

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM VINHOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Poletto Dambrós

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS
EM VINHOS**

Fernanda Poletto Dambrós

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

Orientadora: Neidi Garcia Penna

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

A Comissão Examinadora, abaixo-assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM
VINHOS**

elaborada por
Fernanda Poletto Dambrós

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Comissão examinadora

Neidi Garcia Penna, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Carlos Augusto Mallmann, Dr. (UFSM)

Michele Hoeltz, Dr^a. (AgroMykes Ltda.)

Santa Maria, 05 de agosto de 2013.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Erlei e Cleusa, meu porto seguro, por todo o amor e educação que me deram, por sempre apoiarem minhas escolhas e estarem ao meu lado, ajudando-me a não desanimar frente às dificuldades encontradas.

Às minhas irmãs, Liliana e Helena, meus amores, minhas melhores amigas, agradeço pelo amor, amizade, apoio, companheirismo e felicidade que sempre me proporcionaram.

À minha orientadora, Neidi Garcia Penna, agradeço pelos ensinamentos, pelo carinho, pela amizade, pelo incentivo e sobretudo pelo apoio nas situações mais difíceis.

Ao professor Carlos Augusto Mallmann, por todos os ensinamentos, conselhos, oportunidades, amizade, confiança e apoio dedicados a mim.

A todos os meus colegas do LAMIC, agradeço por estarem sempre dispostos a ajudar, pelos ensinamentos, pelo companheirismo, pelas conversas, e principalmente, pela amizade formada ao longo dos anos que trabalhamos juntos.

A todos aqueles que não citei nomes, mas que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desse trabalho e torceram por mim.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM VINHOS

AUTORA: FERNANDA POLETTO DAMBRÓS

ORIENTADORA: NEIDI GARCIA PENNA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 05 de agosto de 2013.

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que ocorrem naturalmente em alimentos. As micotoxinas mais frequentemente encontradas em frutas e seus produtos processados são alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), citrinina (CIT), ocratoxina A (OTA) e patulina (PAT). OTA é produzida por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* e possui propriedades nefrotóxicas, carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas. Muitas vezes, OTA está presente nos alimentos em coocorrência com outra micotoxina, a CIT, que também possui propriedades nefrotóxicas e teratogênicas. PAT é produzida principalmente por espécies de *Penicillium* e ocorre em uma grande variedade de frutas, como maçã, uva e ameixa. AOH e AME são produzidas pelo *Alternaria alternata* e possuem propriedades carcinogênicas e genotóxicas. Juntamente com OTA, são as micotoxinas mais frequentes em vinhos. Levando em consideração a importância da fiscalização de micotoxinas em alimentos, bem como a regulamentação estabelecida pela ANVISA, desenvolveu-se duas metodologias analíticas para detecção de cinco micotoxinas que podem estar presentes em uvas e, conseqüentemente, em vinhos. A primeira metodologia foi desenvolvida e validada para análise de PAT utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (CLAE/MS/MS) com fonte de ionização química a pressão atmosférica (APCI). Para a preparação das amostras anteriormente às análises, passou-se por etapas de extração com acetato de etila e agitação em vortex, congelamento do extrato por 24 horas, evaporação do solvente em banho-maria, ressuspensão e diluição. O limite de quantificação (LQ) obtido foi de 12 µg kg⁻¹ e a recuperação média do método foi de 89,4%. Através dessa metodologia, foram analisadas 105 amostras de vinhos comerciais, nacionais e importados, e nenhuma delas apresentou contaminação com PAT. A segunda metodologia foi desenvolvida e validada para análise simultânea de AOH, AME, CIT e OTA, utilizando CLAE/MS/MS com fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Para preparação da amostra para análise, apenas diluiu-se a mesma em solução de metanol e água. Os LQs obtidos foram de 1 µg kg⁻¹ para AOH, AME e OTA e de 20 µg kg⁻¹ para CIT. A recuperação média do método foi de 92,5% para AOH, 96,1% para AME, 97,8% para CIT e 96,2% para OTA. Ao analisar 111 amostras de vinhos, encontraram-se 81 contaminadas com AOH, 48 com AME, duas com OTA e nenhuma com CIT.

Palavras-chave: Vinho. Micotoxinas. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Program in Food Science and Technology
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF MYCOTOXINS IN WINES

AUTHOR: FERNANDA POLETTO DAMBRÓS

ADVISER: NEIDI GARCIA PENNA

Date and Place of Defense: Santa Maria, August 05, 2013.

Mycotoxins are secondary metabolites produced by filamentous fungi that occur naturally in foods. The mycotoxins most commonly found in fruits and their processed products are alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), citrinin (CIT), ochratoxin (OTA) and patulin (PAT). OTA is produced by *Penicillium* and *Aspergillus* species and have nephrotoxic, mutagenic, teratogenic and carcinogenic. Often, OTA is present in foods in co-occurrence with other mycotoxin, the citrinin, which also have nephrotoxic and teratogenic. PAT is mainly produced by *Penicillium* species and occurs in a wide variety of fruits such as apple, grape and plum. AOH and AME are produced by *Alternaria alternata* and have genotoxic and carcinogenic properties. Along with OTA, mycotoxins are more common in wines. Given the importance of surveillance of mycotoxins in foods, as soon as regulations established by ANVISA, has developed two analytical methods for detection of five mycotoxins that may be present in grapes and consequently in wine. The first method was developed and validated for analysis of patulin using high performance liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) with atmospheric pressure chemical ionization (APCI). The sample preparation prior to analysis, it moved by extraction with ethyl acetate and vortex, freezing the extract for 24 hours, solvent evaporation in a water bath, resuspended and diluted. The limit of quantitation (LQ) obtained was 12 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and the average recovery of the method was 89.4%. Through this methodology, we analyzed 111 samples of wines and any sample no showed patulin contamination. The second method was developed and validated for simultaneous analysis of AOH, AME, CIT and OTA using HPLC-MS/MS with electrospray ionization (ESI). For preparing for analysis, the sample was diluted with solution of methanol and water. The LQ obtained was 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for AOH, AME and OTA and 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for CIT. The average recovery of the method was 92.5% for AOH, 96.1% for AME, 97.8% for OTA and 96.2% for CIT. By analyzing 111 samples of wine, found 81 contaminated with AOH, 48 with AME, 2 with OTA and no with CIT.

Keywords: Wine. Mycotoxins. High Performance Liquid Chromatography. Mass Spectrometry.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Gradiente de fase móvel (fases aquosa e orgânica) para a determinação de patulina através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	41
Tabela 2 – Parâmetros do espectrômetro de massas referentes ao analito patulina	41
Tabela 3 – Parâmetros de recuperação estabelecidos no regulamento nº 401/2006 pela União Europeia	42
Tabela 4 – Resultados dos testes de repetitividade, precisão intermediária e recuperação	42
Tabela 5 – Resultados obtidos nos ensaios de robustez	43

ARTIGO 2

Tabela 1 – Íons precursores, íons produtos e parâmetros de massas correspondentes	61
Tabela 2 – Linearidade e sensibilidade do método para a determinação simultânea de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), citrinina (CIT) e ocratoxina A (OTA)	61
Tabela 3 – Recuperações e coeficientes de variação na determinação de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), citrinina (CIT) e ocratoxina A (OTA)	62
Tabela 4 – Contaminação de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), citrinina (CIT) e ocratoxina A (OTA) em 111 amostras de vinhos analisadas	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmulas estruturais referentes às micotoxinas alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), citrinina (CIT), ocratoxina A (OTA) e patulina (PAT)	13
Figura 2 – Esquema representativo de espectrometria de massas sequencial	20
ARTIGO 1	
Figura 1 – Cromatogramas de amostra sem contaminação com patulina (A) e de amostra fortificada com patulina (B)	40
Figura 2 – Cromatogramas referente às soluções padrão de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, representando o limite de detecção do método (A) e de $3 \mu\text{g kg}^{-1}$, representando o limite de quantificação do método (B).....	40
ARTIGO 2	
Figura 1 – Cromatogramas das micotoxinas demonstrando o sinal gerado por cada íon produto separadamente. Picos referentes ao padrão com $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME) e ocratoxina A (OTA) e $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de citrinina (CIT)	59
Figura 2 – Cromatograma de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), citrinina (CIT) e ocratoxina A (OTA) resultante da soma dos sinais gerados pelos íons produtos, demonstrando o tempo de retenção dos analitos e o momento da troca de polaridade da ionização (troca do modo positivo para o modo negativo)	59

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AME	Alternariol Monometil Éter
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOH	Alternariol
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization / Ionização Química a Pressão Atmosférica
CAD	Collisionally Activated Dissociation / Dissociação Ativada por Colisão
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CE	Collision Energy/ Energia de colisão
CIT	Citrinina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CUR	Curtain gas / Cortina de gás
CV	Coeficiente de Variação
CXP	Collision Cell Exit Potential / Potencial de Saída da Cella de Colisão
DP	Declustering Potential / Potencial de Desaglomeração
DPR	Desvio Padrão Relativo
EP	Entrance Potential / Potencial de entrada
ESI	Ionização por Electrospray
FAPAS	Food Analysis Performance Assessment Scheme / Sistema de Avaliação de Desempenho em Análises de Alimentos
FDA	Food and Drug Administration / Administração de Alimentos e Medicamentos
FIA	Flow Injection Analysis / Análise por Injeção em Fluxo
FLD	Fluorescência
GS1	Ion Source Gas 1 / Gás 1 da Fonte de Íons
GS2	Ion Source Gas 2 / Gás 2 da Fonte de Íons
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IARC	International Agency for Research on Cancer / Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IS	Ionspray voltage / Voltagem no Vaporizador
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LMT	Limite Máximo Tolerável
MRM	Multiple Reaction Monitoring / Monitoramento de Reações Múltiplas
MS	Mass Spectrometry / Espectrometria de massas
M/Z	Relação Massa/Carga
NC	Nebulizer Current / Corrente de Nebulização
NST	NanoSeparation Technologies (marca de colunas cromatográficas)
OTA	Ocratoxina A
PAT	Patulina
RPM	Rotações por Minuto
TEM	Temperatura
UV	Ultravioleta

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Normas para publicação	72
---	-----------

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1 REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1 Micotoxinas	12
1.2 Alternariol e Alternariol Monometil Éter	13
1.3 Citrinina	14
1.4 Ocratoxina A	16
1.5 Patulina.....	17
1.6 Métodos empregados para análise de micotoxinas em frutas e subprodutos	18
1.7 Espectrometria de massas.....	19
1.7.1 Ionização de compostos.....	20
1.7.1.1 Ionização por <i>Electrospray</i> (ESI)	20
1.7.1.2 Ionização química a pressão atmosférica (APCI).....	21
1.8 Validação	21
1.9 Legislação brasileira.....	22
2 ARTIGOS CIENTÍFICOS	23
2.1 Artigo científico 1.....	23
2.2 Artigo científico 2.....	44
3 DISCUSSÃO	63
4 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO.....	72

INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que ocorrem naturalmente em alimentos, como frutas e cereais. Elas representam um grupo de diversas substâncias produzidas por diferentes espécies micotoxicogênicas. Esses fungos podem infectar culturas agrícolas tanto durante o crescimento da planta, como durante a colheita, armazenagem ou processamento dos alimentos.

A importância do estudo das micotoxinas deve-se aos problemas gerados tanto à saúde pública quanto à economia. Entre as consequências da contaminação micotoxicológica de alimentos e bebidas estão as perdas diretas dos produtos agrícolas, a redução do valor nutricional dos produtos, as patologias animais, os danos à saúde humana e o comprometimento das relações comerciais entre países.

