



Daniela Radavelli

Desenvolvimento de metodologia analítica por LC-MS/MS para determinar ocratoxina A em vinhos e sucos de uva

Maria Gabriele Delagustin¹

Kelen Cristofoli¹

Bruno Cidade Neves¹

Placidina Aparecida Martins¹

Graciela de Oliveira Obes¹

Carine Pedrotti¹

Gregório Bircke Salton¹

¹Vinícola Salton
95710-000 Bento Gonçalves, RS

Autor correspondente:
maria.delagustin@salton.com.br

Aocratoxina A é uma toxina produzida por algumas espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Essa micotoxina tem a capacidade de acumulação em diversos órgãos, o que pode levar a ocorrência de efeitos tóxicos. A ocratoxina A é a principal micotoxina presente no vinho, e o limite máximo permitido pela legislação brasileira é de 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Devido à importância da ocratoxina A, um novo método de identificação e quantificação, por cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas, foi desenvolvido e validado. Ainda, foram avaliadas 140 amostras de diferentes vinhos, espumantes e suco de uva integral produzidos na serra e campanha gaúcha. A validação foi realizada para as matrizes vinho tinto seco, espumante moscatel branco, espumante brut branco, vinho branco suave e suco de uva integral. O método desenvolvido foi seletivo para a identificação de ocratoxina A, com faixa de trabalho de 0,1 a 3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Foi identificado efeito matriz para as matrizes vinho tinto seco, espumante moscatel branco e suco de uva integral. Não foi identificado efeito matriz entre espumante moscatel branco, espumante brut branco e vinho branco suave. Os limites de detecção e quantificação calculados foram de 0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 0,08 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Todos os parâmetros validados estão de acordo com os valores estipulados pelos guias de validação analítica. Das 140 amostras analisadas, 131 apresentaram resultado inferior ao limite de detecção e nove amostras inferiores ao limite de quantificação. O método desenvolvido vem como uma forma de contribuir com a qualidade de vinhos, espumantes e sucos.

Palavras-chave: cromatografia líquida; espectrometria de massas; micotoxinas; segurança alimentar.

Abstract

Development of an LC-MS/MS analytical method to determine ochratoxin A in wines and grape juices

Ochratoxin A is a toxin produced by some fungi species of the genus *Aspergillus* and *Penicillium*. This mycotoxin has a cumulative effect in several organs, which can lead to toxic effects. Ochratoxin A is the main mycotoxin found in wine and the maximum limit allowed by the Brazilian legislation is 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Due to the importance of ochratoxin A, a new method of identification and quantification using liquid chromatography coupled with mass spectrometry was developed and validated. In addition, 140 samples of different wines, sparkling wines and whole grape juices, from Serra and Campanha Gaúcha were analyzed. Validation was established for dry red wine, white moscatel sparkling wine, brut white sparkling wine, sweet white wine, and whole grape juice matrices. The developed method was selective to ochratoxin A identification, with a working range of 0,1 to 3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Matrix effect was identified for the matrices of dry red wine, white moscatel sparkling wine and whole grape juice. No matrix effect was detected between white moscatel sparkling wine, brut white sparkling wine and sweet white wine. The detection and quantification limits calculated were 0,02 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 0,08 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. All validated parameters were in accordance with the values established by analytical validation guidelines. Out of the 140 samples analyzed, 131 presented results below to the detection limit and nine samples below the quantification limit. The method developed is a way to contribute to the quality of wines, sparkling wines and juices.

Keywords: liquid chromatography; mass spectrometry; mycotoxins; food safety.

Introdução

A micotoxina ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário produzido por algumas espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. As espécies *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger*, são as principais responsáveis pela produção da micotoxina em vinhos. A espécie *A. carbonarius* tem grande importância em uvas devido à prevalência e alta capacidade de produção de OTA (quase todas as linhagens são capazes de produzir a toxina em diferentes níveis) (Gil-Serna *et al.*, 2018; Ortiz-Villeda *et al.*, 2021).

A contaminação por OTA pode ocorrer tanto nas uvas que estão na videira quanto no transporte, manuseio e armazenamento. Quando as uvas contêm OTA (na sua polpa e/ou película), a toxina poderá ser transferida para o mosto. Desse modo, o tipo de processo de vinificação pode influenciar no teor de OTA do produto. Ainda, são relatadas maiores concentrações de OTA em vinhos tintos do que nos vinhos rosés e brancos (Gil-Serna *et al.*, 2018; Mateo *et al.*, 2007; Ortiz-Villeda *et al.*, 2021).

Os principais alimentos contaminados por OTA são os cereais, alimentos ricos em amido, café, temperos, frutas secas, cerveja e vinho. Os cereais representam a principal fonte de ingestão de OTA e, em segundo lugar, está o vinho (Gil-Serna *et al.*, 2018; Ortiz-Villeda *et al.*, 2021).

Entre as principais características da ingestão de OTA está o efeito cumulativo em diversos órgãos, podendo levar à ocorrência de doenças crônicas. São relatadas complicações como, por exemplo, a nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, citotoxicidade, imunotoxicidade, teratogênese, genotoxicidade e mutagenicidade. A OTA foi classificada como um possível carcinógeno humano (grupo 2B) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) (Gil-Serna *et al.*, 2018; Ortiz-Villeda *et al.*, 2021; Ostry *et al.*, 2017).

