UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE TECNOLOGIA – ESCOLA DE QUÍMICA

ROSANA PEREIRA DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E ANÁLISE DE OCRATOXINA A EM SUCO INTEGRAL E NÉCTAR DE UVAS INDUSTRIALIZADOS

Rio de Janeiro
ABRIL/2015

ROSANA PEREIRA DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E ANÁLISE DE OCRATOXINA A EM SUCO INTEGRAL E NÉCTAR DE UVAS INDUSTRIALIZADOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (M.Sc.).

Orientadores: Karen Signori Pereira, D.Sc.
Bernardete Ferraz Spisso, D.Sc.

Rio de Janeiro
2015

Santos, Rosana Pereira dos
Desenvolvimento, Validação de Metodologia e Análise de Ocratoxina A em Suco Integral e Néctar de Uvas Industrializados/ Rosana Pereira dos Santos. - - Rio de Janeiro, 2015.
100 f. il. 30 cm.

Orientadora: Karen Signori Pereira.
Coorientadora: Bernardete Ferraz Spisso.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2015.

1. Micotoxinas. 2. Ocratoxina A. 3. Suco de uva. 4. Coluna de imunoafinidade. 5. HPLC. I. Pereira, Karen Signori, orient. II. Spisso, Bernardete Ferraz, coorient. III. Título.

Rosana Pereira dos Santos

DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E ANÁLISE DE OCRATOXINA A EM SUCO INTEGRAL E NÉCTAR DE UVAS INDUSTRIALIZADOS

Dissertação de Mestrado submetida ao corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências, e executada sob orientação das professoras Dra Karen Signori Pereira – UFRJ/EQ e Dra Bernardete Ferraz Spisso (Fiocruz/INCQS).

Aprovada em 06 de abril de 2015

(Karen Signori Pereira, Drª. Sc, UFRJ)

(Bernardete Ferraz Spisso, Drª. Sc, FIOCRUZ)

(Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto, Drª. Sc, UFRJ)

(Christina Maria Queiroz de Jesus Morais, Drª. Sc, FIOCRUZ)

(Marco Antonio Mota da Silva.D Sc, UEZO)

Dedico este trabalho à minha família. Minha mãe Eunice, minhas irmãs Simone e Elaine, minha sobrinha Ana Clara, e em memória de meu tio e avós. Vocês são meu refúgio, força e fé.

Agradecimentos

Ao Meu Pai Maior pelo amor incondicional que Ele tem por todos os filhos, sem distinção. Pela força que Ele nos envia através dos familiares, amigos e desconhecidos, que pelo simples bom dia pode nos encher de carinho. Pela proteção que Ele sempre nos dá nos momentos em que o choro é o único alívio.

Às minhas orientadoras Dra. Karen Signori Pereira e Dra Bernardete Ferraz Spisso, pela confiança, apoio e orientação para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos e ao corpo de gestão pelo ensino de qualidade e o incentivo.

À minha família, que é a minha base para ter segurança em tudo o que realizo. Nesses anos tive que aprender a me dividir entre a família e os estudos. Foi a prova mais difícil, porque mesmo com todas as dificuldades acadêmicas não deixei de dar apoio nos momentos mais caros por que passamos.

Ao meus amigos Maria Heloisa Paulino de Moraes e André Sartori, por todo o ensinamento, apoio e incentivo.

Às amigas Adélia Mara, Mychelle Alves, Patrícia Condé, Vânia Chaves e Juliana Santos por sempre me ajudarem nos momentos mais difíceis, pelo carinho sem condições, por tudo o que vocês representam. À todos os amigos que me apoiaram, mesmo a distância.

À Nínive Matos pela paciência, educação e apoio na realização desse trabalho. As minha amigas Claudia e Angela pelos momentos de descontração no café matinal. Aos amigos Yuri Souza e Fernanda Oliveira pelo carinho e torcida.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fiocruz, ao Laboratório de Resíduo de Micotoxinas pelo apoio financeiro e uso das dependências, e. aos LACENs que participam do Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes em Alimentos (PROMAC).

RESUMO

SANTOS, Rosana Pereira dos**, Validação de Metodologia para Análise de Ocratoxina A em Suco Integral e Néctar de Uvas Industrializados.** Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação intralaboratorial de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência para a determinação da OTA em suco de uva integral e néctar de uva. O método fundamenta-se na extração da OTA das matrizes utilizando polietilenoglicol 8000 e bicarbonato de sódio, com purificação do extrato por coluna de imunoafinidade Ochraprep e posterior detecção e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por fluorescência. O intervalo de medição linear da curva de calibração foi definido de 0,3 a 10,1 ng mL^{-1}. Os limites de detecção e de quantificação foram de 0,03 e 0,1 ng mL^{-1} , respectivamente. Para níveis de contaminação de 0,099 a 1,98 ng mL^{-1} a faixa de recuperação foi de 73 – 104%, em condições de precisão intermediária inferior a 20% e desvio padrão relativo inferior a 20%. O método apresentou-se robusto quando colunas de imunoafinidade da marca Vicam foram utilizadas. Utilizando o método validado, foram analisadas 28 amostras provenientes do Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes em Alimentos (PROMAC). A OTA não foi detectada nas amostras analisadas, indicando que se a amostragem foi representativa as boas práticas na cultura agrícola da uva foi adotada.

Palavras-chave: Micotoxinas, OTA, Suco de uva; Coluna de imunoafinidade; HPLC

ABSTRACT

SANTOS, Rosana Pereira dos**, Methodology Validation for Ochratoxin A in Analysis Wholer Juice and Grape Nectar Manufactory.** Rio de Janeiro, 2015. Dissertation (Master in Chemical and Biochemical Process Technology) – School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The objective of this work was the development and validation of an analytical method by high performance liquid chromatography with fluorescence detection for determining the mycotoxin ochratoxin A in whole grape juice and grape nectar. The method is based on the extraction of ochratoxin A from the matrices using polyethylene glycol 8000 and sodium bicarbonate, with the clean up of the extract performed with Ochraprep immunoaffinity column and subsequent detection and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography with fluorescence detection. The linear measuring interval of de calibration curve was definided from 0.31 to 10.1 $ng.mL^{-1}$. Detection and quantification limits were of 0.03 and 0.1 $ng.mL^{-1}$ respectively. For contamination levels from 0.099 to 1.98 ng mL-1, the recovery interval was from 73-104%, in intermediate precision conditions below 10% and relative standard deviation below 20%. The method showed to be robust when Vicam immunoaffinity columns werw employed. Using the validated method 28 samples from the National Monitoring Program for Additives and Contaminants in Food (PROMAC) were analyzed Ochratoxin A was not detected in analysed samples, indicating that if sampling was representative good agricultural practices in grape culture are being adopted.

Palavras-chave: Ochratoxin A, Juice Grape**,** Immunoaffinity Column, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A: uva Bordo; B uva Isabel; C: uva Niágara Branca 19
Figura 2. Etapas do procesamento de elaboração do suco de uva integral 22
Figura 3. D: Cacho de uva com sintomas de antracnose; E: Cacho de uva com podridão amarga; F: Cacho de uva com podridão cinzenta 23
Figura 4. Cacho de Chardonnay com sintomas de podridão-ácida 24
Figura 5. A: *Aspergillus ochraceus;* B: *Penicillium Verrucose;* C: *Aspergillus Níger* 26
Figura 6. A: Estrutura química da OTA 30
Figura 7. Estrutura geral dos metabólitos da OTA 30
Figura 8. Principios da coluna de imunoafinidade 36
Figura 9. Preparo das soluções intermediárias de OTA 51
Figura 10. Método 1 – Etapas do processamento 53
Figura 11. Método 2 – Etapas do processamento 54
Figura 12. Método 3 – Etapas do processamento 54
Figura 13. Método 4 – Etapas do processamento 55
Figura 14. Método 1 - Avaliação da seletividade. Cromatogramas, A: amostra branco de suco integral de uva tinto; B: Padrão de OTA 0,37 ng mL^{-1} 71
Figura 15. Método 2 – Avaliação as seletividade. Cromatogramas A: amostra branco de suco integral de uva tinto; B: Padrão de OTA 0,37 ng ml^{-1} 72
Figura 16. Método 2; Cromatograma: Amostra de suco de uva tinto integral fortificada com OTA na etapa inicial do método 72
Figura 17. Método 2 - Teste de recuperação. Cromatogramas: A: amostra de suco de uva tinto integral fortificada com 0,5 $ng.mL^{-1}$ de OTA na etapa final do método; B: Branco do método fortificado com 0,5 ng ml^{-1} de OTA 73
Figura 18. Método 3. Cromatograma: A: Amostra branco de néctar de uva tinto; B: Padrão de OTA 73
Figura 19. A: cromatogramas obtidos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial: A: solução padrão de OTA; B: Amostra branco de néctar de uva 74

Figura 20. Método 4 – Teste de seletividade: A: amostra branco de suco de uva tinto integral; B: amostra branco de néctar de uva tinto 74
Figura 21. Método 4 – Teste de recuperação: A: padrão de OTA 0,30 ng mL^{-1}; B: amostra de suco de uva branca integral fortificada com 0,1 ng mL-1 de OTA 75
Figura 22. Curva de calibração final, com a equação de regressão 76
Figura 23. Gráfico de Durbin-Watson (e_i x e_{i-1}) para a curva de calibração 79
Figura 24. Método 4 – Teste de Robustez com coluna de imunoafinidade Vicam. Cromatograma de amostra de suco de uva tinto integral fortificada com 0,099 ng mL^{-1} de OTA 82
Figura 25. Gráfico da quantidade de amostras por Estado comercializador 84
Figura 26. Gráfico da quantidade de amostras por Estado produtor 85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição dos radicais dos metabólitos da OTA 31

Quadro 2. Critérios de aceitação de recuperação de métodos quantitativos 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Preparo das soluções de trabalho para a curva de calibração 51

Tabela 2. Áreas correspondentes a massa de Ota em 50µL injetados. Destaque em vermelho para o valor aberrante 75

Tabela 3 Teste Ryan-Joiner para a normalidade dos resíduos 77

Tabela 4. R_{eq} e R_{crit} calculados 77

Tabela 5: Dados da homocedasticidade dos resíduos 78

Tabela 6. Dados da independência dos Resíduos 78

Tabela 7. Limites d_l e D_u calculados 79

Tabela 8. Análise de variâncias para a significância de regressão e do desvio da linearidade 79

Tabela 9 Método 4 – Dados das fortificação nos três níveis 80

Tabela 10 Método 4 –dados da fortificação no LOQ 81

Tabela 11 Método 4 - Dados da recuperação, repetibilidade e precisão intermediária 81

Tabela 12. Método 4 – Teste de robustez usando coluna de imunoafinidade Vicam para avaliar a recuperação no LOQ 83

Tabela 13 Método 4 – Teste de robustez, dados da recuperação e desvio padrão 83

SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
BA:	Bahia
CLAE/F	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por fluorescência
EMBRAPA:	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EN:	Norma Européia
EUA	Estados Unidos da América
FAO	*Food and Agriculture Organization;* Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
HAc	Ácido acético
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
INCQS:	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde
JECFA:	*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, Comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares e Contaminantes
Mercosul	Mercado Comum do Cone Sul
NaCl	Cloreto de sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
ng	nanograma
nm	nanômetro
OTA:	Ocratoxina A
OTB:	Ocratoxina B
OTC:	Ocratoxina C
OTα	OTAlfa
PE:	Pernambuco
PEG	Polietileno glicol
PROMAC	Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes
PVDF:	Difluoreto de polivinilideno
µg	*micrograma*
UV:	Ultravioleta
Vis:	Visível
WHO;OMS:	*World Health Organization;* Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
2.1 Produção de Uva no Brasil 18
2.2 Consumo de Suco de Uva Integral 18
2.3 Propriedades Físico-Químicas do Suco de Uva 20
2.4 Produção do Suco Integral e Néctar de Uvas 21
2.5 **Presença de Fungos em Uvas** 22
2.5.1 Micotoxinas 24
2.5.1.1 Ocratoxina A (OTA) 26
2. 5.1.1.1 Fungos Produtores de OTA 26
2.5.1.1.2 Toxicologia da OTA 28
2.5.1.1.3 Estrutura Química da OTA..... 29
2.5.1.1.4 Exposição Humana à OTA..... 31
2.5.1.1.5 Presença de OTA em Derivados de Uva..... 32
2..5.1.1.6 Regulamentação para OTA em Alimentos no Brasil 33
2.5.2 Técnicas Analíticas para a Determinação de Micotoxinas em Alimentos 35
2.5.2.1 cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 37
2.5.2.1.1 Componentes Essenciais para a CLAE 37
3. PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS 41
3.1 Seletividade 41
3.2 Curva de Calibração 41
3.3 Teste de Homocedasticidade 42
3.4 Equação da Regressão 43
3.5 Precisão 44
3.5.1 Repetibilidade (precisão intra-corrida) 44
3.5.2 Precisão Intermediária (precisão inter-corridas) 44
3.6 Limite de Detecção 44
3.7 Limite de Quantificação 45
3.8 Recuperação 45

3.9 Robustez..... 46
4. JUSTIFICATIVA 47
5. OBJETIVOS 47
5.1 Objetivos Gerais..... 47
5.2 Objetivos Específicos 47
6 METODOLOGIA 48
6.1 Materiais 48
6.1.1 Reagentes, Solventes e Padrão 48
6.1.2 Equipamentos e Acessórios..... 48
6.1.3 Amostragem..... 49
6.2 Procedimentos 50
6.2.1 Preparo da Solução Estoque de OTA 50
6.2.2 Preparo das Soluções Intermediárias de OTA 50
6.2.3 Preparo das Soluções de Trabalho para a Curva de Calibração 51
6.3 Otimização da Metodologia Analítica 52
6.3.1 Método 1 52
6.3.2 Método 2 53
6.3.3 Método 3 54
6.3.4 Método 4 54
7. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA SELECIONADA 58
7.1 Seletividade do Método 58
7.2 Linearidade do Método 58
7.3 Recuperação e Precisão do Método..... 64
7.4 Limites de Detecção e Quantificação do Método 64
7.5 Robustez do Método 64
7.6 Sugestão para a Determinação da Incerteza da Medição do Método 65
7.6.1 Preparo da Amostra 65
7.6.2 Repetitividade 66
7.6.3 Recuperação 67
7.6.4 Curva de Calibração 68
7.6.5 Incerteza da Solução Padrão 68
7.6.6 Incerteza Combinada..... 70

7.6.7 Incerteza Expandida 70
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO 71
8.1 Método1 71
8.2 Método 2 71
8.3 Método 3 73
8.4 Método 4 74
8.5 Resultado da Avaliação da Linearidade da Curva Analítica 75
8.5.1 Tratamento de Valores Extremos 75
8.5.2 Teste de Normalidade 76
8.5.3 Teste de Homocedasticidade 77
8.5.4 Teste de Independência dos Resíduos (autocorrelação dos resíduos)..... 78
8.5.5 Teste de Significância da Regressão e Desvio de Linearidade..... 79
8.6 Resultados da Recuperação e Precisão do Método Validado 80
8.7 Resultado da Robustez do Método 82
8.8 Procedimento Operacional Padrão – POP 83
8.9 Análise de OTA nas Amostras de Suco Integral e Néctar de Uvas do Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes 84
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 86
10. CONCLUSÕES..... 88
11. PESPECTIVAS FUTURAS 89
REFERÊNCIAS 90
ANEXO 100

1.INTRODUÇÃO

A cultura da uva (*Vitis sp*) está em amplo crescimento no Brasil, principalmente na região sul. A uva é um produto que pode ser aproveitado, não somente para a produção de vinho, mas de suco integral de uva, que atualmente vem disputanto o mercado interno com espumantes e o próprio vinho. O interesse do consumidor brasileiro pelo suco de uva deve-se não somente pelo sabor, mas tem parte com a composição química da uva, de diferentes cultivares e da forma de obtenção do suco, que pode ser tanto artesanal, quanto industrializado, o que leva a uma gama de valor nutricional, que beneficia energética e terapeuticamente.

Entretanto, pelo Brasil ser um país tropical, com uma diversidade de climas, a cultura vieira pode sofrer, dependendo do período climático, o ataque de várias doenças, dentre elas as provocadas por fungos. Os fungos, em condições adequadas, podem gerar micotoxinas, como a ocratoxina A (OTA), que é uma toxina resistente ao aquecimento e foi classificada como possível agente carcinogênico.

A importância sanitária da OTA impulssionou o governo a autorizar alterações na legislação brasileira, adotando limites de restrição baseados em normas internacionais. A alteração na legislação fez com que os orgãos públicos de fiscalização e as indústrias pesquizassem métodos analíticos mais sensíveis, como a cromatografia líquida de alta eficiência, e que estejam dentro dos critérios estatísticos estabelecidos pelos orgão que norteiam o controle de qualidade no Brasil, como o Instituto Nacional de Metrologia (Inmetro) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de Uva no Brasil

O cultivo de uvas no Brasil ocupa 81 mil hectares, com vinhedos desde o extremo Sul até regiões próximas à Linha do Equador, com mais de 90% da produção nacional de uva sendo utilizada na elaboração de vinhos (MAPA, 2014). A maior área cultivada do país localiza-se no Rio Grande do Sul, com cerca de 63 mil hectares, (CANAL RURAL, 2013). Este produz cerca de 777 mil toneladas de uva por ano, sendo elaborados 330 milhões de litros de vinhos e mostos (sumo de uvas frescas que ainda não tenham passado pelo processo de fermentação), por ano, representando a maior produção de uva e derivados do país (BRASIL, 2014).

O Nordeste é outra região que se destaca. Os pólos de frutas de Petrolina (PE) e de Juazeiro (BA) localizados no Vale do São Francisco, são responsáveis por 95% das exportações nacionais de uvas finas de mesa (BRASIL, 2014). Os Estados de Santa Catarina, Paraná e Minas Gerais também se destacam na produção de uva (CANAL RURAL, 2013).

2.2 Consumo de Suco de Uva Integral

Suco integral de uva é uma bebida obtida do mosto simples, não fermentada, não diluída e sem adição de açúcar. Porém, ocorre uma exceção prevista na Portaria n° 001/1987 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) que permite a adição de conservantes ao suco integral, mas se isto ocorrer, deverá estar escrito nos ingredientes do rótulo (BRASIL, 2013).

O suco de uva tinto é elaborado com uvas tintas, como a Bordo e a Concord. O suco de uva rosé é elaborado com uvas tintas mais claras, como a Isabel, e uvas rosadas, como a Niágara Rosada. Já o suco de uva branco é elaborado com uvas brancas como a Niágara Branca, por exemplo (Figura 1) (BRASIL, 2013).

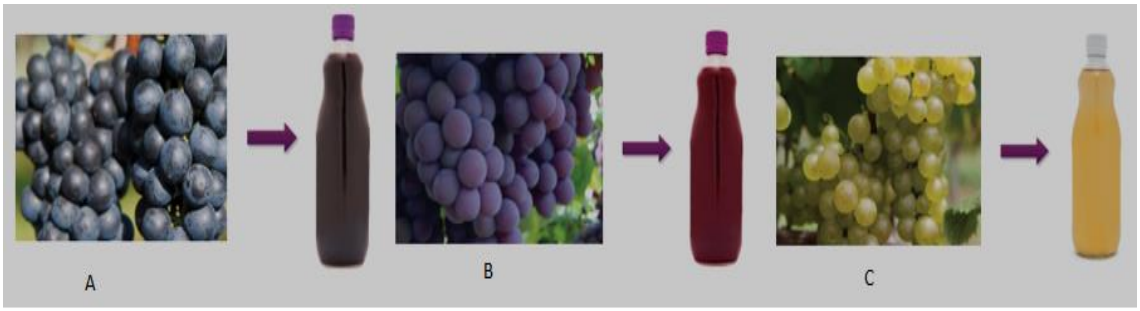


Figura 1: A: uva Bordo; B: uva Isabel; C: uva Niágara Branca.
Fonte: Adaptada de http://www.sucodeuvadobrasil.com.br/publicacoes-cientificas

O suco de uva integral é o segundo derivado de uva mais vendido no Brasil. Desde 2004, o aumento registrado é de 144% (MAPA, 2015). No ano de 2014 foram comercializados 90 milhões de litros de suco de uva prontos para o consumo (CANAL RURAL, 2015). Em 2013, a comercialização foi de 72 milhões de litros de suco integral no mercado, quase 44% a mais do que no ano de 2012 (PME, 2015).

Há, ainda, seis milhões de litros de outros tipos de sucos, como os reconstituídos, vendidos para indústrias. Os dados são da Serra Gaúcha, mas no Vale do São Francisco a produção foi de 300 mil litros registrados em 2013 (IBRAVIN, 2014). A fruticultura no Vale do São Francisco apresenta rápida expansão da área cultivada, elevado crescimento da produção e desenvolvimento do setor exportador de frutas (MAPA, 2015).

A uva de mesa do Vale do São Francisco é produzida por diferentes extratos, com participação significativa de pequenos produtores, que representam 70% dos viticultores, e que embora detenham apenas 17% da área cultivada, produzem mais de 60% da uva do vale (MAPA, 2015).

Com o intuito de divulgar as vantagens do suco de uva integral para uma vida saudável, incluindo crianças e atletas, o Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN) criou o movimento Suco de Uva do Brasil 100%. Esta ação visa fortalecer o produto e incluir novos consumidores na cadeia produtiva da uva. Muitas vinícolas, mesmo as pequenas familiares da Serra Gaúcha, estão começando a se interessar pelo produto. Outras grandes companhias já colhem os resultados dos investimentos feitos a partir do fim dos anos 90. Atualmente, cerca de 10% da produção de uva do país é utilizada na elaboração de sucos (IBRAVIN, 2015).

2.3 Propriedades Físico-Químicas do Suco de Uva.

A composição química do suco de uva depende especialmente da variedade, da origem, da maturação e do tipo de processamento ao qual o produto foi submetido. A qualidade do suco de uva depende da sua composição química. O sabor se deve aos ácidos, açúcares e substâncias fenólicas; seu aroma é uma mescla de distintos metabólitos secundários voláteis em pequenas quantidades e a cor se deve às antocianinas, a seus glicosídeos e produtos de condensação; (GURAK, 2010).

