



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COM DETECTOR DE CARGA
ACOPLADA NA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM VINHOS NACIONAIS
E IMPORTADOS**

Laurita Pinto Monezzi

Porto Alegre
2012/1



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COM DETECTOR DE CARGA
ACOPLADA NA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM VINHOS NACIONAIS
E IMPORTADOS**

Laurita Pinto Monezzi

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito parcial
para obtenção do título de Engenheiro de
Alimentos.

Orientadora: Michele Hoeltz

Porto Alegre
2012/1

**CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COM DETECTOR DE CARGA
ACOPLADA NA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A EM VINHOS NACIONAIS
E IMPORTADOS**

Laurita Pinto Monezzi

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Michele Hoeltz

Doutora Microb. Agric. e do Ambiente

UFRGS

Isa Beatriz Noll

Doutora em Ciência de Alimentos

UNICAMP

Paulo Gustavo Celso

Mestre em Biotecnologia

UNESP

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais Paulo e Izabel, que se dedicaram à minha educação e minha felicidade, sempre me dando muito amor, incentivo e força. Não tenho palavras para agradecer o quanto fizeram e continuam fazendo por mim. Se não fosse por vocês nada disso teria se tornado realidade. Vocês são meu exemplo de dedicação e doação.

À minha irmã Paula, sempre presente e companheira, e ao meu irmão Felipe agradeço os bons momentos compartilhados.

Ao meu namorado, Vítor, pelo amor, carinho e companheirismo. Agradeço pelos momentos de alegrias e felicidade que compartilhamos. Obrigada por tudo, meu amor.

À minha orientadora, Michele, por fornecer todo o suporte necessário para a realização desta obra e pelas boas risadas compartilhadas no laboratório.

Às amigas que encontrei ao longo dos anos de faculdade, pelo carinho e pelos bons momentos juntas.

Agradeço à todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo Geral.....	13
2.2	Objetivos Específicos.....	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1	História da Vitivinicultura no Brasil e no Rio Grande do Sul.....	14
3.2	Vinho.....	15
3.3	Importâncias da vitivinicultura no Brasil e em outras regiões da América do Sul.....	16
3.4	Ocratoxina A.....	19
3.4.1	Ocratoxina A em uvas e vinhos.....	21
3.4.2	Aspectos toxicológicos da OTA.....	23
3.4.3	Legislação	24
3.4.4	Métodos de análise de Ocratoxina A.....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1	Amostragem.....	27
4.2	Extração da OTA.....	28
4.3	Análise de Ocratoxina A por Cromatografia em Camada Delgada com Detector de Carga Acoplada (CCD/DCA).....	28
4.4	Otimização do método.....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1	Testes de Recuperação.....	32
5.2	Limites de Detecção e Quantificação.....	33

5.3	Contaminação dos vinhos.....	37
6	CONCLUSÕES.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Amostras de vinhos analisados.....	27
Tabela 02: Recuperação em OTA em vinhos brancos em diferentes concentrações.....	32
Tabela 03: Recuperação de OTA em vinhos tintos em diferentes concentrações.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Regiões produtoras de vinho no Brasil.....	17
Figura 02: Mapa das principais regiões vitivinícolas no estado do Rio Grande do Sul.....	18
Figura 03: Estrutura Química da Ocratoxina A.....	20
Figura 04: (a) Vista lateral do Fotômetro com perspectiva de luz e (b) Vista superior do Fotômetro mostrando a localização das lâmpadas de luz UV.....	29
Figura 05: Imagem da placa cromatográfica obtida pela câmera DCA com concentrações crescentes de ocratoxina A sob luz UV.....	31
Figura 06: Cromatograma obtido a partir da Figura 04.....	31
Figura 07: Curva padrão de Ocratoxina A para verificação de linearidade do método, conforme medição da intensidade luminosa de cada mancha por <i>ImageJ</i>	32
Figura 08: Curva dos desvios padrão da concentração de 0,4 ng de OTA/mancha versus número de imagens.....	34
Figura 09: Curva dos desvios padrão da concentração de 1,6 ng de OTA/mancha versus número de imagens.....	35
Figura 10: Curva dos desvios padrão da concentração de 2,4 ng de OTA/mancha versus número de imagens.....	35
Figura 11: Cromatograma obtido a partir da soma de duas imagem da placa de CCD com concentrações crescentes de ocratoxina A sob luz UV.....	36
Figura 12: Cromatograma obtido a partir da soma de cinco imagens da placa de CCD com concentrações crescentes de ocratoxina A sob luz UV.....	36

RESUMO

A ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário produzido por espécies de fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Essa micotoxina tem demonstrado efeitos tóxicos em animais, dentre eles a nefrotoxicidade e é classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como possivelmente carcinogênica para humanos. Vários estudos em diferentes partes do mundo têm mostrado que os vinhos podem conter essa substância. O nível máximo de OTA permitido pela legislação Europeia e estabelecido no Brasil pela RDC nº7 de 2011 em vinhos é de 2 µg/l. A exposição à OTA através de alimentos contaminados traz problemas à saúde dos consumidores, além de acarretar grandes perdas econômicas ao setor produtivo. A presença da micotoxina em vinhos produzidos na América do Sul foi determinada através da técnica de Cromatografia em Camada Delgada com Detector de Carga Acoplada. O método se mostrou suficientemente sensível para análise da micotoxina em vinho, com recuperação de 84,48% para vinhos tintos e 93,33% para vinhos brancos. Os limites de detecção e quantificação foram 0,13 µg/l e 0,4 µg/l, respectivamente. Nenhuma das 181 amostras analisadas apresentou contaminação por OTA. Essa baixa ocorrência contribui, entre outros fatores, para a comprovada qualidade do vinho, principalmente da bebida produzida no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Palavras-Chave: ocratoxina A, vinhos tintos, vinhos brancos, cromatografia em camada delgada, detector de carga acoplada.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a secondary metabolite produced by species of filamentous fungi belonging to the genera *Penicillium* and *Aspergillus*. This mycotoxin has shown toxic effects in animals, including nephrotoxicity and it is classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a possible carcinogen for humans. Several studies in different parts of the world have shown that wines can contain this substance. The maximum level of OTA allowed by European legislation and established in Brazil by RDC 7, 2011 in wines is 2 µg/l. The OTA exposure through contaminated food can bring health problems to consumers and still result in large economic losses to the productive sector. The presence of OTA in wines produced in South America was determined using the technique of Thin Layer Chromatography with Charge Coupled Detector. The method was sufficiently sensitive for analysis of OTA in wines, with recovery of 84.48%, in red wines and 93.33% in white wines. The limits of detection and quantification were 0.13 µg/l and 0.4 µg/l, respectively. The 181 samples analyzed were not contaminated by OTA. This low occurrence contributes, among other factors, to the proven quality of the wine, especially the beverage produced in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Keywords: ohratoxin A, red wine, white wine, thin-layer chromatography, charged coupled device

1 INTRODUÇÃO

A indústria vinícola vem se desenvolvendo no Brasil e adquirindo destaque no mercado internacional. Atualmente, a região de maior produção de vinhos e produtos à base de uva no país é a região do Rio Grande do Sul, que contribui com cerca de 90% da produção de vinhos e sucos de uvas.

A qualidade dos vinhos vem sendo monitorada com o objetivo de controlar a presença de compostos que possam reduzir a produtividade e alterar a qualidade das uvas e dos vinhos, trazendo problemas à saúde dos consumidores e acarretando perdas econômicas ao setor.

Uma grande variedade de gêneros fúngicos pode contribuir para a deterioração das uvas durante os períodos de amadurecimento e pré-colheita. Um composto que merece destaque neste contexto é a ocratoxina A (OTA), uma micotoxina produzida por espécies de fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*.

A exposição à OTA através da dieta tem demonstrado efeitos nefrotóxicos, teratogênicos, genotóxicos, hepatotóxicos e imunossupressores em animais não ruminantes, observados em laboratório e efeitos nefrotóxicos em humanos. Em função destas propriedades observadas e comprovadas em animais, a ocratoxina A foi classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como pertencente ao grupo 2B, ou seja, possivelmente carcinogênica para humanos.

Existem diferentes métodos que podem ser empregados para análise desta micotoxina, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), esta última considerada uma forma simples e eficiente de análise.

Com base em estudos que evidenciam a contaminação dos vinhos, as autoridades da União Européia estabeleceram leis que regulamentam os limites máximos permitidos de OTA para diversos produtos, incluindo vinhos, sucos de uva, concentrados e néctares de uva. No Brasil, os limites para esta micotoxina, foram sugeridos através da RDC nº7 de 2011, mas ainda existem poucas pesquisas de monitoramento dedicadas aos vinhos no país.

Com base no exposto destaca-se a necessidade de mais estudos em relação à presença de ocratoxina A em vinhos, considerando a toxicidade dessa micotoxina

e também, às possíveis barreiras comerciais impostas por países importadores desses produtos. O desenvolvimento de técnicas analíticas eficientes e de baixo custo se faz importante, neste contexto, através de sua aplicação, principalmente em países em desenvolvimento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a presença de ocratoxina A em vinhos tintos e brancos provenientes de diferentes países da América do Sul.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar a técnica de extração, detecção e quantificação de ocratoxina A.
- Aprimorar o método de fotometria fotográfica aplicada à Cromatografia em Camada Delgada com Detector de Carga Acoplada (CCD/DCA) para a análise de ocratoxina A (OTA) em vinhos.
- Aplicar a técnica de CCD/DCA na determinação de ocratoxina A em vinhos tintos e brancos brasileiros, argentinos, uruguaios e chilenos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 História da Vitivinicultura no Brasil e no Rio Grande do Sul

A Vitivinicultura brasileira iniciou-se em meados do século XVI, quando as primeiras videiras teriam sido trazidas por Martin Afonso de Souza, na capitania de São Vicente. Junto dele, desembarcaram agricultores provenientes das Ilhas de Açores e Madeira e o fidalgo Brás Cubas, que plantou as primeiras vinhas, tornando-se assim, o primeiro viticultor do Brasil (CATALUÑA, 1991). Mas foi com resultados desanimadores que esta cultura se comportou diante do clima quente e úmido existente no litoral paulista. Assim, nesta época, apenas os vinhos trazidos de Portugal e França eram consumidos (IBRAVIN, 2012).

