

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – ICTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS – PPGCTA**

**DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM VINHOS DA REGIÃO SUL DO
BRASIL ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COM
DETECTOR DE CARGA ACOPLADA**

Tádzio Ribeiro Teixeira

Orientadora

Profa. Dra. Isa Beatriz Noll

Co-Orientador

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Porto Alegre – RS

2011

Mestrando

Tádzio Ribeiro Teixeira

Instituição

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – ICTA
Laboratório de Toxicologia – ICTA/UFRGS

Orientadora

Profa. Dra. Isa Beatriz Noll

Co-orientador

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Título

Determinação de Ocratoxina A em vinhos do Rio Grande do Sul através da Cromatografia em Camada Delgada com Detector de Carga Acoplada

T122d Teixeira, Tádzio Ribeiro
 Determinação de Ocratoxina A em vinhos da região sul do Brasil
 através da cromatografia em camada delgada com detector de carga
 acoplada. / Tádzio Ribeiro Teixeira. -- Porto Alegre, 2011.

56f. : il.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, BR-RS,
2011.

Orientadora: Prof. Dra. Isa Beatriz Noll

Co-orientador: Prof. Dr. Vítor Manfrói

Bibliografia

1. Toxicologia de alimentos 2. Ocratoxina 3. Vinhos tintos I.
Título. II. Noll, Isa Beatriz (Orient.). III. Manfrói, Vítor (Co-orient.)

CDU 615.9:664

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu pai, Francisco Teixeira, e minha mãe, Rosane, por todo amor e apoio que nunca faltaram e sei que nunca faltarão.

À professora e minha orientadora Isa Beatriz Noll, pela oportunidade de ser seu mestrando e por tudo que me ensinou, tanto no âmbito acadêmico como para vida, sempre de forma generosa.

Ao professor Vitor Manfroi pelo grande conhecimento sobre vinhos, cujo apoio foi fundamental para andamento do trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Tiago Einloft e Michele Hoeltz pelo companheirismo e amizade, como também pelo conhecimento dividido ao longo dos anos.

Ao professor Horácio Dottori pelo enorme empenho no desenvolvimento do fotômetro e paciência ao ensinar muito sobre os procedimentos.

Ao professor Plinho Francisco Hertz e a professora Rosane Rech pela simpatia e por permitir o uso de equipamentos em seus laboratórios.

À EMBRAPA Uva e Vinho e a Associação Brasileira de Enologia pelas amostras de vinho que foram cedidas da XVII Avaliação Nacional de Vinhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Ao PPGCTA e ao ICTA pela oportunidade.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO | 11 |
| OBJETIVOS | 13 |
| Objetivo geral..... | 13 |
| Objetivos específicos..... | 13 |
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 1.1 Vinho..... | 14 |
| 1.1.2 Produção de vinho no Brasil..... | 15 |
| 1.2 Ocratoxina A..... | 17 |
| 1.2.1 Fungos produtores de Ocratoxina A..... | 17 |
| 1.2.2 Biossíntese de Ocratoxina A..... | 19 |
| 1.2.3 Estrutura química e propriedades físico-químicas da Ocratoxina A...20 | |
| 1.2.4 Aspectos Toxicológicos da Ocratoxina A..... | 22 |
| 1.3 Ocorrência de Ocratoxina A em alimentos..... | 24 |
| 1.3.1 Ocratoxina A em uvas e vinhos..... | 26 |
| 1.3.1.1 Ocratoxina A em vinhos brasileiros..... | 28 |
| 1.3.2 Variação dos níveis de Ocratoxina A durante vinificação..... | 29 |
| 1.4 Métodos de análise de Ocratoxina A..... | 30 |
| 1.5 Legislação..... | 33 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 34 |
| 2.1 Amostragem..... | 34 |
| 2.2 Ocratoxina A em solução padrão..... | 34 |
| 2.2.1 Curva Padrão..... | 34 |
| 2.3 Extração e limpeza..... | 35 |
| 2.4 Análise de Ocratoxina A por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)..... | 35 |
| 2.5 Testes de Recuperação..... | 36 |
| 2.6 Teste de confirmação..... | 37 |
| 2.7 Extração e limpeza com coluna de imunoafinidade (IAC)..... | 38 |

| | |
|--|----|
| 3. RESULTADOS | 39 |
| 4. DISCUSSÃO | 41 |
| 4.1 Considerações sobre análise fotométrica..... | 44 |
| 5. CONCLUSÕES | 47 |
| 5.1 Considerações finais..... | 48 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Regiões produtoras de vinho do Brasil..... | 16 |
| Figura 2. Via de síntese da Ocratoxina A..... | 20 |
| Figura 3. Estrutura química da Ocratoxina A..... | 21 |
| Figura 4. Metabólitos formados pela OTA e detectados in vivo em diferentes espécies..... | 24 |
| Figura 5. Fluxograma de extração e limpeza de OTA em vinhos, segundo Welke <i>et al</i> , (2010)..... | 35 |
| Figura 6. Fluxograma de extração e limpeza com Coluna de Imunoafinidade..... | 38 |
| Figura 7. Imagem da Curva padrão de OTA em placa de CCD sob luz UV..... | 42 |
| Figura 8. Gráfico da Curva padrão de Ocratoxina A para verificação de linearidade do método, conforme medição da intensidade luminosa de cada mancha por ImageJ..... | 42 |
| Figura 9. Teste de recuperação, limpeza com NaHCO ₃ 1,25%..... | 43 |
| Figura 10. Placa cromatográfica de teste de recuperação, limpeza com coluna de imunoafinidade..... | 43 |
| Figura 11. Leitura de intensidade de luz sobre OTA em fotômetro UVGL-58 e LEDs (distante 30 cm e 12 cm da fonte de luz)..... | 45 |
| Figura 12. Variação da intensidade de luz sobre placa de CCD no equipamento modelo UVGL-58, medição da esquerda para direita na parte central..... | 46 |
| Figura 13. Variação da intensidade de luz sobre placa de CCD no equipamento com filtros, medição da esquerda para direita na parte central..... | 46 |
| Figura 14. Curvas padrão de uma mesma cromatografia, medidas com ImageJ, no modelo usado nas análises (a esquerda) e no modelo UVGL-58 (a direita)..... | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Produção de vinhos finos e safras de uvas do Rio Grande do Sul..... | 16 |
| Tabela 2. Ocorrência de ocratoxina A em alguns alimentos..... | 25 |
| Tabela 3. Ocorrência de Ocratoxina A em vinhos. Adaptado de Shundo <i>et al</i> (2008)..... | 27 |
| Tabela 4. Países que possuem regulamentação para OTA em produtos de Uva ou em todos alimentos..... | 33 |
| Tabela 5. Recuperação de OTA em vinhos em diferentes concentrações..... | 39 |
| Tabela 6. Recuperação de OTA para amostras de mesmo dia e entre dias..... | 39 |
| Tabela 7. Recuperação de OTA em vinhos em diferentes concentrações com coluna de imunoafinidade..... | 40 |
| Tabela 8. Incidência de OTA em vinhos conforme variedade de uva..... | 40 |
| Tabela 9. Incidência de Ocratoxina A em vinhos conforme estado da região Sul do Brasil..... | 41 |

RESUMO

O desenvolvimento de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em uvas destinadas a produção de vinho pode levar a contaminações por Ocratoxina A (OTA), uma micotoxina internacionalmente conhecida como nefrotóxica e possivelmente carcinogênica para humanos. O experimento realizado avaliou a presença de ocratoxina A, através da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com Detector de Carga Acoplada (DCA), em 88 vinhos da região Sul do Brasil, referentes à safra 2009. As amostras estavam divididas em 75 oriundas do Rio Grande do Sul, 9 de Santa Catarina e 4 do Paraná, 56 da variedade Cabernet Sauvignon e 32 da variedade Merlot. A OTA foi determinada através de imagens adquiridas sob luz UV e quantificada através da utilização do software ImageJ. Duas formas de limpeza foram testadas para recuperação. A média de recuperação com coluna de imunoafinidade foi de 82,33%. Recuperação média para análise com limpeza por NaHCO₃ 1,25% foi de 76,95%. Os limites de quantificação e detecção foram 0,8 µg/L e 0,2 µg/L, respectivamente. Os resultados apresentaram 5 amostras contaminadas por OTA, com incidência de 5,68%. A variedade Cabernet Sauvignon apresentou 3 amostras positivas e a Merlot 2 amostras. A maior concentração encontrada foi de 0,84 µg/L, em uma das 3 amostras positivas do Rio Grande do Sul. Santa Catarina e Paraná apresentaram 1 amostra positiva cada, e suas concentrações estavam abaixo do limite de quantificação.

ABSTRACT

The presence of fungi from *Aspergillus* and *Penicillium* genera in grapes for wine production can lead to Ochartoxin A (OTA) contaminations, a mycotoxin internationally recognized as nephrotoxic and possibly carcinogen to humans. The experiment evaluated the presence of OTA through Thin Layer Chromatography (TLC) with Charge Coupled Detector (CCD) in 88 wines from the south region of Brazil, 2009 vintage. Samples were divided in 75 originated from Rio Grande do Sul state, 9 from Santa Catarina and 4 from Paraná, 56 made from Cabernet Sauvignon and 32 from Merlot. OTA was determined through analysis of acquired images and quantified with the software ImageJ. Two different clean-up were tested for recovery verification. The mean recovery with immunoaffinity column (IAC) was 82.33%. The mean recovery for analysis with NaHCO₃ 1.25% clean-up was 76.95. The quantification and detection limits were 0.8 µg/L e 0,2 µg.L⁻¹, respectively. The results shown 5 OTA contaminated samples, with 5.68% incidence. Cabernet Sauvignon variety had 3 positive samples and Merlot had 2. The highest concentration found was 0.84 µg.L⁻¹, in one of three positive samples from Rio Grande do Sul. Santa Catarina e paraná had one positive sample each, and concentrations below the quantification limit.

INTRODUÇÃO

A indústria do vinho vem se desenvolvendo no Brasil e adquirindo destaque no mercado internacional, apresentando produtos com identidade e qualidade próprias.

Atualmente, a região de maior produção de vinhos e produtos a base de uva dentro do país é a região Sul, abrangendo os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. O Rio Grande do Sul contribui com cerca de 90% da produção de vinhos e suas safras vêm se mantendo estáveis nos últimos anos.

A produção de vinhos e sua qualidade vêm sendo monitoradas na Europa com o objetivo de controlar a presença de compostos que possam adulterar a qualidade dos vinhos e trazer problemas a saúde dos consumidores. Na identificação destes compostos está a preocupação com a ocratoxina A (OTA), uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, que crescem e se desenvolvem nas uvas, durante os períodos de amadurecimento e pré-colheita. A sua presença nestas etapas do desenvolvimento pode acarretar em grande quantidade de micotoxinas no produto final e prejudicar a saúde da população. A exposição a OTA através da dieta tem demonstrado efeitos nefrotóxicos em humanos e carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, imunossupressores, genotóxicos e neurotóxicos em animais. Com evidente carcinogenicidade em animais de laboratório, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou a OTA no grupo 2B, ou seja, como um possível carcinógeno para humanos.

Existem diferentes métodos que podem ser empregados para análise de ocratoxina A, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) que é considerada uma forma simples e barata de análise para micotoxinas.

A União Européia, com base em estudos e nas evidências de contaminação dos vinhos, possui leis que regulamentam os limites máximos permitidos de OTA para vários produtos. No Brasil, os limites para esta micotoxina, estão sendo sugeridos através de Consulta Pública aberta pela ANVISA, mas existem poucas

pesquisas e monitoramento dedicados aos vinhos do país, o que torna relevante avaliar a exposição da população a OTA no mercado nacional. A não verificação dos índices desta micotoxina pode acarretar, também, em barreiras comerciais com os países que já possuem controle estabelecido.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a presença de ocratoxina A em vinhos da região sul do Brasil.

Objetivos específicos

Determinar a ocratoxina A em vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot, utilizando o método de Cromatografia em Camada Delgada com Detector de Carga Acoplada (CCD-CDA).

Quantificar a ocratoxina A em imagens fotográficas, de amostras em CCD, através do programa ImageJ.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Vinho

O vinho é, segundo regulamentação brasileira, a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. O mosto simples de uva é o produto obtido pelo esmagamento ou prensagem da uva sã, fresca e madura, com a presença ou não de suas partes sólidas (BRASIL, 1988).

Os vinhos brasileiros estão classificados de diferentes formas quanto a sua classe, cor e teores de açúcar. As classes do vinho se dividem em: de mesa, leve, fino, espumante, frisante, gaseificado, licoroso e composto. O vinho de mesa é um vinho inferior, elaborado a partir de diferentes variedades de uvas (Concord, Herbeumont, Isabel, Seyve Willard, Niágara, etc) de espécies americanas (*Vitis labrusca*, *Vitis bourquina*, etc). Os vinhos finos são elaborados a partir de variedades de uvas nobres (Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Pinot Noir, Merlot, Chardonnay, Riesling, Sauvignon Blanc, etc.) da espécie européia (*Vitis vinifera*). Vinhos finos e de mesa possuem de 10-14% de álcool, enquanto vinho leve possui baixa graduação, entre 7 e 8,5%, e os vinhos compostos e licorosos possuem maior concentração alcoólica, de 14-20% e 14-18% respectivamente (BRASIL, 1988; E-VINHO, 2009).