Porém esta composição difere muito pouco da composição do fruto. Além da água, constituinte maior, o suco de uva apresenta um elevado teor de açúcar, o que lhe garante o sabor doce e lhe atribui característica de bebida energética. Os dois açúcares predominantes são: a glicose e a frutose em partes aproximadamente iguais. Os ácidos tartárico, málico e cítrico determinam principalmente sua acidez, estes ácidos orgânicos atribuem um baixo valor de pH, entre 2,90 e 3,43 (RIZZON, LA; MANFROI, V; MENEGUZZO, J., 1998).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o suco de uva é uma bebida que pode se apresentar límpida ou turva, extraída da uva mediante processo tecnológico adequado, não fermentado, não alcoólico, de cor, aroma e sabor característicos, submetido a tratamento que assegure a sua concentração e apresentação até o momento do consumo (BRASIL, 2015).

Aliado às propriedades sensoriais e valor nutricional, o suco de uva pode contribuir na dieta alimentar, pois em sua composição estão todos os constituintes principais do próprio fruto: açúcares, ácidos, substâncias minerais, vitaminas e compostos fenólicos. Pode-se dizer também, que é uma bebida diferenciada tanto no aspecto energético quanto terapêutico e de fácil digestibilidade, sendo seus componentes facilmente assimiláveis pelo organismo humano (RIZZON & MENEGUZZO, 2007).

Além de concentrar sais minerais, antioxidantes e outros nutrientes, a bebida também atua no tratamento de acúmulo do colesterol, quando consumida freguentemente (DAVID, 2007). As propriedades do suco são obtidas a partir dos bioativos naturais da fruta, enriquecidos no processo de fabricação, onde o líquido é

aquecido, aumentando as trocas químicas entre casca, polpa e sementes, essa troca libera mais polifenóis (LIMA, 2014).

2.4 Produção do Suco Integral e Néctar de Uvas

A história da elaboração do suco de uva começou nos Estados Unidos em 1868, na cidade de Vineland, New Jersey. Um grupo de religiosos resolveu aplicar as idéias de Louis Pasteur na elaboração de uvas Concord, e assim puderam fazer um "vinho não fermentado sacramental" para uso em sua igreja. O sucesso foi grande que em 1893, o suco de uva era a bebida favorita nos Estados Unidos. E em 1897, foi instalada a primeira planta para a elaboração de suco de uva na cidade de Westfiel, em Nova York, com uma produção de 300 toneladas métricas de uva por este grupo de religiosos (NEGREIROS, 2014).

No Brasil, tanto a colheita quanto o processamento da uva ocorrem nos meses de janeiro e fevereiro. O processo mais difundido para a produção de suco de uva integral, entre as empresas produtoras, consiste na extração da cor a quente. Neste processo, as uvas, após serem separadas do engace e esmagadas, são aquecidas a 60 – 80ºC (GURAK, 2010). Este método de extração tem efeito positivo na quantidade de compostos fenólicos presentes no suco de uva (FRANKEL et al., 1998). Após a extração da cor o mosto é escorrido, prensado a frio e, posteriormente, centrifugado para eliminar impurezas (RIZZON & MENEGUZZO, 2007). Procedem-se em seguida as etapas de clarificação, filtração, pasteurização e engarrafamento (Figura 2).

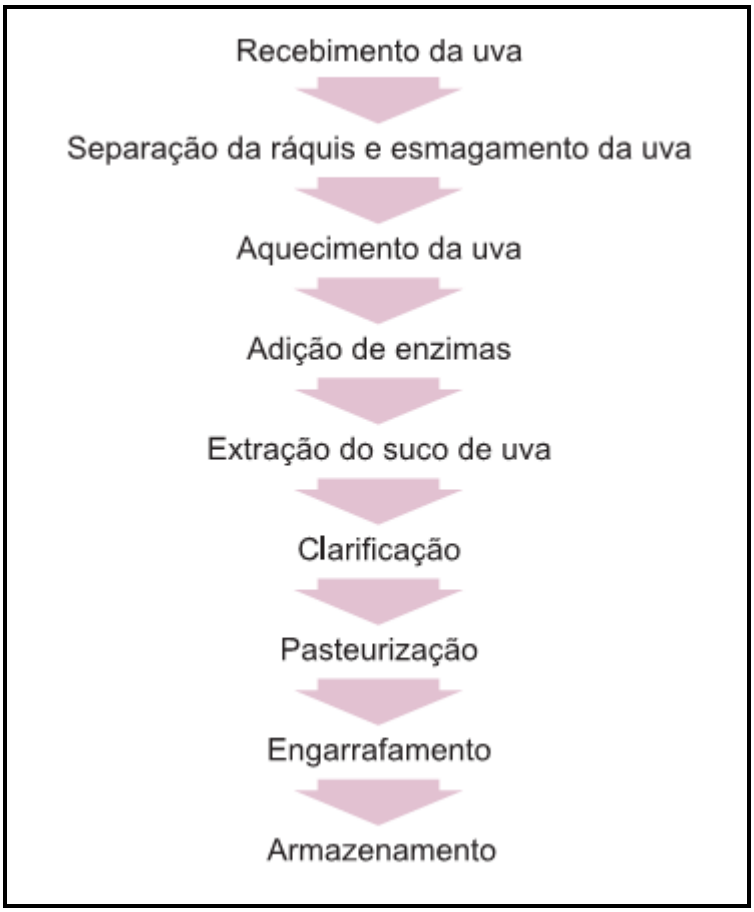


Figura 2: Etapas do processo de elaboração do suco de uva.
Fonte: RIZZON, MENEGUZZO, 2007.

Este processo origina um suco diferenciado a cada safra, pois o suco vai refletir a qualidade e as características de cada ano. Uma possibilidade é estabilizar, concentrar e armazenar o suco de uva para reconstituí-lo e embalá-lo posteriormente, com isto, pode-se elaborar um suco mais parecido ao longo dos anos. Outra característica importante é que o suco, assim como o vinho, pode ser tinto, rosé ou branco (RIZZON & MENEGUZZO, 2007).

2.5 Presença de fungos em uvas

As doenças fúngicas constituem-se num dos principais problemas da viticultura, como a antracnose, a escoriose, o míldio, o oídio, os tipos de podridão, a fusariose, a roseliniose, entre outras (Figura 3). A podridão é a enfermidade mais grave da uva, porque pode originar a redução da quantidade e qualidade do produto, porque a podridão pode se dar a partir da ráquis e desenvolvimento dos cachos, a

medida que os frutos amadurecem, levando a perdas econômicas (SÔNEGO & GARRIDO, 2012).

D **E** **F**

Figura 3: **D**: Cacho de uva com sintomas de antracnose; **E**: Cacho de uva com podridão Amarga; **F**: Cacho de uva com podridão cinzenta
Fonte: http://sistemasdeprodução.cnptia Embrapa.br/fontes TML/Uva/UvaAmericanaHibrida ClimaTemperado/doença.htm

No Estado do Paraná, o maior problema é a podridão ácida, que ocorre no período da primeira colheita, ou seja, nos meses de novembro a janeiro (GENTA et al*.,* 2001). A podridão ácida é causada por um complexo de microrganismos que inclui fungos dos gêneros: *Aspergillus***,** *Penicillium***,** *Cladosporium***,** *Alternaria***,** *Diplodia* e *Rhizopus*, bem como leveduras e bactérias acéticas, como *Gluconobacter spp.* e *Acetobacter spp*. (LOUREIRO & MALFEITO-FERREIRA, 2003).

A podridão ácida é facilmente reconhecida pela coloração marrom-clara (Figura 4), decomposição da polpa, pelas películas escurecidas e aderidas ao pedúnculo e pelo odor de acetato de etila ou ácido acético. A podridão ácida reduz o preço e a competitividade das uvas do grupo Itália no mercado nacional (GUERZONI & MARCHETTI, 1987; SÔNEGO & GARRIDO, 2012).

Figura 4: Cacho de uva com sintomas de Podridão-ácida
Fonte: http://www.cnpuv.embrapa .br/tecnologias/vidia/pod_acida.html

2.5.1 Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos. O termo micotoxinas é derivado da palavra grega *Mykes*, que significa fungo, e *toxicum*, que significa veneno ou toxina (GONÇALEZ et al., 2001).

Foi no início dos anos 60, que se atraiu a atenção para as micotoxinas e as suas implicações na saúde humana e animal. Com a chegada de uma doença onde a causa da morte dos animais era desconhecida, que vitimou milhares de perus na Inglaterra, essa doença foi designada doença X dos perus. A investigação mostrou que a morte ocorreu devido a ingestão de rações à base de farinha de amendoim, provenientes do Brasil, contaminadas com um metabolito tóxico produzido por um fungo, *Aspergillus flavus*. O composto químico tóxico foi isolado e identificado, como Aflatoxina (OGA, 2003; JACOBSEN et al, 2005).

Os fungos micotoxigênicos envolvidos na cadeia alimentar de humanos e animais pertencem principalmente a três principais gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Durante a secagem e estocagem dos alimentos, são encontrados como contaminantes presentes os dois primeiros gêneros. Já o terceiro é um patógeno

encontrado nas plantas, produz micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita (MAIA & SIQUEIRA, 2007).

As micotoxicoses são intoxicações resultantes da ingestão de alimentos contendo micotoxinas, geralmente, produzidas atraves dos metabólitos tóxicos, que podem ser ingeridos pelo homem e animais, por alimentos, ração animal e forragens (GONÇALEZ et al., 2001). As micotoxinas diferenciam-se das toxinas bacterianas por não terem natureza proteica, nem serem imunogênicas (CIB, 2004).

Diversos fatores tais como, umidade e temperatura ambientais, teor de umidade e atividade de água do subtrato, favorecem o crescimento de fungos e a consequente produção de micotoxinas em produtos alimentícios (PATERSON & LIMA, 2010). O clima quente e úmido propicia boas condições para o desenvolvimento de fungos, por isso, a incidência de micotoxinas nos alimentos é relativamente alta em regiões tropicais e subtropicais (RUSTOM, 1997).

A biossíntese de micotoxinas ocorre, na maioria das vezes, em substrato com elevado teor de umidade ou em grãos com danos mecânicos, provocados por infestação de insetos ou resultado da inadequação da colheita, o que facilita a entrada de microrganismo. Isto ocorre predominantemente em áreas com altas temperaturas (25 a 30ºC) e umidade relativa do ar superior a 80%.(KHOURY & ATOUI, 2010).

O Comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares e Contaminantes, *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), faz avaliações de risco para determinar a relação entre e os valores de ingestão diária tolerável provisória e a ingestão semanal tolerável provisória. Estas avaliações incluem: identificação dos agentes tóxicos, a magnitude e a severidade dos efeitos tóxicos, a relevância da duração da exposição (aguda e crônica), grupos que podem ser vulneráveis e outras informações que podem ser importantes para a avaliação de risco (JECFA, 2001).

Cerca de 400 micotoxinas são conhecidas, as quais são classificadas em diferentes grupos de acordo com suas características químicas. Devido à ocorrência e toxicidade, aproximadamente, 30 micotoxinas são consideradas mais relevantes e algumas possuem seus níveis máximos regulamentados em diversos países. (BENNETT & KLICH, 2003).

Outras micotoxinas, devido à sua frequente ocorrência em alimentos, co-ocorrência com micotoxinas relevantes, ou que se pensa que podem ter envolvimento em micotoxicoses ocasionais, como ácido ciclopiazónico, esterigmatocistina, citrinina, micotoxinas termorgênicas, penitrininas, citrioviridinas, ácido penicílico, toxinas de *Alternaria*, suscitam alguma preocupação, mas não há dados suficientes para se estabelecer o risco real destas micotoxinas para a saúde (FERNANDEZ, 2007).

2.5.1.1 Ocratoxina A

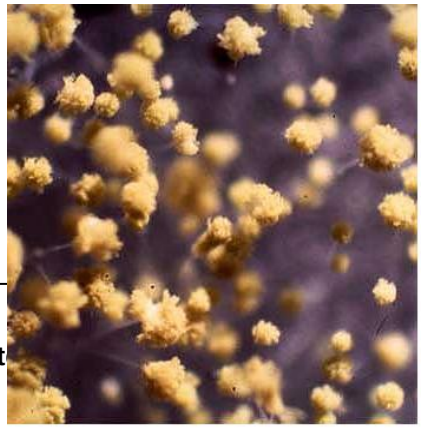
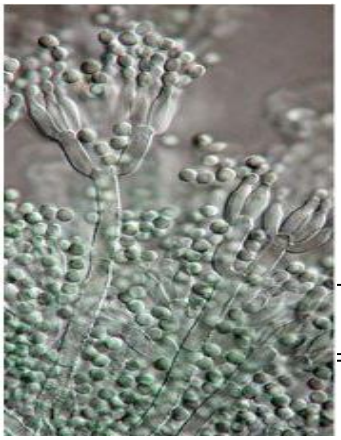
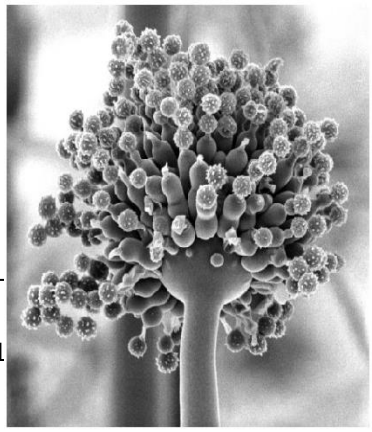
O grupo das ocratoxinas divide-se em ocratoxina A (OTA), ocratoxina B (OTB), ocratoxina C (OTC) e ocratoxina α (OTα). São micotoxinas produzidas por algumas espécies de fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, como exemplo as espécies *A. carbonarium, A. niger* (SOMMA, 2012), *A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. auricomus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, and *A. sulfureus*, *A. alliaceus* e *albertensis*, *A. niger, A. carbonariu, A. glaucus e Penicillium verrucosum* (BAYMAN et al., 2002).

Em termos de síntese, trata-se de um metabólito secundário derivado da família das dihidrocumarinas ligado a uma molécula de L-β-Fenilalanina (KHOURY, 2010).

A OTA foi descoberta em 1965 durante uma grande pesquisa de metabólitos de fungos concebida especificamente para identificar novas micotoxinas. Pouco tempo depois, em 1969, o metabólito foi isolado do *Aspergillus alutaceus* (atualmente conhecido como *Aspergillus ochraceus*), a partir de uma amostra comercial de milho nos Estados Unidos e foi reconhecido como uma potente nefrotoxina (BENNETT; KLICH, 2003).

2.5.1.1.1 Fungos Produtores de OTA

As principais espécies produtoras de OTA são, *A. carbonarium,* relatado como a espécie produtora mais comum (PITT, 2000; WHO, 2001), *A. niger* (SOMMA, 2012), *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum* (BARCELOUX, 2008) (Figura 5).

Font *us* C:
=21

Dentro do gênero *Aspergillus* destacam-se *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius*. Esta última pode aparecer nas uvas, contaminando os produtos (polpa da fruta, vinho, passas) com OTA (WHO, 2001). A espécie *Aspergillus niger* apresenta uma ampla distribuição e é utilizada em diversos processos industriais, sendo deste modo um potencial risco (SOMMA, 2012).

No gênero *Penicillium*, acreditava-se que a espécie *Penicillium verucosum* era a única espécie produtora de OTA. Contudo, sabe-se hoje que a espécie *Penicillium nordicum* é também capaz de produzir OTA, sendo que *Penicillium verucosum*, predominantemente encontrada nos cereais armazenados e a *Penicillium nordicum* são as principais produtoras de OTA, encontradas em produtos como chouriço e presunto (KHOURY & ATOUI 2010). Estas duas espécies de *Penicillium* são as principais produtoras de OTA em regiões frias e temperadas, enquanto que o *Aspergillus ochraceus* é o principal produtor em regiões tropicais e semitropicais. As espécies envolvidas na produção desta micotoxina variam de localização para localização uma vez que as condições que cada uma das espécies requer para o seu crescimento são diferentes (BARCELOUX, 2008).

A composição do substrato e fatores físicos, tais como atividade de água, temperatura e pH são determinantes na produção da ocratoxina (RODRÍGUEZ et al., 2012).

Os fungos, em sua maioria, necessitam de umidade relativa acima de 80 % e uma atividade de água mínima para crescer. Normalmente, a produção de toxina não ocorre a uma umidade relativa abaixo desse valor. As toxinas podem ser produzidas em atividades de água que vão de 0,60 a 0,90 em alimentos com uma

umidade intermédia. A maioria dos fungos são organismos mesófilos, apresentando um crescimento ótimo a temperaturas entre os 25 e os 30 ºC (IAMANAKA et al., 2005). Aspergillus ochraceus produz ocratoxina de 20 até 30°C, mas nunca abaixo de 12°C. A mesma micotoxina é produzida por Penicillium viridicatum entre 4 e 31°C (KNOWMYCOTOXINS, 2015).

O pH também é um fator importante no desenvolvimento dos fungos. Estes apresentam uma capacidade de sobrevivência num intervalo de pH que varia entre 2,5 e 9,5, mas o seu crescimento ótimo, onde pode ocorrer formação de micotoxinas, dá-se num pH ácido, em intervalo entre 5-6 (IAMANAKA et al., 2005).

2.5.1.1.2 Toxicologia da OTA

Dentre todas as ocratoxinas, a OTA é a mais tóxica e a mais relevante (KHOURY, 2010). A Agência Internacional de Pesquisa de Câncer classificou a OTA como um possível carcinógeno humano, com a classificação IIB (IARC, 1993).

Ingerida através de alimentos contaminados, a OTA tem sua absorção facilitada pelas propriedade ácidas do estômago e a alta afinidade de ligaçao às proteínas plasmáticas. Cerca de 99% liga-se à albumina, retardando a eliminação, contaminando, assim, a carne, leite e derivados dos animais (CARDOZO ET AL, 2014; PFOHL-LESZKOWICZ, 2007).

A sua importância deve-se às suas propriedades carcinogênicas, nefrotóxicas, teratogênicas, imunotóxicas e pelas propriedades neurotóxicas. A OTA é imunotóxica na ordem de µg. L^{-1} (DACHOUPAKAN, 2009).

A nefrotoxicidade é o efeito mais notório da OTA. A ação da ocratoxicose afeta os rins, causando alteração da filtração glomerular, que é a primeira etapa na formação da urina e prejuízos no túbulos renais, sendo as principais consequências da intoxicação por OTA, levando a perda da capacidade de concentração urinária. Animais que consumiram rações com contaminação de 200 µg kg^{-1} de OTA contraíram nefropatias. A mortalidade pode chegar a 90% nos lotes afetados (MALLMANN, 2012).

A OTA está associada à nefropatia em humanos e tem sido sugerida uma relação entre a exposição a esta toxina e a Nefropatia Endêmica dos Balcãs, uma

doença progressiva caracterizada por redução da função renal e frequentemente fatal (PFOHL-LESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007).

Em 1950, foi descrito na região dos Balcãs uma doença renal, caracterizada pela presença de tumores no trato urinário, restrita a determinadas áreas geográficas e limitada a centros rurais. Essa doença veio mais tarde a ser denominada por Nefropatia Endêmica dos Balcãs (BAUTMAN, 2006; PFOHL-LESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007).

Em 1972, com base em observações epidemiológicas, sugeriu-se que micotoxinas estivessem na origem da Nefropatia Endêmica dos Balcãs e a limitação às zonas rurais seria explicada pelo consumo de alimentos produzidos e armazenados pela própria população (PFOHL-LESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007).

Tendo em conta as semelhanças entre a Nefropatia Endêmica dos Balcãs e a nefropatia induzida pela OTA nos suínos, pesquisas sugeriram que esta micotoxina estivesse envolvida na etiologia dessa doença (PFOHL-LESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007).

2.5.1.1.3 Estrutura Química da OTA

A OTA é um composto cristalino, cuja coloração pode variar de incolor a branco. Possui fórmula molecular $C_{20}H_{18}ClNO_6$, massa molar 403,82 g mol^{-1}, constante de acidez, pka, 7,1, ponto de fusão, quando recristalizado do benzeno, 90ºC e ponto de fusão, quando recristalizado do xileno, 169ºC. Em meio neutro ou ácido é altamente solúvel em solventes orgânicos polares, como acetona, alcoóis e clorofórmio, moderadamente em água e insolúvel em éter de petróleo e hidrocarbonetos saturados. Quando em meio básico é solúvel em soluções aquosas de bicarbonato de sódio. Quando sob luz ultravioleta, em meio ácido possui fluorescência de coloração verde, e em meio básico coloração azul (KHOURY, 2010).

Absorve no comprimento de onda de 333 nm, com emissão no comprimento de onda entre 440 e 475 nm. Sua absorção molar (ε), quando em solução de tolueno e ácido acético (99:1, v/v), é de 5440 m^2 mol^{-1}, já em solução de benzeno e ácido acético (99:1, v/v) possui absorção molar de 5550 m^2 mol^{-1} (TRUCKSESS,

2012). É constituída por uma dihidroisocumarina ligada pelo grupo 7-carboxilo a uma molécula de L-β-Fenilalanina, através de uma ligação amida (Figura 6). O seu nome químico é R-N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il)carbonil]-fenilalanina (nome IUPAC: 7-(L-β-fenilalanilcarbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocoumarina) (KHOURY & ATOUI, 2010). A Figura 6 mostra a estrutura química da OTA.

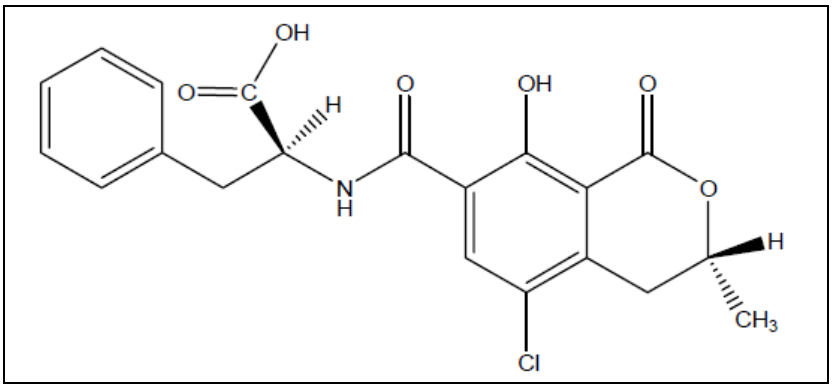


Figura 6: - Estrutura química da OTA.
Fonte: KHOURY, 2010.

A Figura 7 mostra a estrutura geral dos metabólitos da OTA e o Quadro 1 mostra a composição dos radicais.