Por volta de 1551, Brás Cubas introduziu vinhedos nas cercanias de Tatuapé e, em 1789, a plantaçãõ de parreiras se propagou por diversos outros estados, intensificando-se apenas no Rio Grande do Sul (AMARANTE, 1983).

Os primeiros indícios da implantação da vitivinicultura no Rio Grande do Sul foram em 1626, na região dos chamados Sete Povos das Missões, quando o padre jesuíta Roque Gonzáles da Santa Cruz veio de Buenos Aires com o intuito de fundar a primeira missão da ordem e introduziu no solo gaúcho videiras de variedades espanholas da espécie *Vitis Vinifera*. No entanto, a experiência fracassou, pois a região das Missões foram destruídas pelos portugueses em uma disputa com os espanhóis (AMARANTE, 1983). Em 1732, com a chegada dos açorianos, videiras da variedade Moscatel foram plantadas em Porto Alegre e no litoral catarinense, mas mais uma vez o clima impediu que os resultados fossem positivos (HAASE, 2007).

Finalmente, com a chegada dos italianos vindos de Vêneto e Trentino-Alto Àdige na Serra Gaúcha, em 1875, o plantio de uvas da variedade Isabel se expandiu e deu início à produção e comercialização de vinhos. Em 1884, os colonos já elaboravam 8,49 milhões de litros de vinho (HAASE, 2007).

Entre 1908 e 1929, foram inauguradas algumas das principais vinícolas do país, tais como Mônaco, Dreher, Armando Peterlongo e Rio Grandense. Em 1911, foi instalada a Cooperativa Agrícola de Caxias e iniciou-se um movimento cooperativista e, como reflexo desta iniciativa, surgiu uma série de cooperativas

vinícolas, sendo que as duas maiores, Aurora e Garibaldi, surgiram em 1931 (AMARANTE, 1983).

Desde seu início até a década de 1960, a vitivinicultura brasileira se restringiu às regiões Sul e Sudeste do Brasil, onde o clima é classificado como temperado. A partir de então, o cultivo da uva foi levado para a região semiárida do Vale do São Francisco onde, com sucesso, marcou o início da viticultura tropical no Brasil (IBRAVIN, 2012).

3.2 Vinho

Vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. 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 podem ser classificados quanto à classe, cor e teores de açúcar. As classes dos vinhos são: de mesa, leve, espumante, licoroso e composto. O vinho de mesa é classificado como sendo o mais inferior em relação à qualidade e é elaborado a partir de variedades de uvas comuns (Concord, Herbemont, Isabel, Seyve Willard, Niágara, etc.) de espécies americanas (*Vitis labrusca*, *Vitis rupestris*, etc.). Já o vinho leve é elaborado a partir de variedades de uvas nobres (Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Pinot Noir, Merlot, Chardonnay, Riesling, Sauvignon Blanc, etc.) da espécie europeia *Vitis vinifera*. Os Vinhos de mesa e os espumantes possuem graduação alcoólica de 10 a 13% de álcool, enquanto que a graduação alcoólica dos vinhos licorosos e compostos varia de 13 a 18% (BRASIL, 1988; E-VINHO, 2012).

Os espumantes são vinhos que, após sofrerem uma segunda fermentação alcoólica, apresentam formação de anidrido carbônico e devem possuir ao menos 3 atmosferas de pressão (atm) ao final do processamento. Já os vinhos frisantes ou gaseificados são adicionados de anidrido carbônico e possuem pressão mínima entre 1,1 e 2,0 atm (BRASIL, 1988; E-VINHO, 2012).

Outras denominações são utilizadas para classificar os vinhos, tais como: Varietal e Assemblage. O primeiro é feito com um mínimo de 60% de uma mesma

variedade de uva, ou ainda 100% para ser considerado um produto de alta qualidade. O segundo é elaborado a partir de diferentes variedades de uva (BRASIL, 1988; E-VINHO, 2012).

O vinho pode ser dividido em três categorias quanto à cor: tinto, branco ou rose, e quanto às quantidades de açúcares: seco, que possui teor de açúcar menor que 5 g/L; demi-sec, com teor entre 5 e 20 g/L; e ainda suave, com mais de 20 g/L de teor de açúcar (BRASIL, 1988).

3.3 Importância da vitivinicultura no Brasil e em outras regiões da América do Sul

Em virtude da vigorosa expansão da área cultivada e da alta tecnologia utilizada na produção de uvas e processamento de vinhos, a vitivinicultura brasileira apresentou crescimento significativo nos últimos anos (GUERRA *et al.*, 2009).

Segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization) (2012), o Brasil ocupa o 14º lugar mundial em relação à produção de uvas e o 17º em relação à área cultivada. No contexto internacional, o Brasil foi o 11º colocado em quantidade de uvas exportadas, o 7º em valor das exportações de uvas e o 10º maior exportador de suco de uvas, em quantidade e em valor.

De acordo com dados estatísticos disponíveis no portal do IBGE (2011), no ano de 2011, houve um aumento de 12,97% na produção de uvas no Brasil, totalizando 1.463.481 toneladas da fruta, sendo que destas, 57% foi destinada para processamento e o restante à comercialização do produto "in natura". Os maiores aumentos da produção ocorreram no Estado de Pernambuco (24,03%) e no Rio Grande do Sul (19,76%).

Atualmente, as regiões produtoras de vinhos no Brasil são Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Roque, Sul de Minas e Vale do Submédio São Francisco (Figura 01), das quais o Rio Grande do Sul tem maior destaque na produção de uvas e de vinhos de qualidade em função de suas condições climáticas mais favoráveis para o plantio de uvas (ACADEMIA DO VINHO, 2012).

Segundo Mello (2011), o Estado do Rio Grande do Sul representou cerca de 56,7% da produção de uvas e 90% da produção de vinhos e sucos de uva do Brasil. O total em toneladas produzido pelo estado no ano de 2011 foi significativamente

maior do que a produção dos outros estados. O Rio Grande do Sul totalizou uma produção de 829.589 toneladas, enquanto o segundo lugar na produção foi Pernambuco, com 208.660 toneladas (IBGE, 2011).

A região produtora com maior destaque no Estado do Rio Grande do Sul é a Serra Gaúcha. As regiões da Serra do Sudeste e Campanha são consideradas de exploração recente, mas já mostram resultados muito promissores na produção de vinhos de alta qualidade (Figura 02) (TONIETTO *et al.*, 2009).

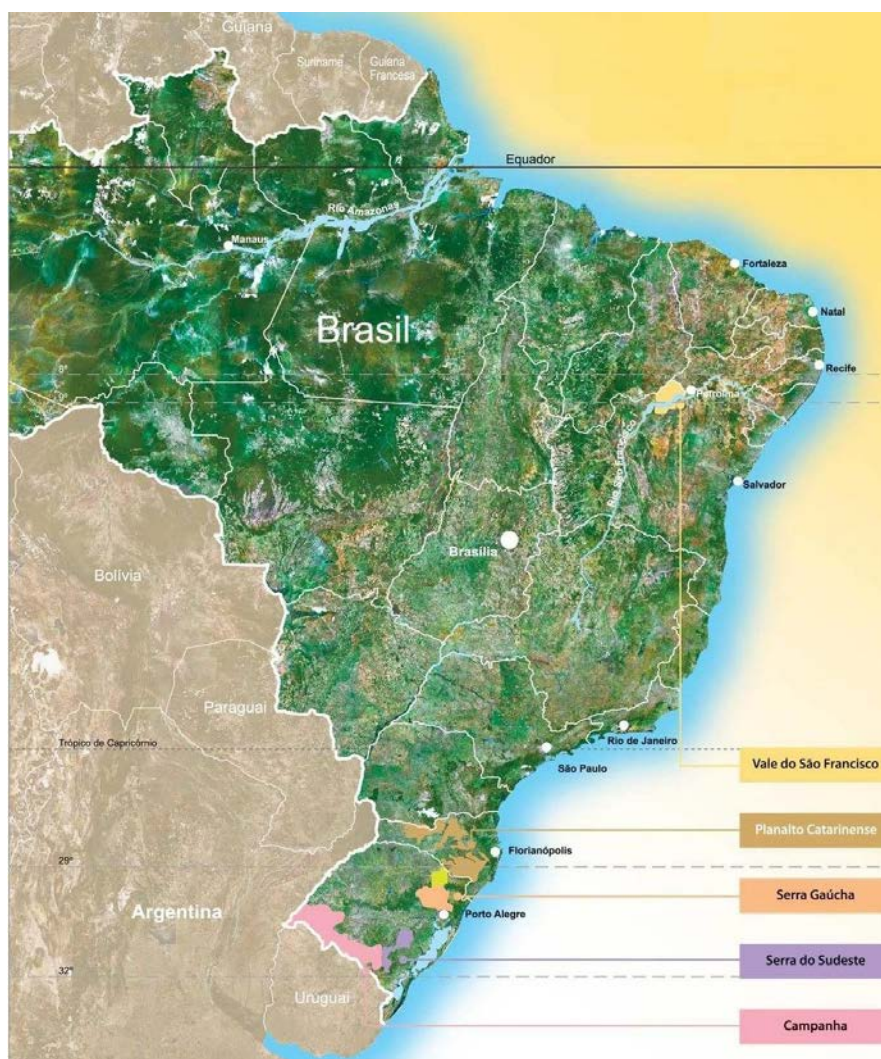


Figura 01: Regiões produtoras de vinho no Brasil.
Fonte: Academia do Vinho, 2012.

A região da Campanha Gaúcha se estende ao longo da fronteira com o Uruguai, tendo como principais referências os municípios de Bagé e Santana do Livramento. Já a região da Serra do Sudeste fica próxima ao extremo sul do Rio Grande do Sul e devido às temperaturas médias mais baixas e menor pluviosidade

que a Serra Gaúcha, apresenta boas condições para uma viticultura de qualidade (ACADEMIA DO VINHO, 2012; TONIETTO *et al.*, 2009).



Figura 02: Mapa das principais regiões vitivinícolas no estado do Rio Grande do Sul.
Fonte: Academia do Vinho, 2012.

A Serra Gaúcha está localizada no nordeste do Rio Grande do Sul e é considerada a maior região vitícola do país com aproximadamente 40 mil hectares de vinhedos. Tem predomínio de mão-de-obra familiar e propriedades pequenas e pouco mecanizadas (IBRAVIN, 2012). Englobado nesta região está o Vale dos Vinhedos, uma região detentora de alta tecnologia enológica, sobretudo no segmento de vinhos finos. O Vale dos Vinhedos é o pioneiro no Brasil a adquirir Indicação de Procedência de seus produtos, exibindo o Selo de Controle em vinhos e espumantes, o que torna evidente a evolução organizacional da região (ACADEMIA DO VINHO, 2012; TONIETTO *et al.*, 2009).