O vinho pode ser dividido em três categorias quanto a cor: tinto, branco ou rose, e quanto as quantidades de açúcares, dividindo-se em: seco, com teor de açúcar menor do que 5 g/L; demi-sec, com 5-20g/L de açúcares; e suave, que possui teor de açúcar maior do que 20g/L (BRASIL, 1988).

Vinhos espumantes ou gaseificados são vinhos com formação ou introdução de gás. O espumante deve possuir ao menos 3 atmosferas (atm) resultantes de fermentação exclusivamente natural, enquanto que o vinho frisante tem uma pressão mínima de 1,1 a 2,0 atm (natural ou adicionado). Os vinhos

gaseificados são adicionados de anidrido carbônico puro não resultante da fermentação (BRASIL, 1988; E-VINHO, 2009).

Outras denominações são utilizadas para classificação dos vinhos, como Vinho Varietal e Assemblage. O primeiro é feito com um mínimo de 75% de uma variedade de uva, e é considerado um produto de alta qualidade quando feito de 100% da mesma uva. O vinho de Corte (ou Assemblage) é elaborado a partir de diferentes uvas (BRASIL, 1988; E-VINHO, 2009).

1.1.2 Produção de vinho no Brasil

A produção de vinhos brasileira está dividida em nove áreas que se encontram divididas em zonas de clima temperado, sub tropical e tropical. (Figura 1). As áreas que mais se destacam são a região da Fronteira, Serra do Sudeste, Serra Gaúcha, Campos de Cima da Serra e regiões Central e Norte do Estado do Rio Grande do Sul, todas de clima temperado (IBRAVIN, 2009; E-VINHO, 2009).

As regiões de cultivo de Santa Catarina, ainda dentro de uma área de clima temperado, são as do Vale do Rio do Peixe, Planalto Serrano, Planalto Norte e Carbonífera. A região Norte do Paraná é tipicamente subtropical e o Noroeste do Estado de São Paulo, Norte do Estado de Minas Gerais e Vale do Sub-Médio São Francisco (Pernambuco e Bahia), caracterizam-se como zonas tropicais. O estado de São Paulo na região Sudeste e a região Sul do Estado de Minas Gerais também são conhecidamente produtores. Além das áreas mencionadas, outros pólos vitivinícolas continuam a surgir pelo Brasil (IBRAVIN, 2010; E-VINHO,2009).

A região Sul do Brasil é responsável pela maior parte da produção de vinhos e sucos do país. O Rio Grande do Sul é responsável por cerca de 90% da produção nacional. Em 2008 a produção de uvas deste estado foi de 625 milhões de toneladas, dos quais 47% foram destinadas à elaboração de vinhos, sucos e outros derivados (IBRAVIN, 2009).

A produção de vinhos finos tintos e de mesa sofreu pouca alteração nos

últimos anos, com safras relativamente constantes. Em 2009, mais de 13 milhões de litros de vinho tinto fino foram produzidos pelas empresas do Rio Grande do Sul, a partir de aproximadamente 39,5 milhões de quilos de uvas colhidas (Tabela 1) (IBRAVIN, 2010).

Tabela 1. Produção de vinhos finos e safras de uvas do Rio Grande do Sul.

| Ano | Vinhos produzidos – milhões de litros | | | | Safra – milhões de toneladas |
|------|---------------------------------------|---------|--------|-------|------------------------------|
| | Branco | Rosados | Tintos | Total | Uvas |
| 2004 | 8,50 | 0,39 | 10,83 | 19,73 | 35,22 |
| 2005 | 8,45 | 0,47 | 12,99 | 21,91 | 41,48 |
| 2006 | 7,95 | 0,31 | 13,52 | 21,78 | 34,24 |
| 2007 | 6,58 | 0,41 | 12,97 | 19,97 | 43,86 |
| 2008 | 5,32 | 0,31 | 11,38 | 17,01 | 49,09 |
| 2009 | 4,76 | 0,21 | 13,05 | 18,02 | 39,53 |

Fonte: IBRAVIN (IBRAVIN/MAPA/SEAPPA-RS), Cadastro Vinícola, 2010.

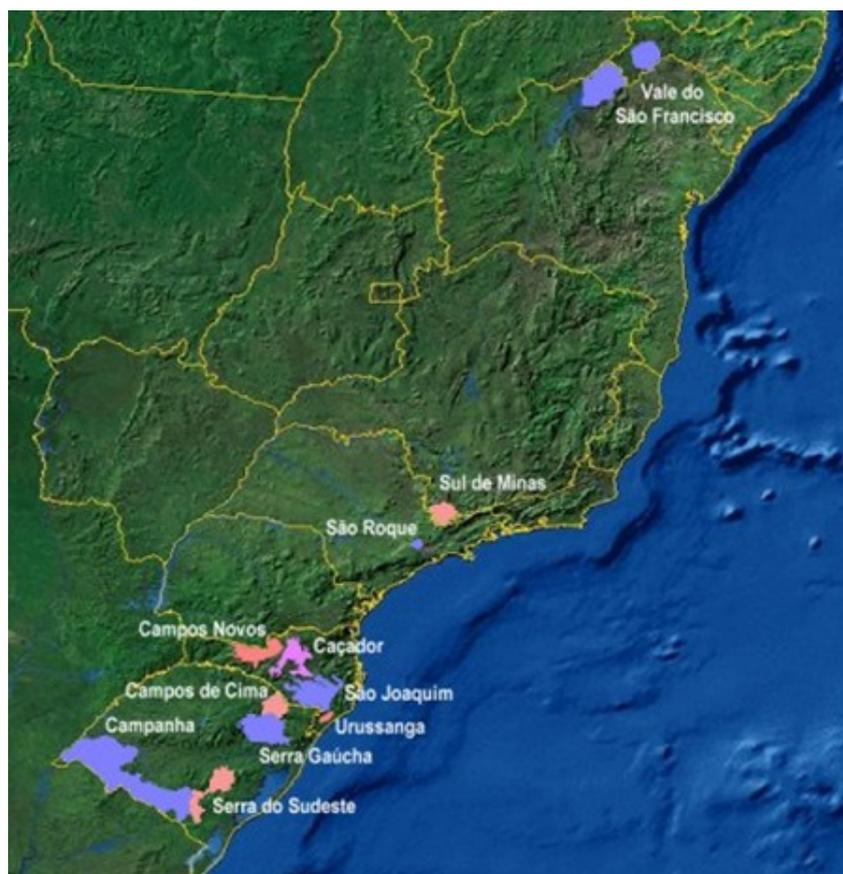


Figura 1. Regiões produtoras de vinho do Brasil. FONTE: HotelierNews.

Os sistemas de manejo e cultivo brasileiros foram adaptados às suas condições ambientais específicas. A viticultura desenvolvida sob condições temperadas segue, no caso dos Estados da região Sul, os mesmos procedimentos utilizados em países tradicionais no cultivo das videiras na Europa (IBRAVIN, 2010; E-VINHO, 2009).

1.2 Ocratoxina A

1.2.1 Fungos produtores de Ocratoxina A

A OTA é um metabólito secundário produzido por fungos filamentosos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*. O gênero *Aspergillus* adaptou-se bem a zonas tropicais e sub-tropicais de clima quente, enquanto fungos do gênero *Penicillium* se desenvolvem mais em áreas de clima frio, e podem ser encontrados ambientalmente nas zonas temperadas e frias, afastadas do equador (BRAGULAT *et al*, 2001; RINGOT, 2006). Segundo Battilani *et al* (2002), os principais fungos considerados causadores de contaminação dos vinhedos são o *Penicillium verrucosum* e o *Aspergillus ochraceus* (anteriormente conhecido como *Aspergillus alutaceus*). Posteriormente, foi evidenciada a capacidade de produção de OTA pelo *A. carbonarius* e *A. niger*, que estão amplamente difundidos nas zonas mais quentes da Europa, como Espanha, Itália e Portugal (MIDIO, 2000; BRAGULAT, 2001; RINGOT, 2006; ATOUI *et al*, 2007; OGA, 2008; VALERO, 2008; KAPETANAKOU *et al*, 2009).

Em uma pesquisa executada por Clouvel *et al* (2008), no Sul da França, a contaminação por *A. carbonarius* nos vinhedos foi intensificada pela incidência de outro fungo, botrytis (*Botrytis cinérea*) e por vetores como a mariposa da uva (*Lobesia botrana*). Neste caso o dano causado na superfície das bagas propiciou

um aumento significativo de OTA em relação as amostras pouco afetadas pelos insetos e pelo *botrytis*.

Leong *et al* (2006) estudaram a relação entre a atividade de água (a_w) e temperatura(°C) no desenvolvimento de fungos e na produção de OTA. As melhores condições encontradas para o *A. carbonarius* produzir OTA eram de a_w de 0,965 e 15°C, e para o *A. niger* a a_w ideal estava em torno de 0,95. O aumento de temperaturas de 16-25°C favoreceu o aumento da produção de OTA para isolados de *A. carbonarius* enquanto que o *A. niger* produziu OTA independentemente da temperatura. Dados similares são relatados por Anli e Bayram (2009), onde isolados de *A. carbonarius* produziram OTA entre 15°C e 20°C, e *A. niger* apresentaram produção maior entre 20°C e 25°C.

Um trabalho realizado por Bau *et al* (2005), avaliando vinhedos ao redor da costa da Espanha constatou a incidência de fungos e de espécies produtoras de OTA. De um total de 2800 amostras, 17,3% da microbiota isolada pertencia ao grupo dos *Aspergillus* spp., sendo 92% de 628 isolados negros, onde 16,9% eram *Aspergillus niger* e 3,6% *Aspergillus carbonarius*. No estudo, 100% dos isolados de *A. carbonarius* foram capazes de produzir OTA, enquanto que nenhum *A. niger* foi produtor. Apenas 2 isolados de *A. ochraceus* foram encontrados e um foi capaz de produzir OTA. Em um estudo similar, El Khoury *et al* (2008), isolaram fungos de uvas libanesas durante a safra de 2005, desde a mudança de cor e amadurecimento até a colheita. Dos isolados, 95,5% pertenciam ao gênero *Aspergillus* spp., onde 56,9% eram constituídos de aspergillus negros (52,2% agregados de *A. niger*, 2,9% *A. japonicus* e 1,8% *A. carbonarius*) e 43,1% eram *A. flavus*. Todos os isolados de *A. carbonarius* foram capazes de produzir OTA e nenhum outro produtor foi identificado.

Na Argentina, a incidência de fungos produtores de OTA foi averiguada por Ponsone *et al* (2007), durante o desenvolvimento das uvas. Nos resultados a maior contaminação foi de *Aspergillus niger*, da qual 24% de 246 isolados eram produtores de OTA, entretanto, nenhuma concentração da micotoxina foi encontrada nas uvas. Segundo Chiotta *et al* (2009), em estudo semelhante conduzido na Argentina, a área de maior incidência apresentava 32,5% da

microbiota isolada de *Aspergillus* sessão *nigri*, onde 81% pertenciam ao *A. niger*, 11% ao *A. carbonarius* e 8% a *Aspergillus* uniseriados. De 284 isolados, 91 (32%) foram identificados como produtores de OTA, divididos em 69% de *A. niger* e 31% de *A. carbonarius*.

1.2.2 Biossíntese de Ocratoxina A

A via de biossíntese da OTA ainda não foi completamente estabelecida, no entanto, testes com carbono 14 como marcadores biológicos mostraram que a metade da fenilalanina origina-se da via do chiquimato (a partir de ácido chiquímico) e a metade dihidro-isocumarina vem da via de um pentacetídeo (Figura 2). O primeiro passo da síntese do policetídeo de isocumarina consiste da condensação de uma unidade de acetato (acetil-CoA) para 4 unidades de malonato. A enzima envolvida nesta atividade é a policetídeo sintetase. As condições que permitem a expressão desta enzima pelos genes de fungos produtores ocorrem somente durante o início da produção da micotoxina. Quando formado, na seqüência, o policetídeo é modificada pela formação de um anel de lactona (síntese de mellein, isocumarina com propriedades similares as da OTA) e a adição de um grupo carboxílico, formando ocratoxina β . A seguir um átomo de cloro é incorporado a molécula pela ação da cloroperoxidase, sintetizando a ocratoxina α . Na última etapa, a enzima ocratoxina A sintetase catalisa a ligação entre a OT α com a fenilalanina (RINGOT *et al*, 2006; ANLI E BAYRAM, 2009).