Devido à toxicidade da OTA, a prevalência em vinhos, e levando em consideração as políticas de segurança alimentar, este trabalho tem como objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica de identificação e quantificação de OTA em vinhos, espumantes e sucos de uva, além verificar a ocorrência de OTA em bebidas

derivadas da uva produzidas na Serra e Campanha Gaúcha.

Material e Métodos

Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE MS/MS)

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo líquido Nexera XR Shimadzu, acoplado ao detector de massas Shimadzu LCMS-8045 com fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Shim-pack GIST C18 (2.1 mm x 75 mm, 3 µm, Shimadzu), pré coluna Giss (G) C18 (3.0 x 10 mm, 3 µm) e temperatura de 40 °C. Fase móvel A composta de solução aquosa de fluoreto de amônio 0,15 mM e Fase B metanol com 0,15 mM de fluoreto de amônio e 0,002% (v/v) de ácido acético. A eluição seguiu de modo gradiente (0 min, 10% B; 2,00 min, 100% B; 4,00 min, 100% B; 4,01 min, 10% B) por 7 min. Fluxo de 0,3 mL.min⁻¹, volume de injeção 5 µL. A fonte ESI foi operada em modo positivo nas seguintes condições: fluxo do gás de nebulização, 3 L.min⁻¹; fluxo do gás de aquecimento, 10 L.min⁻¹; fluxo do gás de secagem, 10 L.min⁻¹; temperatura da interface, 350°C; temperatura da DL, 250°C; temperatura do bloco de aquecimento, 300°C. As análises foram realizadas em modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM).

Preparo do padrão e da amostra

A solução padrão 1 mg.L⁻¹ foi preparada dissolvendo o padrão OTA (Sigma-Aldrich, de *Petromyces albertensis*, ≥98%, HPLC) em metanol. A solução de trabalho 100 µg.L⁻¹ foi obtida pela diluição em metanol.

Os extratos digeridos de vinho tinto seco, espumante moscatel branco, espumante brut branco, vinho branco suave e suco de uva tinto foram preparados conforme a metodologia descrita por Wei *et al.* (2018), com modificações.

Na etapa de extração foram adicionados três mL da matriz e três mL de acetonitrila em um tubo

para centrífuga de 15 mL, contendo 1,2 g de $MgSO_4$ e 0,3 g de NaCl. Os tubos foram agitados, em vórtex, por dois min e centrifugados por dez min (3600 rpm). O sobrenadante, resultante da extração, foi utilizado como extrato digerido nos ensaios de validação. Na etapa de dispersão, dois mL de sobrenadante foram transferidos para um tubo de centrífuga de 15 mL, contendo 0,067 g de DSC-C18 e 0,02 g de $MgSO_4$ anidro. Os tubos foram agitados por um min e centrifugados por dez min (3600 rpm) (Wei *et al.*, 2018).

Todas as amostras foram diluídas em acetonitrila na proporção 1:1 (Fator de diluição 2) e filtradas com filtro de PTFE 0,22 μm , 13 mm. O preparo da matriz branca foi realizado com a mesma metodologia, entretanto, não foi fortificada com o padrão OTA.

Validação do método analítico e preparo de amostra

O método analítico foi desenvolvido para a identificação e quantificação de ocratoxina A (OTA) nas matrizes vinho tinto seco, espumante moscatel branco, espumante brut branco, vinho branco suave e suco de uva tinto integral. O protocolo de validação foi baseado no Manual de garantia da qualidade analítica de resíduos e contaminantes em alimentos do Ministério de Agricultura e Pecuária (MAPA) (Brasil, 2011) e no Documento de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (Brasil, 2020). Os parâmetros utilizados para a validação foram: seletividade, limite de quantificação, limite de detecção, linearidade, precisão, recuperação e efeito matriz.

A curva analítica foi preparada em água ultrapura e em extrato de matriz branca fortificada (vinho tinto seco, espumante moscatel branco e suco de uva tinto integral), contendo sete níveis de calibração. O extrato digerido da matriz foi obtido pela etapa de extração descrita anteriormente. Foi mantida a proporção 1:1 solvente (acetonitrila): extrato digerido de matriz ou água ultrapura. Na porção do solvente, adicionou-se quantidade suficiente da solução padrão de OTA 100 $\mu g.L^{-1}$ para a obtenção de soluções com concentrações de 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 $\mu g.L^{-1}$. O ajuste da curva foi realizado pelo

Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP), os coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) foram calculados utilizando o software Browser LabSolutions (Shimadzu). O Teste de Grubbs e coeficiente de variação (CV %) foram calculados para cada nível de calibração. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir da curva analítica, pelo método simplificado (Brasil, 2011; 2020).