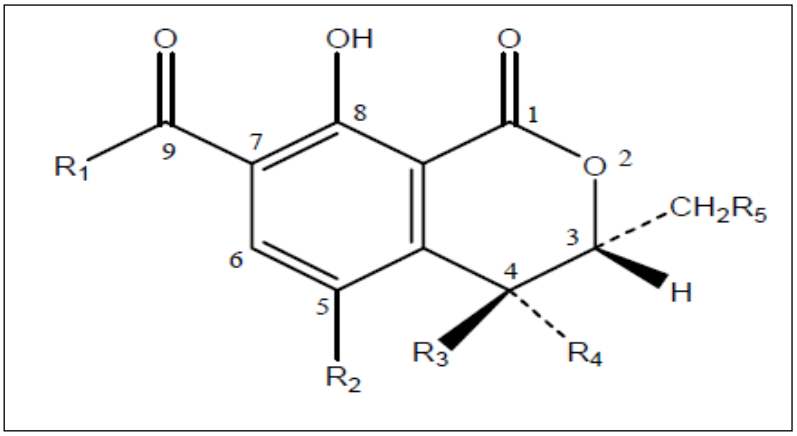


Figura 7: Estrutura geral do metabólitos da OTA.
Fonte: KHOURY, 2010.

Quadro 1: Composição dos radicais dos metabólitos da OTA

Ocratoxina	R1	R2	R3	R4	R5
OTB	Fenilalanina	H	H	H	H
OTC	Etil-éster, fenilalanina	Cl	H	H	H
OTα	OH	Cl	H	H	H
OTβ	OH	H	H	H	H

2.5.1.1.4 Exposição Humana à OTA

A exposição humana está comprovada pela contaminação de sangue, leite e urina pela OTA (RIBEIRO, 2007). A principal via de exposição humana à OTA é a via direta, que ocorre através do consumo de alimentos contaminados principalmente cereais, como milho, trigo, alimentos à base de cereais (MUSCARELLA et al., 2004; MAKUN et al., 2013; NGUYEN & RYU, 2014), café (CORONEL et al., 2011; VANESA & ANA, 2013), vinho, cerveja (ZHONG et al 2014; TERRA et al., 2013), suco de uva, nozes, amendoim, pistache (TOFFA et al., 2013, DEABES & EL-HABIB, 2011, CORONEL et al., 2012) e frutas secas (ZINEDINE et al., 2007; BIRCAN et al., 2009).

Por outro lado, a OTA pode também ocorrer por via indireta, através do consumo de produtos animais contendo resíduos da micotoxina, resultantes da sua alimentação com produtos contaminados (RIBEIRO, 2007).

A maioria dos estudos realizados no Brasil tem se dedicado a investigar a ocorrência de OTA em café. No entanto, esta micotoxina também tem sido encontrada em outros alimentos, como suco de uva, muito consumido por crianças mas também frutos secos e vinhos, entre outros. A transmissão pelo ar também pode ocorrer, embora muito raramente, e apenas em condições particulares (RIBEIRO, 2007).

Uma parte da OTA, quando é ingerida através da alimentação, se transforma em metabólitos de menor toxicidade. Porém, se a OTA estiver na forma inalterada, ela se torna muito persistente em seres humanos devido à eliminação toxicocinética desfavorável, sendo esta a principal razão para ser encontrada com alta ocorrência em diversos fluidos biológicos (PETZINGER & ZIEGLER, 2000), como no sangue,

no leite materno e na urina humana, o que comprova a exposição humana à OTA (RIBEIRO, 2007).

A OTA é uma molécula particularmente estável, uma vez que possui resistência à acidez e a temperaturas elevadas, sendo a remoção da molécula muito difícil. Assim, devido à sua elevada resistência, toxicidade e presença num elevado número de produtos de consumo humano, é de extrema importância a aplicação de programas de monitoramento que visam controlar os níveis de OTA nos alimentos (BAYMAN & BAKER, 2006).

Dada a exposição humana conhecida e a abundância de dados toxicológicos dos estudos em animais, foram conduzidas várias avaliações de risco para a OTA. O Comitê Cientifico da União Europeia recomendou que os níveis de OTA devem ser reduzidos a valores inferiores a 5 ng kg^{-1} de peso corporal por dia. Além disso, vários países europeus propuseram regulamentos individuais para diferentes produtos alimentares com concentrações máximas toleradas que variam de país para país e de produto para produto (BENNETT & KLICH, 2003).

2.5.1.1.5 Presença de OTA A em Derivados de Uva

A detecção de OTA como contaminante em vinhos ocorreu nos anos 80, com maior incidência no Sul da Europa. Foi a partir de 1995 que foi confirmada sua presença em uvas e vinhos.

A diversidade e população de fungos dependem da variedade de uva, grau de população e danos físicos dos grãos, das práticas de viticultura e condições climáticas (ROSA et al, 2002).

Segundo Shundo e colaboradores (2005), os vinhos brasileiros apresentam baixas concentrações de OTA. A safra de 2004 apresentou contaminação inferior a 2 µg L^{-1} para todas as amostras analisadas. Em 2005, na cidade de São `Paulo resultados de análises demonstraram uma contaminação por OTA em 9 das 29 amostras de vinho tinto provenientes do Brasil, com níveis de contaminação variando de 0,10 a 1,33 ng mL^{-1} e em 18 de 34 amostras de vinho tinto importado, com níveis variando de 0,03 a 0,32 ng mL^{-1}; não foi detectado OTA em 11 amostras de suco de uva analisadas na cidade de São Paulo (SHUNDO et al, 2005). Entretanto, Silva (2012) em estudo sobre a presença de OTA em suco, vinhos e

mostos nas regiões sudeste e nordeste, detectou OTA em seis amostras de vinhos em concentrações entre 0,02 a 0,78 µg/L, correspondendo a 42,6% das amostras analisadas.

Almeida e colaboradores (2006) analisaram a presença de OTA em 20 amostras de uvas passas pretas e 22 amostras de uvas passas brancas. A OTA foi detectada em 10 amostras de uvas passas pretas, numa faixa de 1,3 a 39,1 ng g^{-1} e nenhuma detecção nas uvas passas brancas.

2.5.1.1.6 Regulamentação para OTA em alimentos no Brasil

Vários fatores são considerados no estabelecimento dos limites máximos permitidos, sendo os principais a disponibilidade de dados toxicológicos e de ocorrência das micotoxinas em vários alimentos. Estes dados são utilizados como base para realização dos estudos de avaliação de risco, o qual é imprescindível no estabelecimento dos limites máximos permitidos. A avaliação de risco das micotoxinas em alimentos ocorre oficialmente através de uma junta de especialistas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 1997) e Organização Mundial da Saúde (WHO, 2012) que se reúnem regularmente para as reavaliações pertinentes. Desde 1970 os contaminantes de alimentos têm sido avaliados pelos comitês dos órgãos mundiais, entre eles, o *Codex Alimentarius*. São as resoluções tomadas a partir destes encontros que estabelecem os níveis a serem seguidos pela comunidade internacional para o comércio dos seus produtos (CODEX, 2009; WHO, 2012).

A disponibilidade de métodos analíticos de rotina adequados ao controle das micotoxinas em níveis de contaminação estabelecidos também deve ser avaliado. Além disso, fatores socioeconômicos também são considerados no estabelecimento dos limites máximos permitidos atendendo aos interesses comerciais e a adequada disponibilidade de alimentos para a população (MAGAN & OLSEN, 2004; FAO, 2011).

Regulamentações para controle de micotoxinas em alimentos em diferentes países têm sido estabelecidas desde o início da década de 1970, onde alguns poucos países regulamentaram o controle em alimentos. Devido aos problemas econômicos e ao impacto a saúde, o número de países que possuem

regulamentação para controle de micotoxinas em alimentos tem aumentado significativamente nos últimos anos. Atualmente, mais de 100 países possuem legislação para micotoxinas em alimentos. Ainda, novas classes de micotoxinas e alimentos têm sido incluídos às regulamentações (FAO, 1997; FAO, 2004; VAN EGMOND et al., 2007).

A Resolução 34/76, de 19 de janeiro de 1977, publicada pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), do Ministério da Saúde, foi a primeira regulamentação para controle de micotoxinas em alimentos no Brasil, e estabeleceu o limite máximo de restrição (LMR)de 30 µg kg^{-1} para o somatório das aflatoxinas B1 e G1 em alimentos para o consumo humano (BRASIL, 1977).

Publicada pelo Ministério da Agricultura, por intermédio da Secretaria de Fiscalização Agropecuária, a Portaria nº 7, de 9 de novembro de 1988, foi a primeira regulamentação para o controle dos níveis de contaminação das matérias primas empregadas na alimentação animal, estabelecendo o LMR de 50 µg kg^{-1} para o somatório das aflatoxinas nestes alimentos (BRASIL, 1988). Posteriormente, o Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, publicou a Portaria nº 183 de 21 de março de 1996, para controle de micotoxinas em alimentos destinados ao consumo humano adotando os limites estabelecidos no regulamento técnico do Mercado Comum do Cone Sul (Mercosul), sob a forma da Resolução n° 56/94, de 12 de janeiro de 1995, de 20 µg kg^{-1} para o somatório das aflatoxinas B1, B2, G1, G2 em amendoim e milho e de 5 µg kg^{-1} para aflatoxina M1em leite fluído e de 0,5 µg L^{-1} para aflatoxina M1 em leite em pó, (MERCOSUL, 2002; BRASIL, 1996).

Em 15 de outubro de 2002, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, publicou a Resolução RDC n° 274, internalizando a Resolução GMC nº 25/02 do Mercosul e adotando assim os limites de 20 µg kg^{-1} para o somatório das aflatoxinas B1, B2, G1, G2 em amendoim e milho, e de 0,5 µg L^{-1} e 5,0 µg kg^{-1} para a aflatoxina M1 em leite fluido e em pó, respectivamente. Com a publicação desta Resolução, foi revogada a Resolução nº 34/76 (BRASIL, 2002; MERCOSUL, 2002).

O Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), publicou a Resolução RDC n° 07, de 18 de fevereiro de 2011,

representando um grande avanço em relação ao número de micotoxinas e de alimentos contemplados (BRASIL, 2011).

Em relação à OTA, tem se dado atenção especial desde 1993, quando a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer, classificou esta micotoxina como um carcinógeno humano do grupo 2B, baseado em suficientes evidências para carcinogenicidade em estudos em animais de laboratório (WHO, 2012). O JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*, Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares e Contaminantes) após avaliar a nefrotoxicidade da OTA propôs um consumo semanal tolerável de 0,1 µg kg^{-1} de massa corporal, equivalente a 14 ng kg^{-1} de massa corporal por dia. Em relação à carcinogenicidade propôs-se um consumo diário máximo tolerável de OTA de 5 ng kg^{-1} de massa corporal (VISCONTI et al, 1999).

A Anvisa adotou, através da resolução – RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, regulamentação para a presença de OTA em polpa e suco de uvas, sendo os limites máximos tolerados de 2 µg kg^{-1}. Este regulamento aplica-se às empresas que importem, produzam, distribuam e comercializem esses tipos de bebidas (BRASIL, 2011).

2.5.2 Técnicas Analíticas para a Determinação de Micotoxinas em Alimentos

A diversidade química das micotoxinas e os diversos substratos em que elas ocorrem representam desafios para a química analítica. Cada grupo de compostos de cada substrato têm diferentes propriedades físicas e químicas, por isso os métodos para a separação das toxinas a partir de substratos devem ser desenvolvidos de acordo com a matriz em análise (BENNETT & KLICH, 2003).

As micotoxinas são produzidas em concentrações que podem chegar a níveis de picogramas, o que requer alta sensibilidade dos sistemas de detecção. A detecção e a quantificação de micotoxinas em alimentos consistem geralmente em três procedimentos básicos: amostragem; preparação da amostra (extração e limpeza); e análise da micotoxina (BENNETT & KLICH, 2003).

Os métodos de análise de micotoxinas contam com solventes para os passos de extração e limpeza. A eficiência na extração da micotoxina dependerá do bom contato entre solvente e amostra (BENNETT & KLICH, 2003). Normalmente na

extração as micotoxinas são extraídas para uma fase líquida aquosa, misturada a solventes orgânicos (TRUCKSESS, 2000). Os solventes utilizados podem ser metanol, acetonitrila, acetona, clorofórmio, entre outros (SHEPHARD, 2000).

A eficácia do procedimento de extração dependerá, também, da técnica de homogeneização da amostra com o líquido extrator. No caso de matrizes sólidas, quanto menor a granulometria, melhor a penetração do solvente para a extração da micotoxina.

Após a extração são utilizadas técnicas de filtração e de centrifugação para separar as fases heterogêneas. Após a extração da matriz sólida, a purificação da amostra é feita para remover do extrato líquido impurezas e para isolar a micotoxina. Podem ser utilizados ensaios imunogênicos, que podem ser aplicados a amostras com pouca ou nenhuma purificação (BENNETT; KLICH, 2003). Normalmente usam-se colunas de extração em fase sólida ou de imunoafinidade (TRUCKSESS, 2000).

As análises por colunas de imunoafinidade (CI) fundamentam-se na interação imunoquímica específica anticorpo-analito. Esta interação é feita através de ligações covalentes fracas, como Van der Waals e eletrostáticas. O anticorpo é específico para a toxina, pois quando em análise capturam as micotoxinas presentes na amostra, liberando depois da etapa de lavagem (Figura 8).A utilização de IAC é uma técnica altamente sensível e seletiva que oferece a possibilidade de extrair/purificar com rigor as amostras ou os seus extratos, antes da sua quantificação pelos métodos físico-químicos (ROMER, 2015).

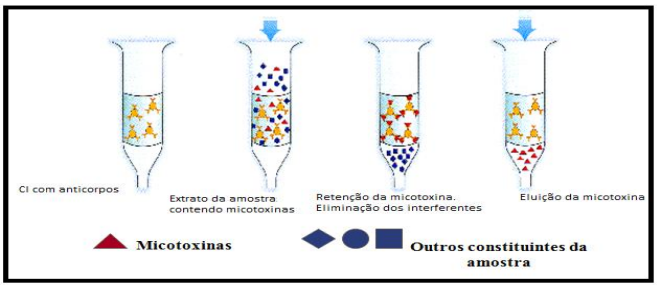


Figura 8: Adaptada: Princípio da coluna de imunoafinidade
Fonte: http://www.r-biopharm.com/news/press-releases/r-biopharm-rhones-official-Launch.

2.5.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise das micotoxinas normalmente é feita por métodos cromatográficos, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector de fluorescência ou ultravioleta (TRUCKSESS, 2000).

A CLAE é utilizada na análise de compostos não voláteis ou instáveis termicamente. As separações em CLAE podem se dar por adsorção, partição ou ambos. É a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação, porque pode tanto identificar compostos por comparação com padrões, quanto para a purificação e separação de substâncias (HOLLER, 2009).

Na CLAE os componentes de uma amostra são transportados através do fluxo de fase móvel e as separações ocorrem segundo as diferenças entre as *velocidades de migração* dos solutos em comparação com a *velocidade de migração* da fase móvel (eluente) (HOLLER, 2009).

2.5.2.1.1 Componentes Essenciais da CLAE

Um equipamento moderno de CLAE é equipado com:

a) Reservatório de fase móvel e sistema de tratamento de solventes;

b) Sistema de bombeamento;

c) Sistema de injeção de amostras;

d) Colunas analíticas para CLAE;

e) Detectores.

<u>Reservatório de fase móvel</u>

A fase móvel é responsável por fazer com que a amostra percorra todo o sistema cromatográfico. A fase móvel em CLAE é totalmente interativa, devendo ter alta pureza e quimicamente inerte, não causando danos ao sistema.. Não deve decompor ou dissolver a fase estacionária. Deve ser compatível com o detector. Deve ter baixa viscosidade. devendo ser filtrada para evitar a possibilidade da existência de poeira, que poderia entupir a coluna ou o sistema de injeção, e desgaseificada para a remoção de gases dissolvidos, que podem formar bolhas na

coluna, gerando irreprodutibilidade das vazões e alargamento das bandas (HOLLER, 2009).

A eluição poder ser da forma isocrática ou por gradiente. Uma eluição onde a fase móvel mantem a mesma proporção entre os solventes é chamada de eluição isocrática. Já a eluição é dita por gradiente quando há alteração na proporção dos solventes da fase móvel (AQUINO NETO & SOUZA NUNES, 2003).

Na cromatografia em fase normal, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, e em fase reversa, a fase móvel é mais polar. Separações analíticas são predominantemente realizadas em fase reversa, sendo a coluna C18 (octadecilsílica) a mais usada, ao passo que são preferidas fases que atuem no modo

Sistema de bombeamento

As bombas de CLAE devem ser de material resistente a corrosão a uma grande varieddade de solventes. A alta pressão deve estar em torno de até 6.000 psi ou 414 bar, com fluxo livre de pulso e vazão na faixa de 0,1 a 10 mL min^{-1}. A relativa reprodutibilidade da vazão deve ser de 0,5%, no mínimo (HOLLER, 2009)

Sistema de injeção de amostras

O volume de injeção de amostra deve ser pequeno para não afetar a reprodutibilidade das medidas. Um volume excessivo poderia provocar o alargamento das bandas, saturando a coluna. Atualmente a maioria dos cromatógrafos é vendida com injetores automáticos, que contêm alça de amostragem e uma seringa para injeção de volumes menores do que 1 µL e maiores do que 10 µL, chegando a 1000 µL (HOLLER, 2009).

Colunas de calibração para CLAE

As colunas analíticas recheadas podem ser, geralmente, feitas de aço inoxidável,: em geral de 10 a 30 cm (AQUINO NETO & SOUZA NUNES, 2003). Possuem diâmetro interno de 3 a 5 mm, com partículas de recheio de 2, 3, 4, 5, 6, chegando a 10 µm, sendo as mais comuns de 3 a 5 µm, permitindo homogeneidade de distribuição de fase estacionária e do fluxo de fase móvel (HOLLER, 2009; AQUINO NETO & SOUZA NUNES, 2003).

Pelas partículas da fase estacionária serem muito pequenas as pressões são elevadas, para forçar a passagem do solvente através de colunas fechadas, isso proporciona a separação dos constituintes de uma amostra. Quanto maior a separação, melhor a resolução, ilustrando que a diminuição do tamanho da partícula inflencia na obtenção de picos mais finos e na qualidade da resolução (HARRIS, 2013). O tamanho de poro regula a capacidade das moléculas da amostra de penetrar no interior das partículas e interagirem com a superfície interna. É na superfície interna das partículas que ocorrem a maioria das interações, pois a razão entre as áreas superficiais externa e interna é de 1/1000 (HARRIS, 2013; HOLLER, 2009; VOGEL, 2002).

Outros fatores, como a temperatura influenciam na resolução. Quando é feito o controle de temperatura da coluna, pode ser obtido uma resolução de melhor qualidade, com cromatogramas mais reprodutíveis (HOLLER, 2009).

Como proteção para a coluna de separação, utiliza-se uma coluna de tamanho reduzido, recheada com o mesmo material da coluna analítica, antes da coluna de separação. Esta é chamada de pré-coluna ou coluna de guarda e tem a função de evitar a entrada de partículas, que podem entupir a coluna analítica, aumentando, assim, a vida util da coluna analítica (HOLLER, 2009).

Uma coluna com empacotamento de 5 µm e tamanho de 25 cm possui em torno de 12500 pratos teóricos, o que garante uma boa eficiência. Pode-se, também obter a mesma eficiência com um empacotamento de 3 µm, utilizando uma coluna de 15 cm, isto porque reduzindo o tamanho da partícula à metade, dobra-se a eficiência (VOGEL, 2002)

Detectores

Os detectores para CLAE são de dois tipos: detectores de propriedades universais**,** que respondem às propriedades da fase móvel como um todo, como índice de refração, constante dielétrica ou densidade, e detectores de propriedade do soluto, que respondem a algumas propriedades do soluto. Como absorbância no ultra-violeta, fluorescência ou corrente de difusão, que não incluem a fase móvel (HOLLER, 2009).

Os detectores por fluorescência possuem um transdutor fotoelétrico. Os detectores mais simples, empregam uma fonte de excitação de mercúrio e um ou

mais filtros para isolar uma banda de emissão de radiação. Os detectores de fluorescência mais sofisticados possuem uma fonte de xenônio e empregam um monocromador de rede para isolar a radiação fluorescente. A fluorescência induzida por laser também é empregada devido à sua detectabilidade e seletividade. Uma vantagem do sistema de detecção por fluorescência e sua alta detectabilidade e seletividade, porque respondem apenas a poucos analito que fluorescem, sendo necessários processos de derivação (HARRIS, 2013; HOLLER, 2009).

Os métodos analíticos para determinar micotoxinas devem ser sensíveis, específicos, exatos e precisos porque são necessários para verificação do cumprimento da legislação e levantamentos de dados com o objetivo de determinar a exposição às micotoxinas (MUSCARELLA *et al*., 2009).Também podem ser utilizados outros métodos para a monitorização qualitativa e semi-quantitativa de micotoxinas, como os métodos de enzimoimunoensaio (ELISA), que são úteis para a triagem e análise de rotina de um grande número de amostras, pois não exigem equipamentos caros ou manuseamento altamente treinado, mas também são técnicas menos precisas e sensíveis.

3 PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS

Validar um método é testar o seu desempenho, de acordo com critérios estabelecidos, tendo como objetivo confirmar se ele é apropriado para o uso pretendido (SOBOLEVA; AMBRUS, 2004). O laboratório de pesquisa de Resíduos de Micotoxinas em Alimentos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da FIOCRUZ (INCQS/ FIOCRUZ) redigiu um Procedimento Operacional Padrão (POP), com base nos principais documentos nacionais e internacionais de validação, a fim de orientar a execução e interpretação dos experimentos de validação.

O POP aplica-se à validação de métodos não normalizados, métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram desenvolvidos e ampliações e modificações de métodos normalizados para a determinação de micotoxinas em alimentos (INMETRO, 2011).

A validação, segundo as orientações deste POP, envolve os seguintes parâmetros, quando aplicáveis: seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, robustez e incerteza de medição (INMETRO, 2011).

3.1 Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (VESSMAN et al, 2001). A identificação por espectrometria de massas também serve de parâmetro para a avaliação da seletividade, sendo utilizados o tempo de retenção do analito, simultaneamente as razões massa/carga dos íons (m/z) e a abundância dos íons de fragmentação (SANCO, 2014).