As micotoxinas mais frequentemente encontradas em frutas e seus produtos processados são as toxinas do *Alternaria*, dentre as quais, destacam-se alternariol (AOH) e alternariol monometil éter (AME), a citrinina (CIT), a ocratoxina A (OTA) e a patulina (PAT). Como essas micotoxinas são muito estáveis, mesmo quando submetidas a altas temperaturas, e como podem difundir-se das partes podres para as partes saudáveis dos frutos, a sua presença, especialmente em produtos processados, é de grande probabilidade. Por isso, é importante que se investigue a presença desses contaminantes em vinhos.

Métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação de micotoxinas em diferentes matrizes. Contudo, não há métodos analíticos para a determinação simultânea de tais micotoxinas em vinhos. Pensando na importância da fiscalização de micotoxinas em alimentos, bem como na regulamentação estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) quanto à presença de ocratoxina A em vinhos, desenvolveram-se duas metodologias analíticas para detecção de cinco micotoxinas que podem estar presentes em uvas e, conseqüentemente, em vinhos: AOH, AME, CIT, OTA e PAT. Para isto, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE/MS/MS).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Micotoxinas

Micotoxinas são substâncias tóxicas resultantes do metabolismo secundário de diversas linhagens de fungos filamentosos. São de ocorrência universal, porém predominam em climas tropicais e subtropicais, nos quais o desenvolvimento fúngico é favorecido pelas condições ambientais (MALLMANN & DILKIN, 2007).

Os fungos micotoxigênicos são contaminantes de alimentos destinados ao consumo humano e animal. Diversos fatores, como umidade e temperatura ambiental, teor de umidade e atividade de água do substrato, favorecem o crescimento fúngico e a consequente produção de micotoxinas em produtos alimentícios (MALLMANN & DILKIN, 2007).

Os alimentos mais afetados são amendoim, café, frutas secas, maçãs, milho, nozes, trigo, entre outros. Algumas micotoxinas também podem ser encontradas em cervejas e vinhos, devido à utilização de cevada e uvas contaminadas na produção dessas bebidas (TURNER et al., 2009). Como a maioria são substâncias muito estáveis e capazes de suportar até altas temperaturas, geralmente não sofrem degradação durante o processamento dos alimentos, permanecendo intactas no produto final (BULLERMAN & BIANCHINI, 2007).

Quando presentes em alimentos, as micotoxinas podem ser patogênicas e causar graves danos à saúde dos consumidores devido às suas propriedades tóxicas. Entre os efeitos deletérios mais preocupantes estão os carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos e imunossupressores. Entretanto, o potencial micotoxigênico depende da substância contaminante, das espécies de fungos produtores, da composição da matriz e de fatores ambientais, como temperatura e umidade (CRUZ et al., 2010).

Regulamentos sobre micotoxinas foram estabelecidos em muitos países, a fim de proteger o consumidor contra os efeitos nocivos desses contaminantes de alimentos. Muitos países têm legislação específica e limites máximos permitidos em frutas e subprodutos. A maioria das micotoxinas com limite máximo estabelecido são produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, sendo que não há nenhum país que estabeleça limites máximos para as produzidas por espécies do gênero *Alternaria* (BARKAI-GOLAN & PASTER, 2008). Dentre as principais micotoxinas contaminantes de frutas, destacam-se as

toxinas do *Alternaria*, alternariol (AOH) e alternariol monometil éter (AME), a citrinina (CIT), a ocratoxina A (OTA) e a patulina (PAT), cujas fórmulas estruturais estão demonstradas na figura 1.

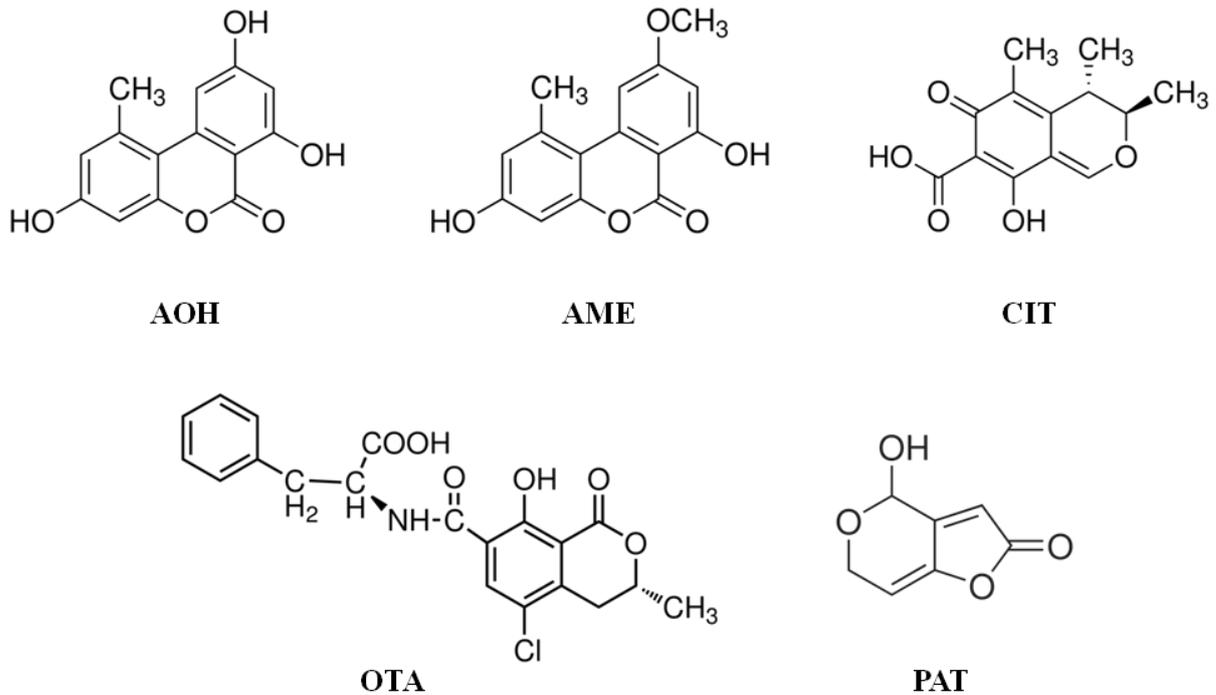


Figura 1 – Fórmulas estruturais referentes às micotoxinas alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), citrinina (CIT), ocratoxina A (OTA) e patulina (PAT).

1.2 Alternariol e alternariol monometil éter

Fungos do gênero *Alternaria* são parasitas de plantas e podem causar a deterioração de frutas e verduras. Também são contaminantes de grãos, como aveia, cevada, trigo e sorgo. *Alternaria alternata* é a espécie mais comum em *commodities* agrícolas, porém outras espécies também podem ser produtoras de micotoxinas em alimentos, como *A. citri*, *A. solanice* e *A. longipes* (LAU et al., 2003).

O fungo *Alternaria alternata* produz as micotoxinas AOH e AME, que foram isoladas pela primeira vez em 1953 (SCOTT, 2001). Essas micotoxinas, chamadas de toxinas do

Alternaria, podem estar presentes em uma grande variedade de alimentos, podendo causar danos à saúde humana. Em um estudo científico, Scott (2004) evidenciou propriedades cancerígenas das toxinas do *Alternaria* em ratos tratados com AOH e AME. Também foram identificados efeitos mutagênicos de AOH e AME em células microbianas de animais (POSE et al., 2010). Lehmann e colaboradores (2006) escreveram sobre o potencial estrogênico de AOH, seus efeitos inibitórios sobre a proliferação celular e seu efeito genotóxico em culturas de células de mamíferos. Contudo, a maior preocupação para a saúde humana é a associação encontrada entre a contaminação em grãos de cereais por *A. alternata* e os altos níveis de câncer de esôfago na China (LIU et al., 1991).

AOH e AME podem ser encontradas em diversas frutas e verduras, como amoras, azeitonas, laranjas, maçãs, melões, tangerinas e tomates (DRUSCH & RAGAB, 2003; SCOTT et al., 2001). Também podem estar presentes em subprodutos de frutas, como suco de maçã e suco de uva, em níveis consideráveis (LAU et al., 2003). Em estudo sobre fungos e micotoxinas em uvas e vinhos, Serra e colaboradores (2005) encontraram fungos *Alternaria* em 24% das amostras analisadas, apresentando-se como o segundo gênero de maior ocorrência nesses alimentos.

A presença das toxinas do *Alternaria* tem sido muito relatada em vinhos, principalmente em vinhos tintos. Scott e colaboradores (2006) encontraram AOH em 83% dos vinhos tintos analisados, em níveis de 0,27 a 19,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ e AME em baixas concentrações. Quanto a vinhos brancos, apenas 13% das amostras estavam contaminadas, sendo que as concentrações de AOH e AME eram menores que 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A determinação das toxinas do *Alternaria* pode ser realizada através de cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta (UV). Detectores de fluorescência (FLD) também têm sido utilizados, porém a detecção por espectrômetro de massas (MS), por ser mais sensível e mais eficiente na análise de traços, é a melhor técnica para análise de AOH e AME (CRUZ et al., 2010).

1.3 Citrinina

Citrinina (CIT) foi isolada pela primeira vez a partir de fungos *Penicillium citrinum* em 1931, por Hetherington & Raistrick (1931). Mais tarde, também foi isolada de outras

espécies contaminantes de grãos, como *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* (GUPTA, 2007) e *Monascus sp* (LI et al., 2003). Em 1951, CIT foi encontrada em grãos de arroz amarelo exportados da Tailândia para o Japão que estavam contaminados com *P. citrinum* (GUPTA, 2007).

CIT produz efeitos teratogênicos em ratos e causa danos de desenvolvimento precoce em camundongos (CHAN, 2007; SINGH et al., 2007). Também é responsável por efeitos hepato-nefrotóxicos em uma variedade de espécies. Estudos *in vitro* demonstraram que essa micotoxina produz múltiplos efeitos na função das mitocôndrias dos rins e na síntese de macromoléculas, o que resulta em morte celular. Outros efeitos tóxicos incluem vasodilatação, constrição dos brônquios e aumento do tônus muscular. No entanto, o mecanismo de toxicidade da CIT não foi bem elucidado até agora (GUPTA, 2007).

Como não há evidências de carcinogenicidade causada por CIT, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) classificou-a no grupo 3, concluindo que há pouca evidência de sua toxicidade em experimentos realizados em animais e não há evidências em humanos (IARC, 2006). Um fato importante sobre sua toxicidade é a coocorrência frequente com ocratoxina A (OTA), outra nefrotoxina, em diversos gêneros alimentícios, onde atuam sinergicamente, potencializando seus efeitos tóxicos (XU et al., 2006).

Contaminações com CIT foram relatadas em uma série de *commodities* agrícolas, alimentos e ingredientes, como também em fluidos biológicos. Ela pode estar presente em uma variedade de grãos e cereais, como amendoim, arroz, aveia, cevada, milho e trigo e também ocorre em frutas e seus produtos derivados. Sabe-se que CIT produzida por *P. expansum* é contaminante de sucos de maçã e, em menor quantidade, de sucos de uva (VINAS et al., 1993). Há poucos dados na literatura sobre os níveis de contaminação por CIT em frutas e seus produtos processados. No entanto, os limites existentes relacionados a dados analíticos foram baseados em diversos métodos analíticos com diferentes sensibilidades e precisão. Assim, é difícil estabelecer limites máximos aceitáveis de CIT. Atualmente, não há legislação específica sobre seus níveis máximos permitidos em alimentos. A principal razão é a falta de métodos analíticos de rotina (XU et al., 2006) e sua instabilidade nos gêneros alimentícios (FLAJS et al., 2009).