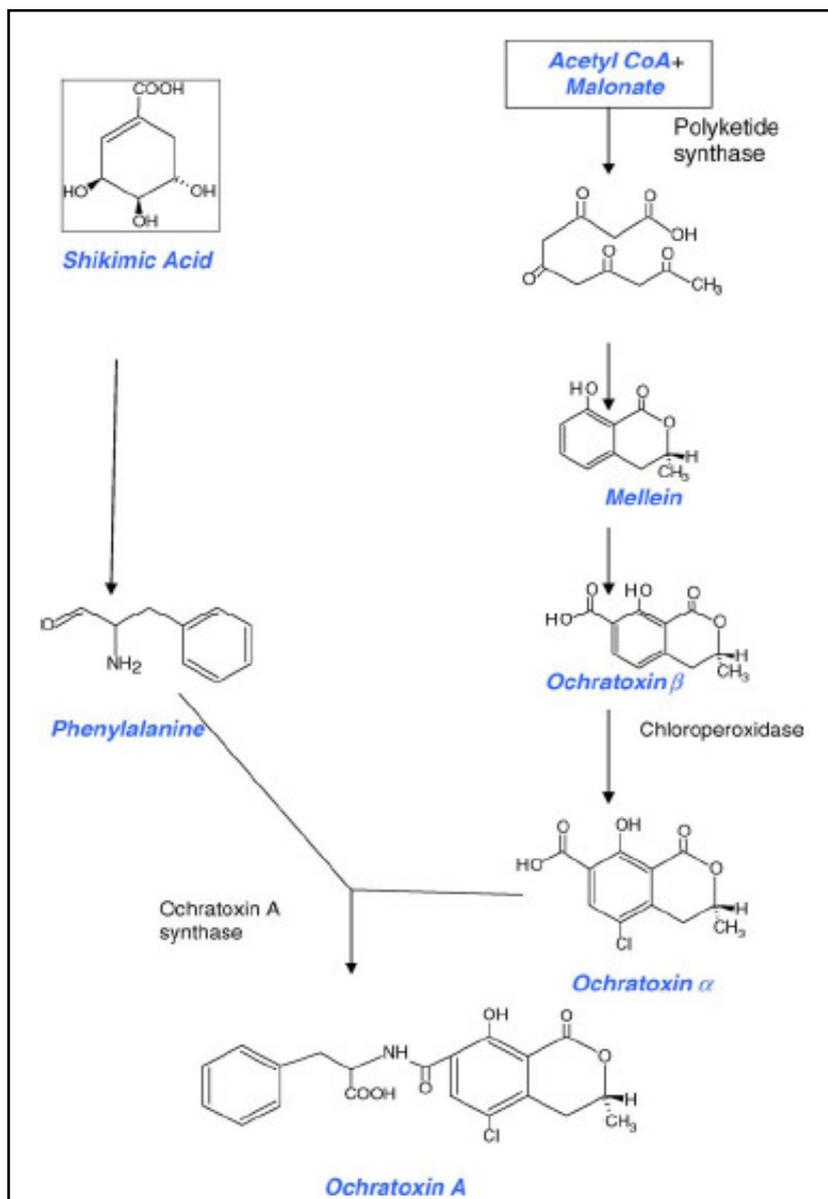


Figura 2. Via de síntese da Ocratoxina A (Ringot *et al*, 2006).

1.2.3 Estrutura química e propriedades físico-químicas da Ocratoxina A

A ocratoxina A é um policetídeo derivado de uma diidro-isocumarina unida pelo carbono 7 carboxílico a uma l-β-fenilalanina através de uma ligação amídica.

A fórmula química é $C_{20}H_{18}O_6NCl$ e seu peso molecular é 403,82. Na figura 2 encontra-se a estrutura química da OTA ou 7-(L-β-fenilalanilcarbonil) - carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3*R*-metilisocumarina (RINGOT *et al*, 2006).

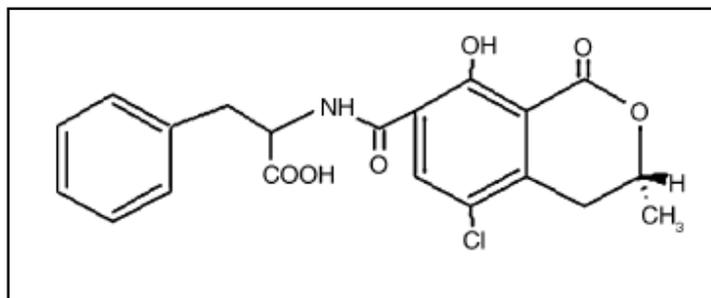


Figura 3. Estrutura química da Ocratoxina A.

A OTA apresenta-se como um composto cristalino altamente solúvel em solventes orgânicos polares, pouco solúvel em água e solúvel em carbonato de sódio de meio aquoso. Seus pontos de fusão são 90 e 171°C quando recristalizada de benzeno ou xileno, respectivamente. Possui absorção no comprimento de onda 333 nm (λ) e emissão no comprimento de onda entre 440-475 nm, com coeficiente de absorção molar (ϵ) de 5440 m^2/mol , quando solubilizada em solução de tolueno-ácido acético 99:1(v/v). A OTA apresenta propriedades de ácido fraco, onde seu *pka* varia de 4,2-4,4 para o grupo carboxílico da fenilalanina, e 7,0-7,3 para o grupo hidroxifenólico da parte isocumarina (VALENTA, 1998; ROSA *et al*, 2004; SHUNDO *et al*, 2006; RINGOT *et al*, 2006; VALERO, 2008).

Ocratoxina A é uma substância resistente a temperatura, e a maioria dos métodos de análise utiliza-se de soluções ácidas para extração e armazenamento, condições nas quais a toxina é extremamente estável. Diferentes solventes podem ser usados no armazenamento e manuseio, e a micotoxina pode permanecer em soluções de etanol por mais de um ano. Soluções de tolueno:ácido-acético 99:1 a temperaturas de congelamento (-18°C) apresentam perdas mínimas em períodos acima de 6 meses. Em metanol, problemas de decomposição podem ser observados após alguns anos de armazenamento a temperaturas de -18°C (VALENTA, 1998).

1.2.4 Aspectos toxicológicos da Ocratoxina A

A ocratoxina A é considerada nefrotóxica e imunossupressora. Estudos apontam efeitos carcinogênicos e hepatotóxicos em animais não ruminantes, principalmente aves e suínos. Nas regiões de criação os sintomas mais aparentes são o de nefropatia com atrofia tubular e fibrose intersticial nos animais. Um dos relatos mais conhecidos da toxicidade da ocratoxina A para humanos foi a Nefropatia Endêmica dos Bálcãs (NEB), onde diversos casos de câncer do trato urinário foram associados a presença da OTA quando comparados a outras regiões onde a micotoxina não está presente com tanta frequência (VALENTA, 1998; MIDIO, 2000; BELLI *et al*, 2002; RINGOT *et al*, 2006).

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2003) a OTA é classificada como um possível carcinógeno para humanos no grupo 2B. Em 2001, o JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) estabeleceu a ingestão tolerável semanal provisória de 100 ng/Kg de peso corpóreo (p.c) (IARC, 1993; JECFA, 2001).

A OTA é facilmente absorvida pelo sistema gastrointestinal e sua toxicidade pode variar conforme a concentração e o organismo. Uma vez ingerida e absorvida pelo trato intestinal a OTA se distribui rapidamente pelo organismo por formar adutos com proteínas sanguíneas e posteriormente ligar-se com os tecidos. Esta ligação é reversível e ocorre em sítios que podem competir com alguns fármacos comumente utilizados. Os grupamentos carboxílicos e fenólicos em sua estrutura química fazem o maior papel na absorção, uma vez que a OTA age como um ácido fraco e passa através das membranas celulares por difusão simples (VALENTA, 1998; MIDIO, 2000; RINGOT *et al*, 2006; TURNER *et al*, 2009).

A porcentagem de OTA absorvida é diferente entre as espécies, por exemplo, nos porcos de 66%, em ratos e coelhos de 56% e em galinhas de 40%. Animais ruminantes apresentam menor sensibilidade devido a seu estômago complexo e a protozoários presentes no rúmen, que degradam a toxina. Na

distribuição da OTA, 99% ligam-se as proteínas séricas, principalmente a albumina, o que facilita a sua absorção passiva. A meia-vida junto ao sangue varia de uma espécie para outra e depende do grau de afinidade e da força da ligação, e é considerada mais longa em humanos (RUHLAND *et al*, 1997; MÍDIO, 2000; MONACI E PALMISANO, 2004; RINGOT *et al*, 2006; TURNER *et al*, 2009).

Em um estudo populacional, Coronel *et al* (2009) analisou plasma sanguíneo de 279 pessoas da província de Lleida, na Espanha, durante uma campanha de doação de sangue. Em paralelo foi realizado um levantamento de produtos alimentícios consumidos, dos qual se gerou uma estimativa dos grupos de alimentos que englobavam as maiores fontes de OTA. Entre os produtos mais consumidos e contaminados estavam cereais e derivados, seguidos de cerveja e vinho. Os resultados apontaram um consumo diário de 1,69 e 1,96 ng/kg de peso corporal/dia, e pessoas acima de 45 anos apresentaram o maior acúmulo ($1,05 \pm 1,29$ ng/mL).

Uma vez que a ocratoxina A atinge o fígado ela é biotransformada em diversos metabólitos. Estes caminhos de biotransformação e seus mecanismos ainda não são claros. A contribuição da OTA e seus metabólitos para toxicidade ainda não foram elucidados totalmente e muitos destes metabólitos ainda estão por serem caracterizados. No entanto, podem estar associados a morte celular por diversas formas, das quais incluem-se distúrbios na respiração mitocondrial, inibição de enzimas nos processos de formação de proteínas e gliconeogênese, e danos ao DNA e RNA pela formação de adutos. Entre os principais metabólitos encontrados (Figura 4) estão a OTB, OT α , 4-OH OTA e seus dois epímeros 4(R) e 4(S)-OH OTA (formados em fígados de porcos), e a OP-OTA que se trata da própria OTA com anel aromático de lactona aberto (RINGOT *et al*, 2006).

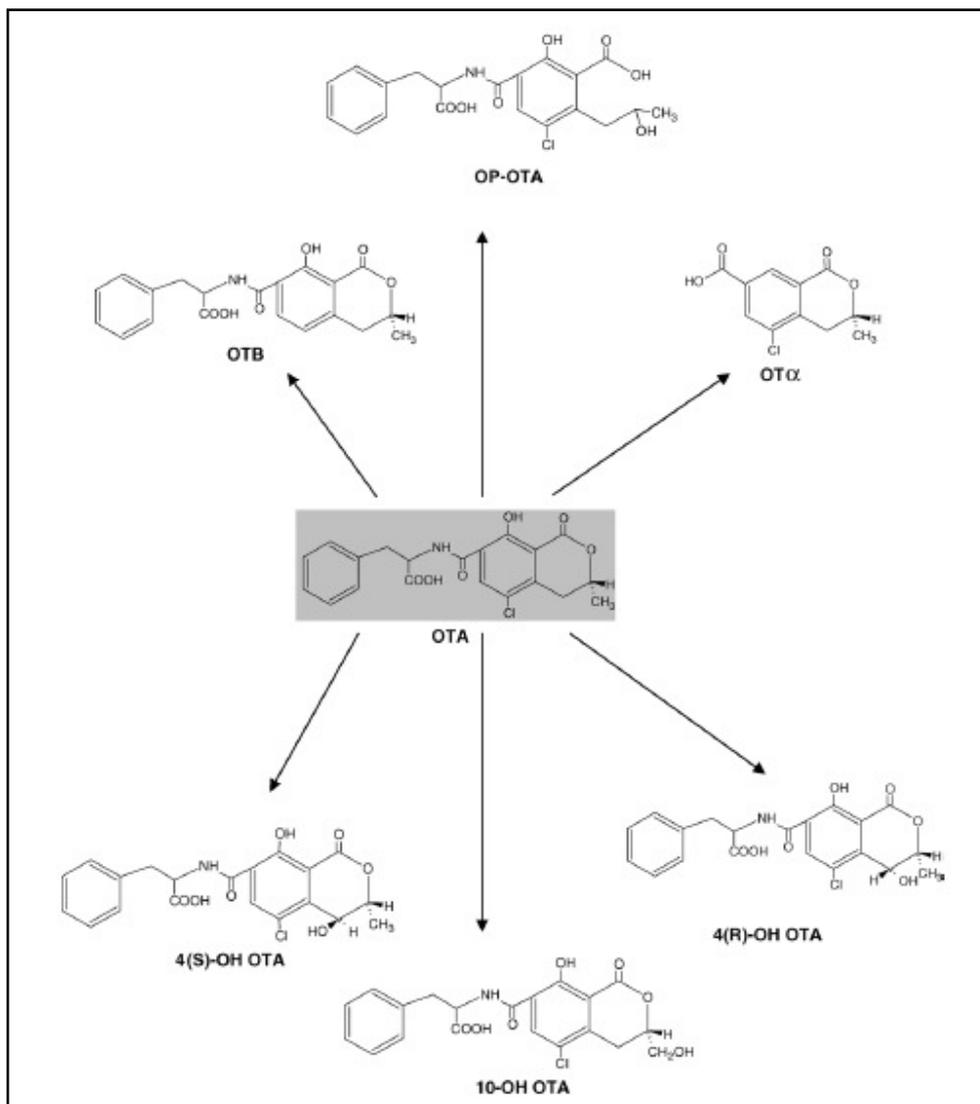


Figura 4. Metabólitos formados pela OTA e detectados *in vivo* em diferentes espécies. Fonte: RINGOT *et al* (2006).

1.3 Ocratoxina A em alimentos

A ocratoxina A pode ser encontrada em diversos alimentos, incluindo nozes, amendoins secos, feijão, temperos, grãos de café e frutas secas, como também em carne processada, cereais, sementes oleaginosas, uvas, vinho, uvas

passas e café (VALENTA, 1998; WOESE, 2000; MONACI E PALMISANO, 2004; RINGOT, 2006; BATTILANI, 2006; VALERO, 2008; KAPETANAKOU, 2009). Alguns produtos se apresentam indiretamente contaminados pela micotoxina, como carne suína e ovos, pelo acúmulo de OTA nos tecidos devido ao consumo de ração contaminada (MONACI E PALMISANO, 2004). Na tabela 2, encontram-se valores de concentrações de OTA em diferentes produtos alimentícios.