3.2 Curva de Calibração

A linearidade de um método é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração

do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A curva de calibração deve ser preparada levando em consideração o limite de restrição presente na legislação da micotoxina e sempre que possível às concentrações nas quais esta se encontra presente nas amostras a serem analisadas, estabelecendo, então o intervalo de trabalho. Caso seja necessário, o analista pode preparar diferentes curvas de calibração compreendendo intervalos de concentração distintos (INMETRO, 2011).

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes, de preferência equidistantes (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Com os dados obtidos na construção da curva de calibração deve-se avaliar a presença de valores aberrantes, que é um dado que apresenta um grande afastamento dos demais dados, utilizando o teste de Grubbs ou Jacknife e estimar os parâmetros de regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários ou ponderados. A avaliação dos dados do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo pode ser realizada através de planilhas específicas. Se não houver relação linear, deve-se realizar transformação matemática. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0,99 (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Pelo protocolo do INCQS a normalidade dos resíduos da regressão é verificada pelo teste Ryan-Joiner. Os erros devem apresentar distribuição normal. Caso isso não ocorra, deve-se excluir os níveis de concentração que não apresentarem distribuição normal devendo permanecer no mínimo de 5 níveis de concentração para construção da curva de calibração. Se o problema não for resolvido, injetar a curva de calibração novamente (RYAN; JOINER, 1976).

3.3 Teste de Homocedasticidade

Como critério para escolha do método dos mínimos quadrados a ser utilizado (ordinal ou ponderado) é necessário avaliar as variâncias dos resíduos, ou seja, diferenças entre os valores observados e os valores estimados pelo modelo ao longo da curva de calibração (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Dois métodos são indicados: Teste de Cochran e Teste de Levene. No entanto, para aplicação do teste de Cochran é necessário que haja o mesmo número de dados em cada nível de concentração da curva de calibração (INMETRO, 2011).

3.4 Equação da Regressão

Considerando as premissas descritas nos itens anteriores e usando a regressão linear (ordinária ou ponderada) deve-se determinar a equação do modelo que melhor se ajusta aos dados (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

$$y = bx + a \qquad \text{Equação 1}$$

Onde:
Y= variável dependente que corresponde à resposta medida;
X= variável independente que corresponde à concentração do analito na solução ou a massa injetada do mesmo;
a= coeficiente linear;
b= coeficiente angular.

Os parâmetros de regressão são estimados por meio das equações a seguir.

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \qquad \text{Equação 2.1}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \qquad \text{Equação 3.2}$$

Sendo,

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \qquad \text{Equação 1.1.1}$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2 \qquad \text{Equação 1.1.2}$$

3.5 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório. Esta é considerada em três níveis, podendo variar analista, tempo, equipamento (INMETRO, 2011).

3.5.1 Repetibilidade (precisão intra-corrida)

Concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (INMETRO, 2011).

3.5.2 Precisão Intermediária (precisão inter-corridas)

Concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (INMETRO, 2011).

3.6 Limite de Detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). O limite de detecção pode também ser estimado para o instrumento de medição ou para o método analítico (INMETRO, 2011).

3.7 Limite de Quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRATINOVA; RAFFAEL; SIMONEAU, 2009).

3.8 Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. A recuperação do método pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas da micotoxina avaliada. As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, em função da concentração, como apresentado na tabela 1. A recuperação é calculada segundo a equação a seguir (INMETRO, 2011).

$$\%\mathrm{Re}c = \frac{C_{medida}}{C_{fortificação}} \times 100 \qquad \text{Equação 2}$$

Quadro 2: Critérios de aceitação da recuperação de métodos quantitativos.

Concentração	Intervalo
< 1µg/Kg	-50% a +20%
≥ 1µg/Kg < 10µg/Kg	-40% a +20%
≥ 10µg/Kg < 100µg/Kg	-30% a +20%
≥ 100µg/Kg < 1000µg/Kg	-30% a +10%
≥ 1000µg/Kg	-30% a +10%

Fonte: Codex Alimentarius, 2012.

A tendência (erro sistemático) observada no estudo de recuperação deve ser utilizada para corrigir as concentrações de micotoxinas nas amostras a serem

analisadas na rotina do laboratório. A incerteza associada com a sua determinação deve ser considerada um componente essencial da incerteza global do método (INMETRO, 2011).

3.9 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (INMETRO, 2011).

4 JUSTIFICATIVA

O alto consumo de suco e néctar de uvas, bem como a carência de pesquisas, que gerem informações quanto ao possível risco de exposição da população à OTA, justificam o conhecimento sobre a contaminação desses produtos, permitindo, assim, uma ação mais eficaz da saúde pública. , tendo como suporte o desenvolvimento e a validação de um método analítico, que é um importante requisito na qualidade metrológica das condições sanitárias de um produto.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método para análise de OTA em suco de uva integral e néctar de uva industrializados.

5.2 Objetivos Específicos

a) Desenvolver, validar intralaboratorialmente e implantar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência para a determinação de OTA em suco de uva integral e néctar de uva;

b) Elaborar um procedimento operacional padrão (POP) para o método analítico.

c) Avaliar a contaminação pela OTA em algumas amostras de suco de uva integral e néctar de uva comercializados no Brasil;

6 METODOLOGIA

6.1 Materiais

6.1.1 Reagentes, Solventes e Padrão

Os reagentes. solventes e padrões utilizados foram:

a) acetonitrila grau CLAE (J. T. Baker, EUA) e (Merck, Alemanha);
b) ácido acético glacial 100% anidro (Merck, Alemanha);
c) metanol grau CLAE (Merck, Alemanha);
d) bicarbonato de sódio P.A.(Merck, Alemanha);
e) tolueno P.A (Merck, Alemanha);
f) polietilenoglicol 6000 e 8000 (Sigma & Aldrich);
g) Água ultra-pura foi obtida através do sistema Milli-Q Gradient (Millipore, Bedford, MA, USA).
h) padrão de OTA, no estado sólido, lote 054M4041V, marca Sigma & Aldrich, mantido entre 2 e 8°C (geladeira), protegido da luz e vedado até o momento do preparo das soluções.

6.1 2 Equipamentos e Acessórios

Os equipamentos e acessórios utilizados foram:

a) sistema CLAE Class LC-10 Shimadzu, com detector RF- 10Axl Shimadzu e sistema CLAE LC-20AD Shimadzu, com detector RF-20A Shimadzu;
b) coluna C_{18} , 5 µm, 250 x 4,6 mm;
c) pré-coluna C18, 5 µm, 4,6 mm x 30 mm;
d) coluna de imunoafinidade com anticorpos específicos para OTA; preferencialmente com quantidade de anticorpos equivalente às encontradas nas da marca Ochraprep ® Código do produto P14/P14B;
e) balança analítica com precisão de 0,1 mg, LP 620P (Sartorius, Alemanha);
f) agitador mecânico;

g) agitador tipo Vortex;
h) espectrofotômetro UV-Vis, Shimadzu, com caminho ótico de 1cm;
i) sistema de filtração a vácuo Millipore;
j) bomba de vácuo Millipore;
k) filtro para fase móvel: membrana para filtração de fase-móvel em PVDF, hidrofílica, com 0,22 µm de poro;
l) papel de filtro de microfibra;
m) frasco de polietileno ou *teflon* com tampa de rosca;
n) provetas de 5, 10, 100, 500 e 1000 mL;
o) placa de aquecimento ou banho-maria;
p) balões volumétricos calibrados 10, 25, 50,100 e 1000 mL;
q) pipetas volumétricas calibradas 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25 mL;
r) cartuchos de filtração GV millex, para amostra, com membrana em polietileno de 0,22 µm de poro;
s) seringas de vidro ou de polipropileno com capacidades adequadas para o uso de volumes de 1, 5, 10 e 20 mL;
t) frasco para injetor automático, com septo de silicone - Shimadzu;
u) frasco tipo vial 5mL;
v) capela de exaustão.

6.1.3 Amostragem

As amostras utilizadas para o desenvolvimento e a validação da metodologia foram coletadas em estabelecimentos comerciais das cidades do Rio de Janeiro, de Duque de Caxias e de Belford Roxo. As amostras fiscais, num total de vinte e oito, foram coletadas pelas Vigilâncias Sanitárias Estaduais dos Estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná, através do Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes (PROMAC). Todas as amostras fiscais deram entrada no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, por meio do núcleo técnico de alimentos, e analisadas no setor de resíduo de micotoxinas.

6.2 Procedimentos

6.2.1 Preparo da Solução Estoque de OTA

A solução estoque foi preparada adicionando-se 5 mL da solução de tolueno-ácido acético (99:1 v/v) em um frasco fechado, que continha 5 mg do padrão de OTA em cristal, com auxílio de uma seringa de vidro. A concentração da solução foi estabelecida por espectrofotometria (aproximadamente 40 µg mL^{-1}). A determinação da concentração é feita por espectrofotometria porque o padrão de OTA não pode ser pesado por ser eletrostático. Através da leitura da solução podemos obter sua concentração conforme os cálculos a seguir:

$$C = \frac{m_{K2Cr2O7} \times mmol^{-1}}{V_{b1}} \qquad \text{Equação 3}$$

Onde,

$M_{k2Cr2O7}$ = massa de dicromato de potássio pesada

$Mmol^{-1}$ – milimol do diromato de potássio (0,2942)

V_{b1} = volume do balão utilizado (mL)

Em seguida, a solução foi armazenada em frasco devidamente vedado, sob temperatura entre 0 e -30°C (congelamento).

6.2.2 Preparo das Soluções Intermediárias de OTA

Foi preparada uma solução intermediária I tomando uma alíquota de 1 mL da solução estoque, esta foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL e completado com o diluente tolueno: ácido acético (99:1 v/v).

Da solução intermediária I, preparou-se uma solução intermediária II transferindo quantitativamente uma alíquota de 2 mL para frasco de vidro, levando a secura em banho-maria sob temperatura de 50 ºC e reavolumando a 50 mL com fase móvel, Figura 9.

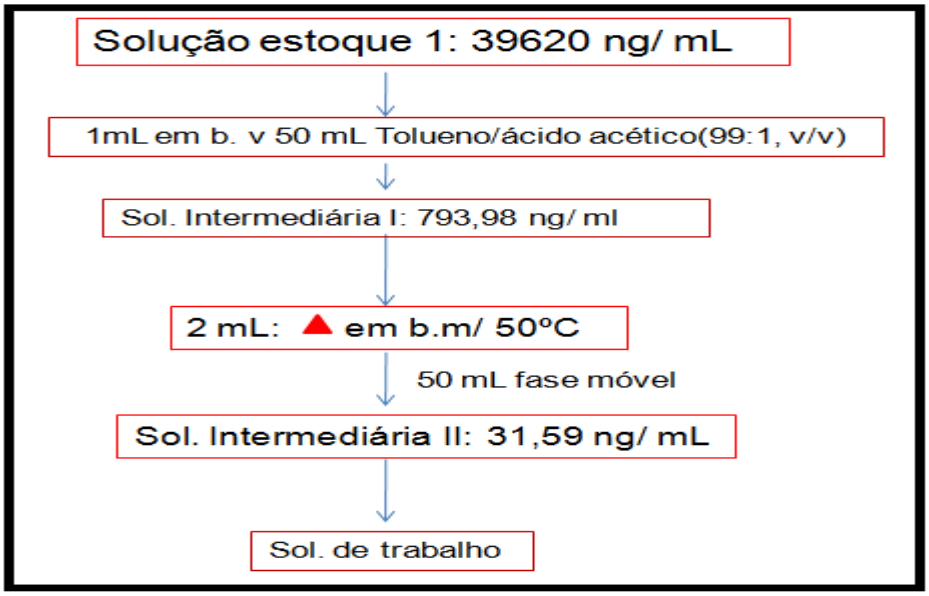


Figura 9 - Preparo das soluções intermediárias de OTA

6.2.3 Preparo das Soluções de Trabalho para a Curva de Calibração

As soluções de trabalho para a construção da curva de calibração foram preparadas por diluições sequenciais da solução intermediária II, onde foram retiradas alíquotas com pipetas volumétricas e transferidas individualmente para balões volumétricos, previamente identificados (Tabela 1), os quais foram completados com o diluente 1% de ácido acético e 99% de água (fase móvel) e homogeneizados, totalizando seis níveis de concentração. As soluções preparadas foram analisadas no cromatógrafo Shimadzu, em triplicata.

Tabela 1. Preparo das soluções de trabalho para a curva de calibração

Solução de trabalho	Alíquota de sol. imtermeddiária (mL)	Volume final da solução (mL)	Concentração final do padrão (ng mL^{-1})
P1	0,483	50,04	0,30
P2	1,002	49,99	0,63
P3	1,002	25,042	1,26
P4	2,005	25,96	2,54
P5	4,0	25,042	5,04
P6	7,999	24,967	10,11

6.3 Otimização da Metodologia Analítica

Foram estudados quatro métodos na otimização da análise de ocratoxina em suco integral e néctar de uvas. No estudo foram realizados testes de extração com solventes de polaridade similar da OTA empregando o bicarbonato de sódio, devido a média polaridade da mesma. A purificação e a concentração da amostra com o uso de colunas de imunoafinidade, com anticorpos específicos para OTA, também foram avaliadas.

Os diluentes utilizados foram polietileno glicol (PEG) 6000 e 8000 e tampão fosfato (pH=7) na purificação das amostras de suco e néctar de uva, quando do uso de colunas de imunoafinidade, porque a pigmentação interfere na ligação entre anticorpo e a OTA. A lavagem da coluna foi feita com água e com solução salina.

A seleção dos métodos testados levou em consideração o material disponível no laboratório e foram utilizadas as matrizes de suco integral de uvas tinto, branco e rosé, e o néctar de uva tinto. A técnica utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa e detecção por fluorescência.

6.3.1 Método 1

O método avaliado inicialmente foi baseado no da norma européia EN 14133 (C*ommitte for Standartization* – EC, 2003), que possui limites de detecção e quantificação de 0,01 e 0,3 µg ml^{-1}, respectivamente, mas com alterações (figura 10).

Descrição do método da norma européia EN 14133: Adiciona-se à 40 mL de amostra, 40 mL de solução de diluição (PEG 8000+bicarbonato de sódio, 1:5 m/m). Agita-se por 30 min, filtra-se a vácuo. Percola-se 40 mL do filtrado por coluna de imunoafinidade. Aplica-se pela coluna de imunoafinidade Ochraprep^{tm}, 10 mL de solução de lavagem (cloreto de sódio+bicarbonato de sódio, 5:1, m/m), seguida de 10 mL de água purificada. Eluí-se com 3 porções de 2 mL de metanol. O extrato metanólico é evaporado à secura em banho-maria, sob temperatura de 50°C e ressuspenso em 250 µL de fase móvel (acetonitrila/metanol/ solução aquosa de ácido acético glacial [1:30], 35:35:30 v/v/v). 50 µL são injetados em coluna

cromatográfica RP-18 (5µm, 4,6x250 mm); com fluxo de 0,8 mL min^{-1}; em comprimento de onda de 333 n de excitação e 476 nm de emissão.

Devido à falta de material, adaptações foram feitas ao método: o PEG empregado foi o 6000 ao invés do PEG 8000(Figura 10), não disponível, que estava sendo adquirido.

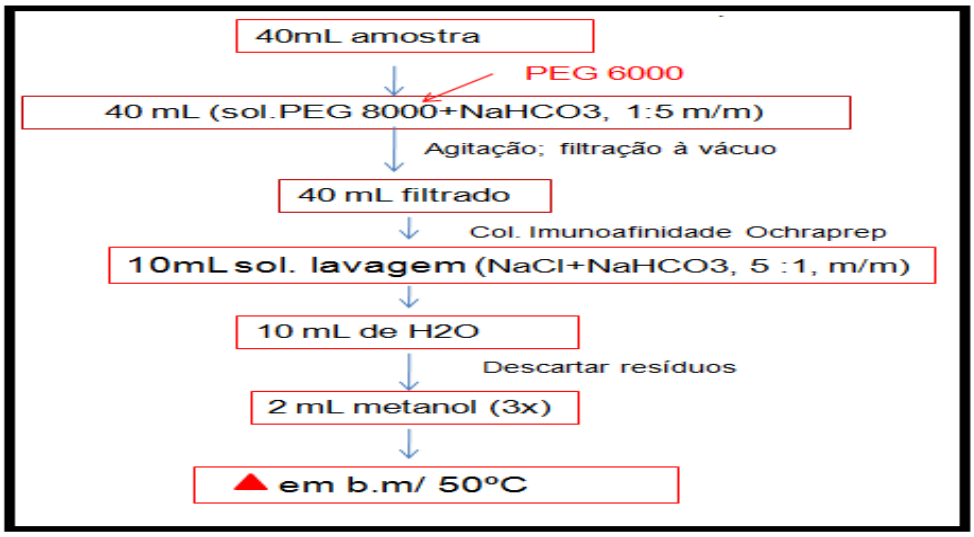


Figura 10 - Método 1: Etapas do processamento.

Como ainda não se tinha disponível o PEG 8000 para avaliação, foram testados outros métodos, empregando outros reagentes que não o PEG 8000.

Testes de seletividade foram realizados com amostras brancas das matrizes de suco de uva de uva tinto, branco e rosé, e o néctar de uva.

6.3.2 Método 2

O segundo método avaliado foi o de Mañes, (2004), que também utiliza coluna de imunoafinidade, mas que substitui o diluente PEG 8000 por tampão fosfato, o volume final da amostra (2 mL de metanol) é reduzido por evaporação à metade e 150 µl são injetados no sistema cromatográfico. A fase móvel utilizada é constituída de acetonitrila/ água/ solução aquosa de ácido acético[1:99], (50:49:1, v/v/v), fluxo de 1 $mL.min^{-1}$, em comprimento de onda de 333 nm de excitação e de 470 nm de emissão.

O método teve que ser ajustado (Figura 11), pois o autoinjetor do equipamento utilizado possui alça de amostrador para volumes de injeção de até 100 µl. Sendo assim, processou-se o dobro do volume de amostra e injetou-se 75 µL. A avaliação da seletividade e o teste de recuperação, foram efetuados contaminando-se amostras de suco de uva tinto, branco e rosé, e o néctar de uva no início (antes da etapa de extração) e no final do procedimento (após a etapa de extração) com 0,5 ng mL^{-1} de OTA em solução de metanol.

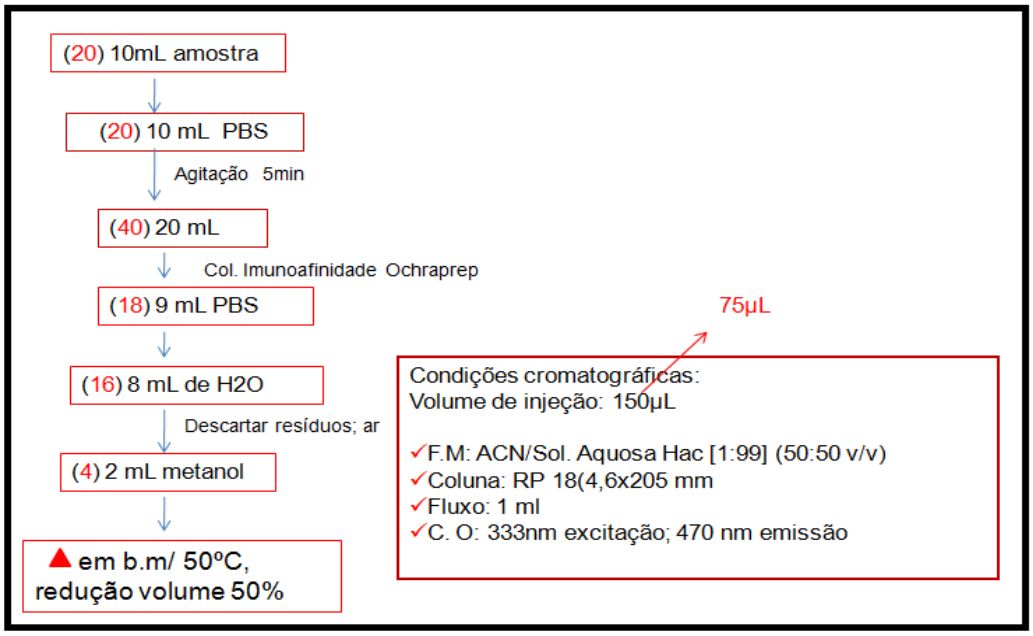


Figura 11- Método 2: Etapas do processamento

6.3.3 Método 3

Com a aquisição do PEG 8000, pode-se testar o método da norma européia EN 14133 (*Committe for Standartization* – EC, 2003) (Figura 12). Foram analisadas amostras branco de néctar de uva.

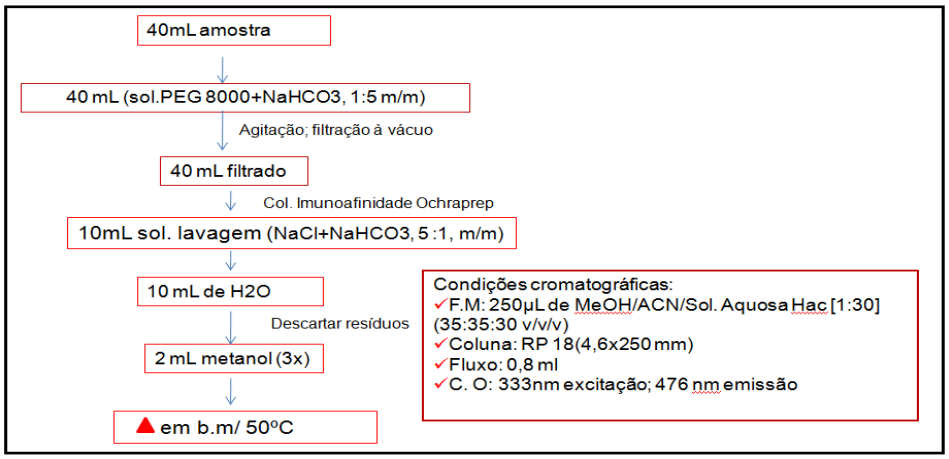


Figura 12 - Método 3: Etapas do processamento

6.3.4 Método 4

O quarto método testado foi uma adaptação feita no laboratório de Resíduo de Micotoxinas do INCQS, do método da norma européia EN 14133 (NORMA EUROPÉIA, 2003), utilizando-se desta vez o PEG 8000, mas com alteração dos constituintes da fase móvel, do comprimento de onda e do volume da amostra (Figura 13), para se adequar o método ao material disponível no laboratório. A seleção da fase móvel foi realizada considerando a sua influência na eficiência da separação cromatográfica, no formato dos picos cromatográficos e na sensibilidade do método.