Os métodos mais utilizados para determinar citrinina qualitativamente e quantitativamente são CCD, CLAE com detecção por UV ou por FLD e ensaios imunoenzimáticos. Recentemente, técnicas CLAE/MS e CG/MS tornaram-se também disponíveis para a determinação dessa micotoxina (ARÉVALO et al., 2011).

1.4 Ocratoxina A

Ocratoxinas são um grupo de micotoxinas produzidas por algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. A OTA foi descrita pela primeira vez na África do Sul como um metabólito secundário produzido por uma cepa do fungo *Aspergillus ochraceus* (VAN DER MERWE et al., 1965). Outras espécies também são produtoras de OTA, principalmente *A. carbonarius* e *P. verrucosum*. Esses fungos podem infectar plantas e produtos vegetais, como cereais (aveia, cevada, milho e trigo), amendoim, café, cacau, especiarias, frutas secas e uvas (JORNET et al., 2000). Consequentemente, a contaminação por OTA pode ocorrer também em seus produtos derivados, tais como cerveja, pães, vinho e outros.

Inquéritos sobre a presença de OTA em vinhos foram realizados em todo o mundo (BATTILANI et al., 2006). A proporção de vinhos em que essa micotoxina já foi detectada é muito elevada (acima de 50%) em alguns países (especialmente na bacia do Mediterrâneo), embora apenas alguns vinhos apresentem concentrações excedentes ao limite máximo estabelecido pela União Europeia ($2,0 \text{ ng mL}^{-1}$) (MATEO et al., 2007). Geralmente, vinhos tintos apresentam maior contaminação do que vinhos brancos ou rosês (BATTILANI et al., 2006), provavelmente por permanecerem por um longo período em contato com as cascas das uvas durante a sua produção. Em um estudo com vinhos brancos feitos no Rio Grande do Sul, não houve detecção de OTA em nenhuma das amostras analisadas, mesmo naquelas produzidas a partir de uvas de baixa qualidade (SIMON, 2006).

A presença de OTA nos vinhos deve-se, principalmente, ao crescimento de *A. carbonarius* em uvas. Área geográfica, condições meteorológicas, feridas de bagas causadas por insetos e suscetibilidade do cultivar são considerados os principais fatores que promovem a invasão de bagas por *A. carbonarius* (COZZI et al., 2006; VISCONTI et al., 2008). Em geral, as pesquisas indicam que os níveis de OTA dependem da região em que o vinho foi produzido. Vinhos produzidos em regiões de baixas latitudes (climas mais quentes), geralmente têm maior incidência e concentrações da toxina do que os produzidos em regiões de altas latitudes (climas mais frios) (CRUZ et al., 2010).

Quando presente em alimentos e bebidas, OTA pode causar danos nefrotóxicos, genotóxicos, hepatotóxicos, imunotóxicos e teratogênicos em diversas espécies. Efeitos carcinogênicos em ratos e camundongos também foram relatados (CASTEGNARO et al., 1998; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 1998). Além disso, OTA tem sido associada à Nefropatia Endêmica dos Balcãs e ao desenvolvimento de tumores no trato urinário de

humanos (NIKOLOV et al., 1996; RADIC et al., 1997). Por essas razões, a IARC classificou a OTA como um possível agente cancerígeno para seres humanos (grupo 2B) (IARC, 2006).

Cromatografia líquida acoplada a detector FLD, precedida por *clean-up* com colunas de imunoafinidade, é, geralmente, o método mais aplicado para determinação de OTA em vinho. Ensaio imunoenzimático (ELISA) também são usados, porém, problemas decorrentes da complexidade da matriz podem resultar em dados não confiáveis. Este problema pode ser superado pelo emprego de CLAE acoplada à espectrometria de massas (BACALONI et al., 2005).

1.5 Patulina

A patulina (PAT) é uma micotoxina produzida por fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, que podem estar presentes em frutas e outros produtos de origem vegetal, particularmente, maçãs e derivados (PIEMONTESE et al., 2005). Alguns autores relataram a capacidade de produção de patulina por cepas do gênero *Penicillium* isoladas de uvas (HARWIG et al., 1978; SOMMER et al., 1974), o que possibilita a contaminação de seus produtos derivados, como sucos e vinhos. Em um estudo realizado na Áustria, 50,6% das amostras de mosto de uva analisadas estavam contaminadas com PAT, apresentando concentrações de até $750 \mu\text{g L}^{-1}$ (MAJERUS et al., 2008).

Na década de 1940, essa toxina foi isolada e qualificada como um antibiótico, porém, estudos posteriores apontaram que a PAT não apresentava toxicidade somente para fungos e bactérias, mas também para plantas superiores e animais (NUNES, 2008). Alguns estudos informaram que vários órgãos ou sistemas, incluindo fígado, intestino, rins e sistema imunológico foram afetados pela administração de PAT em determinados animais experimentais (LIU et al., 2003; LIU et al., 2007). Sabe-se que os sintomas agudos de consumo de alimento contaminado com essa micotoxina podem incluir agitação, convulsões, edema, inflamação intestinal, ulceração e vômitos. Os efeitos crônicos incluem embriotoxicidade, genotoxicidade, imunotoxicidade e neurotoxicidade (ZAIED et al., 2013). No entanto, a IARC (2006) concluiu que não há provas suficientes de carcinogenicidade em humanos e animais, classificando a PAT no grupo 3.

Em função das evidências contínuas dos efeitos negativos da patulina, muitas agências reguladoras estabeleceram limites para a sua concentração em alimentos. Na União Europeia,

o limite permitido é de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. No Brasil, foi estabelecido pela ANVISA, o limite máximo de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ em suco de maçã (BRASIL, 2011). Com relação à incidência de PAT em frutas, a *Food and Drug Administration* (FDA), reserva especial atenção a maçãs e seus derivados não fermentados em função da frequência com que é detectada (USFDA, 2004). Porém, cepas produtoras têm sido isoladas de uma série de vegetais e frutas, incluindo ameixas, cerejas, damascos, peras, pêssego e uvas (LUGAUSKAS et al., 2005). Embora sua presença esteja mais comumente associada a maçãs, estudos devem continuar a investigar e monitorar outras variedades de frutas e produtos vegetais para garantir que medidas de controle de PAT sejam aplicadas a todos os produtos que possam ser contaminados com essa toxina (MOAKE et al., 2005).

Os primeiros métodos para a determinação de PAT em suco de maçã utilizavam CCD, porém, esses métodos têm sido substituídos por técnicas de CLAE/UV. No entanto, essa técnica possui a probabilidade de interferência com a substância hidroximetilfurfural, o que prejudica a eficácia da análise. Por isso, a quantificação de PAT é mais eficiente através da técnica de espectrometria de massas, que, por apresentar maior seletividade e sensibilidade quando comparada à detecção por UV, permite análise de traços mais confiável e precisa, além de dispensar etapas de *clean-up* e de concentração prévia da amostra (NUNES, 2008).

1.6 Métodos empregados para análise de micotoxinas em frutas e subprodutos

O fato de que a maioria das micotoxinas são tóxicas em concentrações muito baixas, torna necessário dispor de métodos sensíveis e confiáveis para a sua detecção (CRUZ et al., 2010). Diferentes métodos de análise foram aplicados à determinação de micotoxinas, devido às suas estruturas variadas. Esses incluem cromatografia líquida com detecção por UV ou FLD, que são amplamente utilizados em pesquisa e para a aplicação das legislações de segurança alimentar e regulamentos do comércio agrícola internacional. Outros métodos cromatográficos, como CCD e CG, também são empregados para a determinação de micotoxinas, enquanto que os recentes avanços na instrumentação analítica têm destacado o potencial da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE/MS/MS) (NUNES, 2008).

Métodos cromatográficos convencionais geralmente são caros e demorados, portanto, uma gama de métodos, a maioria baseada em princípios imunológicos, foram desenvolvidos e

comercializados para análise rápida. Estes métodos incluem, entre outros, fluorimetria direta, polarização de fluorescência e biossensores. Métodos de ELISA diretos e indiretos têm sido desenvolvidos para análise de OTA e PAT em vinhos e outros alimentos (CIGIC & PROSEN, 2009; TURNER et al., 2009).

Como diferentes micotoxinas podem estar presentes na mesma matriz, métodos analíticos para a determinação simultânea de diferentes micotoxinas têm sido desenvolvidos recentemente. Monbaliu e colaboradores (2009) desenvolveram um método multi-toxinas por CLAE/MS para a determinação de micotoxinas produzidas por *Fusarium*, aflatoxinas, OTA e toxinas do *Alternaria* em pimentão, totalizando 23 micotoxinas analisadas simultaneamente na amostra. No entanto, são raros os métodos disponíveis para a determinação simultânea de micotoxinas em frutas ou em produtos de frutas através da técnica de CLAE/MS/MS.

1.7 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica de detecção e quantificação de compostos de alta tecnologia, através do espectrômetro de massas. O espectrômetro de massas é composto basicamente por três unidades fundamentais: uma fonte de íons, um analisador ou filtro de massas e um sistema de detecção. A fonte de íons tem a finalidade de gerar os íons a serem analisados na fase gasosa a partir das amostras de interesse. O analisador de massas emprega combinações entre campos elétricos e magnéticos para separar os íons gerados na fonte de ionização de acordo com as suas razões massa/carga (m/z). O detector tem a finalidade de quantificar os íons provenientes do analisador de massas e convertê-los em sinais eletrônicos (MARTINS JÚNIOR, 2005).

Espectrometria de massas sequencial envolve a geração de íons produtos, formados a partir da fragmentação de um íon precursor, previamente selecionado, após este sofrer aplicação de uma energia de colisão. O processo de fragmentação de um íon de m/z específica requer o isolamento deste íon e dos íons produtos, realizado por quadrupolos analisadores de massas. Um sistema triploquadrupolo é composto por três analisadores quadrupolos dispostos em série. O primeiro (Q1) seleciona a relação m/z referente ao íon precursor. O segundo (Q2) funciona como uma cela de colisão, onde o íon precursor é fragmentado em íons produtos. O terceiro (Q3) seleciona as relações m/z dos íons produtos de interesse. O quadrupolo Q0 não atua como filtro de massas e possui como única função a focalização dos íons provenientes da

fonte de ionização para o primeiro analisador de massas (MARTINS JÚNIOR, 2005). A figura 2 apresenta um esquema representativo de espectrometria de massas sequencial.

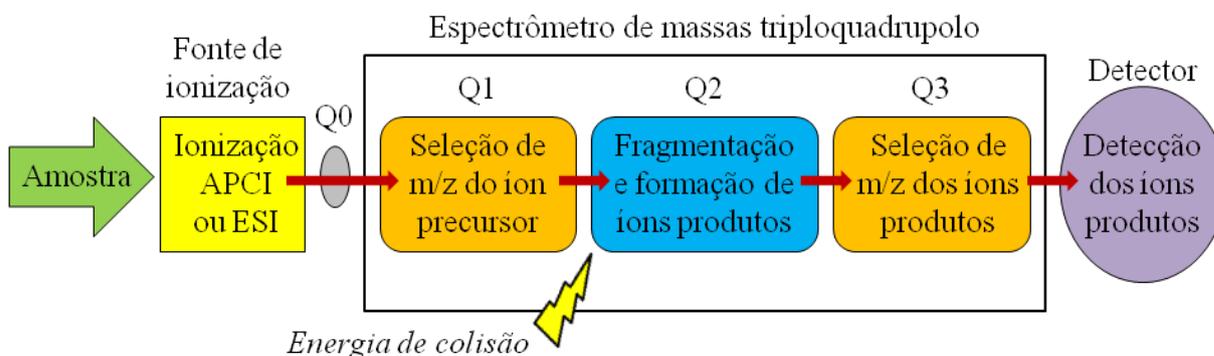


Figura 2 – Esquema representativo de espectrometria de massas sequencial.