Além do Brasil, diversos países produzem vinho na América do Sul, como Chile, Argentina e Uruguai, os quais ocupam posições de destaque entre os maiores produtores mundiais da bebida.

Situada no centro da Argentina, Mendoza é a região vinícola mais importante do país, com produção de 75% do total de vinhos produzidos em todo o território. As

sub-regiões de maior destaque são Salta, onde se faz o melhor vinho da uva Torrontés (uva branca muito plantada no país), e San Juan, cujos vinhedos fornecem 18% da produção do país e faz bons vinhos com uvas Malbec e Cabernet Sauvignon. No Chile, as regiões de maior importância são Aconcágua, Vale Central (Maipo, Rapel, Curicó e Maule) e Região Sul (Bío-Bío). Caracterizada por ser a região mais quente e seca do Chile, o Aconcágua especializou-se em Cabernet Sauvignon e sua sub-região, Casablanca, considerada uma das mais frescas especializou-se em Chardonnay. No Vale Central, ao sul da cidade de Santiago, situa-se Maipo, produtora de vinhos brancos (Semillón) e tintos (Cabernet Sauvignon) aproximadamente em igualdade. Já Bío-Bío, mais ao sul e maior área do Chile, possui 66.700 acres de uvas, dos quais dois terços são tintas, destinadas ao consumo doméstico (ACADEMIA DO VINHO, 2012).

Semelhante ao Brasil, boa parte dos vinhos de mesa do Uruguai são produzidos com uvas não-viníferas, embora esta produção tenda a se inverter com a intervenção coordenada pelo INAVI – Instituto Nacional de Vitivinicultura, que pretende inserir uvas viníferas em solo uruguaio. Devido à boa situação geográfica, o cultivo de vinhas se estende por todo o território. São quatro as regiões vitícolas: Região Sul, que sozinha concentra 90% da superfície vitícola do país, Região Sudoeste (com apenas 5% dos vinhedos uruguaio), Região Norte e Centro (ACADEMIA DO VINHO, 2012).

3.4 Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário produzido por espécies de fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Penicillium* (*P. Verrucosum*), *Aspergillus ochraceus* e *Aspergilli* da seção Nigri (*Aspergillus Carbonarius*) (MATEO *et al.*, 2007, EFSA, 2006). A OTA foi isolada pela primeira vez em 1965, a partir de uma cultura de *A. ochraceus*, na África do Sul (VAN DER MERWE, 1965), e sua presença nos vinhos foi inicialmente relatada em pesquisa por Zimmerli e Dick (1996). Estas espécies ocratoxigênicas têm sido observadas em regiões de clima temperado e tropical, sendo encontradas no solo e em matérias orgânicas e contaminam as uvas durante o período de crescimento dos bagos, implicando em

uma queda de qualidade (OIV, 2005).

A ocratoxina A é um policetídeo derivado de uma dihidro-isocumarina ligado através de seu grupo 7-carboxílico à L-β-fenilalanina por uma ligação amídica. A fórmula química é $C_{20}H_{18}O_6NCl$ (KRUGER, 2006). Na figura 3 encontra-se a estrutura química da OTA ou 7-(L-β-fenilalanilcarbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocumarina (TEIXEIRA, 2010).

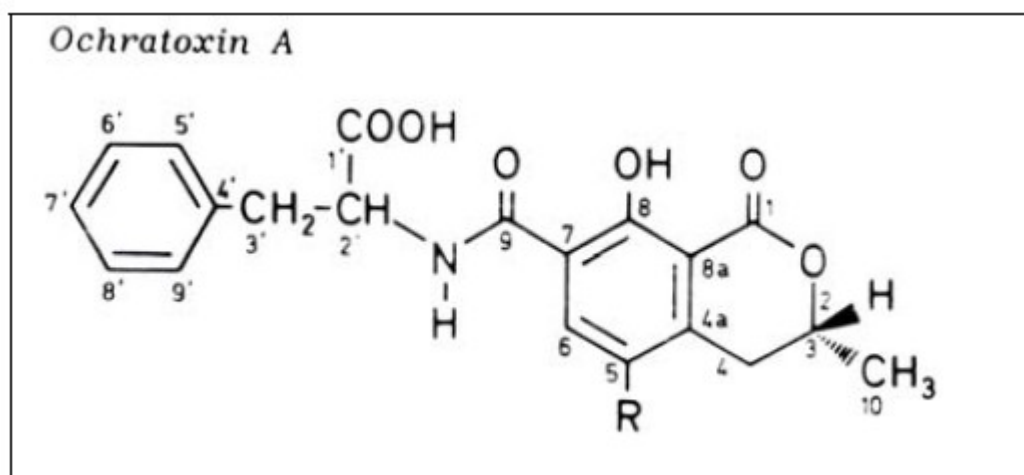


Figura 3. Estrutura química da Ocratoxina A.
Fonte: TEIXEIRA, 2010.

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 (VALENTA, 1998; SHUNDO *et al*, 2006; VALERO, 2008). A ocratoxina A é uma substância resistente à 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 (VALENTA, 1998).

Por possuir uma molécula bastante estável, a OTA pode resistir a diversos tipos de processamento e assim, permanecer em uma grande quantidade de alimentos (MURILLO-ARBIZU *et al.*, 2010).

Pesquisas têm sido conduzidas em diferentes países revelando a presença dessa micotoxina em diversos tipos de alimentos, tais como cevada (BĚLÁKOVÁ *et al.*, 2010), uvas (BATTILANI *et al.*, 2006), café (ALMEIDA *et al.*, 2007; BOZZA, 2010; LEONI *et al.*, 2001), cereais (KABAK, 2008; VEGA *et al.*, 2009), presunto suíno

(DALL'ASTA *et al.*, 2010), suco de maçã (WELKE *et al.*, 2009; AL-HAZMI, 2010), cerveja (SIMIONATO E MENEZES, 2007; MATEO *et al.*, 2007, KAWASHIMA *et al.*, 2007), vinho (SOUFLEROS *et al.*, 2003; RATOLA *et al.* 2005; BELAJOVA *et al.*, 2007; OSTRÝ *et al.*, 2007; VALERO *et al.*, 2008; VISCONTI *et al.*, 2008), entre outros.

3.4.1 Ocratoxina A em uvas e vinhos

A contaminação do vinho por OTA se dá quando as uvas destinadas ao processamento foram alvo do desenvolvimento de fungos. Assim, a matéria-prima é a responsável pela maior fonte de OTA nos vinhos e sua condição fitossanitária é muito importante para a qualidade final deles (NUNES, 2008).

O primeiro relato da presença desta micotoxina nos vinhos foi em uma pesquisa realizada por Zimmerli e Dick, em 1996, onde a maior quantidade encontrada da micotoxina foi de 0,4 µg/l em vinhos tintos provenientes do sul da Europa (ZIMMERLI E DICK, 1996; BAU *et al.*, 2005).

Valero *et al.* (2008) examinaram vinhos de diversas regiões da Europa, os quais foram submetidos a diferentes técnicas de processamento. Aproximadamente 20% dos vinhos estudados apresentaram níveis acima do limite máximo permitido na União Européia (2 µg/l).

Soufleros *et al.* (2003) realizaram a análise de vinhos brancos, rosés e tintos produzidos na Grécia. A toxina foi encontrada em 63,2% das 35 amostras analisadas, das quais apenas três (8,6%) continham níveis entre 2 e 3,2 µg/l. Vinhos com maior quantidade de açúcar apresentaram níveis de OTA mais altos do que os vinhos secos, onde os resultados variaram de <0,02 a 3,2 µg/l e vinhos tintos apresentaram maior contaminação em relação aos brancos e rosés. Labrinea *et al.* (2011) também analisaram vinhos provenientes da Grécia e encontraram resultados semelhantes, onde 69% das amostras continham OTA e apenas uma continha nível da toxina próximo ao limite máximo estipulado pela legislação.

Semelhante estudo foi conduzido na Itália por Battilani *et al.* (2002) em vinhos europeus, em que foi constatada uma maior incidência de OTA em vinhos das regiões do sul, nos quais as concentrações variaram entre 0,01 e 3,4 µg/l.

Visconti *et al.* (2008) fizeram um levantamento sobre os níveis mínimos e máximos de OTA encontrados em vinhos em todo território europeu. As contaminações variaram de um mínimo de 0,01 µg/l até um máximo de 15,6 µg/l e também verificaram que os níveis de contaminação dos vinhos provenientes do Sul da Europa (72,3%) eram maiores quando comparados com aqueles provenientes da região norte da Europa (50,3%).

Estudos mais recentes realizados por Lucchetta *et al.* (2010) mostraram que 30% das amostras analisadas continham OTA, sendo que uma das amostras, proveniente do Sul da Itália, continha uma concentração de 9,2 µg/l. Já Khoury *et al.* (2008) e Murillo-Arbizu *et al.* (2010) encontraram níveis muito inferiores ao limite máximo exigido pela legislação (2 µg/l) ao quantificarem OTA em vinhos libaneses e espanhóis, respectivamente.

Ostrý *et al.* (2007) analisaram vinhos tintos produzidos com uvas de vinhedos das regiões norte e sul da República Tcheca e encontraram ocratoxina A em 12% dos vinhos tintos provenientes da região norte e 95% dos provenientes da região sul do país. Woese (2000) conduziu um estudo na Alemanha onde analisou vinhos tintos provenientes da Bulgária, Tunísia e Itália e verificou que 100% das amostras estavam contaminadas com OTA, das quais 33% se apresentavam acima do limite máximo permitido pela legislação europeia (EC, 2006).

Anli *et al.* (2005), evidenciaram que o clima quente e úmido predominante em duas regiões produtoras de vinhos da Turquia proporcionaram maiores teores de OTA nos vinhos analisados.

A presença de OTA foi analisada por Hocking *et al.* (2003) em diferentes safras de vinhos brancos e tintos provenientes de diversas regiões da Austrália. Do total de 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 enquanto que nos vinhos brancos a toxina foi encontrada em concentrações de 0,05 a 0,5 µg/l.