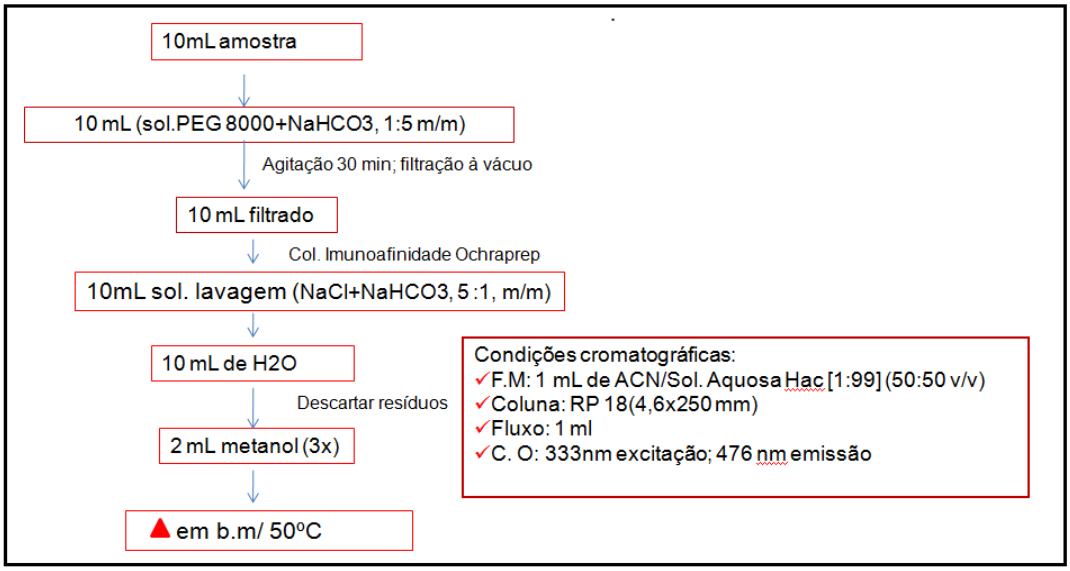


Figura 13 - Método 4: Etapas do processamento

A alteração efetuadas estão descritas a seguir:

Preparo da amostra

- Amostragem

Analisar, no mínimo, 1 L de amostra. Transferir a amostra para recipiente adequado. Homogeneizar por 5 minutos utilizando agitador magnético.

- Extração, limpeza e concentração da amostra.

a) Transferir, quantitativamente, 10 mL da amostra ($V_{amostra}$) para frasco com tampa de rosca.

b) Adicionar à amostra, quantitativamente, 10mL da solução de diluição ($V_{sol.diluição}$).

c) Agitar vigorosamente em agitador mecânico por 30 minutos.

d) Em seguida, filtrar em papel de filtro de microfibra de vidro, com auxílio de vácuo.

e) Adaptar uma seringa de polipropileno ou vidro de volume 15 ou 20mL à coluna de imunoafinidade.

f) Transferir, quantitativamente, 10mL do filtrado ($V_{alíquota}$) para a seringa.

g) Percolar o filtrado através da coluna de imunoafinidade, mantendo fluxo de 2 a 3mL min^{-1} (pode -se controlar o fluxo com o vácuo aplicado).

h) Descartar o percolado.

i) Retirar a coluna, retirar o êmbolo, acoplar a coluna e transferir 10 mL da solução de limpeza.

j) Acoplar o êmbolo e transvazar a solução de limpeza através da coluna de imunoafinidade.

k) Retirar a coluna, retirar o êmbolo, acoplar a coluna e transferir 10 mL de água deionizada.

l) Acoplar o êmbolo e transvazar a água através da coluna de imunoafinidade.

m) Descartar o transvazado.

n) Retirar a coluna, retirar o êmbolo, acoplar a coluna, acoplar o êmbolo e passar cerca de 3 mL de ar pela coluna.

o) Desconectar a coluna e reconectá-la a uma seringa de vidro de 5mL.

p) Substituir o descarte por um frasco de vidro de 10 mL com tampa de rosca.

q) Transferir 2 mL de metanol para a seringa e deixar um pequeno volume em contato com a coluna de imunoafinidade por, no mínimo, 3 minutos.

r) Eluir lentamente o metanol restante, para o frasco de vidro, com tampa.

s) Evaporar o extrato metanólico até a secura em banho-maria à 50ºC, sob corrente de N_2.

Durante a secagem da amostra em banho-maria, evitar a ação oxidante da luz, envolvendo o bequer em papel alumínio, ou usar vidraria âmbar.

t) Ressuspender o resíduo em 1mL de fase móvel, filtrar em cartuchos de filtração para amostra, com membrana em polietileno de 0,22 µm de poro e injetar no CLAE/F.

Condições experimentais (CLAE/F)

a) Coluna: Spherisorb, ODS, 5 µm, 250 X 4,6 mm ou equivalente;
b) Fase móvel: Acetonitrila/ água com 1% de ácido acético (1:1, v / v);
c) Fluxo: 1mL min^{-1};
d) Volume de injeção: 50 µL;
e) Tempo de retenção: em torno de 9,3 minutos;
f) Temperatura do Forno: 40 ºC;
g) Detector de fluorescência: Ex.: 333 nm; Em: 476 nm.

Equação utilizada para o cálculo de obtenção da concentração de OTA nas amostras analisadas pelo método 4:

$$C_{OTA_{(ng/g)}} = \frac{(A_{amostra} - b) \times (V_{sol.diluição} + V_{amostra}) \times V_{final}}{a \times V_{amostra} \times V_{alíquita} \times V_{injeção}} \qquad \text{Equação 4}$$

$A_{amostra}$= área da amostra obtida

b = coeficiente linear

$V_{sol.\ diluição}$ = Volume adicionado da solução PEG+bicarbonato de sódio (mL)

$V_{amostra}$= Volume retirado da amostra (mL)

V_{final}= Volume final (mL)

a = coeficiente angular

$V_{alíquota}$ = Volume da alíquota de extrato que passa pela coluna de imunoafinidade (mL)

$V_{injeção}$ = Volume injetado (mL)

7 VALIDAÇÃO INTRA-LABORATORIAL DA METODOLOGIA ANALÍTICA SELECIONADA

A validação foi dita intralaboratorial porque correspondeu ao estudo analítico envolvendo um único laboratório. Este procedimento de validação é aceito internacionalmente desde que sejam seguidas as normas estabelecidas por um dos órgão oficiais, entre eles INMETRO, ANVISA e Comunidade Européia. No Brasil, os órgão que regulamentam a validação dos métodos analíticos são o INMETRO e a ANVISA (RIBEIRO et al, 2008). A validação do método analítico selecionado foi realizada por meio da avaliação dos seguintes parâmetros de desempenho, estabelecidos pelo INMETRO: limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, precisão e robustez. Para a avaliações estatísticas utilizou-se a uma planilha de cálculo em excel de Bazílio (2011), adaptada de Souza e Junqueira (2005).

7.1 Seletividade do Método

A seletividade foi avaliada pela análise de 6 amostras não contaminadas de cada matriz de interesse, para verificar a existência de picos interferentes.

7.2 Linearidade do Método

A partir da solução intermediária II de concentração 31,59 ng mL^{-1} (acetonitrila/ ácido acético 1%), foram feitas diluições para a obtenção das concentrações de 0,31; 0,63; 1,26; 2,54; 5,04 e 10,11 (ng mL^{-1}) utilizadas no preparo da curva de calibração. Injetou-se 50 µl de cada solução em triplicata no sistema cromatográfico. A curva de calibração foi obtida plotando-se área do pico da OTA e a sua concentração.

A linearidade das curvas de calibração foi avaliada de acordo com procedimento descrito por Souza e Junqueira (2005), já que apenas a utilização dos coeficientes lineares é inadequada para esse propósito (THOMPSON et al., 2002). Como premissas para a análise de regressão, foram verificadas a homocedasticidade, a independência e a normalidade dos resíduos da regressão.

Inicialmente, os valores aberrantes foram investigados sucessivamente pelo teste de resíduos padronizados de Jacknife (BELSLEY et al., 1980) até que valores aberrantes não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2% de valores em relação ao número de resultados originais (HORWITZ, 1995).

A homocedasticidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Levene modificado (BROWN; FORSYTHE, 1974). A independência dos resíduos foi avaliada pela estatística de Durbin-Watson (DURBIN, J. & WATSON, 1951).

A normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner (RYAN, TA & JOINER, 1976).

A significância da regressão e a falta de ajuste foram verificadas pela análise de variância (ANOVA) (DRAPER & SMITH, 1998).

Os parâmetros de regressão foram estimados através das Equações:

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}},$$

Equação 4.1

$$a = \bar{y} - b\bar{x}.$$

Equação 5.2

Sendo:

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}),$$

Equação 1.1.1

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2,$$

Equação 1.1.2

Onde n é o número de pontos da curva de calibração.

O resíduo e_i referente a cada valor x_i, foi calculado através da Equação 5:

$$e_i = y_i - \hat{y}_i,$$

Equação 5

sendo,

$\hat{y}_i$ = variável dependente estimada pela equação de regressão.

O coeficiente de determinação do ajuste R^2 foi calculado, sendo definido pela equação 6:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} (\hat{y} - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^{n} (y_i - \bar{y})^2}$$

Equação 6

Equação utilizada para o cálculo dos valores extremos, utilizando os resíduos padronizados Jacknife, cuja estatística é o resíduo padronizado Jacknife J_{ei}, calculado para cada ponto da curva de calibração:

$$J_{ei} = r_i \sqrt{\frac{n-p-1}{n-p-r_i^2}},$$

Equação 7

Onde,

número total de dados: n,

número de parâmetros do modelo: p,

Resíduo padronizado:

$$r_i = \frac{|e_i|}{s_{e_i}}$$

Equação 7.1

Erro padrão do resíduo:

$$s_{e_i} = s_{res} \sqrt{1 - h_i}$$

Equação 7.1.1

Ponto de avalanca:

$$h_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}}$$

Equação 7.1.1.1

Desvio padrão residual:

$$s_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Equação 7.1.1.2

A normalidade dos resíduos, foi verificada pelo teste Ryan-Joiner, sendo os resíduos primeiramente ordenados em ordem crescente. Em seguida, foi construído um gráfico dos valores dos resíduos ordenados *e i* versus os valores dos percentis estimados para uma distribuição normal reduzida q_i (quantis normais). Os quantis normais foram obtidos pela Equação 8:

$$q_i = \varphi^{-1}\left\{\frac{(i-3/8)}{(n+1/4)}\right\}, i = 1,\ldots,n\ ,$$

Equação 8

onde,
q_i = valor normal esperado,
φ^{-1}= inverso de uma função de distribuição normal padrão.

O coeficiente de correlação R_{eq} entre e_i e q_i foi calculado pela Equação 9:

$$R_{eq} = \frac{S_{eq}}{\sqrt{S_{ee} \times S_{qq}}}\ ,$$

Equação 9

Onde,

$$S_{eq} = \sum_{i=1}^{n} (e_i - \bar{e})(q_i - \bar{q}_i) = \sum_{i=1}^{n} e_i q_i - \frac{\sum_{i=1} e_i \sum_{i=1} q_i}{n},$$

$$S_{ee} = \sum_{i=1}^{n} (e_i - \bar{e})^2 = \sum_{i=1}^{n} e_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^{n} e_i\right)^2}{n},$$

$$S_{qq} = \sum_{i=1}^{n} (q_i - \bar{q})^2 = \sum_{i=1}^{n} q_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^{n} q_i\right)^2}{n},$$

$$\bar{e} = \frac{\sum_{i=1}^{n} e_i}{n},$$

$$\bar{q} = \frac{\sum_{i=1}^{n} q_i}{n}.$$

O coeficiente de correlação R_{eq} foi então comparado com o $Rcrit\ (n)$ para um nível de significância α de 0,05.

A homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi verificada através do teste de Levene (LEVENE, 1960), modificado por Brown & Forsythe (BROWN; FORSYTHE,1974), utilizando a equação 10:

$$t_L = \frac{\left|\bar{d}_1 - \bar{d}_2\right|}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) s_p^2}},$$

Equação 10

Onde, desvio médio de cada K grupo:

$$\bar{d}_k = \frac{\sum_{j=1}^{n_k} d_{kj}}{n_k}$$

Módulo do desvio da mediana de cada grupo:

$$d_{kj} = \left|\tilde{e}_k - e_{kj}\right|$$

Número de dados em cada K grupo:

$$n_k$$

Mediana de cada k grupo:

$$\tilde{e}_k$$

Variância combinada:

$$s_p^2 = \frac{\sum_{k=1}^{2} \sum_{j=1}^{n_k} (d_{kj} - \bar{d}_k)^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

Equação 11

Para o teste de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1951), foi utilizada a equação 12, que defini a estatística d do teste.

$$d = \frac{\sum_{i=1}^{n} (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^{n} e_i^2}.$$

Equação 126

7.3 Recuperação e Precisão do Método

A recuperação e precisão foram avaliadas por meio de estudos de recuperação usando matriz brancas de cada amostra do estudo, fortificadas com a OTA em três níveis de concentração: 0,099; 0,99 e 1,98 ng.mL^{-1}. O primeiro nível corresponde ao limite de quantificação do método, o terceiro nível a um valor próximo ao limite máximo de restrição da legislação brasileira (2 µg L^{-1}) e o segundo nível a uma média dos dois primeiros. Os valores foram determinados utilizando a correção da vidraria calibrada, por isso há diferenças.

7.4 Limites de Detecção e de Quantificação do Método

Os limites de detecção e quantificação foram determinados considerando a relação sinal/ruído de 3 e 10, respectivamente, com base no sinal obtido das amostras fortificadas no menor nível de contaminação utilizado no estudo de exatidão (recuperação) e precisão, que foi de 0,099 ng mL^{-1}.

7.5 Robustez do Método

A robustez foi realizada com a análise de amostra contaminada no nível mais baixo pelo método selecionado, utilizando-se como fator a marca da coluna, empregando-se no experimento uma coluna de imunoafinidade da marca Vicam. Os resultados foram avaliados através da exatidão (recuperação).

7.6 Sugestão para a Determinação da Incerteza de Medição do Método

Para o método 4, foi realizado o cálculo da incerteza de medição, baseado nos documentos da ABNT (2003), DE LA CRUZ (2010), EURACHEM (2012), NIST (2014). A incerteza de medição da concentração de OTA é determinada considerando as principais fontes de incerteza das metodologias analíticas: Preparo da amostra, precisão, recuperação, curva de calibração e concentração da solução padrão. As incertezas são combinadas relativamente e posteriormente expandidas para um nível de confiança de 95,45%. As equações utilizadas na determinação da incerteza de medição estão descritas abaixo. Os resultados das incertezas de medição devem ser expressos com no mínimo duas casas decimais.

7.6.1 Preparo de Amostra

A incerteza do preparo da amostra, u(Preparo), é advinda da equação utilizada na conversão da massa OTA medida na alíquota injetada para concentração de OTA na amostra (Equação 5). A incerteza relativa, u_r (Preparo), é determinada pelo método relativo através da combinação das grandezas de entrada, como demonstrado na Equação 13.

$$u_r(preparo) = \sqrt{2x\left(\frac{u_{(Vamostra)}}{V_{amostra}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(Vsol.diluição)}}{V_{sol.diluição}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(Vfinal)}}{V_{final}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(Valíquota)}}{V_{alíquota}}\right)^2}$$

Equação 73

Onde: $u(V_{amostra})$ = incerteza do volume da amostra
$V_{amostra}$ = volume da amostra
$u(V_{sol.\ diluição})$ = incerteza do volume da solução PEG+bicarbonato de sódio
$V_{sol.\ diluição}$ = volume da solução PEG+bicarbonato de sódio
$u(V_{final})$ = incerteza do volume final
V_{final} = volume final
$u(V_{alíquota})$ = incerteza do volume da alíquota que passa pela coluna de imunoafinidade
$V_{alíquota}$ = volume da alíquota que passa pela coluna de imunoafinidade

A incerteza do volume injetado ($V_{injetado}$) não será considerada no cálculo de incerteza já que esta grandeza é contemplada na incerteza da precisão do método, sendo determinante na variância das áreas obtidas.

7.6.2 Repetitividade

A incerteza da repetitividade, uc(r), é determinada para as amostras analisadas nestas condições, a partir do desvio padrão (Equação 14).

$$u_c\ (r) = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Equação 14

Onde: s = desvio padrão das concentrações medidas
n = número de replicatas

A incerteza relativa, u_r (*r*), desta fonte é dada pela (Equação 15)

$$u_r\ (r) = \sqrt{\left(\frac{u_c\ (r)}{\overline{C}_{medida}}\right)^2}$$

Equação 15

Onde: uc(r) = incerteza combinada da repetitividade
$\overline{C}medida$ = concentração média de OTA

Como método alternativo, pode-se utilizar a incerteza da repetitividade obtida na etapa de validação do método. Caso as variâncias dos resultados nos vários níveis de concentração utilizados na validação estejam na mesma ordem de grandeza, o desvio padrão da precisão do método pode ser determinado através da combinação das variâncias dos níveis de concentração estudados. A equação 16 demonstra a combinação das variâncias para um estudo realizado com cinco níveis de concentração.

$$uc = \sqrt{\frac{(n_1-1)\times S_1^2 + (n_2-1)\times S_2^2 + (n_3-1)\times S_3^2 + (n_4-1)\times S_4^2 + (n_5-1)\times S_5^2}{(n_1-1)+(n_2-1)+(n_3-1)+(n_4-1)+(n_5-1)}}$$

Equação 16

Onde: uc = incerteza combinada
S_n = desvio padrão dos valores obtidos para cada nível de concentração
n_n = “n” é o número de replicatas dos diferentes níveis

Ainda, pode-se utilizar a maior incerteza obtida na etapa validação na incerteza global do método.

7.6.3 Recuperação

Os valores de recuperação determinados na etapa de validação dos métodos são utilizados para correção da concentração de OTA nas amostras analisadas. Portanto, a incerteza da recuperação do método deve ser considerada como uma grandeza de entrada. A contribuição da recuperação para a incerteza relativa de cada nível é calculada através da equação 17 a seguir.

$$u_r(Rec) = \sqrt{u_r(C_{medida})^2 + u_r(C_{fortificação})^2}$$ Equação 17

Onde: u_r (Rec) = incerteza relativa da recuperação;
$u_r(C_{medida})$ = incerteza relativa da concentração medida
u_r ($C_{fortificação}$) = incerteza relativa da concentração fortificada.

Onde u_r (C_{medida}) é dada pela equação 18:

$$u_r(C_{medida}) = \sqrt{\frac{s^2}{n\,C_{medida}^2}}$$ Equação 18

s = desvio padrão das concentrações medidas
n = número de replicatas

C_{medida} = concentração medida

A incerteza relativa da concentração de fortificação será dada por:

$$u_r(C_{fortificação}) = \sqrt{\left(\frac{u_c(C_{fortificação})}{C_{fortificação}}\right)^2}$$ Equação 19

Onde: u_c ($C_{fortificação}$) = incerteza combinada da concentração fortificada
$C_{fortificação}$ = concentração da amostra fortificada

A incerteza da concentração de fortificação "uc($C_{fortificação}$) / $C_{fortificação}$" é determinada combinando-se a incerteza da concentração da solução padrão

determinada pelo espectrofotômetro com a incerteza do fator de diluição das soluções padrão e preparo das amostras fortificadas.

Assim, a incerteza combinada da fortificação, será dada por:

Equação 80

Onde: $C_{padrão}$ = concentração da OTA na solução padrão utilizada na fortificação
$u_c(C_{padrão})$ = incerteza da concentração da OTA na solução padrão
$u_c(Vi)$ = incerteza do volume (balão, pipeta, seringa) utilizado no preparo da amostra fortificada
V_i = Volume medido (certificado)

Caso sejam preparadas mais de uma replicata da amostra (genuína), a incerteza combinada da fortificação será dada pela média das incertezas de cada replicata de acordo com a fórmula abaixo:

$$\bar{u}_c(C_{fortificação}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(u_c(C_{fortificação_i})\right)^2}{n}}$$

Equação 21

Onde: $u_c(C_{fortificação})i$ = incerteza combinada da fortificação.

Assim, a incerteza relativa da concentração de fortificação é dada por:

Equação 92

Caso as incertezas relativas encontradas para cada nível de concentração sejam na mesma ordem de grandeza, a contribuição para a incerteza global do método é dada pela combinação ponderada das mesmas.

7.6.4 Curva de Calibração

A incerteza da curva de calibração é determinada através do método clássico As equações utilizadas no cálculo estão descritas a seguir.

$$Y = aX + b \qquad \text{Equação 1}$$

$$D = n \times \sum x_i^2 - \left(\sum x_i\right)^2 \qquad \text{Equação 23}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_{estim})^2}{(n-2)}} \qquad \text{Equação 24}$$

$$r_{(b,a)} = yb \;, a \;= -\frac{\sum x_i}{\sqrt{n \sum x_i^2}} \qquad \text{Equação 25}$$

$$u^2{}_{(b)} = \frac{S^2 \sum x_i}{D} \qquad \text{Equação 26}$$

$$u^2{}_{(a)} = \frac{n \times S^2}{D} \qquad \text{Equação 27}$$

$$c_{(b)} = \frac{\partial X_{estimado}}{\partial b} = -\frac{1}{a} \qquad \text{Equação 28}$$

$$c_{(a)} = \frac{\partial X_{estimado}}{\partial a} = -\frac{b - y}{a^2} \qquad \text{Equação 29}$$

$$u_c(curva) = \sqrt{(cb \times ub)^2 + (ca \times ua)^2 + 2 \times cb \times ca \times ub \times ua \times r_{(b,a)}} \qquad \text{Equação 30}$$

$$u_c(curva) = \sqrt{\left(\frac{u_c(curva)}{C_{med}}\right)^2} \qquad \text{Equação 31}$$

7.6.5 Incerteza da solução padrão

Esta incerteza é obtida mediante a medição das soluções padrão em espectrofotômetro ou do certificado da concentração da solução, caso utilize-se um

material de referência. Nos dois casos a incerteza relativa da solução padrão, u_r(Cpadrão), é dada pela equação a seguir.

$$u_r(C_{padrão}) = \sqrt{\left(\frac{u_c(C_{padrão})}{C_{padrão}}\right)^2}$$

Equação 102

Onde: $u_c(C_{padrão})$= incerteza padrão combinada da solução padrão (certificado ou espectrofotômetro)

$C_{padrão}$= concentração da solução padrão

7.6.6 Incerteza Combinada

$$u_c(C_{medida}) = \sqrt{[illegible]}$$

Equação 113

Onde: $\overline{C}_{medida}$ = média da concentração medida

$u_r(C_{padrão})$ = incerteza relativa da concentração da solução padrão

u(Preparo) = incerteza relativa do preparo da amostras

u_r(Curva) = incerteza relativa da curva de calibração

u_r(r) = incerteza da repetitividade

u_r(Rec) = incerteza da recuperação

7.6.7 Incerteza Expandida

A incerteza expandida é obtida multiplicando a incerteza padrão combinada pelo fator de abrangência (k=2), obtendo um nível de confiança de 95,45 %.

$$U = k \times u_{(c)}$$ Equação 34

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Método 1

No teste de seletividade foram observados picos interferentes na região de eluição da OTA, confirmados ao se analisar o padrão de OTA (Figura 14). O suco de uva é uma matriz complexa, com pigmentos que podem interferir no resultado final da análise. O uso do PEG 8000 diminui a ação destes interferentes, pois é um agente precipitante, sendo o precipitado eliminado na filtração com filtro de microfibra de vidro (SÁEZ et al, 2003). No método 1, usou-se PEG 6000.