Para cada ensaio de precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) foram preparadas seis amostras independentes, em três níveis de concentração. A OTA foi fortificada em nível baixo (0,5 $\mu g.L^{-1}$), médio (1,5 $\mu g.L^{-1}$) e alto (2,5 $\mu g.L^{-1}$), nos extratos digeridos de vinho tinto seco, espumante moscatel branco e suco de uva tinto integral. O extrato digerido da matriz foi obtido pela etapa de extração descrita anteriormente. A proporção de extrato digerido de matriz e solvente foi mantida em 1:1. A fortificação foi realizada adicionando na porção de solvente (acetonitrila), quantidade suficiente da solução padrão de OTA 100 $\mu g.L^{-1}$. Na avaliação de repetibilidade, as amostras foram analisadas no mesmo dia, e para a reprodutibilidade, foram variados o dia de análise e o analista. Para cada nível de fortificação/concentração, foram calculados as médias, os desvios-padrão e os coeficientes de variação de repetibilidade e reprodutibilidade (intra e inter-dia).

No ensaio de recuperação, as matrizes vinho tinto seco, espumante moscatel branco ou suco de uva tinto integral foram fortificadas como o padrão de OTA em três níveis de concentração/fortificação: baixo (0,5 $\mu g.L^{-1}$); médio (1,5 $\mu g.L^{-1}$) e alto (2,5 $\mu g.L^{-1}$). Adicionou-se quantidade suficiente da solução padrão de OTA 100 $\mu g.L^{-1}$ para a obtenção das concentrações desejadas. Em seguida, foram realizadas as etapas de extração, dispersão e diluição (1:1) para avaliar a recuperação. A porcentagem de recuperação foi calculada em relação à matriz branca.

O efeito matriz foi determinado, por nível de calibração, utilizando a concentração calculada a partir da curva analítica de OTA preparada em solvente (água ultrapura). Os extratos digeridos de vinho tinto seco, espumante moscatel branco, espumante brut branco, vinho branco suave e suco de uva tinto integral foram fortificados em

três níveis, baixo ($0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$), médio ($1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$) e alto ($2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$). Para determinar o efeito da matriz, foram aplicados os testes estatísticos Teste F (*Fischer-Snedecor*) e Teste t (*student*) em cada nível de concentração.

Todos os ensaios da validação à proporção final de 1:1 matriz ou extrato digerido/solvente (acetonitrila) foi mantido.

Análise de OTA em produtos acabados

A metodologia desenvolvida foi aplicada na identificação e quantificação da OTA em diferentes tipos de vinhos, espumantes e suco de uva integral produzidos na Serra e Campanha Gaúcha. O preparo das amostras envolveu as etapas de extração e dispersão, conforme descritas anteriormente. Em seguida, um mL resultante da etapa de dispersão foi diluído em um mL de acetonitrila (Fator de diluição 2) e então filtradas com filtro de PTFE $0,22 \mu\text{m}$, 13 mm. O

Filtrado resultante foi analisado por CLAE MS/MS (LC MS/MS - *liquid chromatography coupled with mass spectrometry*).

Resultados

Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE MS/MS)

O método analítico MS/MS foi desenvolvido para a identificação da OTA. Uma solução de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ foi analisada pelo método de varredura (*Full scan*). No modo positivo, foi detectado sinal com m/z 404 referente a OTA $[\text{M}+\text{H}]^+$, no modo negativo m/z de 402 $[\text{M}-\text{H}]^-$. Para a quantificação da OTA, foi desenvolvido o método de CLAE MS/MS, utilizando uma coluna de separação. Os cromatogramas e espectros de massas do padrão OTA ($1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$) estão demonstrados na figura 1.