Ponsone *et al.* (2010) analisaram vinhos tintos de diversas regiões produtoras da Argentina e constataram que 8,5% das amostras continham OTA e os níveis da toxina variaram entre 0,02 e 4,82 µg/l. Apenas duas amostras apresentaram teores maiores do que 2 µg/l.

Shephard *et al.* (2003) realizaram a análise de vinhos provenientes da África do Sul e Itália. Todos os vinhos sul-africanos apresentaram teores entre 0,04 e 0,39 µg/l. No entanto, vinhos tintos italianos apresentaram teores mais elevados da

toxina, variando entre 0,23 e 0,91 µg/l.

No Brasil, o primeiro trabalho apontando a ocorrência de OTA em vinhos e sucos foi conduzido por Rosa *et al.* (2004). Neste trabalho, os autores relataram a ocorrência desta micotoxina em 28,75% dos vinhos analisados, com concentrações que variaram de 0,0283 a 0,0707 µg/l. Os autores ressaltaram que, assim como nos diversos trabalhos já publicados, as maiores concentrações foram encontradas em vinhos tintos.

Em pesquisa realizada em São Paulo, por Shundo *et al.* (2006), OTA foi avaliada em vinhos brasileiros e importados de regiões da Argentina, Chile, Uruguai, França, Itália, Portugal, Espanha e África do Sul. A contaminação por OTA encontrada em vinhos brasileiros variou de concentrações entre 0,1 e 1,33 µg/l. A incidência foi de 9 amostras positivas em um total de 29. A maior concentração de OTA encontrada nos vinhos importados analisados foi de 0,32 µg/l em vinhos italianos. Avaliando a presença de OTA em 34 amostras de vinho tinto comercializados no sul do Brasil, Welke *et al.* (2010) encontraram apenas uma amostra contaminada com 4,5 µg/l. Semelhante estudo conduzido por Teixeira *et al.* (2011) em vinhos provenientes da região sul do Brasil apontou 5 amostras contaminadas por OTA em um total de 88, o que representa uma baixa incidência da toxina (5,68%). Os valores encontrados oscilaram entre 0,8 e 0,84 µg/l, sendo a maior concentração encontrada em vinho Cabernet Sauvignon.

3.4.2 Aspectos toxicológicos da OTA

A ocratoxina A possui propriedades nefrotóxicas, teratogênicas, genotóxicas, hepatotóxicas e imunossupressoras em animais não ruminantes, principalmente aves e suínos. Os sintomas mais aparentes são o de nefropatia com atrofia tubular e fibrose intersticial. (JECFA, 2001; VISCONTI, 2008). Sua nefrotoxicidade manifesta-se de diversas formas, desde a alteração do volume e cor dos rins e fígados dos animais, hemorragias, congestão, alteração da osmolaridade da urina, aumento do volume de urina, alterações na função renal, necrose do túbulo proximal, diminuição da atividade enzimática do rim e desenvolvimento de adenomas e tumores renais. (NOGUEIRA, 2006; DUARTE *et al.*, 2010).

Em 1972, esta micotoxina foi associada com a Nefropatia Endêmica dos Balcãs (BEN), uma disfunção renal degenerativa que atingiu indivíduos adultos da população rural da região dos Balcãs em meados de 1950 (IARC, 1993). Também está relacionada com a indução de formação de tumores no trato urinário de humanos. (BATTILANI, 2002; SHEPHARD, 2003; CORONEL, 2009; VARGA & KOZAKIEWICZ, 2006; PFOHL-LESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007; REDDY, 2010, MARIN-KUAN, 2011).

Em função destas propriedades observadas e comprovadas em animais, a ocratoxina A foi classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como pertencente ao grupo 2B, ou seja, possível carcinogênica para humanos (IARC, 1993; CORONEL *et. al*, 2009).

Em 2001, o JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) estabeleceu a ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) de 100 ng/kg de peso corpóreo (p.c.). O Comitê Científico Europeu de Alimentos, por sua vez, recomenda uma ingestão diária tolerável (TDI) de 5 ng/kg/p.c., ingestão esta abaixo da definida pelo JECFA (EUROPEAN COMMISSION, 1998; JECFA, 2001). Mais recentemente, o Painel de Contaminantes da Cadeia Alimentar da Agência Europeia de Segurança Alimentar (CONTAM – EFSA), a pedido do Comitê Científico Europeu de Alimentos, divulgou um parecer e definiu a Dose Semanal Tolerável (TWI) de 120 ng/kg p.c. (EFSA, 2006).

3.4.3 Legislação

Atualmente, os países da Comunidade Europeia possuem limites para micotoxinas em diversos produtos. As autoridades da União fixaram um limite de tolerância para a presença de OTA em vinhos, sucos de uva, concentrados e néctar de uvas em 2 µg/Kg e 10 µg/Kg para uvas passas e sultanas, estabelecido na EC N°123 de janeiro de 2005 (EC 123/2005) (EUROPEAN COMMISSION, 2005). Os produtos importados também devem seguir esta legislação e, caso não estejam de acordo com as normas fixadas pela União, os produtos serão bloqueados para o comércio na Europa (DUARTE *et al.*, 2010).

No Brasil, a RDC nº7 de 2011 fixou um limite similar ao estipulado na Europa:

2 µg/kg para vinhos e seus derivados, sucos e polpa de uva e 10 µg/kg para frutas secas e desidratadas (BRASIL, 2011).

Apesar da grande importância sócio-econômica, poucos são os países que possuem legislação que aborde os limites de tolerância para ocratoxina A em alimentos. O ideal seria que cada país tivesse uma legislação pertinente, com limites seguros de ingestão desta micotoxina. Sendo assim, os produtos a serem exportados devem adequar-se às legislações dos países de destino, a fim de que o produto obtenha a liberação para entrada e venda (DUARTE *et al.*, 2010; KRUGER, 2006; FAO, 2012).

3.4.4 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 em alimentos (SOUFLEROS *et al.*, 2003; RATOLA *et al.* 2005; BELAJOVA *et al.*, 2007; OSTRÝ *et al.*, 2007; VALERO *et al.*, 2008; VISCONTI *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2010). Existem diferentes métodos que podem ser empregados para análise da ocratoxina A como a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), entre outros (VALENTA *et al.*, 1998; FURLANI *et al.*, 1999; MARKAKI *et al.*, 2001; TURNER *et al.*, 2009; JORNET *et al.*, 2000; RAHMANI *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2010).

Estes métodos são amplamente adaptados e aprimorados à medida que novos estudos vão sendo feitos. O método mais utilizado atualmente para determinação de OTA em alimentos, sangue humano e tecidos animais é a CLAE (VALENTA, 1998). 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 investimento inicial e custo de manutenção, além de exigir pessoal experiente para operar e manter o equipamento (VALENTA, 1998; CIGIĆ *et al.*, 2009; HOELTZ *et al.*, 2010).

A CCD vem a ser um dos métodos mais simples e baratos, em um sistema de fácil comparação de padrões e manchas dentro do espectro UV, além de ser de baixo custo. (VALENTA, 1998; CIGIĆ *et al.*, 2009; WELKE *et al.*, 2009; HOELTZ *et*

al., 2010). Conforme citado por Turner *et al.* (2009), a CCD já demonstrou precisão similar ao CLAE em análises para alimentos contaminados por OTA.

O principal problema no método de CCD é a quantificação, que normalmente é feita por comparação visual. No entanto, outras técnicas podem ser empregadas para melhorar o desempenho analítico do método, como por exemplo, a densitometria (HOELTZ *et al.*, 2010).

Dispositivos de carga acoplada (DCA) são detectores bidimensionais contendo uma matriz de sensores que captam a imagem de uma área em frações de segundo ou em tempo real. A saída de cada pixel do sensor no CCD é uma tensão, que é proporcional à intensidade da luz que incide sobre o sensor e o tempo de exposição. Estas séries de tensões são digitalizadas e transferidas para um computador para processamento e armazenamento dos dados. Estes dispositivos, ao serem acoplados a CCD proporcionam uma ferramenta precisa para quantificação de micotoxinas (LANCASTER *et al.*, 2006; WELKE *et al.*, 2009; HOELTZ *et al.*, 2010).

ImageJ é uma das ferramentas de processamento de imagem disponíveis para a análise de imagens geradas pela câmara CCD. É um software versátil, que oferece uma grande variedade de funcionalidades que podem ser personalizados para atender necessidades específicas (HOELTZ *et al.*, 2010).

Com o intuito de aprimorar o método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), diversos autores têm analisado diferentes tipos de alimentos utilizando detector de carga acoplada (DCA) junto à CCD, tendo como exemplo a quantificação de patulina em suco de maçã (WELKE *et al.*, 2009), ocratoxina A em vinhos (WELKE *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2010) e aflatoxina B₁ em amendoins (HOELTZ *et al.*, 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Amostras de vinhos tintos e brancos (Tabela 01) de diferentes regiões do mundo foram gentilmente cedidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário do RS (LANAGRO-RS) do Ministério da Agricultura, totalizando 19 vinhos brasileiros e 24 vinhos importados. Além dessas amostras, foram analisados 107 vinhos tintos produzidos e comercializados no estado do Rio Grande do Sul, da safra de 2010, cedidos pela Associação Brasileira de Enologia. Os vinhos estavam depositados na Embrapa Uva e Vinho, tendo sido degustados na XVIII Avaliação Nacional de Vinhos. Outras 34 amostras de vinhos adquiridas no comércio local foram igualmente analisadas. Todas as amostras foram armazenadas sob refrigeração, à temperatura de 4°C.

Tabela 01: Amostras de vinhos analisados

Vinho	País de Origem	Estado	Tinto	Branco
LANAGRO-RS	Brasil	RS	5	5
		PR	2	0
		SC	2	2
	Argentina		11	10
	Chile		1	1
	Uruguai		1	0
ABE	Brasil	RS	88	-
		SC	9	-
		MG	3	-
		BA	3	-
		PE	2	-
		SP	2	-
Comércio local	Brasil		15	6
	Chile		6	4
	Uruguai		3	0
Total			153	28

4.2 Extração da OTA

A OTA foi extraída segundo o método empregado por Visconti (VISCONTI *et al.*, 1999). Uma porção de 10 ml de vinho foi acrescida de 10 ml de solução de diluição (1% PEG e 5% NaHCO₃). Desta solução, 10 ml foram passados em uma coluna de imunoafinidade Ochratest TM (VICAM) específica para Ocratoxina A. A coluna foi lavada com 5 ml de solução de lavagem (2,5% NaCl e 0,5% NaHCO₃) seguidos de 5 ml de água destilada. Após a secagem da coluna com corrente de ar, a OTA foi então extraída da coluna com 2 ml da solução metanol:ácido acético (98:2, v/v). O extrato foi levado à secura em gás nitrogênio e posteriormente dissolvido em 100 µl da solução tolueno:ácido acético (99:1, v/v) para aplicação em CCD.