1.7.1 Ionização de compostos

Espectrômetros de massas necessitam que as moléculas sejam ionizadas para serem selecionadas e identificadas de acordo com sua relação massa/carga (m/z). As técnicas de ionização permitem a produção de íons a partir de compostos de alta massa molecular e não voláteis, que são mecanicamente ou eletrostaticamente selecionados e separados das moléculas neutras (FERREIRA, 2009).

A ionização pode ser feita em modo positivo ou negativo. Para a ionização em modo positivo, ocorre o fornecimento de elétrons para a molécula neutra, enquanto que no modo negativo os elétrons são retirados da molécula.

1.7.1.1 Ionização por *Electrospray* (ESI)

ESI é uma técnica de ionização em que uma pequena quantidade de energia é transferida para as moléculas da substância a ser analisada, permitindo a geração de espécies carregadas do analito com pequena ou nenhuma fragmentação da molécula ionizada

(MARTINS JÚNIOR, 2005). Essa técnica ocorre a pressão atmosférica, quando a fase móvel passa por uma câmara com fluxo de gás aquecido por um capilar, no qual é aplicada uma diferença de potencial elétrico, a fim de formar um campo eletrostático. O campo elétrico criado induz o acúmulo de carga na superfície do líquido no final do capilar, formando gotículas carregadas. O gás aquecido auxilia na evaporação do solvente, que evapora da gotícula carregada, tornando-a instável pelo acúmulo de carga. Quando o acúmulo de carga torna-se maior que a tensão superficial da gota, ocorre um fenômeno chamado explosão de *Coulomb*, que faz com que a molécula do analito retenha a carga da gotícula de solvente e torne-se um íon (OLIVEIRA, 2010).

1.7.1.2 Ionização química a pressão atmosférica (APCI)

APCI é uma técnica de ionização que utiliza reações íon-molécula em fase gasosa sob pressão atmosférica. Nessa técnica, a solução contendo o analito é inserida em um nebulizador, onde é convertida em uma névoa fina por um jato de nitrogênio em alta velocidade. As gotículas formadas são deslocadas pelo fluxo de gás para um tubo de quartzo aquecido, denominado câmara de dessolvatação. O calor transferido para as gotas pulverizadas permite a vaporização da fase móvel e do analito. O gás aquecido e as moléculas do analito vaporizadas deixam a câmara e são direcionadas para a região onde ocorre uma descarga elétrica, a descarga corona. Ao evaporar, a fase móvel atua como gás ionizante e produz íons reagentes a partir do contato com o solvente nebulizado com a descarga. A descarga corona causa a formação de íons primários, que colidem com moléculas de solvente vaporizadas, formando os íons secundários reativos, os quais serão detectados (PRAKASH et al., 2007).

1.8 Validação

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia

analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento. Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são linearidade seletividade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (RIBANI et al., 2004).

O parâmetro linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A seletividade de um método de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir sua determinação em uma amostra complexa (INMETRO, 2011).

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas, e engloba os estudos de repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição: mesmos procedimento, analista, instrumento, local e repetições em um curto intervalo de tempo. A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores (RIBANI et al., 2004).

O parâmetro limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O parâmetro limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida (RIBANI et al., 2004).

Por fim, a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (INMETRO, 2011).

1.9 Legislação brasileira

Em 18 de fevereiro de 2011, foi aprovada a resolução que estabelece os limites máximos toleráveis (LMTs) de micotoxinas em alimentos. Para OTA, o LMT em polpa de uva, suco de uva, vinho e seus derivados é de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para PAT, foi estabelecido LMT apenas em polpa e suco de maçã ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$). Para citrinina e toxinas do *Alternaria*, não foi estabelecido nenhum limite máximo tolerável (BRASIL, 2011).

2 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigos a serem submetidos para a revista Química Nova.

Artigo 1: Desenvolvimento e validação de metodologia para análise de patulina em vinho através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

Artigo 2: Desenvolvimento e validação de metodologia para análise simultânea de micotoxinas em vinho através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

2.1 Artigo científico 1

Desenvolvimento e validação de metodologia para análise de patulina em vinho através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

Fernanda Poletto Dambrós

LAMIC – Laboratório de Análises Micotoxicológicas

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Neidi Garcia Penna*

Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Carlos Augusto Mallmann

LAMIC – Laboratório de Análises Micotoxicológicas

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

*ngpenna@gmail.com

Development and validation of a methodology for analysis of patulin in wine by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

ABSTRACT

Patulin is a mycotoxin produced mainly by the fungus *Penicillium expansum*. When present in fruits and derived products, may cause harmful effects to the health of the consumer. In this study was developed an analytical method using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the determination of patulin in wines. The recoveries were found between 76.7 and 89.4%. The limits of detection and quantification instruments were obtained at 1 and 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The limit of quantification of the method was 12 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The method was validated e used to analyze 105 samples of commercial wines, domestic and imported. However, any had patulin contamination.

Keywords: Patulin. Wine. HPLC/MS/MS.

INTRODUÇÃO

A patulina é uma micotoxina produzida principalmente pelo fungo *Penicillium expansum*¹, além de outras espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*² que podem estar presentes em frutas e outros produtos de origem vegetal.³ A maior fonte de contaminação por patulina são as maçãs e sucos de maçã, no entanto, cepas produtoras dessa micotoxina têm sido isoladas de uma série de outras frutas, incluindo ameixas, cerejas, damascos, peras, pêssego e uvas,⁴ bem como produtos derivados dessas frutas.⁵

Sabe-se que os sintomas agudos decorrentes do consumo de alimento contaminado com patulina podem incluir agitação, convulsões, edema, ulceração, inflamação intestinal e vômitos. Os efeitos crônicos incluem embriotoxicidade, genotoxicidade, imunotoxicidade e neurotoxicidade.⁶ No entanto, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer concluiu que não há provas suficientes de carcinogenicidade em humanos e animais, classificando a patulina no grupo 3.⁷

Em função das evidências contínuas dos efeitos negativos da patulina, muitas agências reguladoras estabeleceram limites para a sua concentração em alimentos. Na União Europeia, o limite permitido é de 50 µg L⁻¹.⁸ No Brasil, foi estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o limite máximo tolerável (LMT) de 50 µg kg⁻¹ em suco de maçã, mas nenhum limite para suco de uva ou vinho.⁹

Existem diversos métodos propostos para a detecção de patulina, incluindo análise por cromatografia em camada delgada (CCD),¹⁰ cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detector ultravioleta (UV)¹¹ e cromatografia gasosa (CG) com espectrometria de massas (MS).¹² Os métodos de CLAE e CG apresentam limites de detecção satisfatórios, porém, para análises de matrizes complexas, como sucos de frutas e vinhos, há a possibilidade de interferentes¹³ e a necessidade de derivação no processo de preparo de amostra.¹⁴ A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/MS/MS)

é considerada a técnica analítica mais avançada para a identificação e a quantificação na análise de micotoxinas. Embora a presença da patulina esteja mais comumente associada a maçãs e seus derivados, estudos devem continuar a investigar e monitorar outras variedades de frutas e seus derivados para garantir que medidas de controle de patulina sejam aplicadas a todos os produtos que possam ser contaminados com essa toxina.¹⁵ Assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um método analítico para a determinação de patulina em vinhos através da técnica de CLAE/MS/MS.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados foram acetonitrila, acetato de etila, acetato de amônio, ácido fórmico e metanol da *J.T.Baker* (EUA). A água utilizada no preparo das soluções foi purificada através do sistema *Milli-Q Gradient A10* da *Millipore* (EUA).

Padrões

O padrão de patulina utilizado foi proveniente da *Sigma-Aldrich* (Alemanha). A partir do padrão liofilizado, foi preparada uma solução estoque de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila. A solução estoque foi utilizada na preparação dos padrões intermediários para o preparo da curva de calibração e fortificação de amostras.

Fortificação da amostra “branco”

Para validação da metodologia, obteve-se uma amostra de vinho tinto não contaminada naturalmente por patulina (amostra “branco”). A amostra “branco” foi

fortificada a partir da solução padrão de 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, em três níveis de concentração diferentes: 25, 50 e 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Amostras de vinho para análise de patulina

Foram coletadas 95 amostras de vinhos tintos e 10 amostras de vinhos brancos comerciais, nacionais e importados, no período de maio a novembro de 2012, totalizando em 105 amostras. As amostras foram mantidas sob refrigeração até a realização das análises.

Extração de patulina

Para extração de patulina, adicionou-se 20 mL de acetato de etila em 1 mL de amostra de vinho e agitou-se a mistura em multi-vortex por 10 minutos. Logo, o extrato foi centrifugado a 4000 rpm, durante 5 minutos e armazenado em freezer, a temperatura de 18 °C negativos, durante 24 horas. Após esse período, coletou-se uma alíquota de 10 mL da fase superior do extrato, a qual foi submetida à secagem em banho-maria, a temperatura máxima de 39 °C, sob fluxo de nitrogênio, até total evaporação do solvente. O extrato seco foi ressuspendido em vortex, durante 1 minuto, com 200 μL de acetonitrila. A amostra ressuspendida foi diluída na proporção de 1:10 em *vial* com solução de metanol:água (1:1, V:V) e submetida à análise.

Condições cromatográficas

O equipamento utilizado para a análise cromatográfica foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1200 da *Agilent Technologies* (EUA), equipado com desgaseificador, bomba binária, amostrador automático e forno da coluna.

A coluna utilizada foi uma Eclipse XDB-C₁₈, 150 x 4,6 mm, 5 μm , marca *Agilent Technologies*. A fase móvel foi composta por uma solução aquosa de água:acetato de amônio

(fase móvel A) e uma solução orgânica de metanol:água:acetato de amônio (fase móvel B). A eluição da fase móvel foi realizada por gradiente com vazão de $1000 \mu\text{L min}^{-1}$, conforme a tabela 1. O volume de injeção foi de $20 \mu\text{L}$ e a temperatura do forno da coluna foi de $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Espectrometria de massas

O espectrômetro de massas utilizado foi da marca *Applied Biosystems*, modelo API 4000 QTrap. Duas fontes de ionização foram testadas para análise de patulina: ionização por *electrospray* (ESI) e ionização química a pressão atmosférica (APCI), ambas em modo positivo e modo negativo. Para facilitar a ionização do composto, foram testadas duas soluções com diferentes aditivos para a diluição do padrão de patulina: uma contendo acetato de amônio e outra contendo ácido fórmico. A fim de definir a melhor forma para a ionização da molécula de patulina, realizou-se uma varredura completa na faixa de 100 a 200 m/z e o monitoramento do íon formado ($m/z=155$ em modo positivo e $m/z=153$ em modo negativo), variando-se a fonte de ionização, o modo de ionização e o aditivo na solução padrão.

