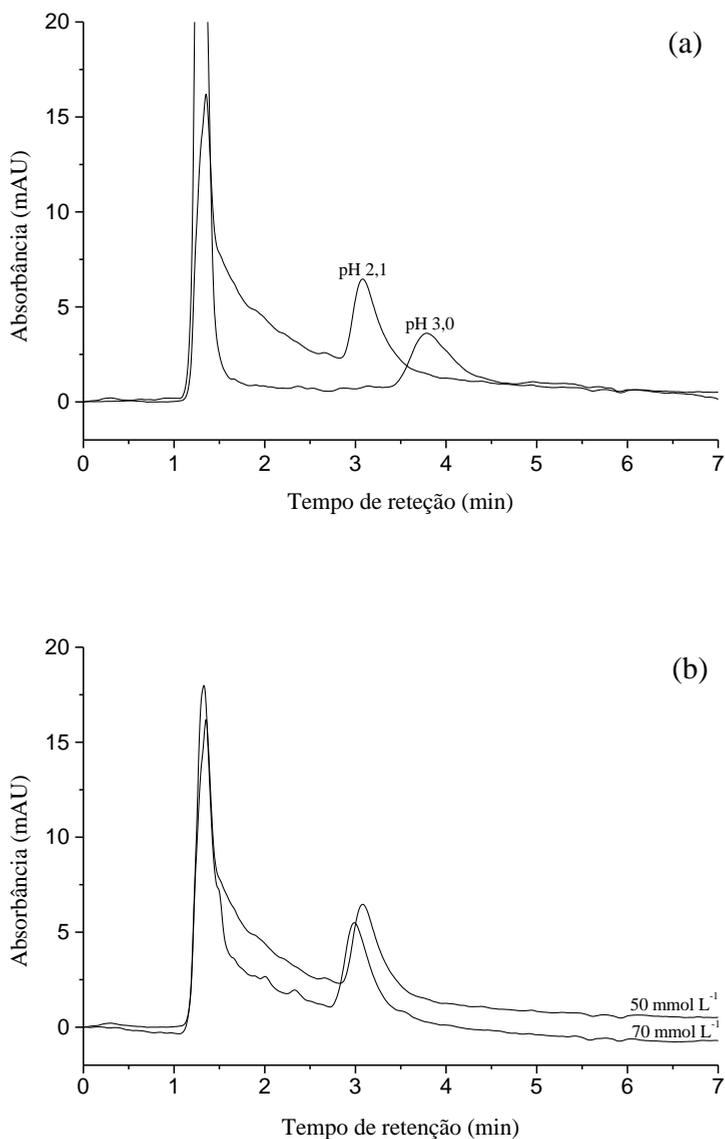


Gráfico 1 - Cromatogramas da solução padrão de ocratoxina A (1 mg L^{-1}) em diferentes condições de fase móvel (acetonitrila:tampão fosfato, 70:30, v/v). a) eluição em pH 2,0 e 3,0; b) eluição em força iônica de 50 e 70 mmol L^{-1}

Fonte: Elaborado pela autora.

As análises utilizando força iônica de 10 mmol L⁻¹, na fase móvel, promoveram baixa repetitividade e resolução do sinal. No GRÁF. 1b, são apresentados os sinais da ocratoxina A eluída com fase móvel composta pelo tampão dihidrogenofosfato de sódio/ácido fosfórico com força iônica de 50 e 70 mmol L⁻¹. Os resultados foram satisfatórios e não foram observadas diferenças no perfil de detecção de OTA. Para preservar o sistema cromatográfico, foi adotada a força iônica de 50 mmol L⁻¹. Embora este valor seja cerca de 10 vezes maior do que o utilizado na literatura para análises de OTA (MURILLO *et al.*, 2007), não interferiu no desenvolvimento do método e no sistema cromatográfico.

3.2 Otimização das técnicas de extração (ESL-PBT e ELL-PBT)

3.2.1 Força iônica

Para avaliar o efeito da força iônica na extração da OTA, diferentes massas de NaCl foram adicionadas ao sistema visando obter fase única em condições ambientes. Somente quantidades inferiores a 0,010 g deste sal apresentaram sistemas homogêneos e não promoveram congelamento brusco da fase aquosa para as quatro matrizes.