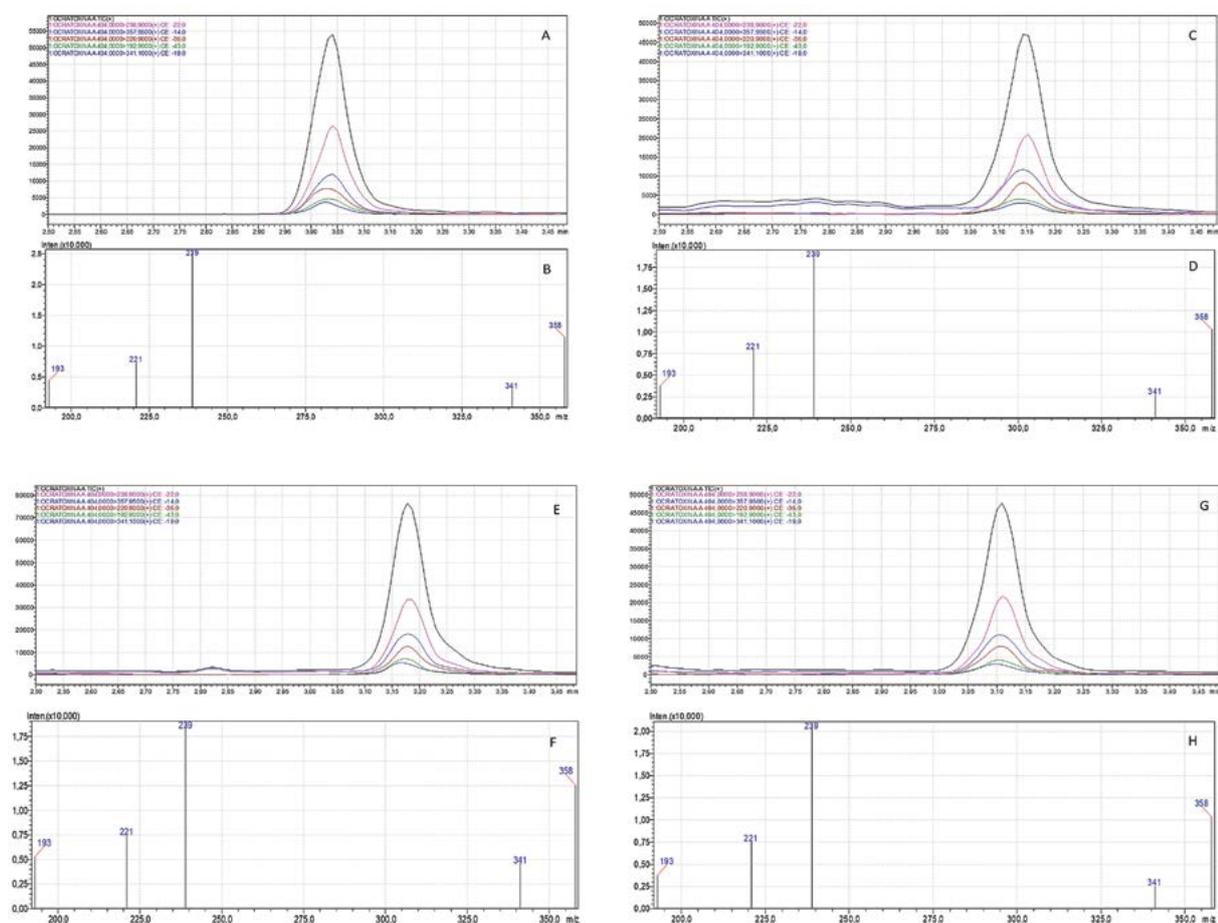


Figura 1. Cromatograma da ocratoxina A ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) obtido por CLAE MS/MS, coluna Shim-pack GIST C18, 40°C , fase móvel A fluoreto de amônio $0,15 \text{ mM}$ e fase B metanol com $0,15 \text{ mM}$ de fluoreto de amônio e $0,002\%$ (v/v) de ácido acético. Cromatograma e Espectro de massas da Ocratoxina A ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) em água ultrapura [A] e [B], extrato digerido de vinho tinto seco [C] e [D], extrato digerido de espumante moscatel branco [E] e [F], extrato digerido de suco de uva tinto integral [G] e [H].

A identificação da OTA foi realizada a partir das cinco transições: m/z 404>239, m/z 404>358, m/z 404>221, m/z 404>193 e m/z 404>341. Para a quantificação foi selecionada a transição m/z 404>239. Na figura 1 estão descritos os cromatogramas e espectros de massas de OTA em água ultrapura (Figura 1 A e B) e em extratos digeridos das matrizes vinho tinto seco (Figura 1 C e D), espumante moscatel branco (Figura 1 E e F) e suco de uva tinto integral (Figura 1 G e H). No cromatograma observa-se o pico cromatográfico da OTA e nos espectros de massas são identificadas as cinco transições da OTA.

Validação do método analítico

A linearidade do método foi avaliada, por meio da curva analítica, em solvente água ultrapura e em extrato digerido de matriz vinho tinto seco, espumante moscatel branco e suco de uva tinto integral. O teste de Grubbs foi aplicado para verificar a presença de valores *outliers*. O coeficiente de variação (CV %) da área foi determinado, por nível de concentração. Valores de CV inferiores a 10% foram obtidos em todos os níveis de concentração, para as quatro matrizes, estando de acordo com os limites aceitáveis (Brasil, 2011; 2020; Moosavi; Ghassabian, 2018).

Verificou-se o comportamento das respostas instrumentais em relação à característica de homoscedasticidade ou heterocedasticidade. A homoscedasticidade foi avaliada por dois métodos: primeiro, foi calculada a variância, por nível de calibração. O teste F foi aplicado comparando a maior variância com a menor.

As quatro curvas analisadas apresentaram diferença significativa de variância, indicando o comportamento heterocedástico. O segundo método foi a avaliação do gráfico dos resíduos em relação à concentração. Os resíduos ficaram dispostos na forma de um cone crescente, sendo um indicativo de heterocedasticidade. Desse modo, considerou-se que o comportamento dos dados é heterocedástico, portanto a regressão linear foi calculada pelo MMQP (Brasil, 2011; 2020; Moosavi; Ghassabian, 2018). O ajuste da curva foi realizado no *software* Browser LabSolutions (Shimadzu), onde a ponderação utilizada foi $1/A^2$. Na tabela 1 estão descritos os resultados das curvas analíticas em solvente água ultrapura e extratos digeridos de vinho tinto seco, espumante moscatel branco e suco de uva tinto integral calculadas pelo MMQP.