Após definidos a fonte e o modo de ionização, os parâmetros de massas referentes ao analito (*declustering potential* (DP), *collision energy* (CE), *collision cell exit potential* (CXP) e *entrance potential* (EP)) foram otimizados, infundindo-se solução padrão de patulina de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ diretamente no espectrômetro de massas, com vazão de $10 \mu\text{L min}^{-1}$. Os parâmetros dependentes da fonte de ionização (*collision gas* (CAD), *curtain gas* (CUR), *ion source gas 1* (GS1), *nebulizer current* (NC) e *temperature* (TEM)) foram otimizados através de análise por injeção em fluxo (FIA), utilizando um padrão de patulina de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Validação do método analítico

O método foi validado conforme as recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO).¹⁶ Os parâmetros avaliados

foram linearidade, seletividade, repetitividade e precisão intermediária, recuperação, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

Para validação do método, obteve-se uma amostra de vinho não contaminado naturalmente com patulina. A partir dessa amostra, foram feitas fortificações com padrão de patulina em três níveis de concentração, com sete replicatas de cada nível. As amostras fortificadas foram extraídas e analisadas conforme a metodologia desenvolvida e o procedimento foi repetido em três dias diferentes, por três diferentes analistas.

Parâmetros avaliados para a validação do método analítico

A faixa de trabalho (curva de calibração) foi definida a partir da injeção de padrões preparados em ordem crescente de concentração, a partir do limite de quantificação encontrado. A linearidade foi determinada a partir da equação da reta e do coeficiente de correlação (r), obtidos através do *Software Analyst*, utilizado para a quantificação do analito em estudo.

A seletividade foi verificada através da comparação entre os cromatogramas obtidos a partir da análise da amostra “branco” (não contaminada com patulina) e da amostra fortificada com padrão de patulina.

Para a avaliação da repetitividade do método, foram extraídas e analisadas amostras fortificadas em septuplicata, em três níveis de concentração. Os resultados obtidos foram avaliados conforme o coeficiente de variação (CV) entre as concentrações encontradas para cada fortificação. A precisão intermediária foi avaliada a partir da extração e análise de amostras fortificadas em três dias diferentes, por três analistas diferentes. Os resultados foram avaliados conforme o regulamento nº 401/2006 da União Europeia, que permite coeficientes de variação máximos de 20 a 30 entre os dias, dependendo da contaminação da amostra.¹⁷

A recuperação do método foi testada a partir da média e do CV encontrados pela análise de amostras fortificadas com três níveis de concentração de patulina: 25, 50 e 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os resultados foram avaliados conforme o regulamento nº 401/2006 da União Europeia, que determina que contaminações com 20 a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de patulina devem apresentar recuperações entre 70 a 105%, enquanto que contaminações acima de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ devem apresentar recuperações entre 75 a 105%.¹⁷

Para a determinação do limite de detecção foi realizada a análise da relação sinal/ruído, que deve ser, no mínimo, igual a 3. Para a determinação do limite de quantificação, foram injetados diferentes padrões em ordem crescente de concentração. O padrão que apresentou sinal com relação sinal/ruído, no mínimo, igual a 10, ou seja, 10 vezes superior à média de oscilações da linha base, foi definido como limite de quantificação.

A robustez do método foi avaliada a partir de variações de $\pm 5\%$ nas condições cromatográficas. Os parâmetros avaliados foram vazão, temperatura da coluna e coluna cromatográfica. A concentração da solução-padrão utilizada para comparação dos resultados obtidos pelo método desenvolvido e pelos métodos com variações cromatográficas foi de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Ensaio de proficiência

A fim de avaliar a reprodutibilidade do método desenvolvido, foi realizada a análise de uma amostra certificada pelo FAPAS (*Food Analysis Performance Assessment Scheme*). Devido à indisponibilidade de amostra certificada de vinho com patulina, utilizou-se uma amostra certificada de suco de maçã, contendo 55,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de patulina, a fim de avaliar a eficácia do método.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização dos parâmetros de massas dependentes do composto

A fonte escolhida para ionização do composto foi a APCI, uma vez que o sinal gerado pelo analito obteve maior intensidade e estabilidade nesse modo do que no gerado em ESI. O modo que apresentou maior intensidade do sinal foi o modo negativo, gerando o íon de $m/z=152,9$. Este resultado confirma o encontrado por Sewram e colaboradores,¹⁸ porém difere do método desenvolvido por Tamura e colaboradores,¹⁹ que optaram pela análise de patulina com ionização ESI, para conseguir analisar 14 micotoxinas simultaneamente. O aditivo escolhido para diluição do padrão e, conseqüentemente, compor a fase móvel, foi o acetato de amônio.

Após definida a forma de ionização, foram realizados experimentos de varredura MS/MS, como *product ion*, *precursor ion* e *neutral loss*, a fim de definir os melhores parâmetros para o monitoramento do íon gerado e seus respectivos fragmentos. Os fragmentos escolhidos para compor o método de análise, ou seja, aqueles que apresentaram maior intensidade do sinal foram os de $m/z=108,9$, $m/z=134,8$ e $m/z=124,8$. Os parâmetros dependentes do composto definidos para o método estão demonstrados na tabela 2.

Otimizações dos parâmetros de massas dependentes da fonte de ionização

Os parâmetros dependentes da fonte de ionização foram obtidos através de análise por injeção em fluxo (FIA), a partir de otimização automática realizada pelo *software*. Durante a otimização automática, diversas combinações de valores dos parâmetros são variadas, a fim de definir a combinação que melhor detecta o analito em estudo. Assim, os valores otimizados para análise de patulina foram CAD=médio, CUR=10, NC=-5, TEMP=500 e GS1=50.

Validação do método analítico

Linearidade

A faixa de trabalho definida foi de 3 a 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sendo que os pontos que compõe a curva de calibração são 3, 5, 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g kg}^{-1}$, correspondentes a uma contaminação na amostra de 12, 20, 40, 80, 120 e 160 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. A linearidade da curva de calibração é comprovada pelo coeficiente de determinação $R^2=0,9998$. A partir dos valores obtidos, conclui-se que o modelo é adequado, pois o coeficiente de correlação foi maior que 0,999, considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

Seletividade

Seletividade de um método de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa.²⁰ Ao comparar o cromatograma da amostra “branco” com o cromatograma de uma amostra fortificada com padrão de patulina, verificou que não há nenhum pico cromatográfico formado no mesmo tempo de retenção e com os mesmo fragmentos de patulina, comprovando, assim, que o método é seletivo. Os cromatogramas podem ser visualizados na figura 1.

Repetitividade, Precisão intermediária e Recuperação

Através da análise das amostras fortificadas, obteve-se a repetitividade do método, que apresentou CV igual a 8,4% para as fortificações de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 5,8% para as fortificações de 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 3,5% para as fortificações de 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A precisão intermediária, avaliada durante três dias de repetição das análises, apresentou CV igual a 9,1%, 6,9% e 8,5% respectivamente. A recuperação média obtida para

o primeiro nível de fortificação foi de 89,4%, enquanto que no segundo nível foi de 84,2% e no terceiro nível igual a 81,4%. A recuperação média entre todas as fortificações, portanto, a recuperação global do método foi igual a 89,4%. Comparando com os parâmetros estabelecidos (Tabela 3) pelo regulamento nº 401/2006 da União Europeia, todos os resultados apresentados (Tabela 4) estão de acordo com os valores aceitáveis pela norma, comprovando a validade do método.¹⁷

De acordo com dados da literatura, Malysheva e colaboradores²¹ desenvolveram um método cromatográfico acoplado a espectrometria de massas para a determinação de patulina, no qual se obteve recuperações de 104 a 111% e um CV máximo igual a 22%. Em outro trabalho, Iha e colaboradores²² encontraram recuperações de patulina em suco de maçã entre 80,5 e 83%, com CV máximo de 5,7, porém a técnica de análise utilizada foi CLAE acoplada a detector de arranjo de diodos.

Limite de detecção e Limite de quantificação

O limite de detecção encontrado foi de 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O limite de quantificação instrumental foi de 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, o que corresponde a um limite de quantificação do método de 12 $\mu\text{g kg}^{-1}$, após correção pelo fator de diluição. Os cromatogramas podem ser visualizados na figura 2.

Robustez

As variações cromatográficas realizadas para análise da robustez não interferiram nos resultados, comprovando, assim, que o método desenvolvido é robusto. Pequenas alterações, como uma mudança sutil no tempo de retenção, foram observadas, porém os resultados obtidos, quando comparados ao método original, apresentaram boa exatidão e precisão, com coeficientes de variação aceitáveis. Os resultados podem ser observados na tabela 5.

Ensaio de proficiência

A análise da amostra de suco de maçã proveniente do FAPAS resultou em uma contaminação de $43,5 \mu\text{g kg}^{-1}$, apresentando assim uma recuperação satisfatória de 78,8%. Além da recuperação obtida, o método é avaliado através do cálculo do *Z-score*, que deve encontrar-se entre -2 e 2, para ser considerado aceitável. O resultado obtido para o FAPAS 1640, expresso em *Z-score*, foi de -1,2, confirmando que o método analítico apresenta reprodutibilidade adequada.

Aplicação do método validado em amostras de vinhos

Não foi encontrada nenhuma amostra contaminada com patulina, entre as 105 amostras de vinhos analisadas através do método desenvolvido nesse estudo. O mesmo ocorreu quando Tamura e colaboradores¹⁹ analisaram 14 vinhos tintos e 13 vinhos brancos no Japão. Em 2009, Bara²³ analisou 60 amostras de vinhos na Romênia e encontrou apenas três amostras contaminadas, em concentrações entre 25 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto que 50% das amostras de suco de uva analisadas apresentaram contaminação. A partir desses resultados, supõe-se que alguma das etapas que compõe a transformação do suco de uva em vinho pode desestabilizar ou degradar a molécula de patulina. A adição de conservantes, como o dióxido de enxofre (SO_2), pode ser uma etapa responsável pela descontaminação do suco que dará origem ao vinho. Outra hipótese para a ausência de patulina nas amostras analisadas é a baixa ocorrência dessa micotoxina em uvas. Em um estudo realizado no Paraná, nenhuma das 40 amostras de uvas analisadas apresentou contaminação com patulina.²⁴ No entanto, essas uvas estavam contaminadas com outra espécie de fungo, que não o *Penicillium*, o que pode ter impedido o seu crescimento e a consequente produção de patulina. Em outro estudo, fungos produtores de patulina foram isolados de todos os cultivares analisados destinados à produção de vinhos, sugerindo, assim, contaminação nas uvas por essa micotoxina.²⁵ Portanto, é

importante que continue a investigação da presença desse contaminante em uvas e seus subprodutos, como sucos e vinhos, uma vez que já foi relatada a presença dessa micotoxina nessas matrizes.

CONCLUSÃO

O método desenvolvido apresentou resultados satisfatórios em todas as etapas de validação, mostrando ser sensível, preciso e exato, portanto, adequado para a quantificação de patulina em amostras de vinhos. Nenhuma amostra analisada apresentou contaminação com essa micotoxina. Conclui-se, assim, que o consumo de vinhos não apresenta riscos à saúde humana, quando se refere à contaminação por patulina.

REFERÊNCIAS

1. Sabino, M. Em *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Barkai-Golan, R.; Paster, N., eds.; Elsevier: San Diego, 2008, cap. 12.
2. Steiman, R.; Seigle-Murandi, F., Sage, L.; Krivobok, S.; *Mycopathologia* **1989**, *105*, 129–133.
3. Piemontese, L.; Solfrizzo, M.; Visconti, A.; *Food Additives & Contaminants* **2005**, *22*, 437–442.
4. Lugauskas, A.; Raudoniene, V.; Veistytė, L.; *Annals of Agricultural Environmental Medicine* **2005**, *12*, 109–118.
5. Spadaro, D.; Garibaldi, A.; Gullino, M. L.; *Food Additives & Contaminants* **2008**, *1*, 134–139.
6. Zaied, C.; Abid, S.; Hlel, W.; Bacha, H.; *Food Control* **2013**, *31*, 263–267.
7. <http://www.iarc.fr>, acessada em Outubro de 2012.