Tabela 2. Ocorrência de ocratoxina A em alguns alimentos.

| Alimento | Amostras contaminadas (%) | Concentração de OTA | Autor |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------------|
| Cerveja | 50 | <2ng/mL | Mateo <i>et al</i> 2007 |
| Cereais Matinais | 38 | 0,172-0,184 ng/mL | Kabak, 2009 |
| Baby-foods | 17 | 0,122-0,374 ng/mL | |
| Cerveja | 14 | 0,012-0,045 ng/mL | |
| Cerveja (dados de outros países) | 0-100* | 0,001-1,530 ng/mL | |
| Presunto | 100 | 0,04-2,3 µg/kg | Monaci e Palmisano, 2004 |
| Rim de porco | 44-96* | 0,01-15 µg/kg | |
| Carne de porco | 17-84,2* | 0,01-2,9 µg/kg | |
| Salsichas de sangue | 77 | 0,01-3.2 µg/kg | |
| Salsichas de fígado de porco | 68 | 0,01-4,6 µg/kg | |
| Farinha de trigo | 70 | 0,15 µg/kg** | Vega <i>et al</i> 2009 |
| Arroz | 50 | 0,15 µg/kg** | |
| Amido de milho | 63 | 0,15 µg/kg** | |
| Presunto suíno | | | Dall'Asta <i>et al</i> 2010 |
| -superfície | 76,4 | 0,53 µg/kg** | |
| -internamente | 29,1 | 0,1 µg/kg** | |

*Máximos e mínimos encontrados para o alimento.

**Valores médios encontrados para o alimento.

Mateo *et al* (2007), atribuíram a presença de fungos ocratoxigênicos na cevada e ou em seus adjuntos como responsáveis pela OTA na cerveja. Kabak em 2009, relaciona a qualidade do malte da cerveja às concentrações da micotoxina.

Na pesquisa realizada por Dall'Asta *et al* (2010), em presunto inteiro, a concentração de OTA foi mais elevada na superfície devido ao crescimento de

fungos, enquanto que a OTA ingerida pelo animal durante a criação pouco influenciou nas concentrações no músculo, internamente às peças. Monaci e Palmisano, (2004), por outro lado, relataram concentrações nos tecidos relacionados à ingestão de OTA.

1.3.1 Ocratoxina A em uvas e vinhos

O vinho pode estar contaminado por ocratoxina A quando as uvas destinadas a produção tenham sido alvo do desenvolvimento de fungos. A matéria-prima é a maior fonte de OTA nos vinhos engarrafados, e sua condição sanitária nos processos é de grande importância (ANLI E BAYRAM, 2009).

A presença de OTA nos vinhos foi inicialmente relatada em pesquisa por Zimmerli e Dick (1996), em que quantidades máximas de 0,4 µg/L da micotoxina foram encontradas (ZIMMERLY E DICK, 1996; VISCONTI, 2008).

Battilani *et al* (2006), quantificaram a presença de OTA em cachos destinados a vinificação na Itália. A concentração do contaminante na uva foi considerada baixa, e a maioria das amostras se apresentou abaixo do limite de detecção (LOD de 0,03 ng/g). Concentrações mais altas foram encontradas nas uvas da região Sul do país (de 0,4 ng/g a 0,65 ng/g). Chiotta *et al* (2009), analisaram a micobiota nas uvas de vinhedos da Argentina e encontraram concentrações de OTA que variaram de 0,1 ng/g e 1,20 ng/g.

Soufleros *et al* (2003), realizaram a análise de vinhos tintos, rosé e brancos produzidos na Grécia e encontraram OTA em 62,8% das amostras. A maior parte destes vinhos não foi considerado um risco a saúde, cujos valores de OTA estavam abaixo de 0,05 ng/mL. Vinhos mais açucarados apresentaram níveis mais altos do que vinhos secos, com resultados variando de <0,02 a 3,2 ng/mL. Valores similares de contaminação foram encontrados na Europa por Battilani *et al* (2002), cujas concentrações encontradas variaram de <0,01 µg/L a 3,4 µg/L. Visconti *et al* (2008), fizeram um levantamento de dados sobre a presença de OTA em vinhos e as contaminações variavam de um mínimo de 0,005 µg/kg até o máximo de 15,6 µg/kg nos vinhos europeus.

Em um estudo realizado por Hocking *et al.* (2003), a presença de OTA foi analisada em diferentes safras, cor e classe de vinhos provenientes de diversas regiões produtoras da Austrália. Das amostras, 344 eram de vinhos tintos e 257 de vinhos brancos. A concentração de OTA nos vinhos tintos variou entre 0,05 e 0,62 µg/L em 14% de amostras positivas. Nos vinhos brancos, 16% das amostras estavam contaminadas em concentrações de 0,05 a 0,5 µg/L. O maior valor encontrado para OTA foi de vinhos de safra indefinida, entretanto, nos resultados entre safras de 1984 a 2000, a concentração mais alta foi de 0,50 µg/L de OTA, em 1999.

Em pesquisa realizada no mercado de São Paulo, Shundo *et al* (2008), avaliaram diversos vinhos provenientes de países da Europa, África e América Latina (Tabela 3). A maior concentração de OTA encontrada foi de 0,32 ng/mL em vinhos italianos. Vinhos de países como Argentina, Uruguai e África do Sul apresentaram valores abaixo de 0,03 ng/mL e os do Chile não apresentaram contaminação.

Tabela 3. Ocorrência de Ocratoxina A em vinhos.

| País | Número de amostras | Nº de amostras positivas (%) | Valores de OTA (ng/mL) |
|---------------|--------------------|------------------------------|------------------------|
| Chile | 7 | 0 | ND |
| Argentina | 6 | 01 (16.7) | <0.03 |
| Uruguai | 3 | 01 (33.3) | <0.03 |
| França | 5 | 03 (60.0) | 0.20-0.29 |
| Itália | 5 | 05 (100) | 0.03-0.32 |
| Portugal | 5 | 05 (100) | 0.03-0.25 |
| Espanha | 2 | 02 (100) | 0.07-0.12 |
| África do Sul | 1 | 01 (100) | <0.03 |

ND = Não Detectada (Limite de Detecção de 0,01 ng/mL)

Adaptado de Shundo *et al* (2008).

Um levantamento de dados realizado por Belli *et al* (2002), que englobou amostras de diferentes regiões da Europa, evidenciou que vinhos do tipo branco e rosé apresentam maiores níveis de contaminação do que vinhos tintos, embora a porcentagem de amostras positivas encontradas em diferentes pesquisas seja

maior neste último. Uma das evidências mais marcantes encontradas é o gradiente Norte-Sul de contaminações dos vinhos Europeus, mais freqüentemente na região do mar Mediterrâneo, ao Sul. Atribui-se este fato a variação de temperaturas mais frias do norte e mais quentes e úmidas ao Sul. Segundo Valero *et al* (2008), vinhos feitos de uvas cultivadas nas regiões mais quentes do Mediterrâneo, conhecidas por serem quentes e secas no verão e úmida no outono, apresentaram 60% de contaminação, dos quais 27% estavam acima de 2 µg/L de OTA.

Rosa *et al* (2004) analisaram vinhos europeus e de países da América Latina vendidos no mercado da cidade do Rio de Janeiro, diferenciando-os por cor. Em seus resultados, os vinhos tintos apresentaram uma incidência de 45% de contaminação por OTA, variando entre as concentrações de 0,0283 e 0,0567 µg/L. A maior incidência foi em vinhos tintos italianos (75%). Na América do Sul, 31,2% das amostras de vinho tinto apresentaram OTA e a maior concentração encontrada foi de 0,0707 µg/L em vinhos chilenos.

1.3.1.1 Ocorrência de Ocratoxina A em vinhos brasileiros

A presença de ocratoxina A em vinhos brasileiros foi reportada na pesquisa de Rosa *et al* (2004), realizada no Rio de Janeiro. Os vinhos brasileiros, neste caso, apresentaram 30% de contaminação em tintos, 20% em brancos e 20% em rosé. A concentração de OTA foi a mais alta para os vinhos tintos (máximo de 0,0424 µg/L), seguida de vinhos brancos (0,0354 µg/L) e de vinho rose (0,0282 µg/L).

Na pesquisa realizada em São Paulo por Shundo *et al* (2006), a contaminação por OTA encontrada variou de concentrações entre 0,1 e 1,33 µg/L. A incidência foi de 9 amostras positivas em um total de 29. Neste estudo, as amostras foram divididas em regiões Norte e Sul. A região Sul apresentou apenas 2 amostras positivas (6,9%) e valores de OTA entre 0,1 e 0,24 µg/L. Das 7 amostras analisadas da região Norte todas apresentaram contaminação, onde o valor máximo foi 1,33 µg/L.

Em ambas as pesquisas citadas, os valores de OTA estavam abaixo do limite da EC N°123/2005, no entanto, Welke *et al* (2010) avaliaram a presença de OTA em 34 amostras de vinho tinto e foi encontrada em uma das amostras a concentração de 4,5 µg/L.

1.3.2 Variação dos níveis de OTA durante vinificação

Mudanças nas características da fermentação dos vinhos podem afetar a concentração de OTA de forma positiva ou negativa. Segundo Meca *et al* (2010), os níveis de contaminação reduziram significativamente em testes realizados com 16 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empregadas pelas indústrias. Esta redução ocorre quando o levedo se desenvolve e absorve a OTA, prendendo-a em suas paredes celulares. (CARIDI *et al*, 2006) Em vinhos licorosos (Vinho do Porto), a interrupção dos processos fermentativos pela “fortificação” do mosto permite que parte da micotoxina mantenha-se no produto, uma vez que o levedo é morto pela adição de álcool etílico potável. Logo, vinhos de fermentação prolongada apresentam menores concentrações de OTA do que vinhos cujos processos fermentativos são tradicionalmente alterados (VALERO *et al*, 2008). O uso de culturas de bactérias lácticas pode reduzir a contaminação da mesma forma que o levedo, através da absorção da OTA pela biomassa em crescimento (CARIDI *et al*, 2006; FUCHS *et al*, 2008; AMASQUETA *et al*, 2009). Outra maneira de diminuir a presença de OTA, está no controle dos processos de filtração e separação de sólidos durante a maceração da uva, que permite a retirada de grande parte da micotoxina junto ao material vegetal (VISCANTI *et al*, 2008).

Valero *et al* (2008) avaliaram processos produtivos e analisaram diferentes vinhos da Europa e região do Mediterrâneo. Constataram que diferentes tipos de tratamento das uvas, conforme as características do produto final desejado, tinham papel importante na concentração de OTA. Houve um aumento nos valores de OTA em pós-colheita, quando usado secagem artificial da uva para vinhos a base de uvas secas ou passas. As correntes de ar morno e seco proporcionaram o desenvolvimento de fungos micotoxigênicos significativamente maior do que em

temperatura mais alta. O uso da secagem artificial ou natural é comum na produção de vinhos doces e licorosos, no entanto a secagem natural proporciona maiores danos pós-colheita nas uvas do que a anterior. Lombaert *et al* (2004), investigaram a presença de ocratoxina A em variedades de uvas passas vendidas no mercado canadense e importadas de outros países. A análise apontou 79% de amostras positivas para OTA. A média de concentração foi maior em amostras importadas da Austrália (12,9 ng/g).

Testes realizados em microvinificação por Ratola *et al* (2005), relataram um decréscimo de até 92% do conteúdo de OTA durante o processo de separação de sólidos do mosto e fermentação. Meca *et al* (2010), reafirmaram os estes dados relatados ao descreverem que a OTA é em parte absorvida pela biomassa do levedo durante seu desenvolvimento. Produtos que não levam processos fermentativos, tais como preparados de sucos e polpas, podem apresentar níveis maiores de OTA quando comparados com os produtos fermentados.

1.4 Métodos de análise de Ocratoxina A

Uma grande variedade de estudos é conduzida atualmente, especialmente na Europa, com o objetivo de monitorar a presença de OTA. A micotoxina vem sendo reportada desde 1996 em vinhos e produtos alimentícios em pesquisas realizadas por Bernhard Zimmerli e Rudolf Dick, cujos métodos usados são amplamente adaptados e aprimorados por outros autores desde então (CABANEZ *et al*, 2002; VISCONTI *et al*, 2008).

Existem diversos equipamentos disponíveis para trabalho e pesquisa com micotoxinas. Somente das técnicas cromatográficas empregadas podem ser citados a Cromatografia Líquida (CL), Cromatografia Gasosa (CG), a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia de Fluido Supercrítico, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), etc. O método mais utilizado atualmente para quantificação da contaminação de OTA em alimentos, sangue

humano e tecidos animais é a CLAE. Diferentes equipamentos acoplados ou combinados podem ser usados, tais como Espectrofotômetros de Massa (MS), normalmente utilizado junto ao sistema do CLAE. Apesar de eficiente e preciso, a CLAE é de alto custo e manutenção. A CCD vem a ser um dos métodos mais simples, em um sistema de fácil comparação de padrões e manchas dentro do espectro UV. O maior desafio do sistema de CCD é a intrínseca rede de substâncias que compõem as amostras (LIN *et al*, 1998; VALENTA, 1998; BELLI *et al*, 2002; VALERO *et al*, 2008; TURNER *et al*, 2009).