A Instrução normativa 160 da ANVISA (Brasil, 2022), que dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos, determina que o limite máximo tolerado de OTA em Vinhos é de $2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$. A faixa de trabalho de $0,1 - 3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ foi determinada, de modo que o LMT mantivesse na faixa central da curva. Os valores de inclinação (coeficiente angular, *b*) e intercepto (coeficiente linear, *a*) das curvas preparadas em solvente água ultrapura e nos extratos digeridos de vinho tinto seco, espumante moscatel branco e suco de uva estão descritos na tabela 1. Foram obtidos valores de r^2 e *r* maiores que 0,998 e 0,999, respectivamente, para as quatro curvas, podendo ser um indicativo de linearidade. O método desenvolvido apresenta limites de quantificação compatíveis com o LMT

Tabela 1. Resultados das curvas analíticas em água ultrapura e extratos digeridos de vinho tinto seco, espumante moscatel branco e suco de uva tinto integral, calculados pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP).

Matriz	Água Ultrapura	Extrato Digerido Vinho	Extrato Digerido Moscatel	Extrato Digerido Suco
Faixa de trabalho ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0,1-3,0	0,1-3,0	0,1-3,0	0,1-3,0
Intercepto (coeficiente linear, <i>a</i>)	773	6267	4444	2486
Inclinação (coeficiente angular, <i>b</i>)	113409	106329	95033	110681
Coeficiente de determinação (r^2)	0,99971	0,99959	0,99898	0,99966
Coeficiente de correlação (<i>r</i>)	0,99985	0,99979	0,99949	0,99932
Limite de Detecção- LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0,0223	0,0271	0,0268	0,0249
Limite de Quantificação- LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0,0675	0,0821	0,0813	0,0753

de OTA em vinhos.

O efeito matriz foi analisado para as matrizes extratos digeridos de vinho tinto seco, espumante moscatel branco, suco de uva, espumante brut branco e vinho branco suave, em relação à matriz solvente água ultrapura. Os resultados estão descritos na tabela 2.

Na tabela 2 estão descritos os valores do Teste F (*Fischer-Snedecor*) e Teste t (*student*), para as matrizes, em níveis de fortificação baixo (0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$), médio (1,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e alto (2,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$). O teste F verifica a homogeneidade de variâncias. Quando as variâncias são consideradas iguais, a matriz não causa um efeito sobre a precisão, por nível de concentração (Brasil, 2011; 2020).

Tabela 2. Teste t (*Student*) e Teste F (*Fischer-Snedecor*) para a determinação de efeito matriz, por nível de calibração, das matrizes água ultrapura e extratos digeridos de vinho tinto seco, espumante moscatel branco, suco de uva tinto integral, espumante brut branco e vinho branco suave.

Matriz	Nível $\mu\text{g.L}^{-1}$	Teste F		Teste t	
		F_{crit}	F_{calc}	F_{crit}	F_{calc}
Água ultrapura x ED vinho tinto seco	0,5	2,31	1,03	2,11	-3,88*
	1,5		1,87	2,11	1,71
	2,5		1,22	2,11	3,23*
Água ultrapura x ED espumante moscatel branco	0,5		5,31*	2,07	2,86*
	1,5		3,83*	2,06	5,25*
	2,5		2,54*	2,05	5,49*
Água ultrapura x ED de suco de uva	0,5		1,33	2,11	-0,66
	1,5		2,37*	2,06	6,17*
	2,5		1,85	2,11	-0,12
Água ultrapura x ED espumante brut branco	0,5		2,17	2,11	1,52
	1,5		2,85*	2,05	4,47*
	2,5		1,01	2,11	7,17*
Água ultrapura x ED vinho branco suave	0,5		2,69*	2,05	6,26*
	1,5		3,79*	2,06	6,17*
	2,5		1,63	2,11	8,56*
ED vinho tinto seco x ED espumante moscatel branco	0,5		5,17*	2,07	5,02*
	1,5		2,04	2,11	3,71*
	2,5		2,09	2,11	3,16*
ED vinho tinto seco x ED suco de uva	0,5		1,37	2,11	3,32*
	1,5		1,27	2,11	0,68
	2,5		2,25	2,11	-3,27*
ED espumante moscatel branco x ED suco de uva	0,5		7,09*	2,07	-3,31*
	1,5		1,61	2,11	-2,67*
	2,5		4,71	2,06	-5,97*
ED espumante brut branco x ED vinho tinto seco	0,5		2,11	2,11	-3,53*
	1,5		1,52	2,11	-2,47*
	2,5		1,23	2,11	-3,98*
ED espumante brut branco x ED espumante moscatel branco	0,5		2,44*	2,05	1,81
	1,5		1,34	2,11	0,96
	2,5		2,58*	2,05	0,55
ED espumante brut branco x ED suco de uva	0,5		2,90*	2,05	-1,87
	1,5		1,2	2,11	-2,23*
	2,5		1,82	2,11	-7,01*
ED vinho branco suave x ED vinho tinto seco	0,5		2,61	2,05	-9,06*
	1,5		2,02	2,11	-3,64*
	2,5		1,34	2,11	-4,71a
ED vinho branco suave x ED espumante moscatel branco	0,5		1,98	2,11	-1,75
	1,5		1,01	2,11	-0,83
	2,5		1,56	2,11	-0,66
ED vinho branco suave x ED suco de uva	0,5		3,58	2,05	-7,00*
	1,5		1,6	2,11	-3,59*
	2,5		3,02	2,05	-8,24*

*Teste t (*Student*), diferença significativa $p < 0,05$. Teste F (*Fischer-Snedecor*), variâncias diferentes. ED: Extrato digerido.