Os resultados do estudo de força iônica, apresentados no GRÁF. 2, foram submetidos à análise pelo teste de Duncan. Nesse teste, para todas as matrizes foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nas porcentagens de recuperação de OTA, após a adição de sal. Nos extratos de suco de uva e uva passa, essa adição favoreceu o aumento na porcentagem de recuperação de OTA. Entretanto, nessas duas matrizes as porcentagens foram superiores a 100%, indicando a presença de interferência da matriz. Resultados semelhantes foram observados por CAMPONE *et al.* (2011).

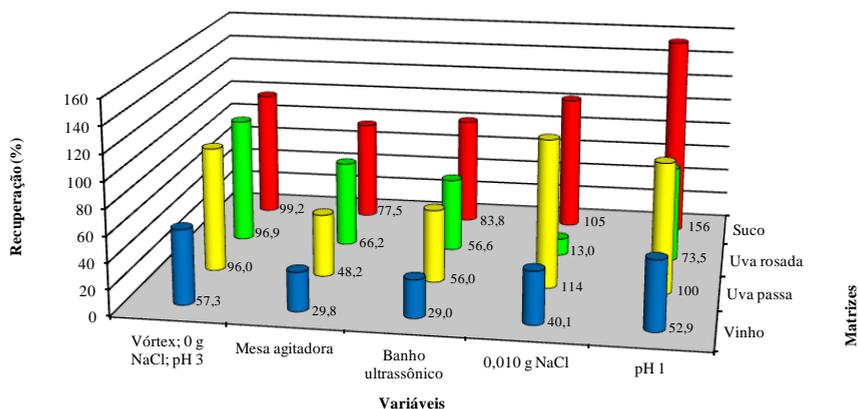


Gráfico 2 - Comparação da influência da força iônica, pH e modo de homogeneização sobre a porcentagem de recuperação de ocratoxina A em quatro matrizes: uva passa, uva rosada, suco e vinho

Fonte: Elaborado pela autora.

Para as matrizes uva rosada e vinho, o efeito foi inverso e a adição de sal promoveu redução significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de recuperação de OTA. Nos extratos de uva rosada a redução foi de 96,9 para 13,0 %, já nos extratos de vinho a redução foi de 57,33 para 40,10 %. Além disso, em todas as análises o desvio-padrão foi superior aos encontrados em experimentos sem alteração da força iônica do meio.

3.2.2 pH

A influência do pH da amostra na extração da OTA foi avaliada para os valores de pH 1 e 3, sendo este último o pH natural das amostras. Os resultados obtidos estão apresentados no GRÁF. 2. No teste de Duncan com 5% de probabilidade, a alteração do pH não promoveu diferença significativa na porcentagem de recuperação de OTA em extratos de uva passa. Para as outras matrizes houve diferença significativa entre as duas condições de pH testadas, com melhor resultado para o pH 3 nos extratos de vinho e uva

rosada. Embora o pH 1 tenha melhorado a extração da ocratoxina A nos extratos de suco de uva, também favoreceu a extração do interferente que coeluiu no mesmo tempo de retenção da OTA. Dessa forma, as extrações em pH 3 apresentaram menos interferentes e a porcentagem de recuperação, bem como o desvio padrão, foram mais satisfatórios para as quatro matrizes.

3.2.3 Modo de homogeneização

Os resultados obtidos na homogeneização das amostras com a fase extratora utilizando vórtex, mesa agitadora e banho ultrassônico estão apresentados no GRÁF. 2. Pelo teste de Duncan, os três modos de homogeneização apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na extração de OTA. A homogeneização em vórtex por 1 minuto apresentou maiores porcentagens de recuperação (57,33 a 99,16 %) e os menores valores de desvio padrão para recuperação de OTA nas quatro matrizes estudadas ($< 10\%$). No entanto, a mesa agitadora e o banho ultrassônico, além de demandarem maior tempo para a homogeneização, não promovem contato efetivo entre a fase orgânica e aquosa (PINHO *et al.*, 2010; GOULART *et al.*, 2012).