4.3 Análise de Ocratoxina A por Cromatografia em Camada Delgada com Detector de Carga Acoplada (CCD/DCA)

Os extratos reconstituídos das amostras foram agitados em vortex e aplicados em placas para cromatografia em camada delgada de alta performance, juntamente com o padrão de OTA para fins de comparação. Os pontos foram aplicados a 1 cm da base da placa de vidro com sílica gel de 10x10 cm (Macherey-Nagel Pre-coated TLC-plates Sil G-25 HR) e 1 cm das laterais, possibilitando a marcação de 9 pontos afastados 1 cm entre si. Para maior exatidão na aplicação das amostras foram utilizadas seringas de 5, 10 e 50 µl conforme a necessidade dos procedimentos. As amostras foram analisadas em duplicata.

As placas foram eluídas em tolueno, clorofórmio e acetato de etila (60:30:10, v/v/v). Após eluição dos solventes, a placa foi retirada e seca, e as manchas características da micotoxina foram observadas sob luz UV, em um fotômetro de fluorescência (Figura 04) 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. O fotômetro possui distância (L) de 30 cm entre a placa cromatográfica e a câmera CCD. Através deste sistema, a placa foi fotografada com câmera Sony Cybershot (modelo DSC H5) em

módulo Manual, com valor de abertura do diafragma (F) de 2.8, valor de exposição (EV) de +2.0 e velocidade do obturador (NR) de 30 segundos. As imagens foram analisadas através do programa ImageJ e os dados obtidos calculados com auxílio do Microsoft Excel.

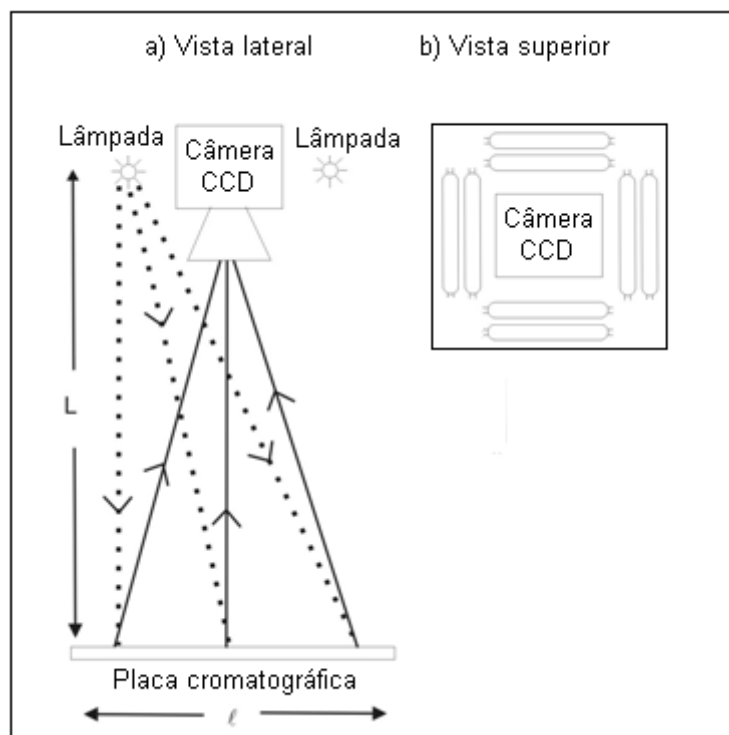


Figura 04. (a) Vista lateral do Fotômetro com perspectiva de luz e (b) Vista superior do Fotômetro mostrando a localização das lâmpadas de luz UV.

Fonte: Adaptado de Hoeltz et al., 2010.

Amostras que apresentaram, na triagem, manchas fluorescentes na mesma altura das manchas do padrão foram novamente analisadas para a confirmação da identidade do composto. O método de confirmação utilizado foi proposto por Hunt et al. (1980).

4.4 Otimização do método

Para a otimização da análise de OTA por Cromatografia em Camada Delgada com Detector de Carga Acoplada (CCD/DCA), testes de recuperação foram feitos

para vinhos tintos e brancos. Vinhos que inicialmente não continham a toxina foram contaminados com solução padrão de 0,4 µg/ml em concentrações de 2, 4 e 8 µg/l para vinhos tintos e 2, 5 e 10 µg/l para vinhos brancos, em triplicata para cada uma das concentrações. A solução padrão de trabalho foi obtida a partir da dissolução da solução padrão estoque de 4 µg/ml em tolueno:ácido-acético (99:1, v/v), sendo a concentração determinada por medição da absorbância UV a 333 nm e calculada segundo AOAC (2002) em 136% de OTA. As amostras foram então submetidas ao processo de extração conforme citado anteriormente. Os extratos foram aplicados em diferentes concentrações nas placas cromatográficas que foram eluídas em tolueno, clorofórmio e acetato de etila (60:30:10, v/v/v).

Para verificação do coeficiente de correlação (r^2) e verificação da linearidade do método empregado, curvas padrão foram feitas com 6 pontos contendo concentrações de 0,4, 0,8, 1,6, 2,0, 3,2 e 4,0 µg/l. 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 nas amostras, com o auxílio da curva padrão.

Como forma de otimização do método de quantificação da ocratoxina A e, conseqüentemente, diminuição dos erros intrínsecos da análise, diversas imagens foram tiradas de uma mesma placa cromatográfica, na mesma posição e posteriormente somadas, através da função *Image calculator > Add* do programa *ImageJ*. As imagens foram somadas aleatoriamente em diferentes grupos e números de imagens e correspondem a diferentes tempos de exposição ao DCA (1'00, 1'30", 2'00 e 2'5").

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da imagem da placa cromatográfica (Figura 05) foi possível, através do programa *ImageJ*, gerar um cromatograma das manchas fluorescentes correspondentes a diferentes concentrações de OTA como mostra a figura 05. O detector de carga acoplada foi suficientemente sensível para detectar pequenas variações na intensidade de fluorescência das manchas de OTA sob luz UV com iluminação homogênea na placa cromatográfica.

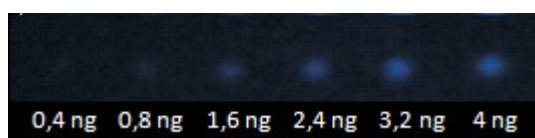


Figura 05: Imagem da placa cromatográfica obtida pela câmera DCA com concentrações crescentes de ocratoxina A sob luz UV.

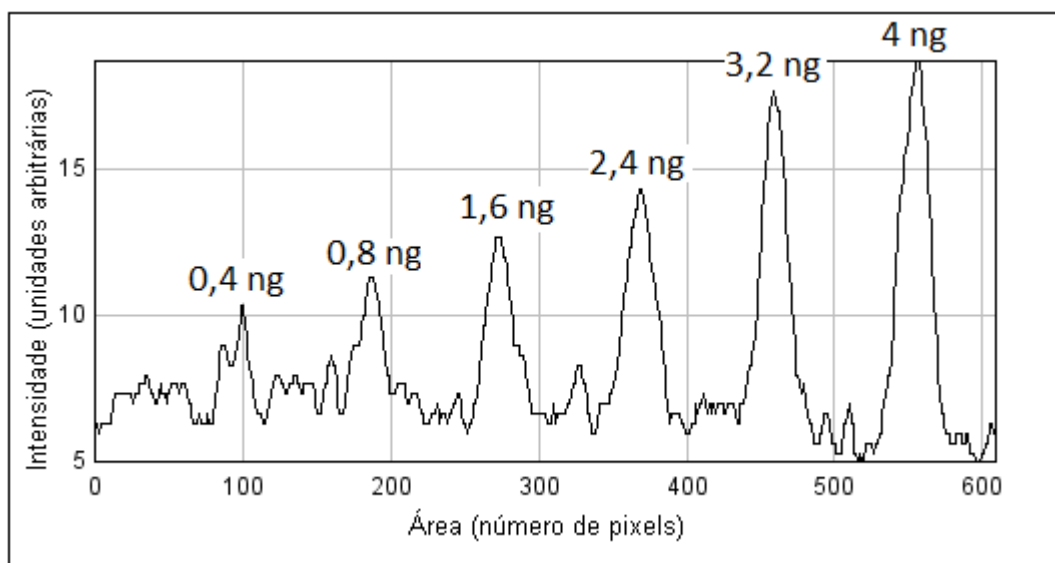


Figura 06: Cromatograma obtido a partir do número de pixels representando as áreas referentes às diferentes concentrações de ocratoxina A sob luz UV.

O método apresentou boa linearidade que foi determinada pela análise de curvas padrão com as concentrações de 0,4, 0,8, 1,6, 2,4, 3,2 e 4 ng por mancha (Figura 07), apresentando um coeficiente de regressão linear da curva ($y = 889,3x + 164,1$) de 0,999.

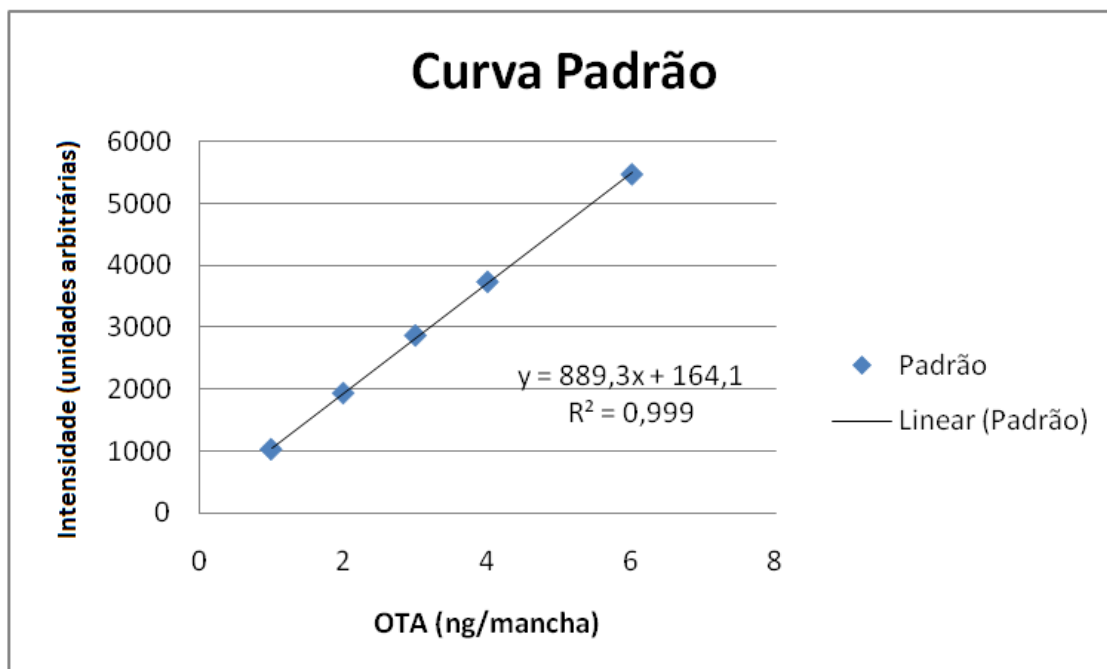


Figura 07: Curva padrão de Ocratoxina A para verificação de linearidade do método, conforme medição da intensidade luminosa de cada mancha por *ImageJ*.