A similaridade dos métodos de extração e limpeza das amostras contaminadas por OTA permite que estas etapas sejam usadas com diferentes sistemas de detecção e visualização, com exceção do método de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) que não requer limpeza de extratos (RAHMANI, 2009).

O uso de solventes adequados é de grande importância e depende da composição e sua preparação. A OTA pode ser extraída de uma fase aquosa com o uso de um solvente não miscível, como o clorofórmio, em pH menor do que 7,0. Segundo Valenta (1998), outros autores recomendam um ajuste de pH para 2,0 em matrizes com grandes quantidades de proteínas. Este ajuste é relatado pela maioria dos autores que trabalha com extrações em vinhos e sucos de uva. Ainda segundo Valenta (1998), o uso de soluções de $MgCl_2$ e HCl (com pH 2,5) em extração com amostra de sangue. Outro solvente utilizado é a solução de H_3PO_4 e NaCl, para ser usado durante o processo de extração inicial da amostra junto de clorofórmio. Esta segunda solução é relatada por vários autores que realizaram extrações em vinho, tais como Zimmerly e Dick (1996), Rosa *et al* (2004) e Budarpal e Legarda (2007). Segundo Welke *et al* (2010), o uso de uma etapa de tratamento com solução aquosa com bicarbonato de sódio 1,25% reduz significativamente as impurezas nas etapas posteriores destinadas a aplicação em CCD. Atualmente, a extração e limpeza dos extratos vêm sendo seguidas do uso de colunas de imunoafinidade (IAC) específicas para micotoxina analisada. Amostras sólidas necessitam muitas vezes de uma etapa de microfiltração, seguida de passagem pela imunoafinidade, para que a extração seja completa e

eficiente (VALENTA, 1998; LIN *et al*, 1998; MONACI E PALMISANO, 2004; VALERO *et al*, 2008; ANLI E BAYRAM, 2009; TURNER *et al*, 2009; WELKE *et al*, 2010).

Na CCD é realizada com a visualização dos pontos ou manchas geradas pelas micotoxinas é realizada sob UV em placa de sílica gel. Após as etapas de extração e limpeza, o extrato é aplicado diretamente sobre placa de sílica gel para eluição em uma cuba com mistura de solventes. Esta mistura pode ser variada e combinações destes solventes são feitas conforme a substância a ser identificada. Os solventes mais usados são: o tolueno, clorofórmio, acetato de etila, acetona, etil éster, metanol, ácido acético, ácido fórmico, etc (LIN, 1998). Em pesquisa feita por Monaci e Palmisano (2004), concentrações de OTA em torno de 0,5 ng/g foram relatadas em amostras de café verde, analisadas com CCD e com o uso de coluna de imunoafinidade. Conforme citado por Turner *et al* (2009), o CCD já demonstrou precisão similar ao o CLAE em análises para alimentos contaminados por OTA. Em estudo realizado por Valero *et al* (2008), com análise por CLAE, relataram a possibilidade de resultados positivos ou superestimados para OTA em vinhos muito açucarados, onde os valores poderiam variar em até 30%. O mesmo pode ocorrer na CCD, o que torna a etapa de limpeza do extrato um momento crítico (LIN *et al*, 1998; MONACI E PALMISANO, 2004; TURNER *et al*, 2009).

Os métodos de determinação de OTA envolvem um procedimento de confirmação. Para este fim, várias metodologias podem ser usadas, dos quais a mais citada é a medição do derivatizado metil-éster de OTA, através do uso de um álcool, como metanol ou outro, que forme ésteres de OTA em uma solução ácida. Hunt *et al* (1980) utilizaram a derivatização com trifluoreto de boro a 14% em metanol, no qual a ocratoxina derivatizada sofre mudanças químicas, no espectro de absorção e emissão de luz UV. Além destes, outros procedimentos que podem ser usados são: os espectrofotômetros de massa (MS), cuja detecção direta da OTA e seu peso molecular específico podem ser encontrados e analisados por um sistema informatizado; o teste de ELISA; e testes que envolvem hidrólise enzimática da OTA para geração de OT α , cujo valor pode ser medido posteriormente (VALENTA, 1998; ANLI E BAYRAM, 2009).

1.5 Legislação

Atualmente os países da Comunidade Européia possuem limites para micotoxinas em diversos produtos de diferentes origens. Para Ocratoxina A, o limite regulamentado em vinhos é de 2 µg/L ou 2 ppb de OTA, estabelecido na EC Nº 123 de janeiro de 2005 (EC 123/2005).

Alguns países fora da União Européia regulamentam Ocratoxina A para uvas passas, sucos de uva e para todos produtos alimentícios (Tabela 4) (FAO, 2004).

Tabela 4 – Países que possuem regulamentação para OTA em produtos de Uva ou em outros alimentos.

| País | Limite de OTA µg/kg | Alimento |
|---------------------|---------------------------|--|
| Bulgária | 3 | Suco de uva |
| | 5 | Uvas passas |
| Eslováquia | 10 | Produtos Alimentícios |
| Hungria | 10 | Uvas passas; café torrado e produtos de café; outros produtos de origem vegetal; |
| Iran | 10 | Uvas passas e frutas secas |
| Romênia | 20 | Produtos Alimentícios |
| Servia e Montenegro | 10 | Produtos Alimentícios |
| Suíça | 5 | Produtos Alimentícios |
| Turquia | 10 | Uvas passas |
| Vietnam | 35 (total de micotoxinas) | Produtos Alimentícios |
| União Européia | 2 | Vinhos |

Fonte: FAO, 2004.

No Brasil ainda não existem limites para OTA em vinhos, encontrando-se, entretanto, em consulta pública, a sugestão para esta micotoxina. A proposta criada pela ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária) na Consulta Pública de nº100, de 21 de dezembro de 2009, sugere para vinhos o limite de 10 µg/L de Ocratoxina A (ANVISA, 2010).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Vinhos produzidos por diferentes empresas das regiões vinícolas do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, foram cedidos pela Associação Brasileira de Enologia. Os vinhos estavam depositados na Embrapa Uva e Vinho, tendo sido degustados na XVII Avaliação Nacional de Vinhos. Entre os vinhos destinados a análise de OTA, 75 eram do Rio Grande do Sul, 9 de Santa Catarina e 4 do Paraná, sendo 56 da variedade Cabernet Sauvignon e 32 da variedade Merlot, da safra 2009.

2.2 Ocratoxina A em solução padrão

A OTA (1 mg de padrão Sigma-Aldrich, 98% de *A. ochraceus*), foi dissolvida em tolueno-ácido acético (99:1, v/v), obtendo-se a solução padrão estoque na concentração de 40 µg/mL. Duas soluções de trabalho foram utilizadas, conforme as necessidades dos procedimentos, nas concentrações de 4,0 µg/mL e 0,4 µg/mL. A concentração da solução estoque foi determinada por medição da absorbância UV a 333 nm e calculada segundo AOAC (2002) em 136% de OTA.

2.2.1 Curva Padrão

Para fins de cálculo e verificação de linearidade do método empregado, uma curva padrão com 7 pontos foi feita contendo concentrações de 1, 2, 4, 6, 8, 10, e 12 µg/L em cada mancha. Durante a realização dos testes outras curvas foram feitas da mesma forma com um mínimo de 5 pontos, para verificação do coeficiente de correlação (r^2) aceitável de 0,99, recomendados pela ANVISA (BRASIL, 2003).

2.3 Extração e limpeza

A figura 5 exibe o fluxograma de extração e limpeza da OTA em vinhos baseado no método utilizado por Welke *et al*, (2010).

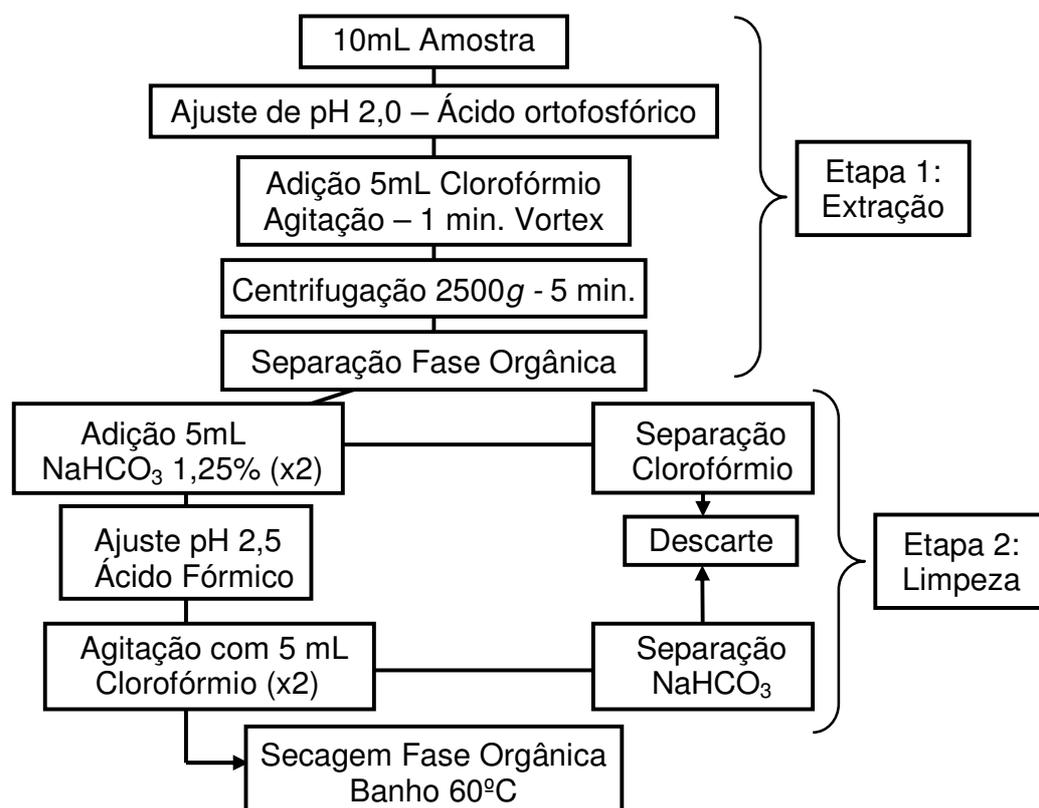


Figura 5. Fluxograma de extração e limpeza de OTA em vinhos, segundo Welke *et al* (2010).

O extrato seco foi redissolvido com 100 μL de solução tolueno:ácido acético (99:1 v/v) para aplicação em CCD.

2.4 Análise de Ocratoxina A por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Amostras reconstituídas com tolueno:ácido acético (99:1) foram agitadas com vortex e coletadas com seringa de 10 μL . Placas cromatográficas de vidro com sílica gel de 20x20 cm (Macherey-Nagel Pre-coated TLC-plates Sil G-25 HR)

foram previamente reduzidas para placas menores de 10x10 cm. Todos os pontos foram aplicados a 1 cm da base da placa e 1 cm das laterais, possibilitando marcação de 9 pontos afastados 1 cm entre si. As amostras foram feitas em duplicata. As placas foram eluídas em solução de tolueno, clorofórmio, acetato de etila e ácido fórmico (35:25:25:10, v/v/v/v) (LIN *et al*, 1998).

Após eluição dos solventes a placa foi retirada e seca para observação sob luz UV, em um fotômetro de fluorescência com filtros para comprimento de onda 333 nm (modelo U-340 2IN SQ, Edmund Optics, USA) com lâmpadas UV (SCT, modelo T-5) desenvolvido em parceria com o Instituto de Física da UFRGS. A placa então foi fotografada com câmera Sony Cybershot (modelo DSC H5) em módulo de abertura prolongada (módulo Aperture). As fotos, com amostras, foram analisadas através do programa ImageJ e os dados obtidos foram calculados com auxílio do Microsoft Excel.

2.5 Testes de recuperação

Amostras contaminadas artificialmente com concentrações de 8, 10 e 12 µg/L foram extraídas e quantificadas. Uma curva padrão de OTA foi aplicada em cada recuperação simultaneamente as amostras na placa cromatográfica para checagem constante da linearidade do método e cálculo das concentrações recuperadas. Cada experimento foi realizado com a presença de um branco e em triplicatas. Para os testes de repetibilidade, amostras de concentrações iguais e diferentes foram realizadas no mesmo dia e em cinco dias consecutivos, respectivamente.

Os valores encontrados foram utilizados para cálculo do Desvio Padrão Relativo (RDSr) (equação abaixo), com fim de verificação da repetibilidade do procedimento conforme equação adaptada de Horwitz, apresentada na Diretiva 2002/26/CE da Comissão de 13 de Março de 2002 e na Consulta Pública de nº100 de dezembro de 2009, da ANVISA.

$$\text{RDSr \%} = [(\text{Sr}/\text{X}) \times 100]$$

Onde: S_r = desvio padrão das amostras, calculado nas condições de repetibilidade;

X = média de todas amostras obtidas;

r = repetibilidade, valor do qual se pode esperar que a diferença absoluta entre os resultados de dois testes obtidos em condições de repetibilidade (ou seja, mesma amostra, mesmo operador, mesmo equipamento, mesmo laboratório e curto intervalo de tempo) se situe dentro dos limites da probabilidade específica (em princípio 95 %), sendo $r = 2,8 \times S_r$.