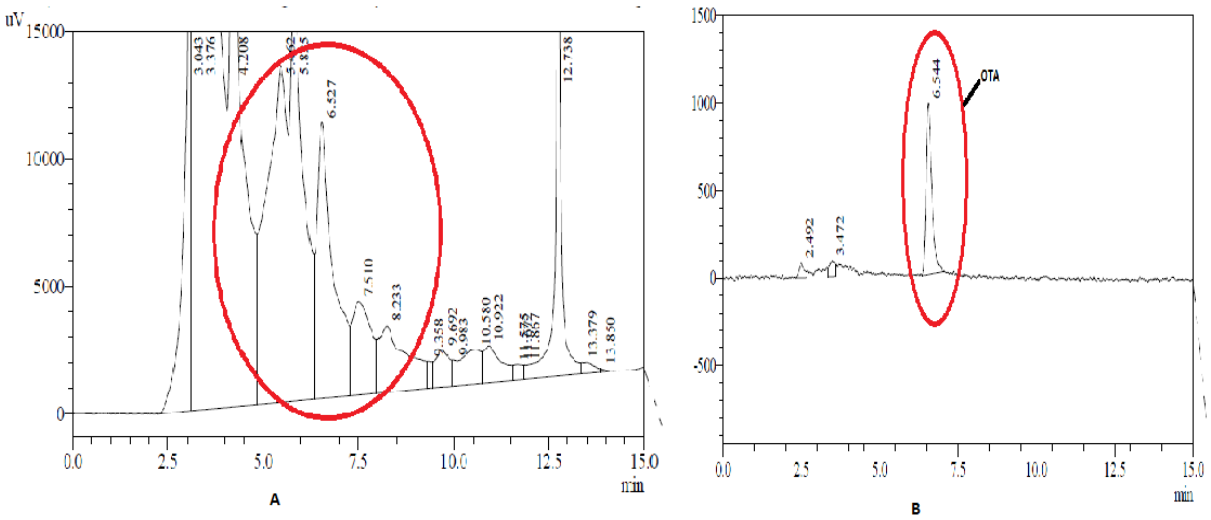


Figura 14 - Método 1 - Avaliação da seletividade: Cromatogramas A: Amostra de suco integral de uva tinta; B: Padrão de OTA 0,37 ng ml^{-1}.

8.2 Método 2

No método 2, para a avaliação de seletividade não foram observados picos no tempo de retenção da OTA.(Figura 15A), comparado com o padrão de OTA (Figura 15B). Entretanto, na avaliação da recuperação iverificouse uma perda de mais de 60% do analito quando se fortificou a matriz de suco de uva tinto integral no início do procedimento com 0,5 ng mL^{-1} (Figura 16), o que inviabilizou o uso da metodologia.

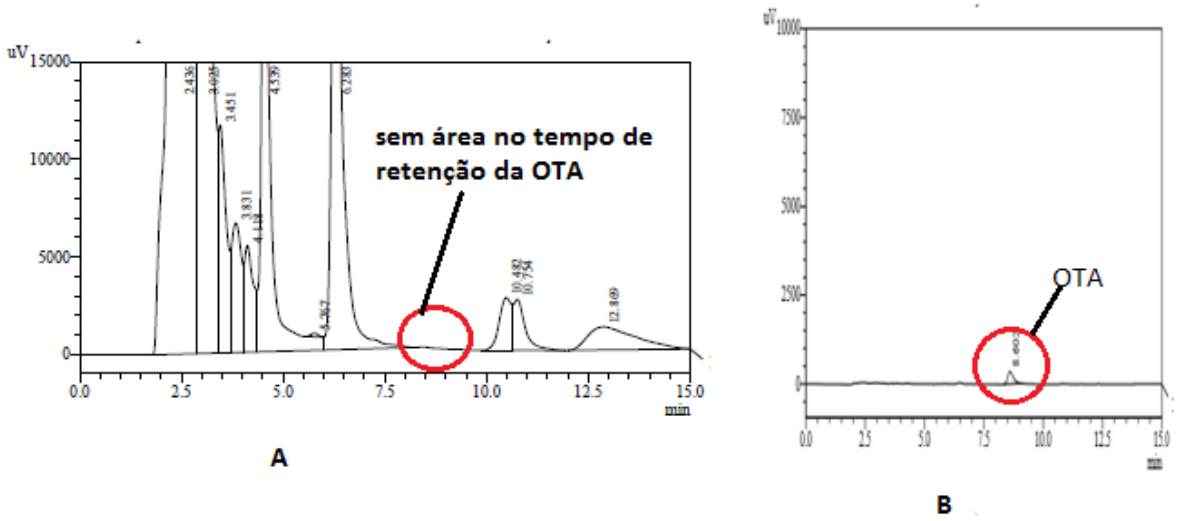


Figura 15 - Método 2 - Avaliação da seletividade: Cromatograma A: Amostra branco de suco integral de uva; B: Padrão de OTA 0,37 ng mL^{-1}

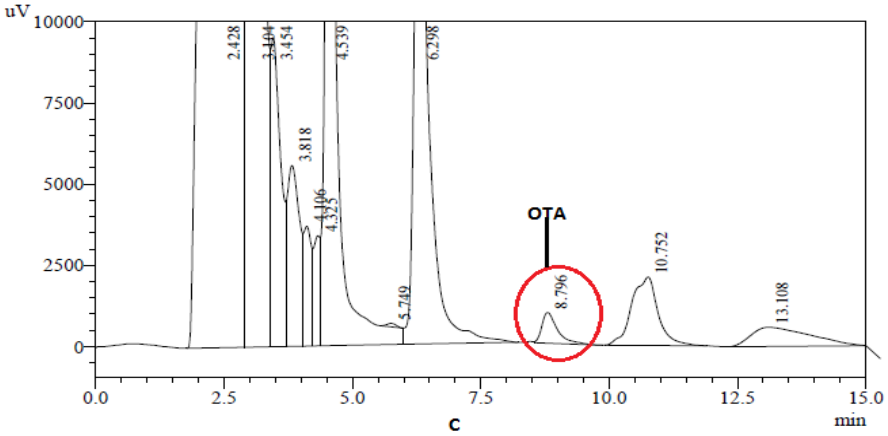


Figura 16 - Método 2: Cromatograma: Amostra de suco de uva integral fortificada com OTA na etapa inicial do método

Para avaliar perdas inerentes a matriz, fêz-se a fortificação do branco do método (sem adição da matriz), com 0,5 ng mL^{-1} (Figura 17B), obtendo-se recuperação acima de 90%. Para avaliar perda durante a secagem da amostra em banho-maria, fêz-se a fortificação da matriz na etapa final com o equivalente ao que seria uma contaminação de 0,5 ng mL, obtendo-se recuperação acima de 90% (Figura 17A).

A baixa recuperação na contaminação inicial pode ser devido ao fato da capacidade da coluna de imunoafinidade em reter a OTA ser afetada pela matriz. As figuras mostra os cromatogramas do teste de recuperação

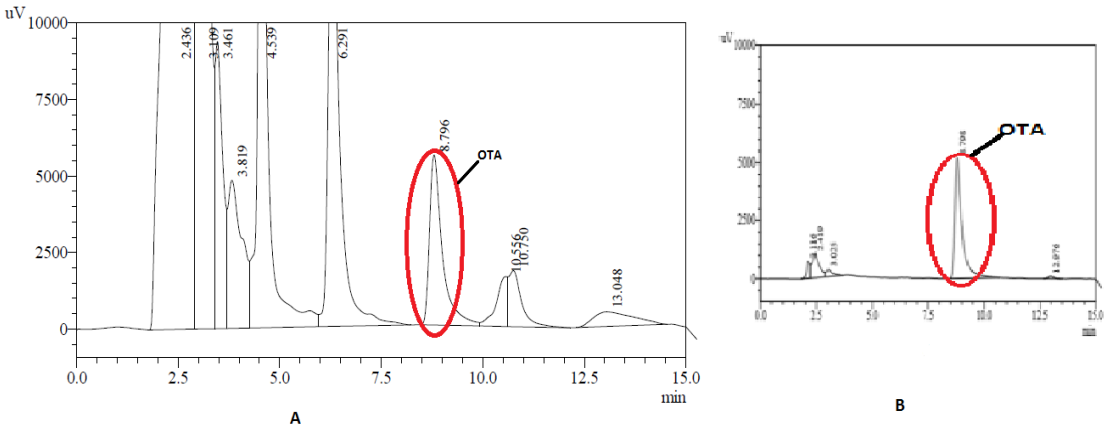


Figura 17 - Método 2: Teste de recuperação: Cromatogramas A: Suco de uva tinto integral fortificada com 0,5 ng ml^{-1} na etapa final do método; B: Branco do método fortificado com 0,5 ng ml^{-1} de OTA.

8.3 Método 3

Nos testes de seletividade, as amostras analisadas pelo método 3 apresentaram pico cromatográfico na região da OTA e no mesmo tempo de retenção do padrão (Figura 18), além de muitos interferentes, similar ao ocorrido na seletividade do método 1. Utilizou-se, então, a cromatografia líquida acoplada a um detector de espectrometria de massas sequencial para a confirmação e o resultado foi negativo para a OTA (Figura 19), ou seja o pico foi considerado um interferente. Assim, este método foi considerado inadequado para tratamento das amostras.

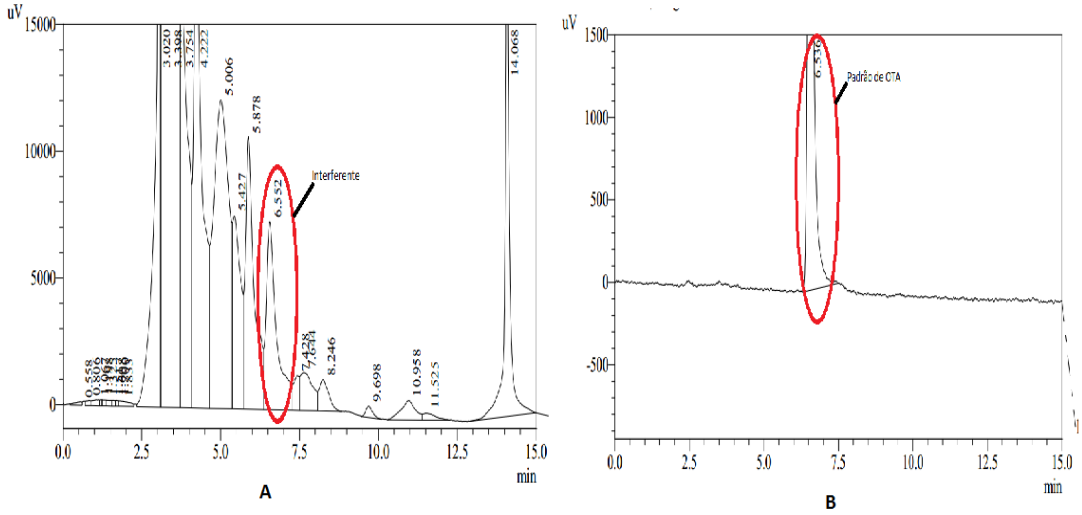


Figura 18 - A: Método 3: Cromatogramas: A, Amostra branco de néctar de uva tinto; B, Padrão de OTA

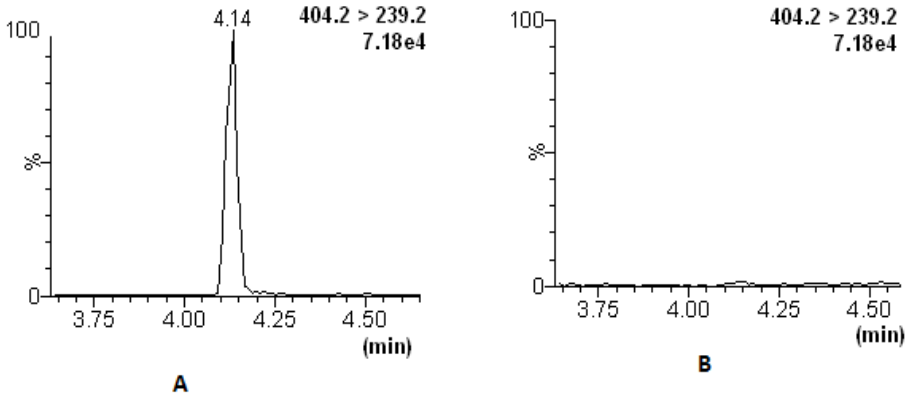


Figura 19 - A: Cromatograma obtido por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial: A, solução padrão de OTA; B, amostra branco de néctra de uva.

8.4 Método 4

Na avaliação da seletividade do método 4, nas amostras em branco, sem a presença da OTA, foi verificada ausência de picos cromatográficos eluindo no mesmo tempo de retenção da OTA (Figura 20).

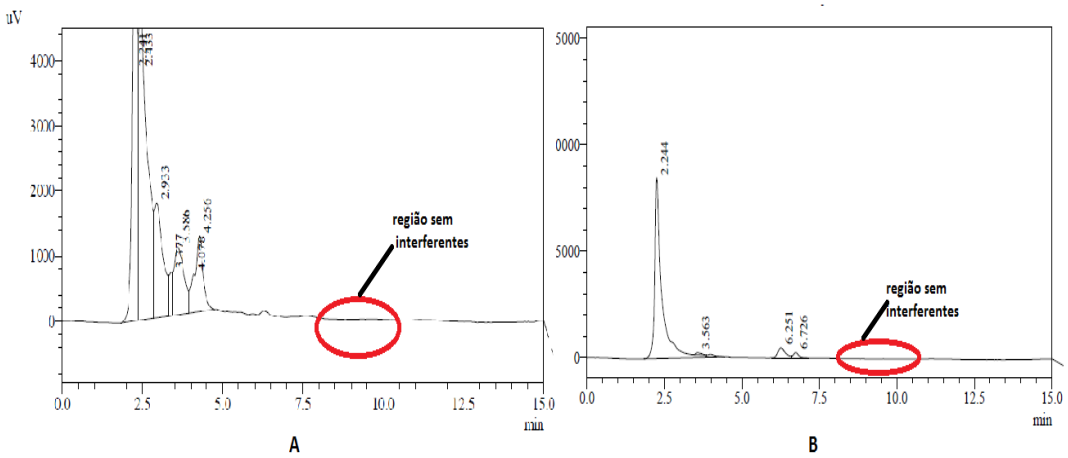


Figura 20 - Método 4 – Teste de seletividade: A: Amostra branco de suco tinto integral; B: Amostra branco de néctar de uva tinto

No teste de recuperação, fortificando com 0,5 ng mL^{-1} a matriz de suco de uva branca, obteve-se recuperação acima de 60% (Figura 21), sendo esse método selecionado para a validação.

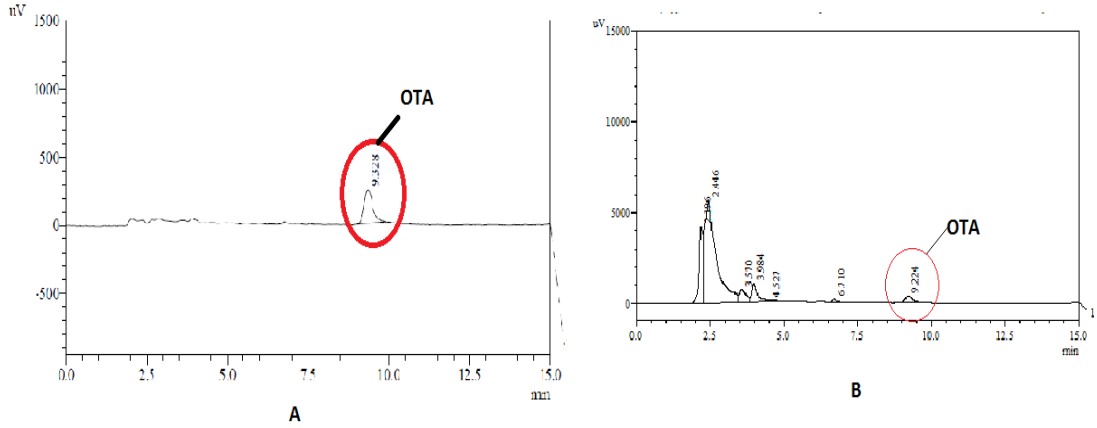


Figura 21 - Método 4 – Teste de recuperação. A: Padrão de OTA; B: Amostra de suco de uva branca integral fortificada com 0,1 ng ml^{-1}

8.5 Resultado da Avaliação da Linearidade da Curva de Calibração

8.5.1 Tratamento de Valores Extremos

Como premissa para a análise da curva de calibração a presença de valores extremos foi avaliada pelo método dos resíduos padronizados Jacknife, sendo a repetição i = 15 considerada extrema e removida do conjunto de dados, Tabela 2.

Tabela 2: Áreas correspondentes a massa de OTA A em 50µL injetados. Destaque em vermelho para o valor aberrante

Nível (K)	i	Concentração (ng $50\mu L^{-1}$)	Área
1	1	0,015	4652
	2	0,015	4753
	3	0,015	4733
2	4	0,032	11056
	5	0,032	11169
	6	0,032	10682
3	7	0,063	23247
	8	0,063	23917
	9	0,063	23404
4	10	0,13	49828
	11	0,13	49606
	12	0,13	49377
5	13	0,25	99928
	14	0,25	100691
	15	**0,25**	**99133**
6	16	0,50	203408
	17	0,50	203522
	18	0,50	202786

A linearidade dos dados experimentais foi avaliada por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).

A regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), utilizando uma planilha de cálculo em Excel de Bazílio (2011), adaptada de Souza e Junqueira (2005), foi aplicada para elaboração da curva de calibração em solvente. O coeficiente linear resultante foi 0,9999. A figura 22 apresenta a curva de calibração final após a remoção dos valores extremos.

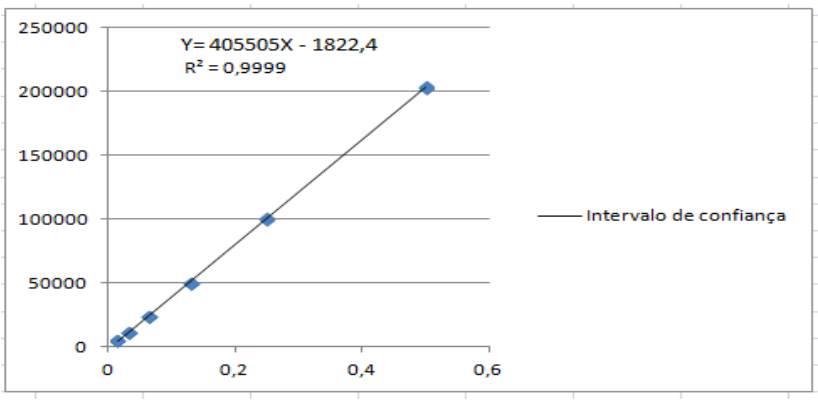


Figura 22 - Curva de calibração final, com a equação de regressão

8.5.2 Teste de Normalidade

O teste Ryan-Joiner foi o utilizado para verificar a normalidade dos resíduos da regressão. O coeficiente de correlação R_{eq} entre e_i e q_i e o valor de R_{crit} foram calculados, , utilizando uma planilha de cálculo em Excel de Bazílio (2011), adaptada de Souza e Junqueira (2005), e a Tabela 3 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 3: Teste Ryan-joiner para a normalidade dos resíduos

i	p_i	bi	e_i	e_i ordenados	$(e_i-emed)(q_i-qmed)$	$(e_i-emed)^2$	$(q_i-qmed)^2$
1	0,03623	-1,79619	291,26204	-562,44105	1010,25	316339,94	3,2263
2	0,09420	-1,31531	392,26204	-444,52656	584,69	197603,86	1,7300
3	0,15217	-1,02715	372,26204	-405,44105	416,45	164382,45	1,0550
4	0,21014	-0,80592	38,39930	-395,47058	318,72	156396,98	0,6495
5	0,26812	-0,61852	151,39930	-335,60070	207,58	112627,83	0,3826
6	0,32609	-0,45074	-335,60070	-258,39867	116,47	66769,87	0,2032
7	0,38406	-0,29484	-562,44105	-29,39867	8,67	864,28	0,0869
8	0,44203	-0,14583	107,55895	38,39930	-5,60	1474,51	0,0213
9	0,50000	0,00000	-405,44105	107,55895	0,00	11568,93	0,0000
10	0,55797	0,14583	192,60133	151,39930	22,08	22921,75	0,0213
11	0,61594	0,29484	-29,39867	192,60133	56,79	37095,27	0,0869
12	0,67391	0,45074	-258,39867	226,52942	102,11	51315,58	0,2032
13	0,73188	0,61852	-444,52656	291,26204	180,15	84833,57	0,3826
14	0,78986	0,80592	318,47344	318,47344	256,66	101425,33	0,6495
15	0,84783	1,02715	226,52942	340,52942	349,78	115960,29	1,0550
16	0,90580	1,31531	340,52942	372,26204	489,64	138579,02	1,7300
17	0,96377	1,79619	-395,47058	392,26204	704,58	153869,51	3,2263

n	17	S_{eq}	4819,01
qmed	-1,57E-16	S_{ee}	1734028,97
emed	0,00	S_{qq}	14,7097

R_{eq}	0,9542

Valores Críticos de R
Rcrit (α: 0,10) = 0,9548
Rcrit (α: 0,05) = 0,9437
Rcrit (α: 0,01) = 0,9192

O valor de R_{eq} encontrado foi maior que o valor crítico R_{crit} (a=0,05), indicando que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, Tabela 4.