5.1 Testes de Recuperação

As médias das recuperações do método para vinhos brancos e tintos calculadas a partir das triplicatas de três concentrações diferentes foi de 84,48 e 93,33%, conforme representado nas tabelas 02 e 03, respectivamente.

Tabela 02: Recuperação de OTA em vinhos brancos em diferentes concentrações.

	2 µg/l (%)	5 µg/l (%)	10 µg/l (%)	Médias finais da Recuperação (%)
Média	80,13	84,96	88,36	84,48
Desvio padrão	8,91	2,21	1,14	4,08

Tabela 03: Recuperação de OTA em vinhos tintos em diferentes concentrações.

	2 µg/l (%)	4 µg/l (%)	8 µg/l (%)	Médias finais da Recuperação (%)
Média	90	94	96	93,33
Desvio padrão	8,03	1,07	4,31	4,47

Os resultados de recuperação foram semelhantes aos do método usado para determinar ocratoxina A em vinhos desenvolvido por Visconti *et al.* (1999), cujas recuperações médias variaram de 88 a 103% a partir de amostras contaminadas com níveis de 0,04 a 10 µg/l. Já Teixeira (2010) encontrou médias de recuperação de 82,33% também utilizando colunas de imunoafinidade como alternativa para a limpeza das amostras.

Shundo *et al.* (2006) extraíram OTA de amostras de vinho utilizando colunas de imunoafinidade e determinação por CLAE, obtendo médias de recuperação de 94,1; 82,5; 86,1% para níveis de 0,03; 2,0; 5,0 µg/l.

Todas as recuperações executadas obtiveram uma boa repetibilidade, que foi expressa como desvio padrão (4,47% e 4,08% para vinhos tintos e brancos, respectivamente). Estes limites de desvio padrão foram menores do que 20%, valor adotado como limite na diretiva EC 26/2002 e sugerido na Consulta pública nº 100 pela ANVISA para concentrações de OTA recuperadas entre 1-10 µg/l, calculados pela equação de Horwitz.

Os resultados de recuperação do presente trabalho confirmam a eficácia e precisão do método de Cromatografia de Camada Delgada com Detector de Carga Acoplada (CCD-DCA).

5.2 Limites de Detecção e Quantificação

A soma de imagens fotográficas possibilitou maior intensidade da luminosidade das manchas características da toxina diminuindo o erro e contribuindo para o melhor ajuste dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).

Abaixo, encontram-se os desvios padrão, plotados em gráficos (Figuras 08, 09 e 10), obtidos de diferentes concentrações do padrão de OTA aplicadas em placa de CCD, a partir da soma de imagens. Observou-se que, através do aumento do número de imagens fotométricas somadas para quantificar OTA houve um decréscimo dos desvios padrão em diferentes concentrações. Na concentração de 0,4 ng de OTA/ mancha, por exemplo, o desvio padrão obtido a partir da soma de apenas duas imagens foi de aproximadamente 70%. Em contrapartida, este desvio reduziu em cerca de 89% quando obtido através da soma do dobro de imagens.

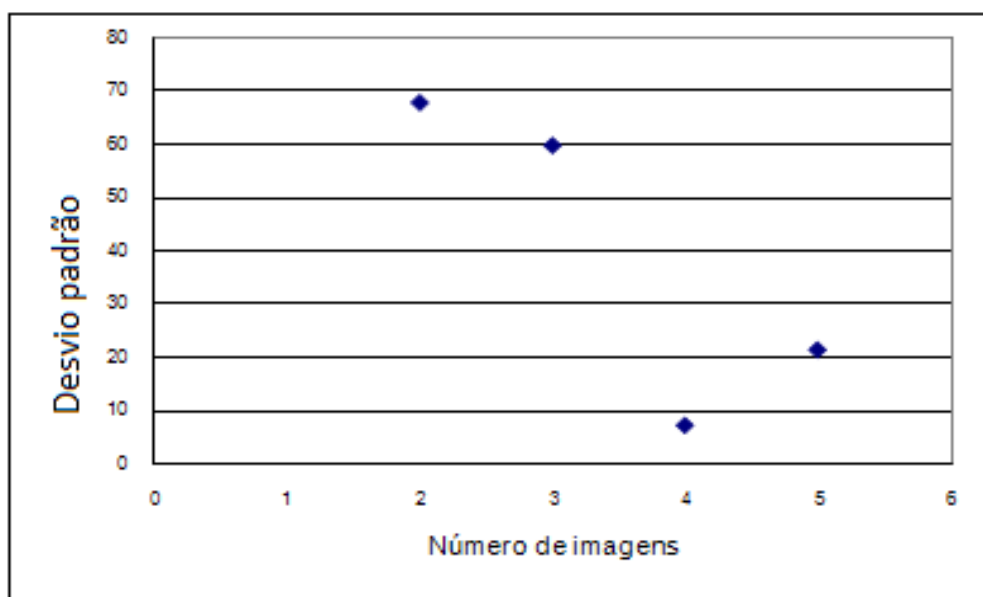


Figura 08: Curva dos desvios padrão da concentração de 0,4 ng de OTA/mancha versus número de imagens.

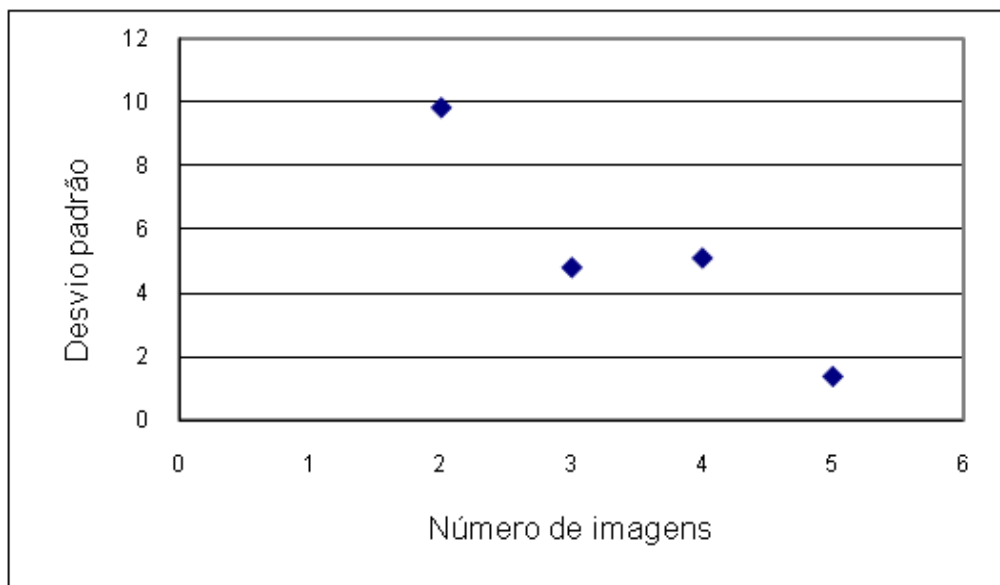


Figura 09: Curva dos desvios padrão da concentração de 1,6 ng de OTA/mancha versus número de imagens.

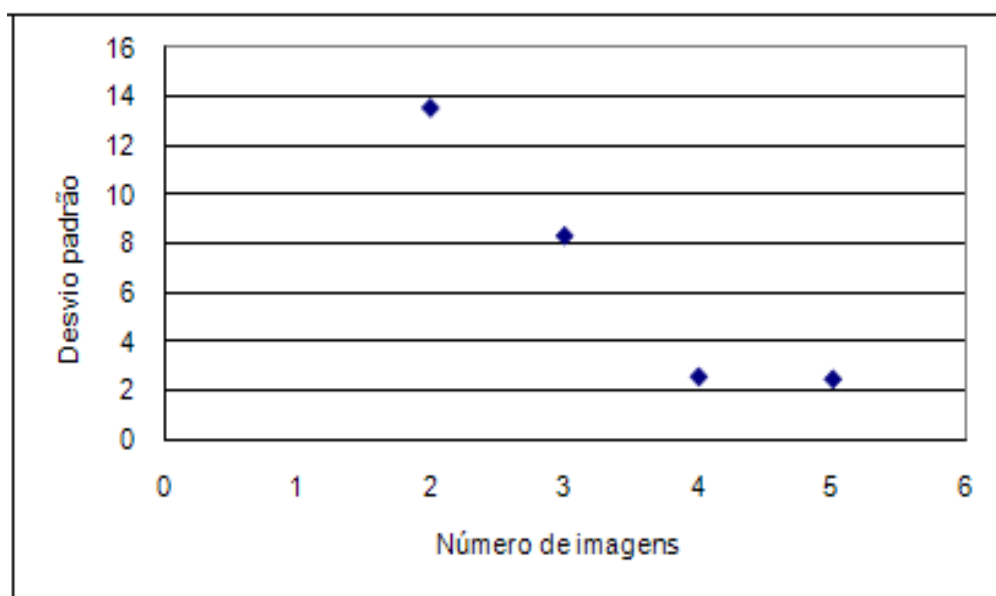


Figura 10: Curva dos desvios padrão da concentração de 2,4 ng de OTA/mancha versus número de imagens.