3.2.4 Limpeza dos extratos

Em geral, as técnicas de ESL-PBT e ELL-PBT possibilitam a extração do analito e *clean up* dos extratos em uma única etapa. Entretanto, foi detectado um interferente no mesmo tempo de retenção da OTA e não foi possível separar durante a otimização das condições cromatográficas. Nesse sentido, foi necessário avaliar uma etapa adicional de *clean up* dos extratos com adsorventes sílica, florisil, C18 e carvão ativo, que são tradicionalmente utilizados em etapas de limpeza de extratos de matrizes complexas (HUWING *et al.*, 2001). As análises espectrofotométricas dos extratos brancos (isentos de OTA), após a etapa de *clean up*, mostraram que o florisil

adsorve menor quantidade de componentes das matrizes. Em contrapartida, o florisil foi o adsorvente que apresentou maior adsorção de OTA ao eluir com acetonitrila.

Neste sentido, quando extratos orgânicos obtidos pela ESL-PBT ou ELL-PBT fortificados com OTA foram submetidos à etapa *clean up*, os componentes da matriz foram eluídos com acetonitrila e a coluna foi lavada com água, conforme LEITNER *et al.* (2002). Entretanto, a dessorção da OTA do florisil não foi obtida com sucesso com fase móvel, tampão fosfato ou metanol com recuperação inferior a 10 % e não eliminou significativamente o interferente do mesmo tempo de retenção da OTA. Dessa forma, nenhuma etapa adicional de limpeza dos extratos foi utilizada.

3.2.5 Derivatização da ocratoxina A

Para eliminar problemas com interferentes, uma etapa de derivatização da OTA com metanol foi acoplada no método. Nas mesmas condições cromatográficas a OTA e a OTA derivatizada apresentaram tempo de retenção de 6,50 min e 10,5 min, respectivamente. A modificação química não promoveu alteração no comprimento de onda de absorção máxima da OTA.

Essa derivatização foi realizada em trabalhos anteriores para confirmação da presença de OTA em amostras (DALL'ASTA *et al.*, 2004; PENA *et al.*, 2010). Porém, no presente trabalho, a formação do éster foi uma alternativa eficiente para quantificação indireta e seletiva da OTA em amostras de uvas e produtos processados.

3.3 Método otimizado

Nas duas técnicas de extração, a condição otimizada combinou pH natural da amostra, sem alteração da força iônica e homogeneização em vórtex por 60 s. Após otimização, o método foi validado e, para isso, 4,00 mL (ELL-PBT) e 4,00 g (ESL-PBT) das amostras foram colocadas em contato com 8,00 mL da fase extratora e homogeneizadas em vórtex. O sistema obtido foi congelado a -18 °C por uma hora e o extrato orgânico foi submetido à derivatização e análise por CLAE-UV.

3.4 Validação do método

3.4.1 Efeito de matriz

Na comparação entre duas curvas analíticas, sendo uma preparada em fase móvel e a outra em extrato de matriz, quando somente o coeficiente angular varia os componentes da matriz contribuem para introduzir nos resultados um erro sistemático proporcional. Quando apenas o coeficiente linear varia, significa que existe um erro sistemático constante (GONZÁLEZ *et al.*, 2002). Para as análises de OTA em uva rosada, uva passa e suco observou-se que as equações das retas (TAB. 2) se diferenciam predominantemente pelo coeficiente linear, uma vez que as curvas obtidas em fase móvel e extrato de matriz foram paralelas. Para os extratos de vinho as curvas analíticas diferenciaram tanto pelo coeficiente angular quanto linear e as curvas se cruzaram.