O teste *t* (*student*) foi utilizado para verificar se há diferenças entre as fortificações, por nível de concentração. Quando o teste for significativo, a matriz tem um efeito estatisticamente significativo sobre o resultado, tem efeito matriz. A partir dos resultados descritos na tabela 2, é possível verificar que há diferenças significativas das matrizes em comparação com a água ultrapura. O extrato digerido de vinho branco suave e extrato digerido de espumante brut branco não apresentaram efeito matriz em relação ao extrato digerido de espumante moscatel branco. Portanto, a curva analítica preparada em extrato digerido de espumante moscatel branco pode ser utilizada para quantificar OTA em extrato digerido de vinho branco suave e extrato digerido de espumante brut branco. Os extratos digeridos de suco de uva tinto integral e vinho tinto seco apresentaram efeito matriz em comparação com os demais extratos. Portanto, para a quantificação de OTA, devem ser utilizadas as curvas das respectivas matrizes.

Na tabela 3 estão descritos os resultados de precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e de recuperação.

A precisão é avaliada de maneira que alguns parâmetros sejam alterados, enquanto outros sejam mantidos iguais. A repetitividade (Dia 1) foi

realizada por um analista, em um dia de análise. O parâmetro de avaliação de resultados da precisão é o coeficiente de variação (CV%). Os resultados do coeficiente de variação de repetibilidade do dia um, nos três níveis de concentração (0,50, 1,5 e 2,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$), das três matrizes estudadas, foram inferiores a 10,21% (Tabela 3). Resultados estão de acordo com os valores preconizados pelos guias de validação analítico. O limite de aceitação do coeficiente de variação para a micotoxina OTA deve ser de até 20%, para concentrações de 1 $\mu\text{g/Kg}$ a 10 $\mu\text{g/Kg}$ ($\mu\text{g.L}^{-1}$), e até 40% para concentrações < 1 $\mu\text{g/Kg}$ ($\mu\text{g.L}^{-1}$) (Brasil, 2011). E, o documento de orientação sobre validação de métodos analíticos, recomenda que o coeficiente de variação seja de até 30% para a concentração de 1 $\mu\text{g/Kg}$ (Brasil, 2020).

O ensaio de reprodutibilidade (Dia 2) foi realizado pelo mesmo analista, alterado o dia de análise. Foram calculados o coeficiente de variação intra-dia (repetibilidade dia 2) e coeficiente de variação inter-dia. Os coeficientes de variação da repetibilidade do dia 2 e da reprodutibilidade inter-dia, nos três níveis de concentração, para as matrizes estudadas, foram inferiores a 11,00% e 13,98%, respectivamente. Os critérios de aceitação de coeficiente de variação de reprodutibilidade para a micotoxina OTA são de até 30% na faixa de concentração de 1 $\mu\text{g/Kg}$ a 10 $\mu\text{g/Kg}$, e de até

Tabela 3. Resultados de precisão e recuperação de Ocratoxina A nas matrizes extratos digeridos de vinho tinto seco, espumante moscatel branco e suco de uva, em níveis de fortificação, baixo (0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$), médio (1,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e alto (2,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Matriz		Extrato digerido de vinho tinto seco			Extrato digerido de moscatel branco			Extrato digerido de suco de uva tinto integral		
		$\mu\text{g.L}^{-1}$	0,5	1,5	2,5	0,5	1,5	2,5	0,5	1,5
Repetibilidade (intra-dia) Dia 1 n=6	$\mu\text{g.L}^{-1}$	0,54±0,02	1,53±0,08	2,50±0,12	0,53±0,05	1,58±0,13	2,63±0,19	0,51±0,02	1,481±0,09	2,53±0,07
	CV (%)	4,02	5,46	4,7	10,21	8,45	7,22	3,41	6,11	2,97
Repetibilidade (intra-dia) Dia 2 n=6	$\mu\text{g.L}^{-1}$	0,44±0,04	1,26±0,13	2,11±0,14	0,55±0,04	1,58±0,12	2,58±0,17	0,41±0,04	1,184±0,12	1,97±0,18
	CV (%)	9,04	10,61	6,62	7,93	7,47	6,43	11	9,86	8,97
Reprodutibilidade dias diferentes (inter-dia) Dia 1 e 2 n=6	$\mu\text{g.L}^{-1}$	0,48±0,06	1,40±0,17	2,30±0,23	0,54±0,05	1,58±0,12	2,60±0,18	0,46±0,06	1,33±0,18	2,25±0,31
	CV (%)	11,95	12,54	10,21	9,05	7,86	6,83	13,71	13,7	13,98
Repetibilidade operador diferente (intra-dia) n=6	$\mu\text{g.L}^{-1}$	0,41±0,03	1,12±0,11	1,86±0,15	0,51±0,04	1,70±0,13	2,60±0,27	0,44±0,05	1,44±0,11	2,12±0,19
	CV (%)	7,86	9,85	8,28	8,86	7,58	10,58	12,09	7,66	8,96
Reprodutibilidade operador diferente (inter-dia) n=6	$\mu\text{g.L}^{-1}$	0,46±0,06	1,31±0,20	2,16±0,30	0,53±0,05	1,62±0,14	2,60±0,21	0,45±0,06	1,37±0,17	2,20±0,28
	CV (%)	13,67	15,7	13,82	9,24	8,41	8,17	13,34	12,34	12,88
Recuperação	%	95,7±5,2	95,8±5,7	96,8±5,6	96,5±8,9	104,4±8,3	103,9±6,6	88,3±9,9	86,9±7,4	86,4±6,4
	CV (%)	5,4	6	5,6	9,3	8	6,3	11,2	8,5	7,4