Tabela 4: Req e Rcrit calculados

R_{eq}	R_{crit} (α=0,05)
0,9542	0,9437

8.5.3 Teste de Homocedasticidade

A homocedasticidade dos resíduos foi confirmada (p> 0,05), indicando que as variâncias foram constantes ao longo da curva (Tabela 5) e que os dados podem ser avaliados por regressão linear ordinária. O valor encontrado, utilizando uma planilha de cálculo em Excel de Bazílio (2011), adaptada de Souza e Junqueira (2005), para a estatística do teste de Levene, menor que o valor crítico (1 /2; 2) -a n1+n2- t indica a homoscedasticidade dos resíduos

Tabela 5: Dados da homocedasticidade dos Resíduos

Estatística	Grupo 1	Grupo 2
n	9	8
Mediana	$1{,}08 \times 10^2$	$8{,}16 \times 10^1$
dm	$2{,}75 \times 10^2$	$2{,}76 \times 10^2$
SQD	$1{,}10 \times 10^6$	$7{,}89 \times 10^5$
Var	$1{,}26 \times 10^5$	
t	-0,006	
$T_{crítico}$	2,131	

dm, média das diferenças entre cada resíduo e a mediana do seu grupo; t, estatística t.

8.5.4 Teste de Independência dos Resíduos (autocorrelação dos resíduos)

Utilizando o teste de Durbin-Watson, feito através da planilha de cálculo em Excel de Bazílio (2011), adaptada de Souza e Junqueira (2005), a autocorrelação dos resíduos foi avaliada (p> 0,05). Os resultados para os limites inferior (dL) e superior (dU), com nível de significância de 0,05, foram calculados, Tabela 6. Se o valor d estivesse entre os dois limites, o teste seria inconclusivo. Se o Valor de d fosse menor que dL, indicaria autocorrelação.

Tabela 6: Dados da independência dos resíduos

i	i	e_i	e_{i-1}	$e_i - e_{i-1}$	$(e_i - e_{i-1})^2$	e_i^2
1	1	291,262	-	-	-	8,48E+04
2	2	392,262	291,262	101,000	1,02E+04	1,54E+05
3	3	372,262	392,262	-20,000	4,00E+02	1,39E+05
4	4	38,399	372,262	-333,863	1,11E+05	1,47E+03
5	5	151,399	38,399	113,000	1,28E+04	2,29E+04
6	6	-335,601	151,399	-487,000	2,37E+05	1,13E+05
7	7	-562,441	-335,601	-226,840	5,15E+04	3,16E+05
8	8	107,559	-562,441	670,000	4,49E+05	1,16E+04
9	9	-405,441	107,559	-513,000	2,63E+05	1,64E+05
10	10	192,601	-405,441	598,042	3,58E+05	3,71E+04
11	11	-29,399	192,601	-222,000	4,93E+04	8,64E+02
12	12	-258,399	-29,399	-229,000	5,24E+04	6,68E+04
13	13	-444,527	-258,399	-186,128	3,46E+04	1,98E+05
14	14	318,473	-444,527	763,000	5,82E+05	1,01E+05
	15	226,529	318,473	-91,944	8,45E+03	5,13E+04
15	16	340,529	226,529	114,000	1,30E+04	1,16E+05
16	17	-395,471	340,529	-736,000	5,42E+05	1,56E+05

O valor da estatística d do teste foi maior do que o limite superior, indicando a independência dos resíduos, conforme mostrado na tabela 7.

Tabela 7: Limites d_l e d_u calculados

d	d_l	d_u
1,600243	1,132186	1,380498

A figura 23 representa graficamente a independência dos resíduos da regressão, pois os dados estão distribuídos homogeneamente.

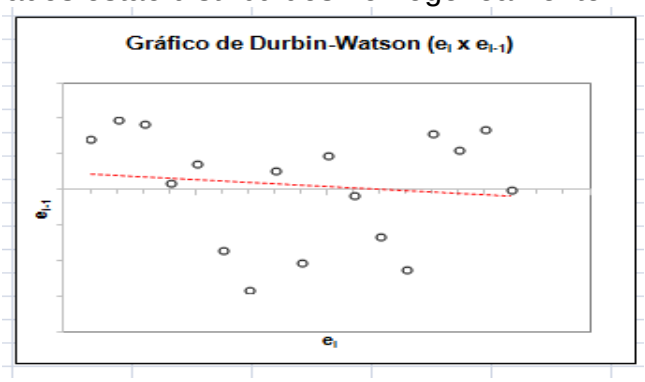


Figura 23 - Gráfico de Durbin-Watson (ei x e_{i-1}) para a curva de calibração d, estatística d; d_L, limite inferior; d_U, limite superior

8.5.5 Teste de significância da regressão e desvio da linearidade

Empregando a análise de variância –ANOVA – foram realizados os cálculos do teste de significância da regressão e desvio da linearidade. Os resultados obtidos, utilizando uma planilha de cálculo em Excel de Bazílio (2011), adaptada de Souza e Junqueira (2005), encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8: Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade.

Fonte de variação	G.L	SQ	QM	F	P
Regressão	1	$8{,}53x10^{10}$	$8{,}53x10^{10}$	$7{,}38x10^{5}$	$1{,}31x10^{-36}$
Resíduos	15	$1{,}73x10^{6}$	$1{,}16x10^{5}$		
Desvio da Linearidade	4	$6{,}43x10^{5}$	$1{,}62x10^{5}$	1,63x10	$2{,}35x10^{-01}$
Erro puro	11	$1{,}09x10^{6}$	$9{,}89x10^{4}$		
Total	16	$8{,}53x10^{10}$			

GL , graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados; QM , média dos quadrados; F , estatística da análise de variância; p , significância.

Os dados indicam uma alta significância de regressão ($p<0,001$), e falta de ajuste não significativa ($p>0,05$), atestando a linearidade da curva de calibração para a faixa de trabalho estudada, 0,3 a 10, ng ml^{-1}.

8.6 Resultados da Recuperação e Precisão do Método Validado

A exatidão e precisão foram avaliadas por meio de estudos de recuperação, onde amostras branco das matrizes de interesse foram fortificadas com alíquotas de padrões de OTA, de concentrações 66,30 ng ml^{-1} e 660,30 ng ml^{-1}, em três níveis de fortificação para a matriz suco integral de uva tinto, sendo de 0,099; 0,99 e 1,98 ng.mL^{-1} (Tabela 9).

Tabela 9: Método 4 - Dados das fortificações nos três níveis.

Matriz: suco de uva tinto					
Analistas					
1	2	1	2	1	2
0,099 ng ml^{-1}		0,99 ng ml^{-1}		1,98 ng ml^{-1}	
0,070	0,069	0,80	0,84	1,53	1,76
0,070	0,069	0,79	0,82	1,67	1,53
0,070	0,069	0,81	0,86	1,67	1,56
0,075	0,070	0,82	0,84	1,58	1,80
0,072	0,070	0,81	0,81	1,66	1,66
0,076	0,070	0,82	0,81	1,55	1,53
0,075	0,070	0,83	0,85	1,61	1,82
0,072	0,075	0,81	0,83	1,52	1,69
0,075	0,074	0,83	0,82	1,65	1,55

Para suco integral de uva branca, néctar de uva e suco integral de uva rosé a fortificação foi no nível de 0,099 ng mL^{-1} (Tabela 10).

Tabela 10: Métdodo 4 - Dados da fortificação no LOQ

0,99 ng mL^{-1}		
Suco integral de uva branca	Suco integral de uva rosé	Néctar de uva tinto
0,095	0,075	0,096
0,092	0,075	0,097
0,096	0,077	0,095
0,092	0,075	0,103
0,091	0,079	0,108
0,092	0,078	0,105
0,097	0,069	0,105
0,094	0,068	0,108
0,096	0,070	0,106

Os resultados obtidos estatisticamente estão demonstrados na Tabela 11, onde a precisão é expressa pelo desvio padrão relativo (RSD %) e a exatidão pelos valores de recuperação.

Tabela 11: Método 4 - Dados da recuperação, repetibilidade e precisão intermediária

			0,099 ng/mL			**0,99 ng/mL**			**1,98 ng/mL**		
matriz	**LD**	**LQ**	**Rec**	**[a]RSD**	**[b]RSD**	**Rec**	**[a]RSD**	**[b]RSD**	**Rec**	**[a]RSD**	**[b]RSD**
Suco integral tinto	0,03	0,1	75	3,34	5,97	83	1,96	3,62	82	5,59	2,25
Suco integral branco	0,03	0,1	95		2,21						
Néctar de uva tinto	0,03	0,1	104		5,10						
Suco integral rosé	0,03	0,1	75		5,45						

LD= Limite de detecção (µg/kg); LQ= Limite de quantificação (µg/kg); Rec(%)= Recuperação; RSD[a] (%)= Desvio Padrão Relativo para analistas diferentes, em dias diferentes; RSD[b] (%), Desvio Padrão mesmo analista.

Os resultados foram avaliados de acordo com os critérios utilizados na Diretiva da Comissão Europeia 2002/657 / CE (CE, 2002). Os valores de recuperação foram entre 73 e 104 %, com RSD inferior a 17% para todos os níveis.

O método desenvolvido apresentou boa exatidão e precisão nos níveis de concentração avaliados (Tabela 11).

Segundo os resultados obtidos, pode-se concluir que o método analítico demonstrou, recuperação, repetibilidade e precisão intermediária aceitáveis para todos os níveis de concentração estudados. Como não foi feita a recuperação utilizando um material de referencia certificado (MRC) de OTA em suco de uva, não foi possível avaliar a veracidade do método. A veracidade mínima, deve atender aos critérios estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (Tabela 2).

Em todos os níveis foram feitos testes quanto à presença de *outliers,* utilizando *Grubbs, n*as concentrações encontradas resultantes da injeção em triplicata de cada uma das amostras. O valor de G calculado foi comparado com o valor de G crítico (tabelado) para um intervalo de confiança de 95% (p=0,05).

8.7 Resultado da Robustez do Método

A robustez foi realizada com a análise de 3 amostras de suco de uva tinto integral (Figura 24), fortificadas com a ocratoxina A no nível de concentração de 0,099 ng mL^{-1}, utilizando colunas de imunoafinidade de um fabricante (Vicam) diferente do utilizado nos estudos de recuperação e precisão (r-Biopharm) (Tabela 12).

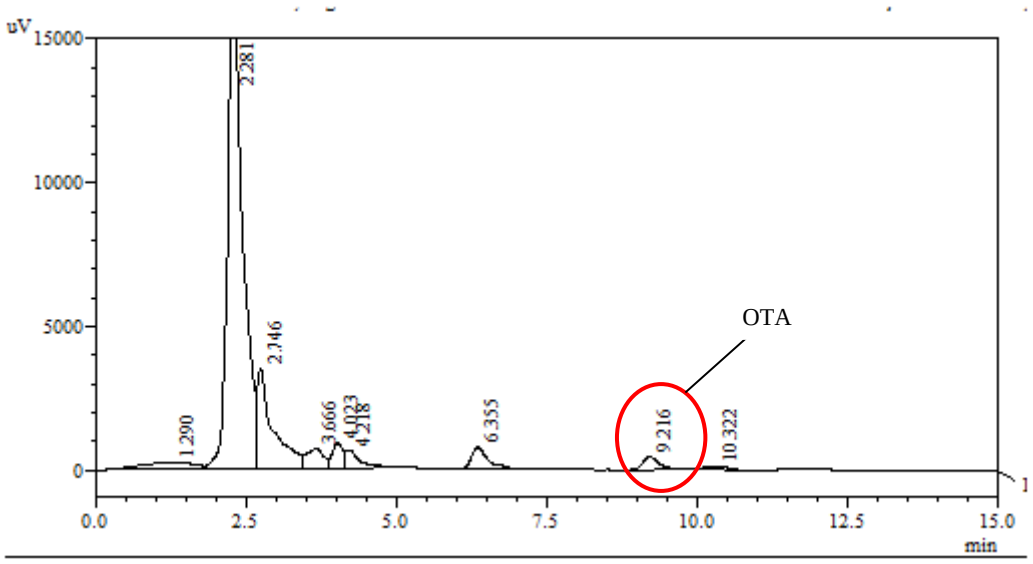


Figura 24 - Método 4 – Teste de robustez com coluna de imunoafinidade Vicam. Cromatograma de amostra de suco de uva tinto Integral fortficada com a ocratoxina A (0,099 ng ml^{-1}).

Tabela 12: Método 4 - Teste de robustez usando coluna Vicam para avaliar a recuperação

0,099 ng mL^{-1}
Suco integral de uva tinto
0,076
0,075
0,073
0,077
0,077
0,068
0,078
0,077
0,076

O resultado de recuperação foi de 76%, para um desvio padrão relativo de 4,07 (Tabela 13.).

Tabela 13: Método 4 - Teste de robustez. Dados da recuperação, e desvio padrão relativo

	0,099 ng mL^{-1}	
matriz	Rec %	RSD %
Suco integral tinto	76	4,07

Rec(%)= Recuperação; RSD (%)= Desvio Padrão relativo.

Pelos resultados obtidos nos estudos realizados foi verificado boa recuperação e precisão do método analítico empregando colunas de imunoafinidade dos fabricantes avaliados.

8.8 Procedimento Operacional Padrão – POP

Após o processo de validação, foi elaborado um procedimento operacional padrão (ANEXO) para a determinação de OTA em amostras de suco integral e néctar de uvas. O procedimento descreve as condições de realização do ensaio, levando em consideração os parâmetros avaliados no processo de validação, a serem seguidas no laboratório de resíduos de micotoxinas do Departamento de Química do INCQS.

8.9 Análise de OTA nas Amostras de Suco Integral e Néctar de Uvas do Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes

Em 2013, foi pactuado um Programa Monitoramento de Aditivos e Contaminantes (PROMAC) em alimentos entre a ANVISA e as Vigilâncias Sanitárias Estaduais (VISAs) para a coleta de amostras de suco integral e néctar de uvas comercializados nos mercados locais. Entre os anos de 2014 e 2015, os Laboratórios Centrais Estaduais (LACENs) dos Estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná, coletaram e enviaram ao INCQS um total de 26 amostras. Pelo estado do Rio de Janeiro, foram coletadas 16 amostras através do Laboratório de Resíduo de Micotoxinas, de néctar de uva e suco de uva integral, para análise de OTA. As amostras foram analisadas no Departamento de Química, no Setor de Resíduo, Laboratório de Micotoxinas utilizando o método 4 após validação.

O Estado do Paraná enviou apenas amostras de néctar de uva, num total de 8 amostras. O estado de Santa Catarina enviou 3 amostras de néctar de uva e 9 amostras de suco integral de uva. Do estado do Rio de Janeiro foram analisadas 10 amostras de suco integral e 2 amostra de néctar de uvas, enquanto o estado do Grande do Sul enviou 5 amostras de néctar de uva e 11 amostras de suco integral de uva (Figura 25).

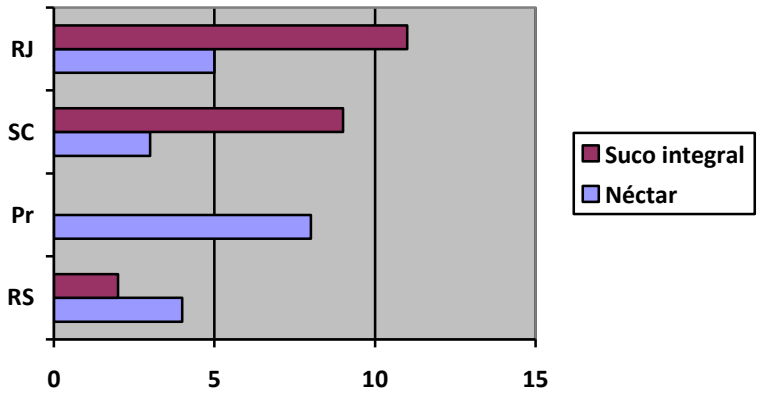


Figura 25 - Gráfico da quantidade de amostras por Estado comercializador

Na conferência dos dados da embalagem, observou-se que algumas amostras de néctar de uva não eram produzidas nos estados coletados, mas nos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo (Figura 26). Os resultados das análises das amostras não apresentaram contaminação por OTA. Estes resultados podem ter sido devido a fatores diversos, tais como a variedade de uva utilizada na produção do suco, a fase de maturação e as práticas vitícolas aplicadas, que impediram o crescimento de fungos produtores de OTA.

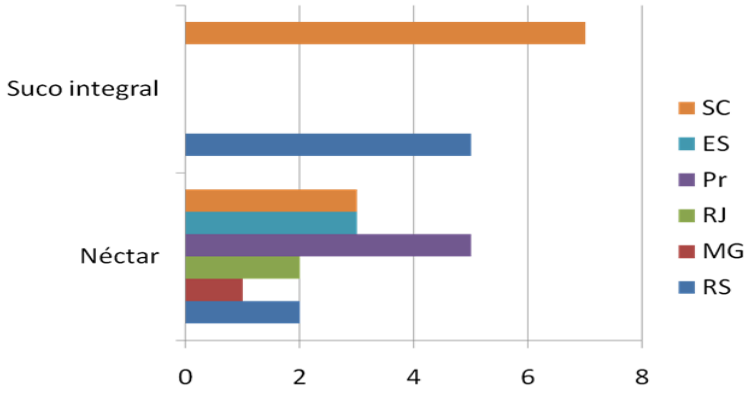


Figura 26 - Gráfico da quantidade de amostras por Estado produtor

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo um método analítico foi validado para análise de OTA em suco de uva integral e néctar de uva, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, que se mostrou uma ferramenta analítica adequada, que utilizada como método de detecção específico, é sensível para substâncias que fluorescem, podendo detectar quantidades da ordem de picogramas.

O método validado apresentou limites de detecção e quantificação abaixo dos valores estabelecidos pela legislação vigente. Todos os parâmetros avaliados como linearidade, seletividade, repetibilidade, precisão intermediária e robustez apresentaram resultados satisfatórios para as faixas de concentração definidas na validação do método, com o método se mostrando seletivo, pois, a eluição da matriz isenta das micotoxinas em comparação à matriz fortificada indicou que nenhum interferente eluiu no tempo de retenção desta, exato e preciso dentro da faixa de trabalho estudada, comprovado pelos estudos estatísticos, com resultados dentro do aceitável, com coeficientes de variação menores do que 20%, demonstrando que o método é repetitivo, sendo simples, sem muitas etapas de tratamento da amostra e modelo de regressão linear foi adequado para a determinação das micotoxinas em estudo, pois os coeficientes de correlação (r), foram maiores que 0,90, conforme recomendação do INMETRO. Os resultados estatísticos também atendem as recomendações do limite estabelecido pela ANVISA de coeficiente de variação não superior a 20%.

O estudo gerou o Procedimento Operacional Padrão “DETERMINAÇÃO DE OTA EM SUCO DE UVA INTEGRAL E NÉCTAR DE UVA POR CLAE/F”, que foi utilizado pelo INCQS nas análises fiscais de amostras de suco e néctar de uvas coletadas durante o ano de 2014 e 2015 no comércio dos Estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná pelas Vigilâncias Sanitárias.

Nesse estudo não foi detectado OTA nas 28 amostras analisadas, demonstrando que os resultados estão de acordo com os encontrados no Brasil, no qual a presença de OTA não foi encontrada nas amostras de suco de uva analisadas no estado de São Paulo (Shundo et al., 2006; Terra et al., 2012). No entanto, em outro estudo realizado com amostras de suco de uva do Rio de Janeiro, a OTA foi encontrada com baixa ocorrência e em baixos níveis de contaminação (Rosa et al., 2004).

Estes resultados podem indicar que a adoção de Boas Práticas Agrícolas, Boas Práticas de Fabricação e Boas Práticas de Higiene, com base no programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que têm sido recomendadas como medidas preventivas para a ocorrência de micotoxinas estão sendo praticadas. Assim é possível prevenir e minimizar o risco de contaminação e desenvolvimento de fungos toxigênicos e consequentemente a produção de micotoxinas. A falta de incidência de ocratoxina nas amostras também pode ser associada a provável inexistência de fungos ocratoxigênicos na uvas utilizadas para a produção dos sucos integrais e néctares.

A principal via de exposição humana às micotoxinas é pela ingestão de alimentos contaminados. O interesse pelos fungos e pelas micotoxinas tem aumentado no âmbito científico, sanitário e econômico. As micotoxinas retêm a atenção mundial pelas perdas econômicas relacionadas aos seus efeitos sobre a saúde humana, produtividade animal e comércio nacional e internacional, já que não podem ser eliminadas dos alimentos por completo. Entretanto as pesquisas no Brasil, em sua maioria, são realizadas nas matrizes de café, leite e amendoim, se restringindo a OTA e as aflatoxinas B, G e M. Necessita-se de dados em outras matrizes e micotoxinas, porque a população, em sua maioria crianças e idosos, estão mais suscetíveis à ação nociva desses compostos. Estima-se que as micotoxinas apresentem um risco maior que os pesticidas e aditivos, então os laboratórios de pesquisas brasileiros têm que investir nas análises não somente dos alimentos, mas também na área dos fluídos biológicos humanos para que se tenham dados que possam aumentar o controle de qualidade dos alimentos e rever as restrições quanto a regulação nacional.

O método desenvolvido e validado será utilizado pelo Laboratório de Resíduos de Micotoxinas, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, em futuras análises de OTA em suco e néctar de uvas.

10 CONCLUSÃO

- O método desenvolvido e validado possui limites de detecção e quantificação apropriados para atender a legislação vigente.
- Método desenvolvido e validado foi seletivo, preciso e exato dentro da faixa de trabalho estudada, atendendo a veracidade mínima estabelecidas pelo *Codex Alimentarius*.
- O método desenvolvido e validado é uma importante ferramenta de suporte para a fiscalização junto à vigilância sanitária.
- A não contaminação das amostras de suco e néctar de uvas por OTA indicaram que as boas práticas de produção da uva e fabricação dos produtos estão de acordo com as Boas Práticas de Fabricação.