No GRÁF. 3, é apresentada a porcentagem de variação da resposta cromatográfica [% = $(\bar{A}_{\text{matriz}} - \bar{A}_{\text{solvente}}) / \bar{A}_{\text{solvente}} \times 100$], na qual \bar{A} corresponde à área do sinal detectado para a ocratoxina A derivatizada na fase móvel e nos extratos das matrizes estudadas. As análises indicaram a presença de gradiente no efeito de matriz, que decresce da uva rosada, para uva passa, suco e vinho, de acordo com o maior número de etapas de processamento industrial. Para os extratos de suco, uvas passas e rosada foram observados efeitos de matriz negativo com redução da resposta cromatográfica. O extrato

de vinho apresentou comportamento diferenciado, com efeito de matriz negativo de 350 a 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ e positivo de 900 a 1200 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Além disso, em baixas concentrações, próximo ao limite de quantificação, observou-se maior influência dos componentes da matriz na resposta cromatográfica. Das matrizes analisadas, os constituintes químicos da uva rosada exercem o maior efeito sobre a detecção da ocratoxina A derivatizada.

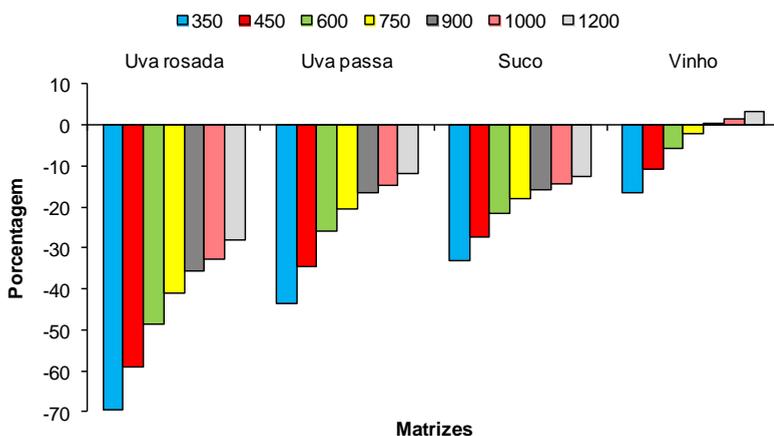


Gráfico 3 - Representação da porcentagem de variação da resposta cromatográfica da ocratoxina A derivatizada preparada em extratos (suco, vinho, uva passa e rosada) em relação às preparadas em fase móvel nas concentrações de 350 a 1200 $\mu\text{g L}^{-1}$

Fonte: Elaborado pela autora.

A confirmação do efeito de matriz foi realizada pelo teste Duncan (5 % probabilidade). As médias foram consideradas estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), confirmando que a matriz possui efeito significativo sobre a exatidão dos métodos na faixa de concentração estabelecida, por isso as curvas obtidas nos extratos das matrizes foram utilizadas para quantificação.

3.4.2 Seletividade

No GRÁF. 4 é apresentado o cromatograma da solução padrão da ocratoxina A derivatizada (1 mg L^{-1}) preparada na fase móvel e em extratos brancos das quatro matrizes analisadas. Verificou-se que o método foi seletivo, pois os cromatogramas dos extratos branco não apresentaram interferentes com mesmo tempo de retenção da OTA derivatizada (10,83 min).

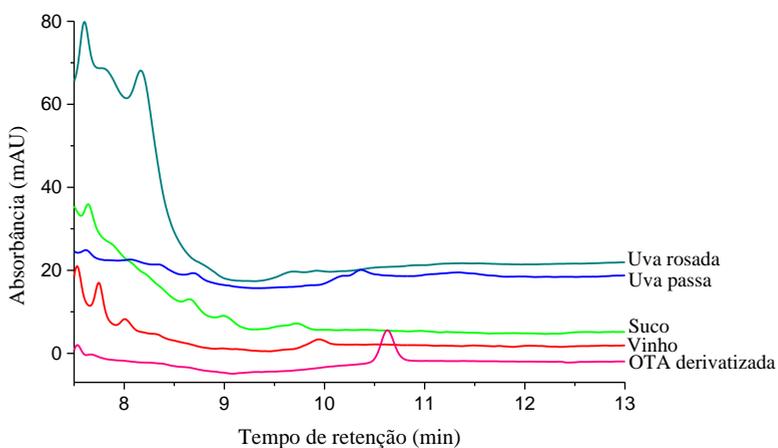


Gráfico 4 - Cromatograma comparativo entre a solução padrão de ocratoxina A derivatizada (1 mg L^{-1}) preparada na fase móvel e os extratos brancos obtidos a partir da ESL-PBT e ELL-PBT das quatro matrizes analisadas

Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.3 Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade

O limite de detecção (LD) foi determinado utilizando branco das amostras com adição da menor concentração aceitável de OTA, quantificada na forma esterificada. Os valores de LD foram obtidos considerando o valor cerca de três vezes a altura do sinal da linha de base (ruído) obtido para amostras das matrizes isentas de OTA (branco) e analisadas por CLAE-UV. Os resultados encontrados foram inferiores a $12,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para as matrizes sólidas e de $6,25 \mu\text{g L}^{-1}$ para as matrizes líquidas (TAB. 2).