CV (%): Coeficiente de variação.

60% para concentrações < 1 µg/Kg (Brasil, 2011). Os resultados de reprodutibilidade estão dentro dos valores preconizados (Brasil, 2011; 2020).

A reprodutibilidade também foi avaliada, variando o analista. Foram avaliadas a repetitividade e a reprodutibilidade do analista. Os coeficientes de variação de repetitividade, calculados para as três matrizes nos três níveis de fortificação, ficaram abaixo de 12,09%. A reprodutibilidade foi calculada comparando os resultados de repetitividade com operador diferente, repetibilidade (intra-dia) dia 1 e repetibilidade (intra-dia) dia 2. O coeficiente de variação da reprodutibilidade com o operador diferente (intra-dia), para as três matrizes, nos níveis de fortificação estudados, foram inferiores a 15,70%. Resultados dentro dos valores preconizados pelos guias de validação descritos anteriormente (Brasil, 2011; 2020).

Os limites de aceitação de recuperação, na faixa de concentração entre 1 µg/Kg e 10 µg/Kg, são de -30% a +10% e, para concentrações < 1 µg/Kg, entre -50% e +20% (Brasil, 2011). A matriz extrato digerido de vinho tinto seco apresentou recuperação média de 95% nos três níveis de concentração avaliados. O espumante moscatel branco apresentou recuperação média de 96% na concentração 0,5 µg.L⁻¹ e 104% nas concentrações de 1,5 e 2,5 µg.L⁻¹. O suco de uva

tinto integral teve recuperação média de 86% nas três concentrações (Tabela 3). Os resultados obtidos de recuperação de OTA estão de acordo com os dos valores estipulados pelos guias oficiais.

De maneira geral, os resultados da validação sugerem que o método desenvolvido para a identificação e quantificação de OTA em extratos digeridos de vinho tinto seco, espumante moscatel branco, suco de uva tinto integral, espumante brut branco e vinho branco suave estão de acordo com os parâmetros estipulados pelos guias de validação analítica (Brasil, 2011; 2020).

Análise de OTA em produtos acabados

Foram analisadas 140 amostras, de diferentes tipos de vinhos, espumantes e suco de uva integral. Os resultados estão descritos na tabela 4 e figura 2.

Na tabela 4, estão descritos os tipos de amostras analisadas para OTA por CLAE MS/MS. Os produtos selecionados foram analisados entre 2022 e 2023 e compreendem uma ampla variedade de matrizes. Na figura 2, estão descritos os resultados da análise de OTA por CLAE MS/MS. Entre todos os produtos analisados, 131 apresentaram resultado < LD (0,02 µg.L⁻¹, Tabela 1) e nove amostras com resultado < LQ (0,08 µg.L⁻¹, Tabela 1). Entre os produtos com resultado

Tabela 4. Tipo de produtos analisados e a quantidade de amostras analisadas para Ocratoxina A por CLAE MS/MS.

Produto	Número de amostras
Espumante Branco Brut	16
Espumante Branco Demi-sec	6
Espumante Branco Extra-brut	1
Espumante Moscatel	13
Espumante Moscato Rosé Doce	7
Espumante Rosé Brut	12
Espumante Rosé Demi-sec	1
Frisante Branco Demi-sec	1
Suco de Uva Integral	54
Vinho Branco Suave	1
Vinho Branco Seco	5
Vinho Licoroso	1
Vinho Tinto Suave	18
Vinho Tinto Seco	4
Total	140

< LQ, oito amostras são de suco de uva tinto integral e uma de espumante moscato rosé doce. Os resultados demonstram que os produtos analisados estão dentro do limite máximo permitido de OTA pela legislação brasileira, que é de 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Devido aos relatos de presença

de OTA em vinhos e a toxicidade crônica que envolve a ingestão de OTA, é fundamental que este parâmetro analítico seja implementado como análise de rotina pelo setor produtivo (Gil-Serna et al., 2018; Ortiz-Villeda et al., 2021).