O limite de detecção (LOD) foi determinado como o menor valor de intensidade luminosa capaz de ser diferenciado de zero através do programa ImageJ. O limite de quantificação (LOQ) foi calculado a partir do valor mais baixo medido com precisão, de diferentes concentrações de OTA, através da média de 5 análises de uma imagem sob luz UV no programa imageJ.

2.6 Teste de confirmação

Para este teste foi utilizado método adaptado de Hunt *et al* (1980), onde o extrato de uma amostra presuntiva positiva é evaporado em banho a 65°C. O mesmo é feito com 25 µL de solução padrão de OTA (4 µg/mL). Ao resíduo foi acrescentado 100 µL de trifluoreto de boro a 14% em metanol e colocado em banho por 10 minutos, com os frascos tampados para a reação de derivatização. O trifluoreto de boro foi evaporado sob corrente de nitrogênio e o resíduo da derivatização redissolvido em tolueno-ácido acético 99:1 (v/v) para ser submetido a CCD. As amostras derivatizadas e o padrão foram eluídas em solvente tolueno:clorofórmio:acetato de etila:ácido fórmico 35:25:25:10 (v/v/v/v). As amostras derivatizadas positivas apresentaram mudança de coloração e/ou posicionamento da placa cromatográfica.

2.7 Extração e limpeza com Coluna de Imunoafinidade (IAC)

Este método foi efetuado conforme Rosa *et al.* (2004) e Budarspal e Legarda (2007), para limpeza do extrato com colunas de imunoafinidade, e segue o método de Welke *et al* (2010) para extração (Figura 6). Neste procedimento foram utilizadas colunas de imunoafinidade Ochratest™ (VICAM), substituindo a etapa de limpeza demonstrada na figura 5. O fluxo de líquido na coluna foi de 1-2 gotas por segundo em todos os momentos. A solução PBS utilizada segue o manual da VICAM.

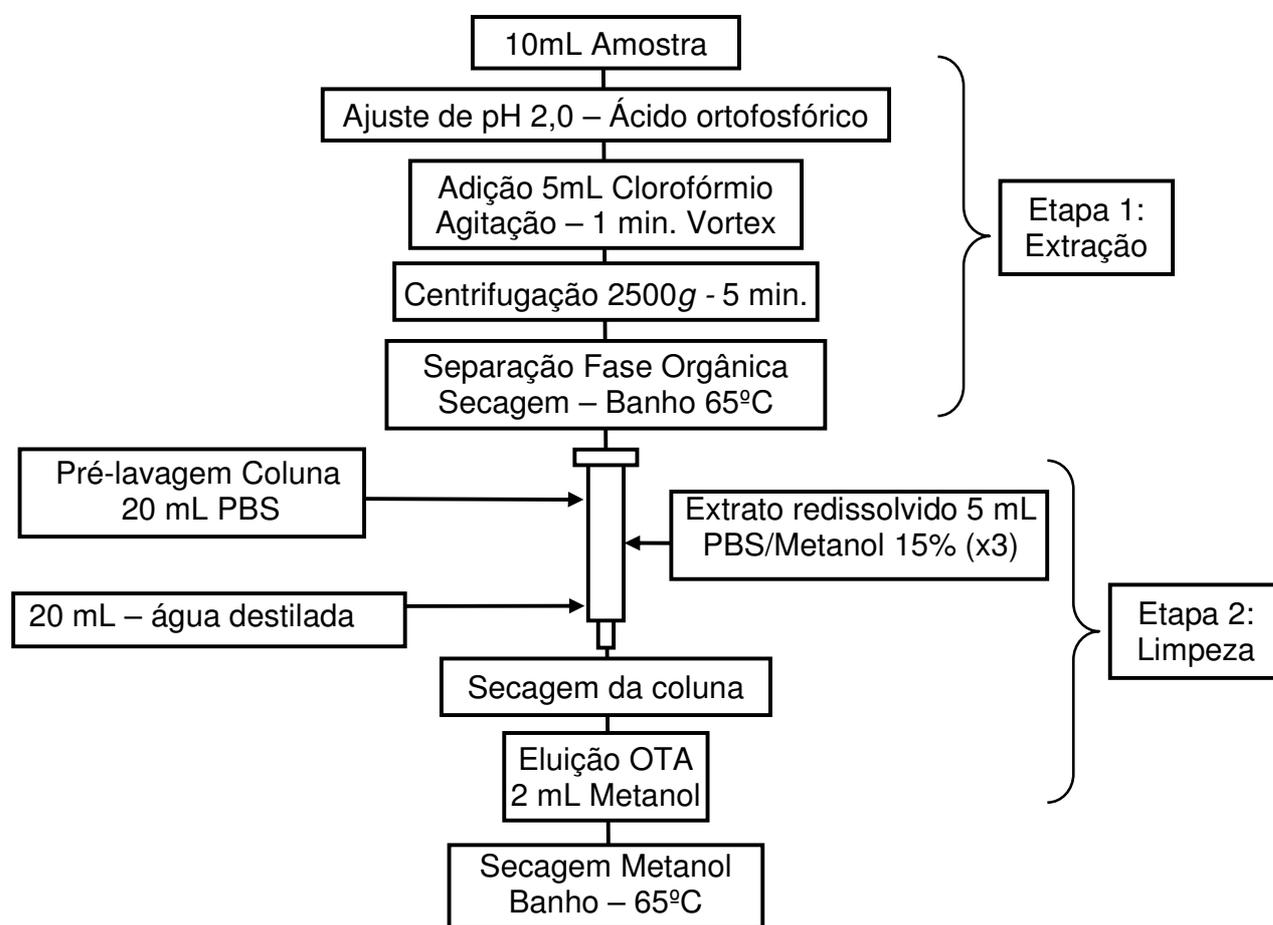


Figura 6. Fluxograma de extração e limpeza com Coluna de Imunoafinidade.

O extrato seco foi redissolvido com 100 μ L de solução tolueno:ácido acético (99:1) para aplicação em CCD (ROSA *et al*, 2004; BUDARSPAL E LEGARDA,

2007; WELKE *et al*, 2010). Testes de recuperação foram feitos com mesma concentração e mesmo dia, em triplicatas de 8, 10 e 12 µg/L, para avaliação das colunas de imunoafinidade.

3. RESULTADOS

Os testes de recuperação nas condições de análise apresentaram média de 76,95% e desvio padrão relativo (RDSr) de 8,746% para concentrações diferentes (Tabela 5). A precisão dos testes entre dias diferentes e amostras de mesmo dia, em condições de repetibilidade, está apresentada na tabela 6.

Tabela 5. Recuperação de OTA em vinhos em diferentes concentrações.

| Concentração da amostra | Nº amostras | Média recuperação % | Sr* (%) | RDSr** (%) |
|-------------------------|-------------|---------------------|---------|------------|
| 12 µg/L | 8 | 74,88 | 6,17 | 8,23 |
| 10 µg/L | 8 | 78,55 | 5,57 | 7,09 |
| 8 µg/L | 8 | 77,41 | 8,47 | 10,94 |
| Todas concentrações | 24 | 76,95 | 6,73 | 8,74 |

*Sr = desvio padrão.

**RDSr = desvio padrão relativo.

Tabela 6. Recuperação de OTA para amostras no mesmo dia e entre dias.

| Concentração da amostra (µg/L) | Amostras de mesmo dia | | Amostras entre dias* | |
|--------------------------------|-----------------------|-----------|----------------------|------------|
| | Média (%) | RDSr* (%) | Média (%) | RDSr** (%) |
| 12 µg/L | 69,58 | 0,87 | 78,07 | 5,71 |
| 10 µg/L | 75,91 | 3,87 | 80,13 | 8,05 |
| 8 µg/L | 76,63 | 2,25 | 77,88 | 14,25 |

* Amostras feitas em 5 dias diferentes.

**RDSr = Desvio padrão relativo.

Testes de recuperação pela adaptação do método para colunas de imunoafinidade apresentaram média de 82,33% e desvio padrão relativo de 11,66% para o total de amostras testadas (Tabela 7).

Tabela 7. Recuperação de OTA em vinhos em diferentes concentrações com coluna de imunoafinidade.

| Concentração da amostra | Nº amostras | Média recuperação % | Sr* (%) | RDSr** (%) |
|-------------------------|-------------|---------------------|---------|------------|
| 12 µg/L | 3 | 83,43 | 8,04 | 9,64 |
| 10 µg/L | 3 | 75,33 | 6,89 | 9,15 |
| 8 µg/L | 3 | 88,26 | 11,34 | 12,85 |
| Média Total | 9 | 82,33 | 9,60 | 11,66 |

*Sr = desvio padrão.

**RDSr = desvio padrão relativo.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) encontrados conforme método de análise com coluna de imunoafinidade foram de 0,2 µg/L e 0,8 µg/L, respectivamente.

Os resultados apontaram 5 amostras contaminadas por OTA em um total de 88, com incidência de 5,68%, feitos através do método com coluna de imunoafinidade. A variedade Cabernet Sauvignon apresentou 3 amostras positivas de um total de 56, e da variedade Merlot 2 amostras em 32 foram positivas (Tabela 8). Na segmentação por estado, das 75 amostras do Rio Grande do Sul, 3 se apresentaram positivas para OTA; em Santa Catarina e Paraná uma amostra foi positiva para cada estado, dos conjuntos de 9 e 4 vinhos, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 8. Incidência de OTA em vinhos conforme variedade de uva.

| Variedade do Vinho | Nº Amostras Positivas | Relação percentual | Concentração de OTA (µg/L) |
|--------------------|-----------------------|--------------------|----------------------------|
| Cabernet Sauvignon | 3/56 | 5,36% | <LOQ – 0,84±0,17(SD) |
| Merlot | 2/32 | 6,25% | <LOQ |
| Total | 5/88 | 5,68% | <LOQ – 0,84±0,17(SD) |

LOQ = 0,8 µg/L.

SD = desvio padrão.

Tabela 9. Incidência de Ocratoxina A em vinhos conforme estado da região Sul do Brasil.

| Estado | Nº Amostras Positivas | Relação percentual | Concentração de OTA ($\mu\text{g/L}$) |
|-------------------|-----------------------|--------------------|---|
| Paraná | 1/4 | 25% | <LOQ |
| Santa Catarina | 1/9 | 11,11% | <LOQ |
| Rio Grande do Sul | 3/75 | 4% | <LOQ – 0,84 \pm 0,17(SD) |

LOQ = 0,8 $\mu\text{g/L}$.

SD = Desvio padrão.

Os valores encontrados oscilaram entre o limite de detecção e 0,84 $\mu\text{g/L}$ de OTA. O vinho Cabernet Sauvignon apresentou a maior concentração.

4. DISCUSSÃO

Previamente às análises foram realizados alguns testes de extração em vinhos, utilizando-se 20 mL de solução de $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaCl}$ (16,85 mL H_3PO_4 e 59g $\text{NaCl}/500$ mL) misturada aos 10 mL de amostra e clorofórmio. A solução foi usada por Rosa *et al* (2004) e Budarspal e Legarda (2007), entretanto, a extração feita desta forma foi testada sem sucesso encontrando variações nas médias de recuperação abaixo de 60% (dados não exibidos). O ajuste de pH para 2,0-2,2 com ácido ortofosfórico, diretamente aos 10 mL de vinho conforme descrito no item 2.3, demonstrou ser mais eficiente, o que justificou o uso do método de Welke *et al* (2010).

Todas as recuperações executadas obtiveram uma boa repetibilidade com limites de desvio padrão relativo (RDSr) menores do que 20%. Este valor foi adotado como limite na diretiva EC 26/2002 e é sugerido na Consulta pública nº100 pela ANVISA para concentrações de OTA recuperadas entre 1-10 $\mu\text{g/L}$, calculados pela equação de Horwitz. O método apresentou boa linearidade pela curva padrão (Figura 7), cujo coeficiente de correlação foi $r^2=0,999$ (Figura 8).

Outras curvas feitas junto às amostras de recuperação obedeceram ao padrão aceitável recomendado pela ANVISA para o coeficiente de correlação de no mínimo 0,99, descrito na Resolução Nº 899 de 23 de maio de 2003.



Figura 7. Imagem da Curva padrão de OTA em placa de CCD sob luz UV.

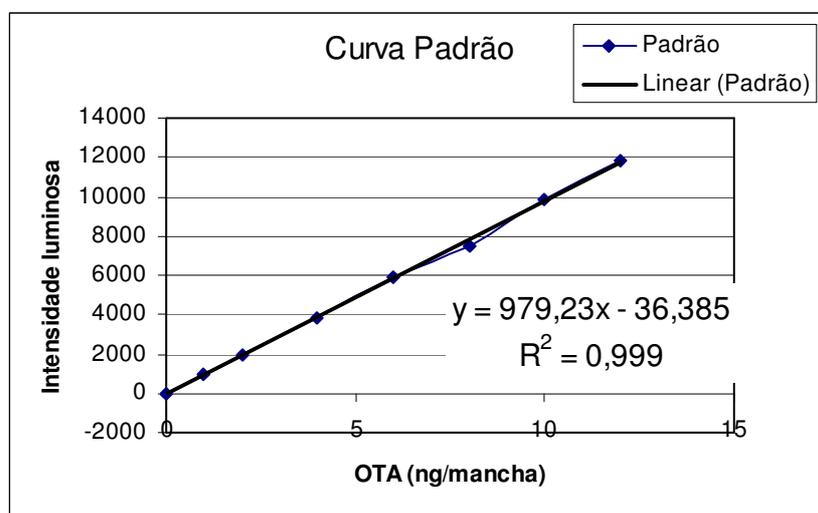


Figura 8. Curva padrão de Ocratoxina A para verificação de linearidade do método, conforme medição da intensidade luminosa de cada mancha por ImageJ.