O limite de quantificação (LQ) da OTA na forma derivatizada para as quatro matrizes analisadas foi determinado considerando cerca de 10 vezes a altura do sinal da linha de base (ruído) obtido para o extrato branco analisado por CLAE-UV. Nesse caso, para as matrizes sólidas foram obtidos valores inferiores a $41,63 \mu\text{g kg}^{-1}$ e, para as matrizes líquidas, esse valor foi de $20,88 \mu\text{g L}^{-1}$.

Na TAB. 2, estão apresentados os dados das equações de regressão. O método mostrou-se linear com coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,99.

TABELA 2

Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ) e linearidade do método para OTA quantificada indiretamente na forma de ocratoxina A derivatizada nas quatro matrizes

Dados da calibração					
Matrizes	Concentração	Equações	r^2	LD	LQ
Uva passa	29,13 – 156,3 ^(a)	$y = 0,00835x - 0,12198$	0,9975	8,750 ^(a)	29,13 ^(a)
Uva rosada	41,63 – 208,1 ^(a)	$y = 0,00661x - 0,14372$	0,9973	12,50 ^(a)	41,63 ^(a)
Suco	20,88 – 150,0 ^(b)	$y = 0,00787x - 0,05767$	0,9955	6,250 ^(b)	20,88 ^(b)
Vinho tinto	20,88 – 150,0 ^(b)	$y = 0,00902x - 0,03829$	0,9934	6,250 ^(b)	20,88 ^(b)

^(a) $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ^(b) $\mu\text{g L}^{-1}$

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.4 Exatidão e precisão do método

A exatidão do método foi avaliada pela fortificação das quatro matrizes em concentrações correspondentes a três níveis: baixo (LQ), médio (2 x LQ) e alto (5 x LQ), conforme recomendações do INMETRO (2010). A taxa de recuperação obtida variou de 66,45 a 94,84 %, com desvio padrão relativo inferior a 6,53%. Esses resultados foram satisfatórios quando comparados com os encontrados por FABIANI *et al.* (2010) ao utilizarem a técnica tradicional de extração líquido-líquido de OTA em vinho. A precisão do método foi avaliada em termos de repetitividade, determinando o desvio padrão relativo (DPR) para sete extrações idênticas de amostras fortificadas nas concentrações de duas vezes o limite de quantificação e analisadas por CLAE-UV. Os resultados apresentados na TAB. 3 foram satisfatórios, pois para matrizes complexas, como uvas e produtos processados, é aceito desvio padrão de até 30 % (European Commission, 2011).

TABELA 3

Porcentagem de recuperação da OTA, quantificada na forma de ocratoxina A derivatizada, após extração das amostras de suco, uva passa, rosada e vinho tinto fortificadas em três concentrações diferentes

Recuperação (%) (média ± DPR)				
Concentração	Suco	Uva passa	Uva rosada	Vinho tinto
1 x LQ ⁽¹⁾	92,73±5,51	94,84±0,84	91,18±3,13	67,57±6,33
2 x LQ ⁽²⁾	90,40±4,08	94,10±6,23	92,62±5,06	66,45±6,53
5 x LQ ⁽¹⁾	92,15±3,76	93,88±3,85	93,37±0,72	66,86±1,56

⁽¹⁾ Média de três repetições. ⁽²⁾ Média de sete repetições.

Fonte: Elaborada pela autora.