Levando em consideração que os desvios padrão diminuiriam com o aumento do número de imagens fotométricas, o mesmo procedimento foi executado em placas de CDD contendo concentrações crescentes de uma amostra contaminada com solução padrão, a fim de diminuir os limites de detecção e quantificação.

Pode-se observar nas imagens de cromatogramas mostradas a seguir (Figuras 11 e 12) que os picos referentes às manchas contendo concentrações na

ordem de nanogramas de OTA (0,4; 0,6; 0,8 e 1 ng OTA/ mancha), se tornaram muito mais visíveis e nítidos quando a quantidade de imagens fotométricas somadas aumentou, ou seja, melhor e mais possível foi a detecção e quantificação da micotoxina.

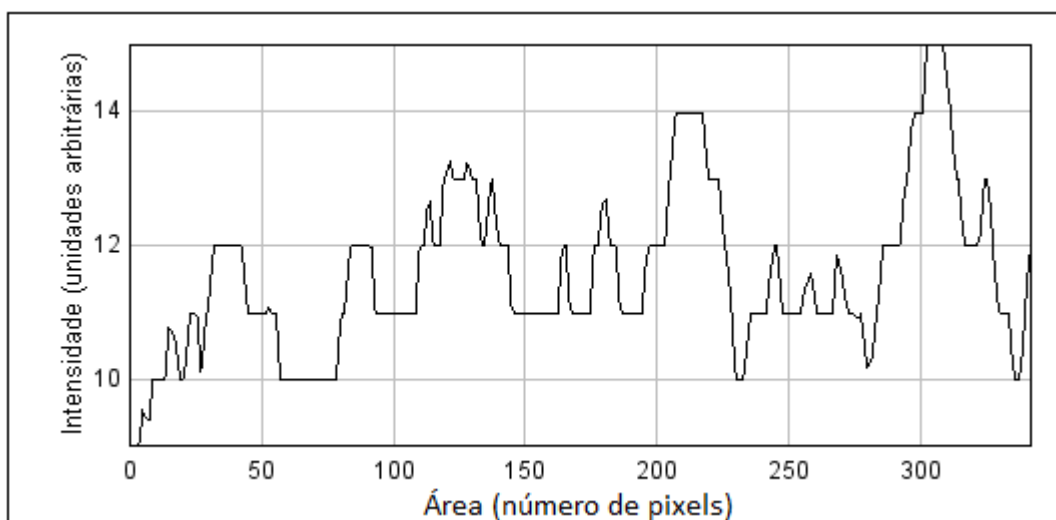


Figura 11: Cromatograma obtido a partir da soma de duas imagens da placa de CCD com concentrações crescentes de ocratoxina A sob luz UV.

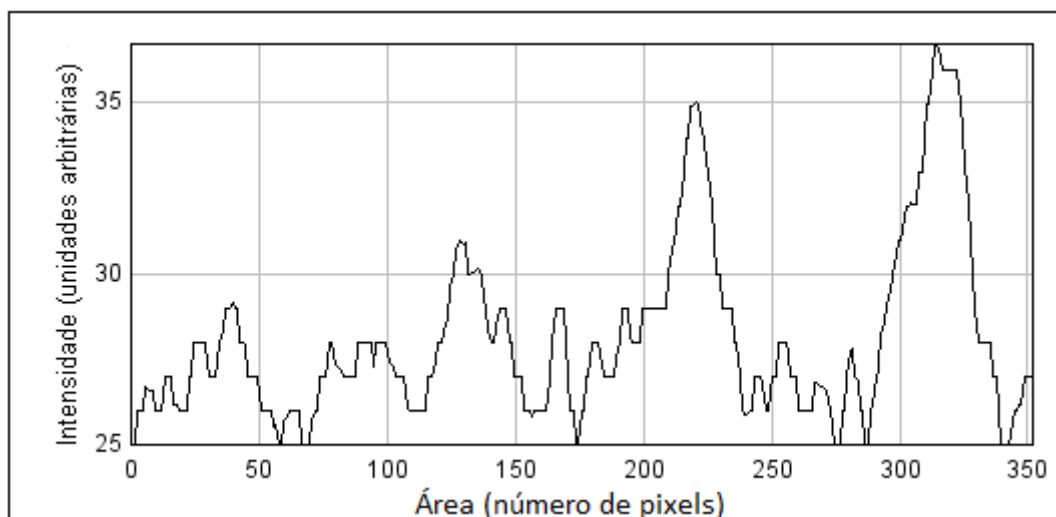


Figura 12: Cromatograma obtido a partir da soma de cinco imagens da placa de CCD com concentrações crescentes de ocratoxina A sob luz UV.

O limite de detecção foi diminuído em 85% e o limite de quantificação em 50% através da soma de imagens exposta acima. Os valores de LD e LQ encontrados foram de 0,13 $\mu\text{g/l}$ e 0,4 $\mu\text{g/l}$, respectivamente.

Soufleros *et al.* (2003) trabalharam com limite de detecção de 0,02 µg/l, ao analisar vinhos gregos com CLAE. O mesmo método foi utilizado por SHUNDO *et al.* (2006), que estabeleceu limites de detecção e quantificação de 0,01 µg/l e 0,03 µg/l, respectivamente.

5.3 Contaminação dos vinhos

Das 153 amostras de vinhos tintos e 28 amostras de vinhos brancos brasileiros, argentinos, uruguaios e chilenos analisados, a OTA não foi detectada (<LD) em nenhuma delas. Durante a última década, a ocorrência de OTA em vinhos provenientes de vários países tem sido reportada e a baixa ocorrência de OTA nas amostras analisadas está de acordo com outros estudos realizados em vinhos nacionais e importados (HOCKING *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2010; WELKE *et al.* 2010). Ressalta-se essa baixa ocorrência de OTA como um ponto positivo principalmente para o setor vitivinícola do Rio Grande do Sul e para a saúde do consumidor.

No Brasil, Welke *et al.* (2010) encontraram apenas uma amostra contaminada em 34 vinhos tintos analisados. Já Teixeira *et al.* (2010) relataram a presença de OTA em 5,7% das amostras de vinhos produzidas na região sul do Brasil. Por outro lado, Rosa *et al.* (2004) detectaram OTA em 28,75% das 80 amostras de vinhos europeus e de países da América Latina comercializados no mercado da cidade do Rio de Janeiro. Os níveis de OTA encontrados variaram de 0,0283 a 0,0707 µg/l, com uma média de 0,037 mg/l.

Shundo *et al.* (2006) encontraram contaminação por OTA em nove dos 29 vinhos tintos brasileiros, com níveis variando de 0,10 a 1,33 µg/l e em dezoito dos 34 vinhos tintos importados, com níveis variando de 0,03 a 0,32 µg/l.

A baixa incidência de OTA nos vinhos pode estar relacionada à baixa presença de fungos ocratoxigênicos nas uvas ou às condições climáticas desfavoráveis para o desenvolvimento destes durante o período quando os vinhos foram produzidos (PIETRI *et al.*, 2001).

O primeiro relato do uso de CCD-CDA para quantificar OTA foi de Welke *et al.* (2010) seguido por Teixeira *et al.* (2010). Este sistema também foi utilizado para

quantificar patulina em suco de maçã (WELKE *et al.*, 2009) e aflatoxina em amendoins (HOELTZ *et al.*, 2010). O método CCD-DCA é útil, principalmente em países em desenvolvimento, onde os produtores e analistas necessitam de métodos rápidos, simples e eficientes de análise. Além da vantagem de utilizar quantidade mínima de solvente, o método possui baixo custo de re'alização das análises, considerando que a utilização de uma única placa de CCD permite a identificação e a quantificação da micotoxina em diferentes amostras com boa precisão. Cabe ressaltar que a análise comumente empregada na CCD é de comparação visual entre diferentes concentrações da amostra e do padrão, o que acarreta erros significativos e dificuldade de uma quantificação precisa. Com o DCA, como ferramenta na determinação de micotoxinas, esse problema foi resolvido.

6 CONCLUSÕES

O uso da Cromatografia em Camada Delgada com Detector de Carga Acoplada para determinar ocratoxina A em vinhos foi bem sucedido mostrando ser suficientemente sensível para ser usado na determinação de OTA em vinhos.

O método se mostrou capaz de quantificar a micotoxina nos vinhos analisados abaixo do limite estabelecido pela União Européia e RDC nº 7 de 2011, com auxílio do programa *ImageJ*, através de imagens fotográficas obtidas a partir de placas de CCD, incluindo a construção de curvas de calibração padrão para o equacionamento e cálculo das concentrações de OTA.

Este estudo demonstrou a aplicabilidade do método CCD-DCA como uma ferramenta rápida e eficiente para determinar OTA. O sistema fotométrico aprimorado forneceu sensibilidade, precisão e linearidade para a determinação quantitativa da micotoxina.

Pesquisas sobre a ocorrência de OTA em vinhos produzidos e/ou comercializados no Brasil devem continuar sendo conduzidas, uma vez que o consumo de vinho no país é significativo e que a presença de OTA está relacionada com a qualidade microbiológica das uvas que pode variar entre as safras. Além disso, estudos em torno do equipamento fotômetro de fluorescência aliados ao método de cromatografia em camada delgada podem levar a resultados mais precisos e concentrações mais baixas na determinação da micotoxina.

REFERÊNCIAS

- ACADEMIA DO VINHO. **Regiões Vinícolas**. Disponível em <http://www.academiadovinho.com.br/regiao_mostra.php?reg_num=BR>. Acesso em: 17 Mar. 2012.
- AL-HAZMI, N. A. Determination of Patulin and Ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 17, p. 353-359, 2010.
- ALMEIDA, A.P. et al. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 300-303, 2007.
- AMARANTE, José Osvaldo Albano do. **Vinhos do Brasil e do mundo para conhecer e beber**: 6ed. São Paulo: Editora Summus, 1983, 44-48 p.
- ANLI, E. et al. Ochratoxin A in Turkish Wines. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, p. 611–623, 2005.
- AOAC. Official methods on analysis of AOAC international. **Official Method 973.37. Thin-Layer Chromatographic Method, IUPAC-AOAC Method**. 2002.
- BATTILANI, P.; PIETRI, A. Ochratoxin A in grapes and wine. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 639–643, 2002.
- BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 2–4, 2006.
- 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, p. 125 – 130, 2005.
- BELAJOVA, E.; RAUOVA, D. Determination of ochratoxin A and its occurrence in wines of Slovakian retail. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 46, n. 2, p. 68-74, 2007.
- BĚLÁKOVÁ S. et al. Determination of ochratoxin A in brewing materials and beer by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 321–325, 2010.
- BOZZA, A. **Detecção e quantificação de ocratoxina A produzida por espécies de *Aspergillus* isoladas de grãos de café**. 2010. 144f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **RESOLUÇÃO - RDC Nº 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011**, dispõe sobre limites máximos tolerados

(LMT) para micotoxinas em alimentos. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d91966804745973d9f9bdf3fbc4c6735/RDC_07_2011.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 28 Abr. 2012.