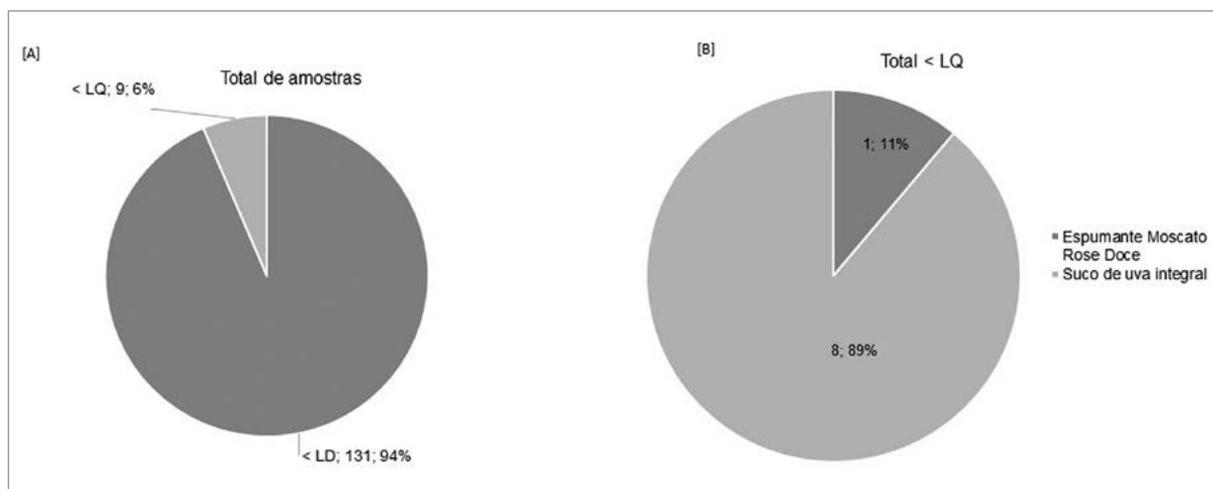


Figura 2. [A] Total de amostras com resultado de Ocratoxina A < LQ (Menor que o Limite de Quantificação) e < LD (menor que o Limite de Detecção). [B] Amostras com resultados de Ocratoxina A < LQ.

Conclusão

No presente estudo foi desenvolvido e validado um método para identificação e quantificação de OTA em vinhos, espumantes e sucos de uva. O método de MRM otimizado mostrou-se específico e seletivo para OTA nas matrizes estudadas. A curva analítica foi elaborada em solvente água ultrapura, extratos digeridos de vinho tinto seco, espumante moscatel branco e suco de uva tinto integral. A regressão linear foi calculada pelo método dos mínimos quadrados ponderados ($1/A^2$). Resultados demonstraram linearidade na faixa de trabalho. Efeito matriz, em relação à água ultrapura, foi identificado para as matrizes extratos digeridos de vinho tinto seco, espumante moscatel branco e suco de uva tinto integral. Não

foi determinado efeito matriz entre as matrizes espumante moscatel branco, espumante brut branco e vinho branco suave, podendo utilizar a mesma curva analítica para a quantificação de OTA. O método validado é preciso para a quantificação de OTA nas matrizes estudadas. O método de extração da OTA é adequado para a recuperação da OTA das matrizes. Entre todas as amostras analisadas, a quantidade de OTA foi inferior aos LD e LQ, sendo um indicativo de qualidade dos produtos analisados. Os resultados desse trabalho vêm como uma ferramenta de avaliação da qualidade e de garantia da segurança alimentar.

Referências

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa - in nº 160, de 1º de julho de 2022. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. **Diário oficial da União**, Brasília, DF, n.126, 6 jul 2022.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica: Resíduos e contaminantes em alimentos**. Brasília, DF: MAPA, 2011.
- BRASIL. Instituto nacional de metrologia, qualidade e tecnologia. **Coordenação Geral de Acreditação: Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008**. Brasília, DF: INMETRO, 2020.
- GIL-SERNA, J. *et al.* Wine Contamination with Ochratoxins: A Review. **Beverages**, Switzerland, v.4, n.6, jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/beverages4010006>. Disponível em <https://www.mdpi.com/2306-5710/4/1/6>. Acesso em: 22 dez. 2022.
- MATEO R. *et al.* An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Netherlands, v.20, n.119, p.79-83, out. 2007. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.029. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016816050700390X>. Acesso em: 22 dez. 2022.
- MOOSAVI, S. M.; GHASSABIAN, S. 'Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability'. In: STAUFFER, M. **Calibration and Validation of Analytical Methods: A Sampling of Current Approaches**. London: InTech, 2018. DOI:10.5772/intechopen.72932. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/58596>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- ORTIZ-VILLEDA, B. *et al.* Ochratoxins in Wines: A Review of Their Occurrence in the Last Decade, Toxicity, and Exposure Risk in Humans. **Toxins**, Basel, v.13, n.7, p.478, jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins13070478>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/7/478>. Acesso em: 10 mar. 2023.
- OSTRY, V. *et al.* Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. **Mycotoxin Research**, Germany, v.33, n.1, p.65-73, fev 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27888487/>. Acesso em: 22 fev. 2023.
- WEI, D. *et al.* Determination of Ochratoxin A contamination in grapes, processed grape products and animal-derived products using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectroscopy system. **Scientific Reports**, United States, v.8, n.2051, 2018. DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20534-7>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-20534-7>. Acesso em: 20 abr. 2022.