4 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos de extração, derivatização, quantificação e análises estatísticas observou-se que as técnicas otimizadas (ESL-PBT/ELL-PBT) resultaram em dois métodos inéditos para análise de ocratoxina A em uva e produtos processados. Esses métodos têm como principal vantagem o baixo consumo de solvente e uma eficiente recuperação de ocratoxina A, com porcentagens entre 66,4 % e 94,8 % e desvio padrão de 6,53 % para as quatro matrizes analisadas.

A etapa de derivatização da ocratoxina A garantiu a seletividade dos métodos, sem a necessidade de uma etapa adicional de *clean up* utilizando adsorventes. Além disso, a derivatização foi utilizada como método confirmatório e possibilitou a quantificação indireta de ocratoxina A nas amostras.

Os métodos propostos têm aplicação para análise de ocratoxina A acima de 29,13 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ em uva passa, de 41,63 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ para uva rosada e 20,88 $\mu\text{g L}^{-1}$ em amostras de suco e vinho.

REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 240-242, 2001.

AFSAH-HEJRI, L.; JINAP, S.; MIRHOSSEINI, H. Ochratoxin A quantification: Newly developed HPLC conditions. **Food Control**, v.23, p.113-119, 2012.

AMÉZQUETA, S.; GONZALEZ-PENAS, E.; MURILLO-ARBIZU, A.; CERAIN, A. L. Ochratoxin A decontamination: a review. **Food Control**, v. 20, p. 326-333, 2009.

AMÉZQUETA, S.; SCHORR-GALINDO, S.; MURILLO-ARBIZU, M.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LÓPEZ DE CERAIN, L.; GUIRAUD, J.P. OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. **Food Control**, v.26, p.259-268, 2012.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 354 a Resolução - RDC Nº 7, 18 de fevereiro de 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html> Acesso em: 18 set. 2012.

ARAGUÁS, C.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. **Food Chemistry**, v.92, p.459–464, 2005.

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

ARESTA, A.; VATINNO, R.; PALMISANO, F.; ZAMBONIN, C. G. Simultaneous determination of ochratoxin A and cyclopiazonic, mycophenolic, and tenuazonic Acids in cornflakes by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5232-5237, 2003.

AYDOGDU, H.; GUCER, Y. Microfungi and mycotoxins of grapes and grape products. **Trakia Journal of Sciences**, v. 7, p. 211-214, 2009.

BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO. A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 2-4, 2006.

BATTILANI, P.; PIETRI, A. Ochratoxin A in grapes and wine. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 639–643, 2002.

BECKER, M.; DEGELMANN, P.; HERDERICH, M.; SCHREIER, P.; HUMPF, H. Column liquid chromatography–electrospray ionisation–tandem mass spectrometry for the analysis of ochratoxin. **Journal of Chromatography A**, v. 818, p. 260–264, 1998.

BELLÍ, N.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Review: Ochratoxin A (OTA) in Wines, Musts and Grape Juices: Occurrence, Regulations and Methods of Analysis. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 325-335, 2002.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 497–516, 2003.

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

CABAÑES, F. J.; ACCENSI, F.; BRAGULAT, M. R.; M.L. ABARCA, M. L.; CASTELLÀ, G.; MINGUEZ, S.; PONS, A. What is the source of ochratoxin A in wine? **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 213– 215, 2002.

CALDAS, E. D.; SILVA, S, C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 319-23, 2008.

CAMPONE, L.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the identification and the accurate quantification by isotope dilution assay of Ochratoxin A in wine samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 99, p. 1279–1286, 2011.

CAST. **Mycotoxins**: risks in plant, animal and human systems. Council for Agricultural Science and Technology - task force report, n. 139, 2003.

CHEMSPIDER – The free chemical database. Disponível em: < <http://www.chemspider.com> > Acesso em: 12 jan. 2013.

CLOUVEL, P.; BONVARLET L., MARTINEZ, A.; LAGOUARDE, P.; DIENG, I.; MARTIN, P. Wine contamination by ochratoxin A in relation to vine environment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 74-80, 2008.

COMMISSION REGULATION (EC) N^o. 1881/2006. **Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs**. Official Journal of the European Union. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF> Acesso em: 19 set. 2012.

CORONEL, M. B.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; MARIN, S. Assessment of the exposure to ochratoxin A in the province of Lleida, Spain, **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2847-2852, 2009.

DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, p. 275-279, 2004.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, v. 27, p. 187-198, 2010.

EUROPEAN COMMISSION (2011). Document N° SANCO/12495/2011. **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol_en.pdf>. Acesso em: 08 nov. 2012.

FABIANI, A.; CORZANI, C.; ARFELLI, G. Correlation between different clean-up methods and analytical techniques performances to detect Ochratoxin A in wine. **Talanta**, v. 83, p. 281-285, 2010.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical databases**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 24 mar. 2010.

FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; MANSILLA, M. L.; TADEO, J. L. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. **Journal of Advanced Research**, v. 1, p. 113-122, 2010.

GHALI, R.; HMAISSIA-KHLIFA, K.; GHORBEL, H.; MAAROUFI, K.; HEDILI, A. HPLC determination of ochratoxin A in high consumption Tunisian foods. **Food Control**, v. 20, p. 716-720, 2009.

GIANCARLO, B.; ELISABETTA, B.; EDMONDO, C.; VALERIANA, C.; GIUSEPPINA, T. Determination of ochratoxin A in eggs and target tissues of experimentally drugged hens using HPLC-FLD. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1278-1282, 2011.

GIRAUD, G.; ANFOSSI, L.; BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; TOZZI, C. Solid-phase extraction of ochratoxin A from wine based on a binding hexapeptide prepared by combinatorial synthesis. **Journal of Chromatography A**, v. 1175, p. 174-180, 2007.

GONZÁLEZ, F. J. E.; TORRES, M. E. H.; CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; ALMANSA-LÓPEZ, E.; MATÍNEZ-VIDAL, J. L. Estimation and correction of matrix effects in gas chromatographic pesticide multiresidue analytical methods with a nitrogen-phosphorus detector. **Analyst**, v. 127, p. 1038-1044, 2002.

GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LEACHE, C.; VISCARRET, M.; PÉREZ DE OBANO, A.; ARAGUÁS, C.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Determination of ochratoxin A in wine using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, p. 163–168, 2004.

GOULART, S.M.; ALVES, R. D.; DE PAULA, W. X.; QUEIROZ, J. H.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Determination of carbamates in beverages by liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and liquid chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1154-1165, 2012.

HERNÁNDEZ, J. M.; GARCÍA-MORENO, M. V.; DURÁN, E.; GUILLÉN, D.; BARROSO, C. G. Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia. **Analytica Chimica Acta**, v. 566, p. 117–121, 2006.

HUWING, A.; FREIMUND, S.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, p. 179-188, 2001.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**, DOQ-CGCRE-008, 2010.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 2005.

JUAN, C.; LINO, C. M.; PENA A.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES J.; SILVEIRA, I. Determination of ochratoxin A in maize bread samples by LC with fluorescence detection. **Talanta**, v. 73, p. 246-250, 2007.

KHALDI, N.; SEIFUDDIN, F. T.; TURNER, G.; HAFT, D.; NIERMAN, W. C.; WOLFE, K. H.; SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, p. 723-741, 2010.

LEITNER, A.; ZÖLLNER, P.; PAOLILLO, A.; STROKA, J.; PAPADOPOULOU-BOURAOUI, A.; JABOREK, S.; ANKLAM, E.; LINDNER, W. Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 453, p. 33-41, 2002.

LEUNG, M. C. K.; DÍAZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9623-9635, 2006.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Metodologias analíticas para determinação das fumonisinas em milho e alimentos à base de milho. **Química Nova**, v. 29, p. 293-299, 2006.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 23-50, 2003.

MAGAN, N.; MEDINA, A.; ALDRED, D. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. **Plant Pathology**, v. 60, p. 150-163, 2011.

MURILLO, M. T.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; AMÉZQUETA, S.; LÓPEZ DE CERAIN, A. In-house validation of a high-performance liquid chromatography analytical method for quantification of ochratoxin A in unfermented grape juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 2164-2169, 2007.

NAVES, R. L.; GARRIDO, L. R.; SÔNEGO, O. R.; MÁRIO FOCHEATO, M. **Antracnose da videira: sintomatologia, epidemiologia e controle**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2006. 32p.