8. Commission Regulation N° 1425/2003 of 11 August 2003.
9. <http://www.brasil.gov.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>, acessada em Outubro de 2012.
10. Welke J. E.; Hoeltz, M.; Dottori, H. A.; Noll, I. B.; *Food Control* **2009**, *20*, 48–52.
11. Barreira, M. J. ; Alvito, P. C.; Almeida, C. M. M.; *Food Chem.* **2010**, *121*, 653–658.
12. Cunha, S. C.; Faria, M. A.; Fernandes, J. O.; *Food Chem.* **2009**, *115*, 352–359.
13. Boonzaaijer, G.; Bobeldijk, I.; Van Osenbruggen, W. A.; *Food Control* **2005**, *16*, 587–591.
14. Kataoka, H.; Itano, M.; Ishizaki, A.; Saito, K.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3746–3750.
15. Moake, M. M.; Padilla-Zakour, O. I.; Worobo, R. W.; *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2005**, *1*, 1–21.
16. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientação sobre validação de métodos analíticos*, 4ª ed., **2011**, 19 p.
17. Commission Regulation (EC) N° 401/2006. *Official Journal of the European Union* **2006**.
18. Sewram, V.; Nair, J. J.; Nieuwoudt, T. W.; Leggott, N. L.; Shephard, G. S.; *Journal of Chromatography A* **2000**, *897*, 365–374.
19. Tamura, M.; Takahashi, A.; Uyama, A.; Mochizuki, N.; *Toxins* **2012**, *4*, 476–486.
20. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771–780.
21. Malysheva, S. V.; Mavungu, J. D.; Boonen, J.; Spiegeleer, B.; Goryacheva, I. Y.; Vanhaecke, L.; Saeger, S.; *Journal of Chromatography A* **2012**, *1270*, 334–339.
22. Iha, M. H.; Souza, S. V. C.; Sabino, M.; *Food Control* **2009**, *20*, 569–574
23. Bara, C.; *Natural Resources and Sustainable Development* **2009**, 199–202.
24. Caldas, G. M. M.; Oliveira, R. C., Tessmann, D. J.; Junior, M. M.; *Ciência Rural* **2008**, *38*, 14–18.

25. Chunmei, J.; Junling, S.; Qi'na, H.; Yanlin, L.; *Food Control* **2013**, *31*, 5–13.

Figura 1 – Cromatogramas de amostra sem contaminação com patulina (A) e de amostra fortificada com patulina (B).

Figura 2 – Cromatograma referente às soluções padrão de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, representando o limite de detecção do método (A) e de $3 \mu\text{g kg}^{-1}$, representando o limite de quantificação do método (B).

Figura 1

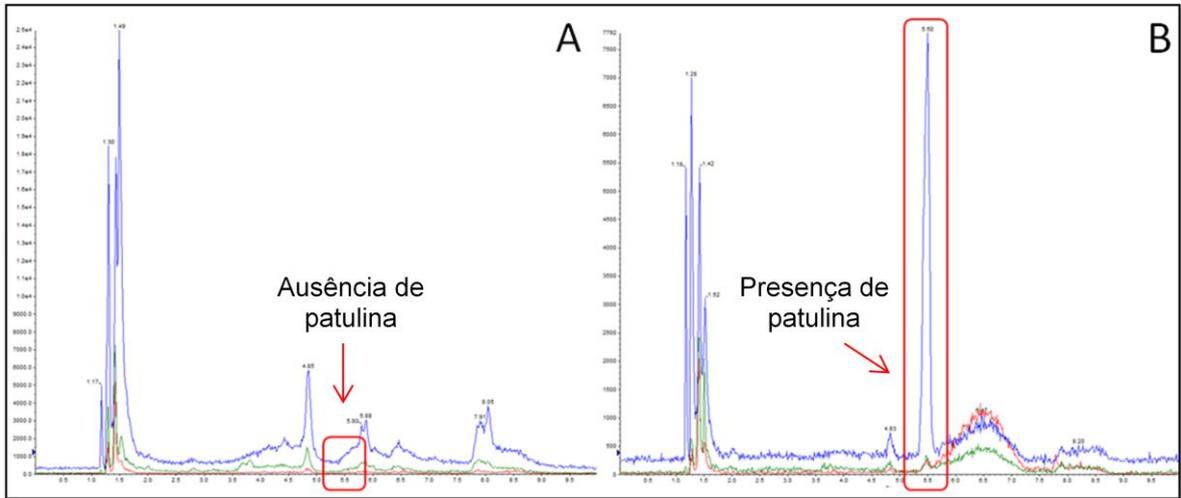


Figura 2

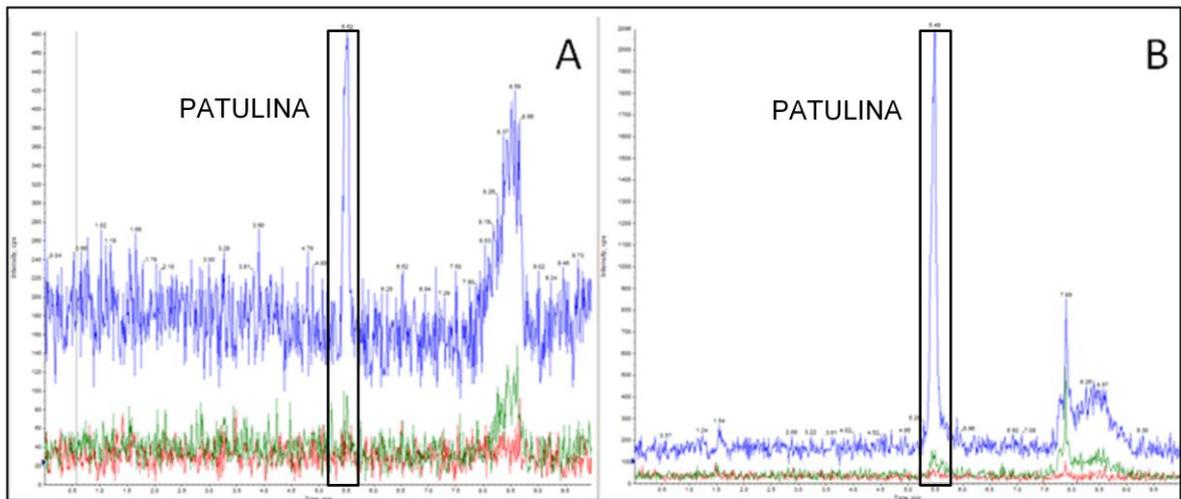


Tabela 1 – Gradiente de fase móvel (fases aquosa e orgânica) para a determinação de patulina através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Tempo (min)	Vazão ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Fase aquosa (%)	Fase orgânica (%)
0,00	1000	95	5
1,00	1000	95	5
1,01	1000	90	10
2,00	1000	90	10
2,01	1000	85	15
3,00	1000	85	15
3,01	1000	70	30
5,50	1000	70	30
5,51	1000	0	100
6,50	1000	0	100
6,51	1000	70	30
7,20	1000	70	30
7,21	1000	95	5
10,00	1000	95	5

Tabela 2 – Parâmetros do espectrômetro de massas referentes ao analito patulina.

Íon precursor (m/z)	Íon produtos (m/z)	<i>Declustering potential</i> (V)	<i>Collision energy</i> (V)	<i>Collision cell exit potential</i> (V)
	108,9	-35	-14	-5
152,9	124,8	-35	-14	-21
	134,8	-35	-12	-5

Tabela 3 – Parâmetros de recuperação estabelecidos no regulamento nº 401/2006 pela União Europeia.

Nível ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CV _{intradia} (%)	CV _{entre os dias} (%)	Recuperação (%)
< 20	≤ 30	≤ 40	50 a 120
20 – 50	≤ 20	≤ 30	70 a 105
> 50	≤ 15	≤ 25	75 a 105

*Coeficiente de variação

Tabela 4 – Resultados dos testes de repetitividade, precisão intermediária e recuperação.

Fortificação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Repetitividade		Precisão intermediária	
	Recuperação Média*	CV**	Recuperação Média***	CV**
	(%)	(%)	(%)	(%)
25	84,5	8,4	89,4	9,1
50	79,3	5,8	84,2	6,9
75	76,7	3,5	81,4	8,5

*Média entre 7 replicatas analisadas no mesmo dia. ** Coeficiente de variação. ***Média entre 21 replicatas analisadas em três dias diferentes.

Tabela 5 – Resultados obtidos nos ensaios de robustez.

Variável	Área do pico (<i>counts</i>)	Altura do pico (cps)	Recuperação (%)	Tempo de retenção (min)	CV*
Sem variação cromatográfica	$2,93 \times 10^{-4}$	$6,47 \times 10^{-3}$	100,0	5,53	0,0
Vazão $950 \mu\text{L min}^{-1}$	$2,50 \times 10^{-4}$	$6,02 \times 10^{-3}$	85,32	5,72	11,2
Vazão $1050 \mu\text{L min}^{-1}$	$2,56 \times 10^{-4}$	$5,62 \times 10^{-3}$	87,37	5,33	9,5
Temperatura da coluna $38 \text{ }^\circ\text{C}$	$2,47 \times 10^{-4}$	$6,05 \times 10^{-3}$	84,30	5,54	12,0
Temperatura da coluna $40 \text{ }^\circ\text{C}$	$2,11 \times 10^{-4}$	$4,13 \times 10^{-3}$	72,01	5,42	23,0
Coluna C_{18} NST	$2,59 \times 10^{-4}$	$4,96 \times 10^{-3}$	88,40	5,52	8,7

*Coeficiente de variação calculado entre a área do pico obtido pelo método sem variação cromatográfica e a área do pico obtido pelo método com variação cromatográfica.

2.2 Artigo científico 2

Desenvolvimento e validação de metodologia para análise simultânea de micotoxinas em vinho através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

Fernanda Poletto Dambrós

LAMIC – Laboratório de Análises Micotoxicológicas

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Neidi Garcia Penna*

Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Carlos Augusto Mallmann

LAMIC – Laboratório de Análises Micotoxicológicas

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

*ngpenna@gmail.com

Development of an analytical method for analysis of mycotoxins in wine by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

ABSTRACT

An analytical method using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry was developed for the simultaneous determination of four mycotoxins in wines: alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), citrinin (CIT) and ochratoxin A (OTA). In order to obtain a quick result of analysis, were discarded extraction steps and developed an analytical method with simple sample preparation: only one dilution step. The recoveries were found between 86.8 and 100.3%. The limits of detection and quantification obtained were 0.003 and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for AOH, AME and OTA and 0.05 and 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ for CIT, respectively. The method was validated and used for analysis of 111 samples of commercial wines. The occurrence was 72.9% of AOH, AME 43.2% and 1.8% of OTA, any of the samples were contaminated by CIT.

Keywords: Mycotoxin. Wine. HPLC/MS/MS.

INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos filamentosos capazes de contaminar diversos alimentos. Cereais estão entre as culturas mais estudadas para contaminação por essas toxinas, mas frutas e seus produtos processados, como uva e vinho, podem também representar uma fonte potencial de risco.¹

Ocratoxina A (OTA) é a micotoxina mais estudada em vinhos, porém outras micotoxinas, como alternariol (AOH) e alternariol monometil éter (AME) também são encontradas. A OTA é produzida pelas espécies *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus niger*, entre outras, e constitui uma séria ameaça para a saúde humana e animal, pois é uma potente nefrotoxina, além de apresentar propriedades imunossupressoras, teratogênicas e cancerígenas.² A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) classificou OTA no Grupo 2B, como possível cancerígeno para os seres humanos.³ Atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece um limite máximo tolerável igual a 2 µg L⁻¹ de OTA em vinhos, o mesmo limite estabelecido pela União Europeia.^{4,5} Outra característica da OTA é a sua coocorrência com outra micotoxina, chamada citrinina (CIT), que também é produzida por *Penicillium verrucosum*, além de outros fungos como *P. citrinum*, *P. expansum*, *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber*.⁶

CIT é uma micotoxina menos estudada que OTA e sua presença em vinhos, apesar de possível, ainda não foi relatada. Os efeitos deletérios causados por essa toxina não são muito bem conhecidos, mas sabe-se que CIT possui propriedades embriotóxicas, genotóxicas e carcinogênicas, além de causar nefrotoxicidade em animais domésticos, como cães, coelhos e bovinos. Quando em coocorrência com OTA, as duas micotoxinas podem agir em sinergismo, potencializando seus efeitos e provocando maiores danos aos consumidores do alimento contaminado.⁷

AOH e AME são produzidas por fungos do gênero *Alternaria*, principalmente pela espécie *Alternaria alternata*. Seus efeitos à saúde humana ainda não foram totalmente elucidados, no entanto, há uma grande preocupação em relação a sua toxicidade.⁸ Os poucos relatos existentes descrevem a atividade genotóxica de AOH em mamíferos⁹ e seu potencial efeito carcinogênico em humanos.¹⁰ A presença de AOH e AME tem sido muito relatada em vinhos, sendo que, na maioria das vezes, a contaminação é maior em vinhos tintos do que em vinhos brancos. Isso ocorre porque o mosto destinado à produção de vinhos tintos permanece durante um longo período em contato com as cascas da uva, na etapa de maceração, ao contrário da produção de vinho branco, em que raramente a maceração é realizada.

Devido aos possíveis efeitos deletérios à saúde humana, há necessidade de monitorar essas quatro micotoxinas em vinhos. São encontrados na literatura diversos métodos analíticos para a determinação de OTA em vinhos, inclusive métodos que utilizam cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. No entanto, são raros os métodos descritos para a determinação de multi-micotoxinas em vinhos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico capaz de identificar e quantificar simultaneamente quatro micotoxinas em amostras de vinhos, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas sequencial (MS/MS), bem como avaliar a presença das mesmas em vinhos comerciais, nacionais e importados.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados foram acetonitrila, acetato de amônio e metanol da *J.T. Baker* (EUA). A água utilizada no preparo das soluções foi purificada através do sistema *Milli-Q Gradient A10* da Millipore (EUA).

Padrões

Os padrões de AOH, AME, CIT e OTA utilizados foram todos provenientes da *Sigma-Aldrich* (Alemanha). O padrão CIT foi obtido em solução de acetonitrila, pronto para ser usado, com concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir dos padrões liofilizados de AOH, AME e OTA foram preparadas três soluções estoque, as quais foram utilizadas na preparação dos padrões intermediários para o preparo da curva de calibração e fortificação de amostras. As soluções estoque de AOH e AME foram preparadas em metanol, com concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto a solução estoque de OTA foi preparada em acetonitrila, com concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Fortificação de amostra

Para avaliação da recuperação e da repetitividade do método, fortificou-se com padrões de micotoxinas uma amostra de 10 mL de vinho, previamente analisada em espectrômetro de massas, não contaminada com os compostos a serem analisados. Para a fortificação, preparou-se, a partir das soluções estoque, uma solução intermediária de cada micotoxina, com concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, em metanol:água (1:1, V:V).

Amostras de vinho para análise de micotoxinas

Foram coletadas 101 amostras de vinhos tintos e 10 amostras de vinhos brancos comerciais, nacionais e importados, no período de maio de 2012 a janeiro de 2013, totalizando em 111 amostras. As amostras foram mantidas sobre refrigeração até a realização das análises.

Preparação de amostras

Para obter um método analítico rápido e econômico, optou-se por uma etapa de preparação de amostras simples, rápida e de baixo custo e, para isto, eliminaram-se etapas de extração. Assim, as amostras de vinhos a temperatura ambiente foram agitadas em vortex por 10 segundos e, em seguida, diluídas (1:200) em solução de metanol:água (1:1, V:V).

Equipamentos e condições da CLAE/MS/MS

O equipamento utilizado para a análise cromatográfica foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1200 da *Agilent Technologies* (EUA), equipado com desgaseificador, bomba binária, amostrador automático e forno da coluna acoplado a espectrômetro de massas. A coluna utilizada foi uma Eclipse XDB-C₈, 150 x 4,6 mm, 5 µm, marca *Agilent Technologies*, mantida a temperatura de 25 °C.

Para a obtenção de cromatogramas bem definidos, com melhor relação sinal/ruído, em um curto intervalo de tempo, foram testadas diferentes proporções de fase móvel. A fase móvel utilizada em gradiente era composta por uma solução aquosa de água:acetato de amônio (fase móvel A) e uma solução orgânica de metanol:água:acetato de amônio (fase móvel B).

O espectrômetro de massas utilizado foi da marca *Applied Biosystems* modelo API 5500 QTrap. Primeiramente, infundiu-se uma solução padrão de cada uma das micotoxinas separadamente para encontrar os espectros referentes a cada um dos compostos, através de experimentos de varredura em modo MS. Os experimentos de varredura foram realizados a partir da ionização por *electrospray* (ESI) e da ionização química a pressão atmosférica (APCI), ambas em modo positivo e em modo negativo.

Após definidos a fonte e o modo de ionização, os parâmetros de massas referentes ao analito (*declustering potential* (DP), *collision energy* (CE), *collision cell exit potential* (CXP)

e *entrance potential* (EP)) foram otimizados, infundindo-se as soluções padrão de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada micotoxina diretamente no espectrômetro de massas, com vazão de $10 \mu\text{L min}^{-1}$. Os parâmetros dependentes da fonte de ionização (*collision gas* (CAD), *curtain gas* (CUR), *ion source gas 1* (GS1), *ion source gas 2* (GS2), *temperature* (TEM) e *ion spray voltage* (IS)) foram otimizados através de análise por injeção em fluxo (FIA), utilizando soluções padrão de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de AOH, AME, CIT e OTA.

Validação do método analítico

O método foi validado conforme as recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO).¹¹ Os parâmetros avaliados foram linearidade, seletividade, repetitividade e precisão intermediária, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação.

Para validação do método, obteve-se uma amostra de vinho que não apresentou picos cromatográficos correspondentes aos compostos analisados. A partir dessa amostra, foram feitas fortificações com soluções padrões de AOH, AME, CIT e OTA em três níveis de concentração, com sete replicatas de cada nível. As amostras fortificadas foram agitadas em vortex, diluídas 200 vezes em metanol:água (1:1, V:V) e analisadas conforme o método cromatográfico desenvolvido. O procedimento foi repetido em três dias diferentes, por três diferentes analistas.

Parâmetros avaliados para a validação do método analítico

A faixa de trabalho (curva de calibração) foi definida a partir da injeção de padrões preparados em ordem crescente de concentração, a partir do limite de quantificação encontrado. A linearidade foi determinada a partir da equação da reta e do coeficiente de correlação (r), obtidos através do *Software Analyst*, utilizado para a quantificação do analito

em estudo. Para a determinação do limite de detecção foi realizada a análise da relação sinal/ruído, que deve ser maior ou igual a 3. Para a determinação do limite de quantificação foram injetados diferentes padrões em ordem crescente de concentração. O padrão que apresentou sinal com relação sinal/ruído, no mínimo, igual a 10, ou seja, 10 vezes superior à média de oscilações da linha base, foi definido como limite de quantificação.

A recuperação do método foi testada a partir da média e do coeficiente de variação (CV) encontrados pela análise de amostras fortificadas com três níveis de concentração diferentes. Para AOH, AME e OTA, os níveis de fortificação foram de 2, 4 e 8 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para CIT, os níveis foram de 40, 80 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados foram avaliados conforme o regulamento nº 401/2006 da União Europeia, que determina que contaminações com 1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de OTA devem apresentar recuperações entre 70 a 110%.¹² Como não há recomendações para as demais micotoxinas, utilizou-se, para essa validação, os parâmetros estabelecidos para contaminações com OTA.

Para a avaliação da repetitividade do método, foram extraídas e analisadas amostras fortificadas em septuplicata, em três níveis de concentração. Para AOH, AME e OTA, os níveis de fortificação foram de 2, 4 e 8 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para CIT, os níveis foram de 40, 80 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados obtidos foram avaliados conforme o CV entre as concentrações encontradas para cada fortificação. A precisão intermediária foi avaliada a partir da extração e análise de amostras fortificadas em três dias diferentes, por três analistas diferentes. Os resultados foram avaliados conforme o regulamento nº 401/2006 da União Europeia, que estabelece que o CV máximo entre os dias seja no máximo 30 para validação de OTA.¹²

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Condições CLAE/MSMS

Cromatografia

As micotoxinas são substâncias com uma ampla faixa de polaridade, portanto, uma fase móvel com grau variável de hidrofobicidade durante a corrida cromatográfica de cada análise é necessária. Assim, a cromatografia foi iniciada com maior proporção de solvente aquoso, para eluição das micotoxinas mais polares, com aumento gradual de solvente orgânico, para posterior eluição das micotoxinas mais apolares. Os picos cromatográficos referentes a eluição de cada uma das micotoxinas estão demonstrados na figura 1.

O gradiente de eluição da fase móvel mais eficiente para a separação dos compostos foi realizado com vazão de $1000 \mu\text{L min}^{-1}$. Nos primeiros 2 minutos, a fase móvel era composta por 60% de fase aquosa e 40% de fase orgânica. A partir de 2 minutos, a composição foi mudando gradualmente, até que as porcentagens de fases aquosa e orgânica se igualassem em 50% em 3 minutos. De 3 a 5,5 minutos, a porcentagem de fase orgânica foi aumentando até 100%, a qual se manteve durante 2,5 minutos, quando a composição da fase móvel voltou às condições iniciais de equilíbrio. O tempo total da análise cromatográfica foi de 10 minutos, resultando em uma determinação rápida de multi-toxinas. O volume de injeção do método foi de $20 \mu\text{L}$. O gradiente de fase móvel pode ser observado na figura 2.

Otimização dos parâmetros de massas

A fonte de ionização por ESI apresentou sinais de maior intensidade para os quatro analitos quando comparados aos sinais obtidos por APCI, sendo assim, a fonte escolhida para a elaboração do método. Quanto à polaridade da ionização, AOH e AME apresentaram melhor padrão de fragmentação no modo negativo, enquanto que CIT e OTA foram analisadas em modo positivo. Assim, há uma troca de polaridade de ionização durante a corrida cromatográfica, que ocorre em 7,23 minutos (Figura 2). Os parâmetros otimizados em modo negativo e positivo para cada fragmento estão demonstrados na tabela 1.

Os parâmetros dependentes da fonte de ionização foram obtidos através de análise por injeção em fluxo, a partir de otimização automática realizada pelo *software*. Durante a otimização automática, diversas combinações de valores dos parâmetros foram testadas, a fim de definir a melhor combinação para a detecção dos analitos. Assim, os valores otimizados para a determinação de AOH e AME foram CAD=médio, CUR=15, GS1=50, GS2=50, TEMP=650 e IS=-4500, enquanto que para CIT e OTA foram CAD=médio, CUR=15, GS1=50, GS2=50, TEMP=650 e IS=5500.