Durante os testes, as amostras de recuperação apresentaram manchas além da OTA, que apareceram nas mesmas alturas das amostras ou logo abaixo, criando variações nas medidas na mesma posição da toxina (Figura 9). As amostras foram aplicadas simultaneamente a um branco (amostra igual não contaminada), que quando medido na mesma altura de eluição da OTA apresentava valores que possivelmente estavam sendo interpretados como ocratoxina A. A medição dos extratos recuperados apresentou valores percentuais mais elevados do que as contaminações inicialmente adicionadas nos vinhos, como por exemplo, oscilando entre médias de 111% para contaminações de 8

$\mu\text{g/L}$. A eliminação de interferentes que estavam atrapalhando a leitura das manchas e dificultando a quantificação tornou necessário o uso de colunas de imunoafinidade para limpeza mais eficiente dos extratos, permitindo assim análise mais precisa do conteúdo de OTA das amostras.

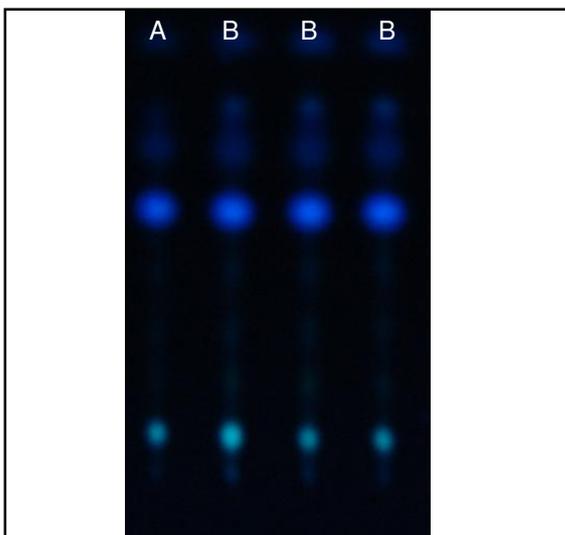


Figura 9. Teste de recuperação, limpeza com NaHCO_3 1,25%.

Coluna A: vinho tinto sem contaminação;
Colunas B: manchas de amostras contaminadas artificialmente com OTA;

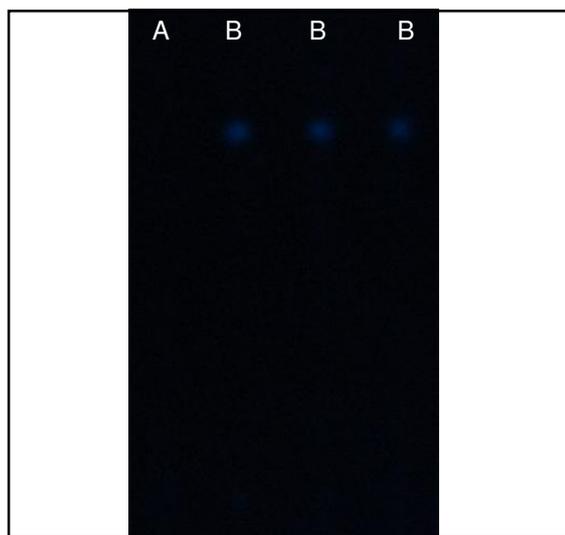


Figura 10. Teste de recuperação, limpeza com coluna de imunoafinidade.

Coluna A: vinho tinto sem contaminação;
Colunas B: manchas de amostras contaminadas artificialmente com OTA;

A coluna de imunoafinidade foi utilizada com sucesso por Rosa *et al* (2004), em vinhos e foi considerada uma forma confiável de limpeza da matriz de compostos, atingindo recuperações em média maiores do que 80%. Outros autores também mencionam o uso de IAC, como Anli e Bayram (2009), Rahmani *et al* (2009), Lin *et al* (1998) e Valenta (1998), para limpeza de extratos como uma alternativa precisa para isolamento de micotoxinas, devido ao sistema de anticorpos específicos nas colunas. O método de Welke *et al* (2010), foi adaptado para limpeza com IAC e a média de recuperação excedeu 80% (Tabela 7).

Os limites de detecção e quantificação encontrados com utilização de CCD foram de $0,2 \mu\text{g/L}$ e $0,8 \mu\text{g/L}$. Soufleros *et al* (2003), analisando vinhos com CLAE trabalharam com limite de detecção de $0,02 \text{ ng/mL}$. Hocking *et al* (2003), descrevem limites de detecção e quantificação de $0,02 \text{ ng/mL}$ e $0,05 \text{ ng/mL}$. Os limites encontrados por Shundo *et al* (2006), foram de $0,01 \text{ ng/mL}$ e $0,03 \text{ ng/mL}$.

para detecção e quantificação, respectivamente, igualmente através de equipamento CLAE em vinhos. Estes trabalhos apontam uma maior sensibilidade da CLAE. Os valores encontrados no presente trabalho, entretanto, estão abaixo de 2 µg/L, valor estabelecido por lei na EC 123/2005, permitindo a avaliação da qualidade destes vinhos em relação a OTA. Santos e Vargas (2002), obtiveram um limite de detecção de 0,5 µg/kg em amostras de café analisados através de CCD, similares aos limites encontrados na análise dos vinhos.

A baixa incidência de OTA nos vinhos destinados a XVII Avaliação Nacional de Vinhos pode estar relacionada a baixa presença de fungos ocratoxigênicos nas uvas, a presença de fungos potencialmente produtores que não produziram OTA e ou as condições climáticas durante o período de 2009, quando os vinhos foram produzidos. Ponsone *et al* (2007), analisaram vinhedos da Argentina e apesar de encontrar fungos potencialmente produtores (24% das cepas encontradas) nenhuma concentração de OTA foi encontrada nas uvas da região. Chiotta *et al* (2009), entretanto, analisando vinhedos de regiões similares da Argentina, encontraram tanto fungos potencialmente produtores como OTA nas uvas, em concentrações de 0,1 a 1,2 ng/g. Uvas da variedade Cabernet Sauvignon estavam entre as mais contaminadas por *A. carbonarius*.

A incidência encontrada para OTA de 5,68% é similar a relatada por Shundo *et al* (2006), que separaram o Brasil em duas regiões produtoras principais (Norte e Sul), e a contaminação de OTA encontrada nos vinhos da região sul foi de 6,9%, cuja concentração variou de 0,1 a 0,24 ng/mL.

4.1 Considerações sobre análise fotométrica

Durante o desenvolvimento da pesquisa, algumas diferenças entre os fotômetros ultravioletas disponíveis puderam ser observadas com auxílio do programa ImageJ e de fotos tiradas nos aparelhos durante os procedimentos.

O fotômetro anteriormente construído, para ser usado com equipamento UVGL-58 (Mineralight® Lamp, USA) acoplado, possuía abertura para aquisição de imagens ao lado da fonte de luminosidade e sem posição afixada para placa, o

que gerava imagens em ângulos nem sempre iguais entre uma foto e outra, dificultando a repetibilidade do método. Outro equipamento utilizado fazia uso de LEDs (modelo T039, Spectrecology, USA) em um fotômetro de fluorescência, que emitiam luz no comprimento de onda 335 nm. Neste caso, a intensidade de luz incidente sobre a placa foi mais baixa com os LEDs do que em comparação ao modelo UVGL-58 (Figura 11), mesmo em distâncias mais próximas da fonte de luz. A posição da placa no fotômetro de fluorescência com LEDs foi adaptada para ficar diretamente abaixo da câmera e da fonte de luz e não oferecer diferenças entre as aquisições de imagem.

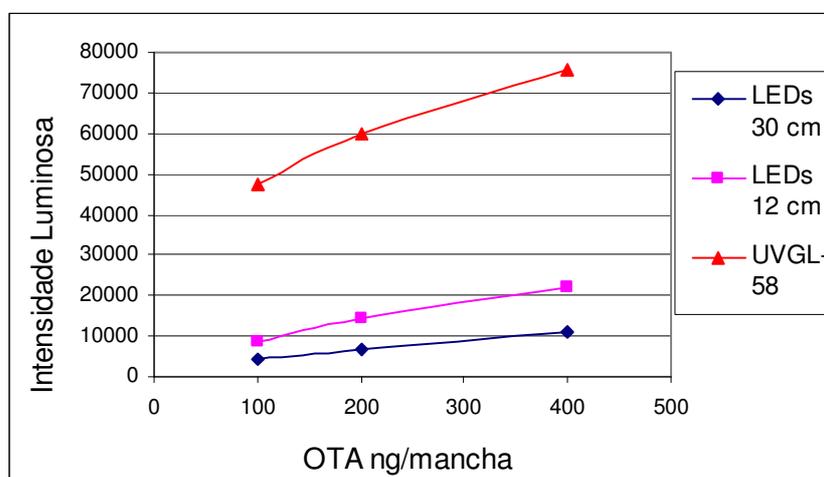


Figura 11. Leitura de intensidade de luz sobre OTA em fotômetro UVGL-58 e LEDs (distante 30 cm e 12 cm da fonte de luz).

A baixa intensidade de luz evidenciada com os LEDs conduziu a uma substituição por lâmpadas UV fluorescentes (marca SCT, modelo T-5) acompanhadas de filtros (modelo U-340 2IN SQ, Edmund Optics, USA) para o comprimento de onda adequado.

O fotômetro UV modelo UVGL-58, foi comparado com a nova configuração de filtros (U-340) e lâmpadas UV (T-5) e apresentou baixa homogeneidade na distribuição da luz, quando visualizadas as variações de intensidade de luz ao longo do centro de uma placa cromatográfica. Esta variação na luz pode ser observada no gráfico de valores de cinza gerado pelo ImageJ, mostrado na figura 12 para o modelo UVGL-58. Este valor é a medida da intensidade luminosa em uma escala de preto e branco.

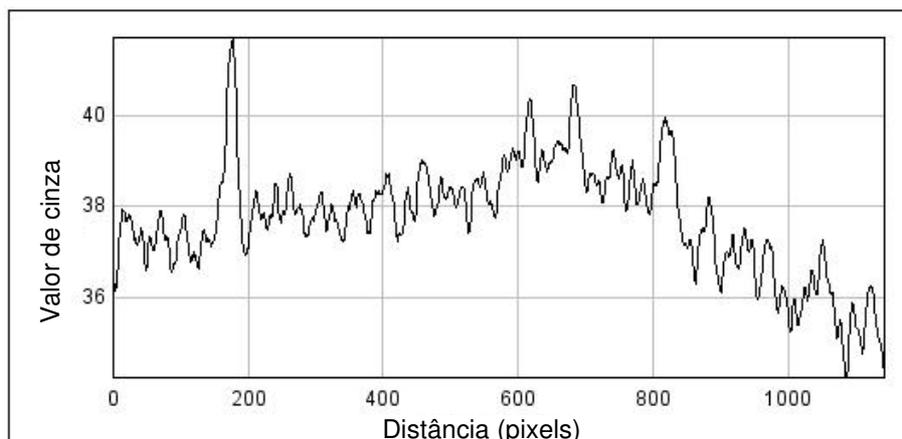


Figura 12. Variação da intensidade de luz sobre placa de CCD no equipamento modelo UVGL-58, medição da esquerda para direita na parte central.

O fotômetro ultravioleta com filtros U-340 apresentou melhor homogeneidade quando medido da mesma forma que o modelo UVGL-58, na qual a intensidade luminosa foi proporcional ao longo de toda placa (Figura 13).

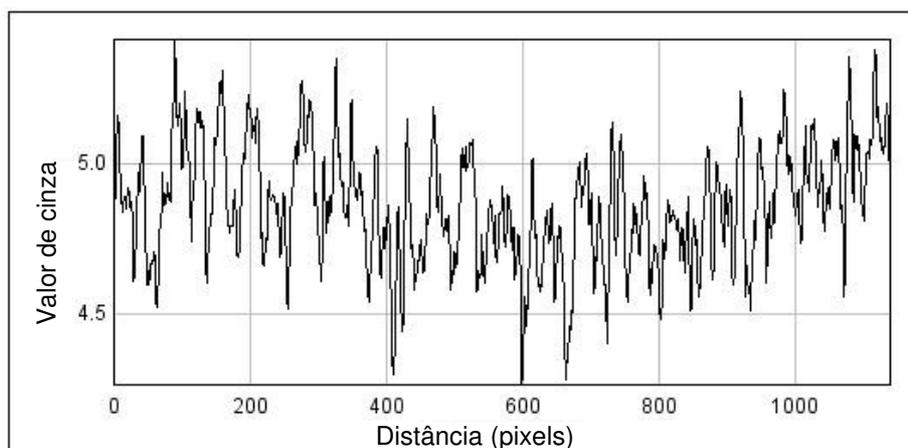


Figura 13. Variação da intensidade de luz sobre placa de CCD no equipamento com filtros, medição da esquerda para direita na parte central.

Esta diferença foi observada com mais clareza na verificação de linearidade de curvas padrão em ambos os equipamentos a partir das mesmas placas cromatográficas. A figura 14 mostra duas imagens comparativas de ambos os aparelhos sobre a mesma curva em placa cromatográfica, onde o valor de r^2 foi

melhor (próximo de 0,999) no equipamento com filtros U-340.