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: 25 Mar. 2012.

CATALUÑA, Ernesto. **As uvas e os Vinhos**: 3ed. São Paulo: Editora Globo, 1991, 20-21 p.

CIGIĆ, I. K., PROSEN, H. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 62-115, 2009.

CORONEL, M.B. et al.. Assessment of the exposure to ochratoxin A in the province of Lleida, Spain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2847 – 2852, 2009.

DALL'ASTA, C. et al. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. **Food Chemistry**, v. 120, p.978–983, 2010.

DIRECTIVA DA COMISSÃO EUROPEIA (EC), Nº26 de 13 de Março de 2002, que fixa os métodos de colheita de amostras e de análise para o controle oficial do teor de ocratoxina A nos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**, 2002.

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

EFSA (European Food Safety Authority). **Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the Commission related to ochratoxin A in food.** Question Nº EFSA-Q-2005-154. 2006. The EFSA Journal 365. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/science/contam/contam_opinions/1521.html>.

ENCICLOPÉDIA DO VINHO. **Regiões produtoras de Vinho.** Disponível em: <<http://www.e-vinho.com.br/pais.php?pais=Brasil&continente=Am%E9ricas>>. Acesso em: 25 Mar. 2012.

EUROPEAN COMMISSION. Scientific Committee for Food. **Opinion on Ochratoxin A, CS/CNTM/MYC/14**, Brussels. 18 September, 1998.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC), Nº 123/2005 of 26 January 2005. Amending Regulation (EC) Nº 466/2001, as regards ochratoxin A. **Official Journal of the European Union**, 2005.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 364, p. 5–24, 2006.

FAO; WHO. CODEX ALIMENTARIUS: **Food and Agricultural Organization & World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/>>. Acesso em: 28 Abr. 2012.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). Disponível em: <<https://www.fao.org.br/publicacoes.asp>>. Acesso em: 08 Abr 2012.

FURLANI, R. P. Z.; SOARES, L. M. V.. Revisão: Ocratoxina A em café. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2(1,2), p. 1-6, 1999.

GUERRA, C.C. et al. Embrapa uva e vinho: Documento nº 48. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Bento Gonçalves, 2009. v. 48, Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc048.pdf>>. Acesso em: 24 Mar. 2012.

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.

HAASE, Pedro Filho. **Novo guia do vinho gaúcho**: Porto Alegre: RBS Publicações 2007, 16 -18 p.

HOCKING, A.D. et al. Occurrence of ochratoxin A in Australian wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 9, n. 1, p 72-78, 2003.

HOELTZ M., WELKE, J. E., NOLL, I.B. Photometric procedure for quantitative analysis of aflatoxin B1 in peanuts by thin-layer chromatography using charge coupled device detector. **Química Nova**. v. 33, n 1, p. 43-47, 2010.

HUNT, D.C.; MCCONNIE, B.R.; CROSBY, N.T.. Confirmation of ochratoxin A by chemical derivatization and high performance liquid chromatography. **Analyst**, v. 105, p. 89–90, 1980.

IBRAVIN, 2012. **Histórico: A Vitivinicultura Brasileira**. Bento Gonçalves, 2012. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/brasilvitivinicola.php>>. Acesso em: 17 mar 2012.

_____, 2012. **Regiões Produtoras: Principais Regiões Produtoras**. Bento Gonçalves, 2012. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php>>. Acesso em: 17 mar 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE). **Produção de Uvas no Brasil**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_20120.pdf>. Acesso em: 08 Abr. 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION OF VINE AND WINE (OIV). **Code of Sound Vitivinicultural Practices in Order to Minimise Levels of Ochratoxin A in Vine-Based Products**. 2005. Disponível em: <<http://www.oiv.int/oiv/info/enguidesoiv>>. Acesso em: 09 Abr. 2012.

JECFA. 2001. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; 56th Meeting, Geneva, 6–15 February 2001.

JORNET, D.; BUSTO, O.; GUASCH, J.. Solid-phase extraction applied to the determination of ochratoxin A in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 29–35, 2000.

KABAK, B. Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: Occurrence and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 348–352, 2008.

KAWASHIMA, L. M.; VIEIRA, A. P.; VALENTE SOARES, L. M. Fumonisin B₁ and ochratoxin A in beers made in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 317-323, abr.-jun. 2007.

KHOURY, A. et al. Fungal contamination and Aflatoxin B₁ and Ochratoxin A in Lebanese wine–grapes and musts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2244–2250, 2008.

KRÜGER, C.D. **Ocratoxina A em suínos abatidos no Estado do Rio de Janeiro sob Inspeção Sanitária. I. Determinação de níveis séricos por Cromatografia Líquida. II. Correlação com as lesões renais e hepáticas**. 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Higiene veterinária e processamento tecnológico de produtos de origem animal) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

LABRINEA, E. P. et al. A survey of ochratoxin A occurrence in Greek wines. **Food Additives and Contaminants**, v. 4, n. 1, p. 61–66, 2011.

LANCASTER M, et al. Real-time image acquisition for absorbance detection and quantification in thin-layer chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 78, p 905–11, 2006.

LEONI, L. A. B. et al. Ochratoxin A in Brazilian Green Coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 105-107, 2001.

LUCCHETA, G. et al. Occurrence of Black Aspergilli and Ochratoxin A on Grapes in Italy. **Toxins**, v. 2, p. 840-855, 2010.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food: Detection and Control**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004. 488p.

MARIN-KUAN, M. et al. Evidence for a Role of Oxidative Stress in the Carcinogenicity of Ochratoxin A. **Journal of Toxicology**, p. 1-15, 2011.

MARKAKI, P. et al. Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 533–537, 2001.

MATEO, R. et al. An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 79–83, 2007.

MELETIS, K.; MEIMAROGLOU, S.M.; MARKAKI, P. Determination of ochratoxin A in grapes of Greek origin by immunoaffinity and high-performance liquid chromatography. **Food Additives and Contaminants**, v 24, n. 11, 2007.

MELLO, L. M. R. Comunicado Técnico 115. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2011. Embrapa Uva e Vinho**. Bento Gonçalves, 2012. Disponível em: <<http://www.cnpqv.embrapa.br/publica/comunicado/cot115.pdf>>. Acesso em: 08 Abr. 2012.

MURILLO-ARBIZU, M. T. Occurrence of Ochratoxin A in Southern Spanish Generous Wines under the Denomination of Origin “Jerez-Xérès-Sherry and “Manzanilla” Sanlúcar de Barrameda”. **Toxins**, v. 2, p. 1054-1064, 2010.

NOGUEIRA, S.; M. B. P. P., OLIVEIRA. Prevalência de Ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação Humana**, v. 12, n. 2, p. 69-75, 2006.

NUNES, E. de O. **População de fungos filamentosos e sua relação com micotoxinas presentes na uva e no vinho de Santa Catarina**. 2008. 200f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química, Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

OSTRY, V. et al. Grape vine, toxigenic microfungi a ochratoxin A. **Vinarsky obzor**, v. 98, p. 389–391, 2007.

PFOHL-LESZKOWICZ, A., MANDERVILLE, R.A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 1, p. 61-99, 2007.

PIETRI, A. et al. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. **Food Additives and Contaminants**, v.18, p.647-654, 2001.

PONSONE, M. L. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic Aspergillus species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 131–135, 2007.

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

RATOLA, N. et al. A. Evolution of ochratoxin A content from must to wine in Port Wine microvinification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 405 –

411, 2005.

REDDY, L., BHOOLA, K. Ochratoxins-Food Contaminants: Impact on Human Health. **Toxins**, v. 2, p. 771-779, 2010.

ROSA, C. A. R. et al. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 4, p. 358-364, 2004.

SIMIONATO, E. M. R. S.; MENEZES, M. L. DE. Determinação de ocratoxinas em cervejas, por injeção direta da amostra empregando uma coluna cromatográfica IS-aniônica. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 3, p. 234-239, 2007.

SHEPHARD, G. S. et al. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1102–1106, 2003.

SHUNDO, L. et al. Ochratoxin a in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 533-537, 2006.

SOUFLEROS, E.H., TRICARD, CH., BOLOUMPASI, E.C. Occurrence of ochratoxin A in Greek wines. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 173–179, 2003.

TEIXEIRA, T. R. **Determinação de ocratoxina a em vinhos da região sul do Brasil através da cromatografia em camada delgada com Detector de carga acoplada**. 2010. 57f. 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, Porto Alegre, 2010.

TEIXEIRA, T. R. et al. Determination of ochratoxin A in wine from the southern region of Brazil by thin layer chromatography with a charge-coupled detector. **Food Additives and Contaminants**. v.4, n. 4, p. 289-293, 2011.

TONIETTO, J. et al. Embrapa uva e vinho: Documento nº 48. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Bento Gonçalves, 2009. v. 48, Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc048.pdf>>. Acesso em: 24 Mar. 2012.

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

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

VALERO, A. et al. Survey: Ochratoxin A in European special wines. **Food Chemistry**, v. 108, p. 593–599, 2008.

VAN DER MERWE, K.J., STEYN, P.S., FOURIE, L. Ochratoxin A, a toxic metabolite

produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, p. 1112–1113, 1965.

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

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

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.

VISCONTI, A. et al. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. **Food Additives and Contaminants**, v. 25 n.2, p. 193-202, 2008.

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**, v. 666, p. 85-99, 1995.

ZIMMERLI, B., DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, v. 13 n. 6, p. 655-668, 1996.

WELKE, J. E. et al. Quantitative analysis of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using a charge coupled device detector. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 5, p. 754–758, 2009.

WELKE, J. E. et al. Determination of Ochratoxin A in Wine by High-Performance Thin-Layer Chromatography using Charged Coupled Device. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 3, p. 441 – 446, 2010.

WOESE, K.; Ochratoxin A in grape juice and wine. **Mycotoxin Research**, v. 16, n. 1, p. 132 – 135, 2000.