11 PESPECTIVAS FUTURAS

- Continuidade ao programa PROMAC para a análise de ocratoxina nos sucos integrais consumidos no Estado do Rio de Janeiro e outros estados que não foram contemplados.
- Programa de monitoramento de OTA em vinhos das diversas regiões brasileiras e vinhos importados.
- Que a metodologia seja readaptada para a análise de produtos como uva-passa.
- Aquisição de material de referência para corroborar os dados obtidos na validação da metodologia.
- Possibilidade de produção de materiais de referência utilizando produtos a base de uva.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Adriana Palma de; ALABURDA, Janete; RUVIERI, Valter e SABINO, Myrna. Ocratoxina A em amostras de uva passa comercializadas em São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)** [online]. 2006, vol.65, n.3, pp. 171-175. ISSN 0073-9855

AQUINO NETO, Francisco Radler de; SOUZA NUNES, Denise da Silva e. Cromatografia; princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Guia para a Expressão da Incerteza de Medição**. 3ª ed., Rio de Janeiro, 2003

_____. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**: NBR ISO/IEC 17025/2005. 2a ed., Rio de Janeiro, 2005

BARCELOUX, D. Medical Toxicology of Natural Substances. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. Part 2: 343-347 (2008).

BAYMAN P, Baker J L., Doster M A. , Michailides T J., Mahoney N E. . Ochratoxin production by the Aspergillus ochraceus group and Aspergillus alliaceus Appl Environ Microbiol. 68(5): 2326–2329, 2002.

BAYMAN, P.; Baker, J. Ochratoxins: A global perspective. **Mycopathologia** 162: 215-223 (2006).

Bautman, V.; (2006), Fifty years of Balkan endemic nephropathy: daunting questions, elusive answers. Kidney International 69: 644–646.

BAZILIO, F.S.; BOMFIM, M. V. J.; ALMEIDA, R. J.; ABRANTES, S. M. P. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva de calibração ao modelo linear. **Analytica.** [2011].

BELSLEY, D. A.; KUH, E.; WELSCH, R. E. Regression diagnostics: identifying influential data and sources of colinearity. New York: Wiley, 1980.

BENNETT, J. W. and Klich, M. 2003. Mycotoxins. ***Clin Microbiol Rev***. 16:497-516

BIRCAN, C. Incidence of ochratoxin A in dried fruits and co-occurrence with aflatoxins in dried figs. **Food and Chemical Toxicology**, August, 2009, Vol.47(8), p.1996(6).

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria n. 183, art 1. Adotar regulamento técnico do MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela resolução nº 56/94 do grupo Mercado comum do Sul de 1 de janeiro de 1995. Diário Oficial [da] União, Brasília, 25 mar. 1996.

_____. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Inspeção de Produtos Vegetais. Complementação de padrões de identidade e qualidade para suco, refresco e refrigerante de uva. Brasília, DF, 1974. 29 p.

_____. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e padrões para alimentos. Resolução nº 34/76. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos. Diário Oficial [da] União, Brasília, pt. I, p. 710, 19 jan. 1977. Seção I.

_____ Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002. Diário Oficial [da] União, Brasília, 16 out. 2002.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Publicada no D.O.U em 22 de fevereiro de 2011.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013. Dispõe sobre a prorrogação dos prazos estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da Resolução da Diretoria Colegiada RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011 que dispõe limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. DOU: 30 de dezembro de 2013, Seção 1.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do **"Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"**; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. DOU: 02 de junho de 2003, Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 55, de 27 de julho de 2004. Normas referentes à complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e dos derivados da uva e do vinho. Disponível em: www.agricultura.gov.br . Acesso em 27 dez. 2013.

_____. Secretaria de Fiscalização Agropecuária. Ministério da Agricultura. Portaria nº 7, de 9 de novembro de 1988. Estabelece os padrões mínimos das diversas matérias primas empregadas na alimentação animal. Publicado: D.O.U., 14/11/1988.

_____. MAPA – ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 27 de fev. 2015.

_____. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva. Acesso em: 27 DE FEV. 2014

BRATINOVA, S.; RAFFAEL, B.; SIMONEAU, C. **Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials: EUR 24105 EN**. 1. ed. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2009. Disponível em: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/111111111/1326>

BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust Tests for the Equality of Variances. **Journal of the American Statistical Association**, v. 69, n. 346, p. 364-367, 1974.
CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHEL, P. BRS Carmem: nova cultivar de uva tardia para suco. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008 (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 84). Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot084.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2014.

CANAL RURAL. Técnica Rural mostra o processo de produção do suco de uva. Disponível em: http://www.canalrural.com.br/noticias/tecnica-rural/tecnica-rural-mostra-processo-producao-suco-uva-28412. Acesso em: 30 de Nov. 2013

CANAL RURAL. Demanda por suco integral cresce no Brasil. Disponível em: http://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/demanda-por-suco-integral-cresce-brasil-55035. Acesso em: 30 de jan. 2015

CARDOZO, M.; Souza, S. P.; França, T. C. C.; Rezende, C. M; Pinto, A. C.; Lima, A. L. S.; Lima, K. S. C. Quantificação da Inativação da OTA pela Radiação Gama. Um Exemplo do Potencial da Radiação Ionizante na Descontaminação de Agentes Químicos. **Revista Virtual de Química**, 2014 *6* (3), 779-794. Disponível em http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/700/453.

CIB – **Conselho de informações sobre Biotecnologia. Ingestão de aflatoxina pode causar câncer**. Biotech. Ano 2, nº. 5, p. 01-01, ago. 2004. Disponível em: http://www.cib.org.br/pdf/biotech09.pdf> Acesso em 1 nov.2009.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). European Community Comments on the Proposed Draft Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs (avilamycin, dexamethasone, monensin, narasin, tilmicosin, triclabendazole, tylosin). CAC/CCRVDF 11 a 15/05/2009, Natal, Brazil. 3 p. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/fs/ifsi/eupositions/ccrdvf/archives/ccrdvf_2009-item5b_en.pdf. Acesso em: 28/12/2012

CORONEL, M.B. ; Marin, S. ; Cano, G. ; Ramos, A.J. ; Sanchis, V. Ochratoxin A in Spanish retail ground roasted coffee: occurrence and assessment of the exposure in Catalonia. **Food Control**, 2011, Vol.22(3), pp.414-419.

CORONEL, M.B. ; Marín, S. ; Cano-Sancho, G. ; Ramos, A.J. ; Sanchis, V. Exposure assessment to ochratoxin A in Catalonia (Spain) based on the consumption of cereals, nuts, coffee, wine, and beer. **Food Additives and Contaminants** - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, June 2012, Vol.29(6), pp.979-993.

DACHOUPAKAN, C. et al. Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, 2009, Vol 132, p. 14-23.

DAVID, J. M. P. et al. Resveratrol: ações e benefícios à saúde humana. Diálogos e Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC, Nº10, Ano V, 2007. Disponível em: <http://www.ftc.br/dialogos>. Acesso em 24 abr 2014.

DEABES, MM ; El-Habib, RES. Toxigenic fungi and ochratoxin A associated to nuts in Saudi Arabia. **Toxicology Letters**. 2011, Vol.205, pp.S140-S140

DE LA CRUZ, M. H. C. et al. Estimativa da incerteza de medição em análise cromatográfica: abordagem sobre a quantificação de carbamato de etila em cachaça. **Química Nova,** v. 33, p. 1578-1584, 2010.

DRAPER, N.R.; SMITH, H. Applied regression analysis. New York: Wiley, 1998. 706 p.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression. II. **Biometrika**, v. 38, n. 1/2, p. 159-177, 1951

EURACHEM/CITAC WORKING GROUP. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement.** 3a ed., London, 2012.

EUROPEAN COMUNITY (EC). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, Brussels, 2002, L 221/8.

FAO. Evaluation of certain contaminants in food: seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO technical report series ; no. 959, 105 p., 2011.

____. Worldwide Regulations for Mycotoxins 1995. A compendium. FAO Food and Nutrition Paper 64. Rome, Italy, 1997.

____. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Food and Nutrition Paper 81. Rome, Italy, 2004

FERNANDEZ, Rui Rafael Góis. **Micotoxinas: a situação atual da legislação e metodologias analíticas** (2007). Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro 2007. Disponível em: http://ria.ua.pt/bitstream/10773/2997/1/2008001219.pdf. Acesso em: 24 nov.. 2011

FRANKEL, E.N.; et al. Commercial grape juice inhibits thein vitro oxidation of human lowdensity lipoproteins **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 834-838, 1998

GENTA, W. et al. Doenças fúngicas da parte aérea da videira nas safras de verão-outono e inverno-primavera nas regiões norte e noroeste do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.424, 2001.

GONÇALEZ, E.; Pinto, M. M.; Felicio, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **O Biológico**, v. 63, n. 1/2, p. 15-19, 2001.

GUERZONI, E.; Marchetti, R. Analysis of yeast flora associated with grape sour rot and of the chemical disease markers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, p.571-573, 1987.

GURAK, POLIANA D. et al. **AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE SUCOS DE UVA INTEGRAL, NÉCTARES DE UVA E NÉCTARES DE UVA LIGHT (2010)**. Disponível em: http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25528/1/2010-051.pdf. acesso em: 24 out. 2013

HARRIS, D.C., Análise Química Quantitativa. 8ª ed. LTC – Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro,2013.

HOLLER, F. James; Skoog, Douglas A; Crouch, Stanley R. Cromatografia Líquida. In____. Princípios de Análise Instrumental. 6ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. Cap. 28. p.830-865.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of methodperformance
studies. Pure Applied Chemistry. v. 67, p. 331-43, 1995.

IAMANAKA, B. T., Taniwaki, M. H., Menezes, H. C., Vicente, E., & Fungaro, M. H. (2005). Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Bazil. **Food Additives and Contaminants** 22 , 1258-1263.

IARC (International Agency for Research on Câncer). Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: World Health Organization, v. 56 (1993) p. 489.

IBRAVIN. **Instituto Brasileiro do Vinho.** 2013. Disponível em htpp://www.ibravin.org.br. Acesso em: 14 dez. 2013

IBRAVIN. **Informativo Saca-Rolhas**. Ano 5, Nº 11, 24 p. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/public/upload/bulletin/1408120830.pdf>. Acesso em: 30 de junho de 2014.

IBRAVIN. **Instituto Brasileiro do Vinho.** 2015. Disponível em <htpp://www.ibravin.org.br>. Acesso em: 20 fev. 2015

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial , Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-08, rev. 4, 2011.

JACOBSEN, B. J.; Bowen, K. L.; Shelby, R. A.; Diener, U. L.; Kemppainen, B. W.; Floyd, J. **Mycotoxins and Mycotoxicoses**. Circular ANR-767 (2005). Disponível em: http://aces.edu/dept/grain/ANR-767.php>. Acesso em: 20 jun 2012.

JECFA (2001). Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety Evaluation of certain Mycotoxins in Food; WHO Food Additives Series 47; FAO Food and Nutricion Paper; WHO, Geneva, 2001.

KHOURY, A.; Atoui, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. **Toxins** 2: 461-493 (2010).

KNOWMYCOTOXINS. Formação de micotoxina durante o armazenamento. 2015. Disponível em: http://www.knowmycotoxins.com/pt/npoultry5.htm. Acesso em: 14 nov. 2014.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I; GHURYE, S.G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (Ed.). Contributions to probability and statistics. Stanford University Press, p. 278-292, 1960

LIMA, Nayla Elaine Ferreira. Perfil fenólico e atividade antioxidante de vinhos Goethe [dissertação] : caracterização e evolução durante o armazenamento em garrafa / Nayla Elaine Ferreira Lima. 136p. Disponível em: < http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:_PAeos16BKcJ:https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/96118/307716.pdf%3Fsequence%3D1+&cd=4&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br . Acesso em: 19 dez. 2014

LOUREIRO, V.; Malfeito-Ferreira, M. Spolaige yeasts in the wine industry. International **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.86, p.23-50,(2003).

MAGAN, N.; Olsen, M. **Mycotoxins in food. Detection and control**. CRC New York Washington, DC, 471 p., 2004.

MAIA, PP; Siqueira, MPB. AFLATOXINAS EM RAÇÕES DESTINADAS A CÃES, GATOS E PÁSSAROS – UMA REVISÃO. **Revista da FZVA** (PUCRS).Uruguaiana, v.14, n.1, p. 235-257. 2007

MAKUN, HA ; Adeniran, AL ; Mailafiya, SC ; Ayanda, IS ; Mudashiru, AT ; Ojukwu, UJ ; Jagaba, AS ; Usman, Z ; Salihu, DA. Natural occurrence of ochratoxin A in some marketed Nigerian foods. **Food Control**, 2013, Vol.31(2), pp.566-571.

MALLMANN, C.A; Dilkin, P. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxinas. LAMIC. Disponível em:< http://www.lamic.ufsm.br/papers/142z.pdf >. Acesso em: 14/09/2012 .

MERCOSUL. Mercado Comum do Cone Sul. Resolução nº 25 de 2002. **Regulamento Técnico Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho**. Disponível em: <htpp://www.mercur.int/msweb/Normas//normas_web/Resoluciones/PT/Res_025_002_RTM%20Aflatoxinas%20Leite-amendoim-milho_Ata%202_02.PDF>. Acesso em: 30 jan. 2013.

MUSCARELLA, M.; Palermo, C.; Rotunno, T.; Quaranta, V.; D'Antini, P. Survey of ochratoxin A in cereals from Puglia and Basilicata. **Veterinary Research Communications**, 2004, Vol.28(1), pp.229-232.

NEGREIROS, DANIEL: De New Jersey (EUA) para a mesa brasileira. Disponível em: http://www.oestadoce.com.br/noticia/de-new-jersey-eua-para-mesa-brasileira. Acesso em: 14 de maio de 2014.

NGUYEN, K T N; Ryu, D. Concentration of ochratoxin A in breakfast cereals and snacks consumed in the United States. **Food Control**, 2014, Vol.40, pp.140-144.

NIST. **Guidelines for evaluating and expressing the uncertainty of NIST measurement results: NIST Technical Note 1297**. 1994 Edition, Washington: U.S. Government Printing Office, 1994. Disponível em: < http://physics.nist.gov/Pubs/guidelines/TN1297/tn1297s.pdf>. Acesso em: 30 fev. 2014.

NORMA EUROPÉIA EN 14133, British Standard Institution - BSI. (2003) 389 Chiswick High Road. Londres W4 4AL, pp.1-14.

OGA, Seizi. **Micotoxinas em alimentos. In: Fundamentos de Toxicologia**. P. 429-436. São Paulo: Atheneu Editora, 474p. (2003).

PATERSON, R. Russell M; Lima, Nelson. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research International**. Vol 43, p.1902-1914 (2010).

PETZINGER, E ; Ziegler, K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. **Journal Of Veterinary Pharmacology And Therapeutics**, 2000, Vol.23(2), pp.91-98.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; Manderville, R. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition & Food Research** 51: 61-99 (2007).

PITT, JI. Toxigenic fungi and mycotoxins. Britishi Medical Bolletin. V. 56, n. 1, p. 184-192, 2000.

PME. Suco de uva anima produtores do sul. Disponível em < http://pme.estadao.com.br/noticias/noticias,suco-de-uva-anima-produtores-do-sul,4993,0.htm>. Acesso em 14 nov.2014

RIBEIRO, Fabiana Alves de Lima, et al. "Validation spreadsheet: a new tool for estimating the analytical figures of merit for the validation of univariate methods." Química Nova 31.1 (2008): 164-171.

RIBEIRO, E. **Contaminação Toxicológica de Resíduos Vitivinícolas – OTA**. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (2007). Disponível em: <http://www.compass-group.com/>. Acesso em: 19 out. 2012.

RITSCHEL, P.; CAMARGO, U. A. **O Programa de melhoramento de uva e o segmento de sucos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos>. Acesso em: 19 jun.2012.

RIZZON, L. A; MANFROI, V; MENEGUZZO, J.. Elaboração de Suco de uva na propriedade vitícola. Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, 1998. 24 p. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 21). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/538470/1/Doc21.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2013

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. Suco de uva. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007, 45 p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/122741/1/00081370.pdf>. Acessado em: 19 abr.2014

RODRÍGUEZ, A., Rodríguez, M., Martín, A., Delgado, J., & Córdoba, J. (2012). Presence of ochratoxin A on the surface of dry-cured Iberian ham after initial fungal growth in the dryting stage. **Meat Science** 92 , 728-734.

ROMER. Colunas de imunoafinidade. Disponível em: <http://www.romerlabs.com/pt/products/mycotoxins/immunoaffinity-columns/> Acessado em: 24 fev. 2015.

ROSA, C. A. R; Magnoli, CE; DALCEIROS, A. M; Combina, M; Fraga, M.E; SANTANA, D. M. M. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, N° 4 (April 2002), pp 358-364.

RUSTON, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, London, v. 59, nº 1, p. 57-67, 1997.

RYAN, T.A.; JOINER, B.L. **Normal probability plots and tests for normality**. The States College: Pensylvania State University, 15 p., 1976.

Rosa, Car; Magnoli, CE; Fraga, ME; Dalcero, A; Santana, Dmn. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives & Contaminants**. V. 19, n.4, p. 408-414, 2002.

Sáez, Joan. M.et al. Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1029, p.125–133, 2004.

SANCO. **Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed**: **SANCO/12571/2013**. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/plant/plant_protection_products/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf>. Acesso em: 25 abril. 2014.

SAÚDE DO SUCO DE UVA. Disponível em: http://www.vinicolagaribaldi.com.br/suco-saude. Acesso em: 27 out. 2013.

SHEPHARD, G. S. (2000). Analytical methodology for mycotoxins: recent advances and future challenges. Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium 2 , 19-28.

SHUNDO, Luzia et al. Ocratroxina A em vinhos e sucos de uva comercializados na cidade de São Paulo, Brasil. Braz. **J. Microbiol**. [online]. 2005, vol.37, n.4, pp. 533-537

SILVA, D. M. da. Fungos filamentosos e micotoxinas em uvas, sucos, mostos e vinhos das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. 2013. 184 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
SOBOLEVA, E.; AMBRUS, Á. Application of a system suitability test for quality assurance and performance optimisation of a gas chromatographic system for pesticide residue analysis. **Journal of Chromatography A,** v. 1027, n. 1–2, p. 55-65, 2004

SOMMA, Stefania; Perrone, Giancarlo; Logrieco, Antonio F. Diversity of black Aspergilli and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. **Phytopathologia Mediterranea**, (2012), Vol51(1), p131−147.

SÔNEGO, OR; Garrido, L.R. **Doenças fúngicas da videira e seu controle**. Disponível em: http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/viticultura/doevid.html. Acesso em 15 jun 2012.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 25-35, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S00032670050 12857>. Acesso em 19 de agosto de 2014

TERRA, MF; Prado, G; Pereira, GE; Ematne, HJ; Batista, LR. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. J**ournal of the Science of Food and Agriculture**, 2013, Vol.93(4), p.890-894.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for a singlelaboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**, v.74, p. 835- 855, 2002.

TOFFA, D.D. ; Mahnine, N.; Ouaffak, L.; El Abidi, A.; El Alaoui Faris, F.Z.; Zinedine, A. First survey on the presence of ochratoxin A and fungi in raw cereals and peanut available in the Republic of Niger. **Food Control**, August 2013, Vol.32(2), pp.558-562.

TRUCKSESS, M. W. (2000). Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in food and feeds. **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium 2** , 29-40.

TRUCKSESS, M. W. Natural Toxins**. In Associação de Analistas Químicos Oficiais – AOAC International**, 19 ed, Arlington, Vergínia, USA, 2012, 2V, II, cap. 49.

VAN EGMOND, H. P.; Schothorst, R. C.; Jonker, M. A. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. **Anal Bioanal Chem** 389: 147-157, 2007

VANESA, D ; Ana, P. Occurrence of Ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation. **Food Control**, 2013, Vol.30(2), pp.675-678.

VESSMAN, J. et al. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure Applied Chemistry, v.**73, p.1381-1386, 2001.

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.

VOGEL, . Cromatografia com fase líquida. In: _____. Análise Química Quantitativa. 6ª ed., Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002. Cap. 8, p. 144-159.

WHO – World Health Organization – Evalution of certain mycotoxin in food. Fifty-six Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Genebra, 2012.

ZHONG, QD ; Li, GH ; Wang, DB ; Shao, Y ; Li, JG ; Xiong, ZH ; Wu, YN. Exposure assessment to ochratoxin A in Chinese wine. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, 2014, Vol.62(35), pp.8908-891.

ZINEDINE, A ; Soriano, J M ; Juan, C ; Mojemmi, B ; Moltó, J C ; Bouklouze, A ; Cherrah, Y ; Idrissi, L ; El Aouad, R ; Mañes, J. Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. **Food additives and contaminants**, 2007, Vol.24(3), pp.285-91

ANEXO

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INCQS

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

TÍTULO:	NÚMERO
DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM SUCO DE UVA INTEGRAL E NÉCTAR DE UVA POR CLAE/F	65.3120.175

PALAVRAS-CHAVE	REVISÃO	SEÇÃO DO MANUAL
OCRATOXINA A - SUCO DE UVA INTEGRAL - NÉCTAR DE UVA - HPLC	00	4.3

ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	REFERENDADO	DATA
Rosana Pereira dos Santos	Maria Heloisa P de Moraes André Victor Sartori	Filipe S. Quirino da Silva	Eduardo Leal	29/03/2015

CÓPIA NÃO CONTROLADA

SUMÁRIO

1. Objetivo

2. Campo de aplicação

3. Segurança de trabalho

4. Siglas

5. Fundamento do método

6. Condições específicas

7. Cálculo e expressão dos Resultados

8. Critério de Aceitação e Garantia da Qualidade dos Resultados

9. Cálculo de Incerteza de Medições

10. Bibliografia

11. Anexo
A. Registro dos dados para cálculo da concentração e incerteza de medição para amostras em suco e néctar de uvas.

1. OBJETIVO

Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras para a determinação de Ocratoxina A por CLAE/F, com base na norma européia EN 14133 (Committe for Standartization – EC, 2003), com alterações. A análise segue o critério da Resolução RDC 7/2011 (Anvisa, 2011), que estabelece um limite máximo de restrição de 2µg/L para ocratoxina A em suco de uva.