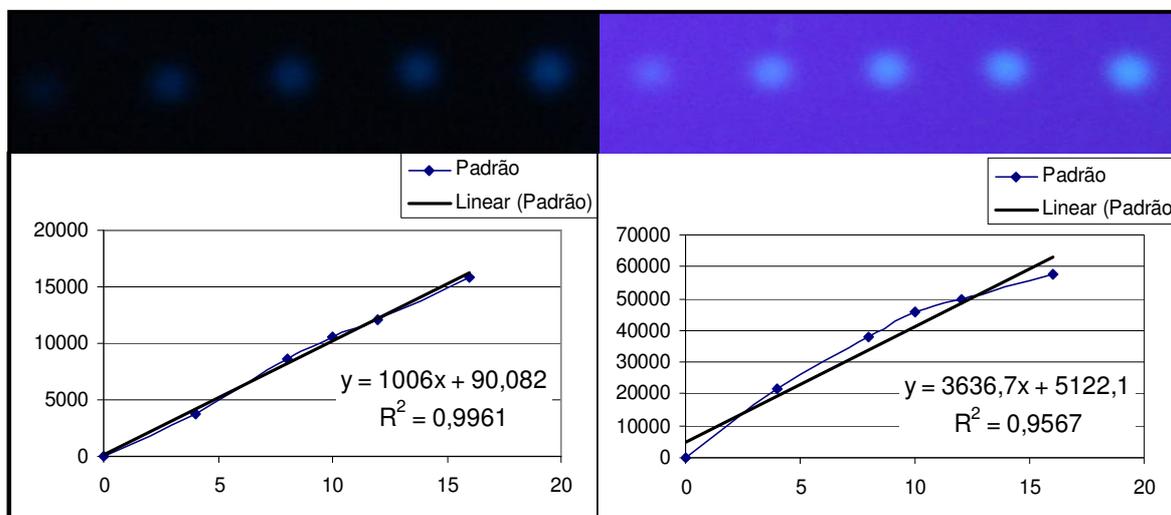


Figura 14. Comparação entre imagens sob luz UV e suas respectivas Curvas padrão de OTA, no modelo usado nas análises (esquerda) e no modelo UVGL-58 (direita) medidas com ImageJ.

Através destas comparações foi definido o uso do fotômetro com filtros U-340 para andamento da pesquisa e análise dos vinhos tintos.

5. CONCLUSÕES

Os valores de Ocratoxina A encontrados nos vinhos oscilaram entre o limite de detecção e 0,84 µg/L. O vinho Cabernet Sauvignon apresentou a maior concentração.

Todos os resultados apontaram para uma baixa incidência de ocratoxina A em vinhos produzidos na região Sul do Brasil, referentes a safra 2009. As duas variedades de uvas apresentaram resultados próximos, com percentuais de contaminação para Cabernet Sauvignon e Merlot de 5,36% e 6,25%, respectivamente.

O uso da Cromatografia em Camada Delgada com Detector de carga Acoplada foi bem sucedido. A análise de imagens adquiridas das placas de CCD

através do software ImageJ foi possível, incluindo a construção de curvas de calibração padrão para o equacionamento e cálculo das concentrações de OTA, atingindo-se limites de detecção e quantificação entre 0,2 e 0,8 µg/L, respectivamente.

5.1 Considerações finais

As análises foram referentes apenas a uma única safra e das regiões onde foram encontradas amostras positivas, apenas alguns vinhos foram analisados. Dados mais exatos dessas áreas, através de um número maior de amostras e de safras, permitiriam a construção de um perfil desta contaminação, e posterior controle de seus focos.

Mais pesquisas em torno do equipamento fotômetro de fluorescência combinados com cromatografia em camada delgada ainda podem levar a resultados mais precisos e concentrações mais baixas na determinação da micotoxina. Mesmo assim, o método se mostrou capaz de quantificar abaixo do limite estabelecido pela União Européia, valor semelhante sugerido pela Consulta Pública da Legislação Brasileira.

REFERÊNCIAS

ANLI, E.; BAYRAM, M. Ochratoxin A in Wines. **Food Reviews International**, 25 (2009) 214–232.

AMÉZQUETA, S.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN A. L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, 20 (2009) 326–333.

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária). Regulamento Técnico sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) de Micotoxinas em Alimentos. Consulta Pública nº 100, de 21 de dezembro de 2009. D.O.U de 22/12/09. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acessado em: Fevereiro de 2010.

AOAC. Official methods on analysis of AOAC international. Official Method 973.37. Thin-Layer Chromatographic Method, IUPAC-AOAC Method, (2002).

ATOUI, A.; MITCHELL, D.; MATHIEU, F.; MAGAN AND,N.; LEBRIHI, A.; Partitioning of ochratoxin A in mycelium and conidia of *Aspergillus carbonarius* and the impact on toxin contamination of grapes and wine. **Journal of Applied Microbiology**, 103 (2007) 961–968.

BATTILANI, P.; GIORNI, P.; BERTUZZI, T., FORMENTI, S.; PIETRI A.; Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, 111 (2006) S53 – S60.

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

BAU, M.; BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; MINGUEZ, S.; CABANES, F.J. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98 (2005)125 – 130.

BELLI, N.; MARIN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; Review: Ochratoxin A (OTA) in Wines, Musts and Grape Juices: Occurrence, Regulations and Methods of Analysis. **Food Science and Technology International**; 8(6), (2002) 325 – 335.

BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. An easy screening method for fungi production Ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, 71(2), (2001) 139 – 144.

BRASIL, Lei nº 7.678, de 08 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Diário Oficial da União, de 09 de novembro de 1988. Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/legislacao/Leis/Ant2001/lei767888.htm>> Acesso em: setembro de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 23 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0617c880431db04bbebbe9c579bb600/Consolidado+de+normas+COBIO.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: dezembro de 2010.

BURDASPAL, P.; LEGARDA, T. Occurrence of ochratoxin A in sweet wines in Spain and other countries. **Food Additives and Contaminants**, 24(9), (2007) 976-986.

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

CARIDI, A.; GALVANO, F.; ALESSIO, T.; ALBERTO, R.; Ochratoxin A removal

during winemaking. **Enzyme and Microbial Technology** 40 (2006) 122–126.

CHIOTTA, M.L.; PONSONE, M.L.; COMBINA, M.; TORRES, A.M.; CHULZE, S.N. Aspergillus section Nigri species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, 136 (2009) 137–141.

CHULZE S.N.; MAGNOLI C.E.; DALCERO A.M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 111 (2006) S5 – S9.

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

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

DALL'ASTA, C.; GALAVERNA, G.; BERTUZZI, T., MOSERITI, A.; DOSSENA, A. P. A.; MARCHELLI, R. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. **Food Chemistry**, 120 (2010) 978–983.

DIRECTIVA DA COMISSÃO EUROPEIA (EC) de 13 de Março de 2002 N^o26, que fixa os métodos de colheita de amostras e de análise para o controlo oficial do teor de ocratoxina A nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**. (2002)

EUROPEAN COMMISSION REGULATION (EC), of 26 January 2005 N^o 123/, amending Regulation (EC) N^o 466/2001, as regards ochratoxin A. **Official Journal of the European Union**. (2005)

EL KHOURY, A.; RIZK, T.; LTEIF, R.; AZOURI, H.; DELIA, M. L., LEBRIHI, A. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine–grapes and musts. **Food and Chemical Toxicology**, 46 (2008) 2244 – 2250.

E-VINHO, Enciclopédia do vinho. **O Brasil vitivinícola**. Disponível em: <<http://www.e-vinho.com.br/pais.php?pais=Brasil&continente=Am%E9ricas>> Acesso em: dezembro de 2009.

FAO, Food And Agriculture Organization of the United Nations. Worldwide Regulations for Mycotoxins in food and feed In 2003, **Fao Food And Nutrition**, paper 81, (2004).

FUCHS, S.; SONTAG, G.; STIDL, R.; EHRLICH, V.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, 46 (2008) 1398 – 1407.

HOCKING, A. D.; VARELIS, P. PITT, J.I.; CAMERON, S.F.; LEONG, S. L. Occurrence of ochratoxin A in Australian wine. **Australian Journal of Grape and Wine**, 9 (2003) 72 - 78.

HUNT, D. C.; MCCONNIE, B.R.; CROSBY, N.T. Confirmation of ochratoxin A by chemical derivatization and high performance liquid chromatography. **The analyst**. Vol. 105 (1980) 89 - 90.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 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. Cadastro Vinícola. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br>> Acesso em: julho de 2009.

IBRAVIN. Instituto Brasileiro do Vinho. Cadastro Vinícola. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br>> Acesso em: junho de 2010.

IBRAVIN. Instituto Brasileiro do Vinho. Regiões produtoras. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php>> Acesso em: Setembro de 2010.

JECFA (2001). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluations on certain mycotoxins in food. JECFA Food Additives Series 47, 2001. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>> Acesso em: 10 de maio de 2009.

KABAK, B. Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: Occurrence and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, 47 (2009) 348–352.

KAPETANAKOU, A. E.; PANAGOU, E. Z.; GIALITAKI M.; DROSINOS, E. H.; SKANDAMIS, P. N.; Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. **Food Control**, 20 (2009) 725–732.

KAWASHIMA, L. M.; SOARES, V. L. M. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, 26(3) (2006) 516 - 521.

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; SCOTT, E. S. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice médium, **International Journal of Food Microbiology** 110 (2006) 209–216.

LIN L.; ZHANG, J.; WANG, P.; WANG, Y.; CHEN, J.; Thin-layer chromatography of

mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. **Journal of Chromatography A**, 815 (1998) 3–20.

LOMBAERT, G. A.; PELLAERS, P.; NEUMANN, G.; KITCHEN, D.; HUZEL, V.; TRELKA, R.; KOTELLO, S.; SCOTT, P. M. Ochratoxin A in dried vine fruits on the Canadian retail market. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, No. 6 (2004), 578-585.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A. J.; CARRASCOSA, A. V.; HACCP to control microbial safety hazards during winemaking: Ochratoxin A. **Food Control**, 20 (2009) 469–475.

MATEO, R.; MEDINA, A.; MATEO, E.M.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**, 119 (2007) 79–83.

MECA, G.; BLAIOTTA, G.; RITIENI, A.; Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. **Food Control**, 21 (2010) 579–583.

MÍDIO, A. F. **Toxicologia de Alimentos**. Ed. Varela, São Paulo - Brasil, 2000. 1^o Ed, 295 p.

MONACI E PALMISANO, L.; PALMISANO, F. Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 378 (2004) 96–103.

OGA, S; CARVALHO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos da Toxicologia**. Ed. Atheneu, São Paulo - Brasil, 2008. 3^o Ed. 696 pg.

PONSONE, *et al.* Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems.

International Journal of Food Microbiology, 114 (2007) 131–135.

RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEYMANI, F.; Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 8 (2009) 202 - 251.

RATOLA N.; ABADE, E.; SIMÕES, T.; VENÂNCIO, A.; ALVES, A. Evolution of ochratoxin A content from must to wine in Port Wine microvinification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 382 (2005) 405 – 411

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y. J.; LARONDELLE, Y.; Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, 159 (2006) 18 – 46.

ROSA, C. A. R.; MAGNOLIS, C.E.; FRAGA, M. E.; DALCEROS, A. M.; SANTANA, D. M. N., Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, N°. 4 (April 2004), pp 358-364.

RUHLAND, M; ENGELHARDT, G; WALLNÖFER, PR. Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in artificially contaminated vegetables and cereals. **Mycotoxin Research**, v. 13 (1997) 54 – 60.

SANTOS, E. A.; VARGAS, E. A.; Immunoaffinity column clean-up and thin layer chromatography for determination of ochratoxin A in green coffee, **Food Additives and Contaminants**, Vol. 19, N°. 5, (2002), 447 - 458.

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

SOUFLEROS, E. H.; TRICARD, C.; BOULOUMPASI, E. C. Occurrence of ochratoxin A in Greek wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 83 (online: 2003) 173–179.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAMB, S.; PILETSKYB, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, 632 (2009) 168–180.

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

VALERO, A.; MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Survey: Ochratoxin A in European special wines. **Food Chemistry**, v. 108, (2008) 593–599.

VEGA, M.; MUÑOZ, K.; SEPÚLVEDA, C.; ARANDA, M.; CAMPOS, V.; VILLEGAS, R.; VILLARROEL, O.; Solid-phase extraction and HPLC determination of Ochratoxin A in cereals products on Chilean market. **Food Control**, 20 (2009) 631–634.

VISCONTI, A.; PERRONE, G.; COZZI, G.; SOLFRIZZO M. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. **Food Additives and Contaminants**, 25(2) (2008) 193 – 202.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup" methodology and Swiss data. **Journal of Chromatography B**, 666 (1995) 85-99.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, 13(6) (1996) 655 - 668.

WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; DOTTORI, H. A; NOLL, I. B. Determination of Ochratoxin A in Wine by High-Performance Thin-Layer Chromatography using Charged Coupled Device. **J. Braz. Chem. Soc.** Vol. 21, No. 3 (2010) 441 - 446.

WOESE, K.; Ochratoxin A in grape juice and wine. **Mycotoxin Research**, 16, (2000) Supplement 1, 132 - 135.