PEDRAS, M. S. C.; CHUMALA, P. B.; JIN, W.; ISLAM, M. S.; HAUCK, D. W. The phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*: phytotoxin production and phytoalexin elicitation. **Phytochemistry**, v. 70, p. 394-402, 2009.

PENA, A.; CEREJO, F.; SILVA, C.L.J.G.; LINO, C. M. Ochratoxin A survey in Portuguese wine by LC–FD with direct injection. **Talanta**, v. 82, p. 1556–1561, 2010.

PETZINGER, E.; WEIDENBACH, A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. **Livestock Production Science**, v. 76, p. 245-250, 2002.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. P.; SILVÉRIO, F. O. Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, p. 1307-1311, 2010.

PRIETO-SIMÓN, B.; KARUBE, I.; SAIKI, H. Sensitive detection of ochratoxin A in wine and cereals using fluorescence-based Immunosensing. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1323–1329. 2012.

RANČIĆ, A.; SOKOVIČ, M.; KARIOTI, A.; VUKOJEVIČ, J.; SKAL TSA, H. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, p. 80-84, 2006.

REINSCH, M.; TÖPFER, A.; LEHMANN, A., NEHLS, I. Determination of ochratoxin A in wine by liquid chromatography tandem mass spectrometry after combined anion-exchange/reversed-phase *clean-up*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 1592-1595, 2005.

REMIRO, R.; IBÁÑEZ-VEA, M.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LIZARRAGA, E. Validation of a liquid chromatography method for the simultaneous quantification of ochratoxin A and its analogues in red wines. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 8249–8256, 2010.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 33, p. 1-11, 2002.

ROHLFS, M.; CHURCHILL, A. C. L. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 23-34, 2011.

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

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

SERRA, R. M. A. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A**. 2005. 140 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Universidade do Minho, 2005.

SERRA, R.; MENDONÇA, C.; VENÂNCIO, A. Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 42–47, 2006.

SHIN, K. H.; PARK, H. S.; LEE, C. H.; DO, G. R.; YUN, S. K.; CHOI, I. M.; Morphological structure and chemical composition in epicuticular wax of Fruits in four kinds of grape cultivars. **Korean Journal of Horticultural Science & Technology**, v. 27, p. 353-358, 2009.

SHUNDO, L.; ALMEIDA, A. P.; ALABURDA, J.; RUVIERI, V.; NAVAS, S. A.; LAMARDO, L. C. A.; SABINO, M. Ochratoxin a in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 533-537, 2006.

SHWAB, E. K.; KELLER, N. P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. **Mycological Research**, v. 112, p. 225-230, 2008.

SKAUG, M. A.; EDUARD, W.; STØRMER, F. C. Ochratoxin A in airborne dust and fungal conidia. **Mycopathologia**, v. 151, p. 93–98, 2000.

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

STEYN, P. S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. **Toxicology Letters**, v. 82, p. 843-851, 1995.

TANIWAKIL, M. H.; MARTINS, C. P.; IAMANAKAL, B. T.; LEITE, R. S. S. F.; VICENTE, E.; OKAZAKIL, M. M. *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* produtores de ocratoxina a em alimentos: ocorrência, significado e fatores que afetam a sua presença REVNET DTA. (Divisão de doenças de Transmissão hídrica e alimentar), v. 4, 2004. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/revp04_vol4n1.pdf > Acesso em: 24 mar. 2011.

TIMPERIO, A. M.; MAGRO, P.; CHILOSI, G.; ZOLLA, L. Assay of ochratoxin A in grape by high-pressure liquid chromatography coupled on line with an ESI-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 832, p. 127-133, 2006.

USDA - United States Department of Agriculture. Disponível em: < <http://www.usda.gov> > Acesso em: 24 mar. 2010.

VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 815, p. 75-92, 1998.

VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 72-81, 2006.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretroides em água e análise por GC. **Química Nova**, v. 30, p. 535-540, 2007.

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

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 129-144, 2011.

ZINEDINE, A.; MAÑES, J. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. **Food Control**, v. 20, p. 334-344, 2009.