Validação do método analítico

O desempenho do método foi avaliado para cada micotoxina em diferentes níveis de contaminação e os resultados foram comparados com os parâmetros recomendados pelo INMETRO.¹¹ O método apresentou linearidade satisfatória na faixa de trabalho relevante para as quatro micotoxinas, apresentando um R^2 acima de 0,999. O limite de detecção instrumental foi de $0,003 \mu\text{g L}^{-1}$ para AOH, AME e OTA e de $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ para CIT. O limite de quantificação instrumental e, portanto, o primeiro ponto da curva de calibração foi de $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$ para AOH, AME e OTA e de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para CIT. O limite de quantificação para amostras, considerando um fator de diluição de 200 vezes, foi de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para AOH, AME e OTA e de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para CIT. Os resultados de linearidade e de sensibilidade são apresentados na tabela 2.

A partir da análise das amostras fortificadas verificou-se a repetitividade do método, que apresentou resultados satisfatórios quando comparados ao regulamento nº 401/2006 da União Europeia. Os coeficientes de variação obtidos para as quatro micotoxinas ficaram todos abaixo de 11, independentemente do nível de fortificação. A precisão intermediária, avaliada durante três dias de repetição das análises e as recuperações médias obtidas também

atenderam à regulamentação, comprovando a validade do método. Os resultados de repetitividade, precisão intermediária e recuperações médias estão demonstrados na tabela 3.

Aplicação do método validado em amostras de vinhos

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos quanto à presença das micotoxinas nas amostras de vinhos analisadas. Entre essas amostras, 81 apresentaram contaminação com AOH, sendo que as concentrações variaram entre 1,03 e 21,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, demonstrando um alto índice de positividade (72,9%). Apenas dois vinhos brancos apresentaram contaminação, as quais ficaram em torno de 1,03 $\mu\text{g L}^{-1}$. Quanto à presença de AME, 48 (43,2%) amostras estavam contaminadas, sendo que todas elas eram de vinhos tintos. Esses resultados são similares aos os obtidos por Scott e colaboradores,¹³ que encontraram AOH em 83% dos vinhos tintos analisados, em níveis de 0,27 a 19,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ e AME em baixas concentrações. Quanto aos vinhos brancos analisados, apenas 13% das amostras estavam contaminadas, todas com concentrações de AOH e AME inferiores a 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. A menor ocorrência de micotoxinas em vinhos brancos pode ser devido às diferenças durante a produção dos vinhos. Nos vinhos tintos, sempre há a etapa de maceração, em que o mosto das uvas fica em contato com as cascas em média, durante seis dias. As cascas são as partes das uvas com maior contaminação fúngica, o que aumenta a probabilidade de micotoxinas. Na produção dos vinhos brancos, nem sempre a maceração é realizada, sendo que, quando executada, ocorre por um período muito curto (um dia), o que diminui a contaminação do mosto por fungos presentes nas cascas.¹⁴

Nenhuma amostra de vinho apresentou contaminação com CIT nos limites quantificáveis. Não há na literatura algum estudo que demonstre a presença de citrinina em vinhos. Há a possibilidade de haver contaminação com CIT em níveis menores que o limite

de detecção definido no método proposto, resultando, portanto, em 100% de amostras negativas.

Quanto à presença de OTA, apenas duas amostras, ambas de vinho tinto, estavam contaminadas, sendo que o nível de contaminação apresentado é menor que o limite máximo tolerável pela legislação. Em um estudo realizado no Rio de Janeiro, em 2004, analisaram-se 106 amostras de vinhos, sucos de uva e polpa congelada utilizando colunas de imunoafinidade e CLAE. Entre as amostras de vinho, 24% apresentaram contaminação com OTA, com níveis que variaram de 0,028 a 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que as maiores concentrações foram encontradas nos vinhos tintos.¹⁵ Já em uma pesquisa no Chile, realizada por Saelzer e colaboradores,¹⁶ nenhuma das amostras analisadas de vinho tinto apresentaram contaminação com OTA. Esses resultados confirmam o observado por CRUZ e colaboradores,¹⁷ que afirmam que vinhos produzidos em regiões de baixas latitudes geralmente apresentam maior contaminação com OTA do que os vinhos produzidos em latitudes mais altas, onde o clima não é tão favorável ao crescimento dos fungos produtores.

CONCLUSÃO

O método de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando espectrometria de massas com modo de ionização ESI negativo e positivo foi desenvolvido para análise de micotoxinas em vinhos.

O método apresentou ótimos resultados nos parâmetros avaliados para comprovação de sua eficácia, podendo assim ser utilizado para análise de AOH, AME, CIT e OTA em vinhos.

A aplicação do método em amostras de vinhos comerciais, nacionais e importados, demonstrou uma alta positividade de contaminação com AOH (72,9%) e AME (43,2%), baixa ocorrência de OTA (1,8%) e nenhuma contaminação com CIT.

REFERÊNCIAS

1. Battilani, P.; Barbano, C.; Logrieco, A. Em *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Barkai-Golan, R.; Paster, N., eds.; Elsevier: San Diego, 2008, cap. 1.
2. Spadaro, D.; Lorè, A.; Garibaldi, A.; Gullino, M.L.; *Food Control* **2010**, *21*, 1294–1297.
3. <http://www.iarc.fr>, acessada em Outubro de 2012.
4. <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>, acessada em Outubro de 2012.
5. Commission Regulation N° 683/2004 of 13 April 2004. *Official Journal of the European Union* **2004**, L106/3.
6. Cabañes, F. J.; Abarca, M. L.; Bragulat, M.R.; Castellá, G. Em *Micotoxinas en alimentos*. Soriano, J. M., eds.; Díaz de Santos: Madrid, 2007, p. 29–61.
7. Bragulat, M. R.; Martínez, E.; Castellá, G.; Cabañes, F. J.; *International of Food Microbiology* **2008**, *126*, 43–48.
8. Bensassi, F.; Gallerne, C.; Dein, O. S. E.; Hajlaoui, H. B.; Lemaire, C.; *Toxicology in Vitro* **2012**, *26*, 915–923.
9. Pfeiffer, E.; Eschbach, S.; Metzler, M.; *Mycotoxin Research* **2007**, *23*, 152–157.
10. Ostry, V.; *World Mycotoxin Journal* **2008**, *1*, 175–188.
11. INMETRO. *Orientação sobre validação de métodos analíticos* **2011**. 19 p.
12. Commission Regulation (EC) N° 401/2006. *Official Journal of the European Union* **2006**.
13. Scott, P. M.; Lawrence, G. A.; Lau, B. P.; *Mycotoxin Research* **2006**, *22*, 142–147.
14. Simon, T. T., *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2006.
15. Rosa, C. A. R.; Magnoli, C. E.; Fraga, M. E.; Dalcero, A. M.; Santana, D. M. N.; *Food Additives and Contaminants* **2004**, *21*, 358–364.

16. Saelzer, R.; Vega, M.; Retamal, A.; Rios, G.; Herlitz, E. *Colagro IX* **2002**.
17. Cruz, M. L. F.; Mansilla, M. L.; Tadeo, J. L. *Journal of Advanced Research* **2010**, *1*, 113–122.

Figura 1 – Cromatogramas das micotoxinas demonstrando o sinal gerado por cada íon produto separadamente. Picos referentes ao padrão com $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME) e ocratoxina A (OTA) e de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de citrinina (CIT).

Figura 2 – Cromatograma de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), citrinina (CIT) e ocratoxina A (OTA) resultante da soma dos sinais gerados pelos íons produtos, demonstrando o tempo de retenção dos analitos e o momento da troca de polaridade da ionização (troca do modo positivo para o modo negativo).

Figura 1

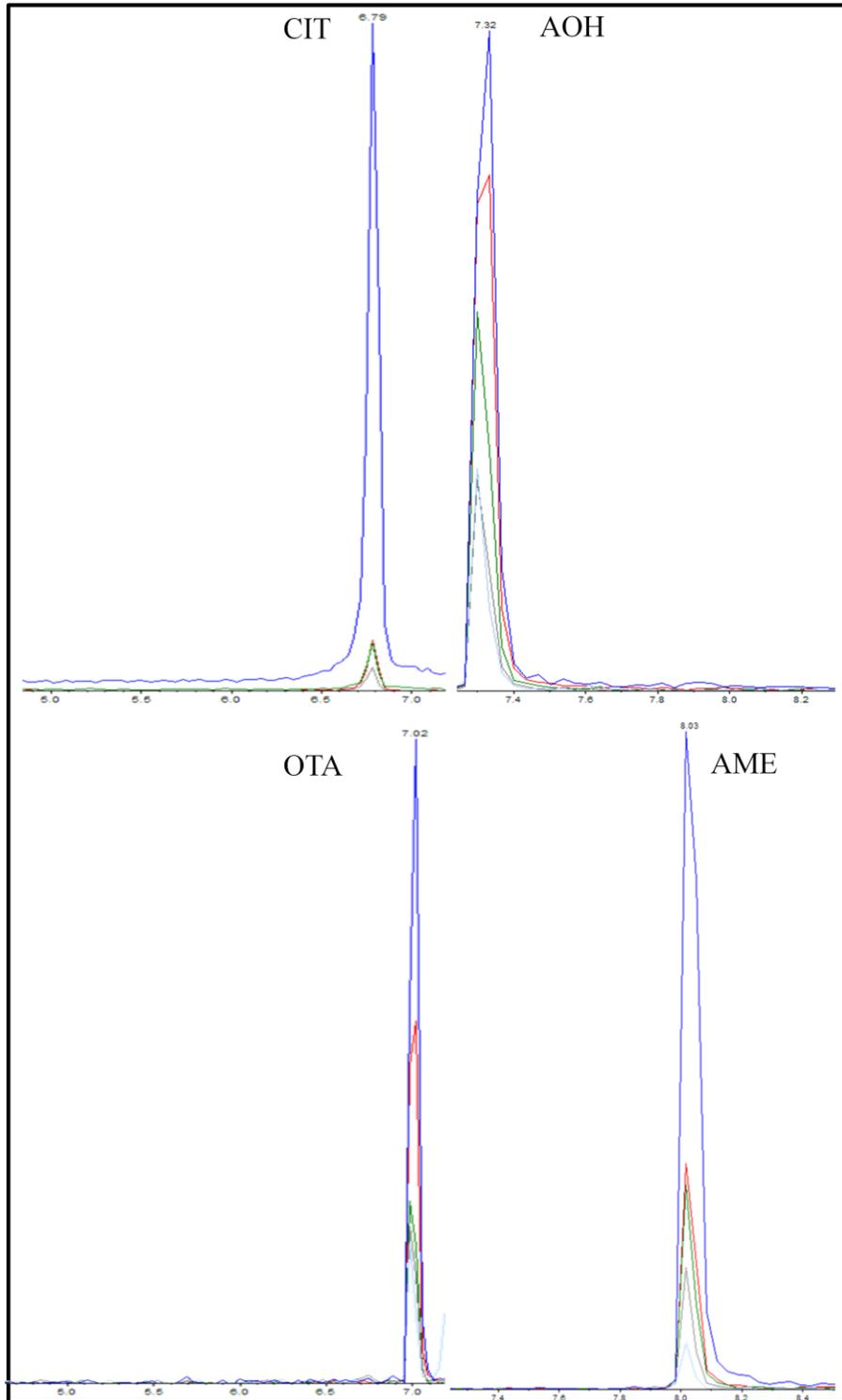


Figura 2

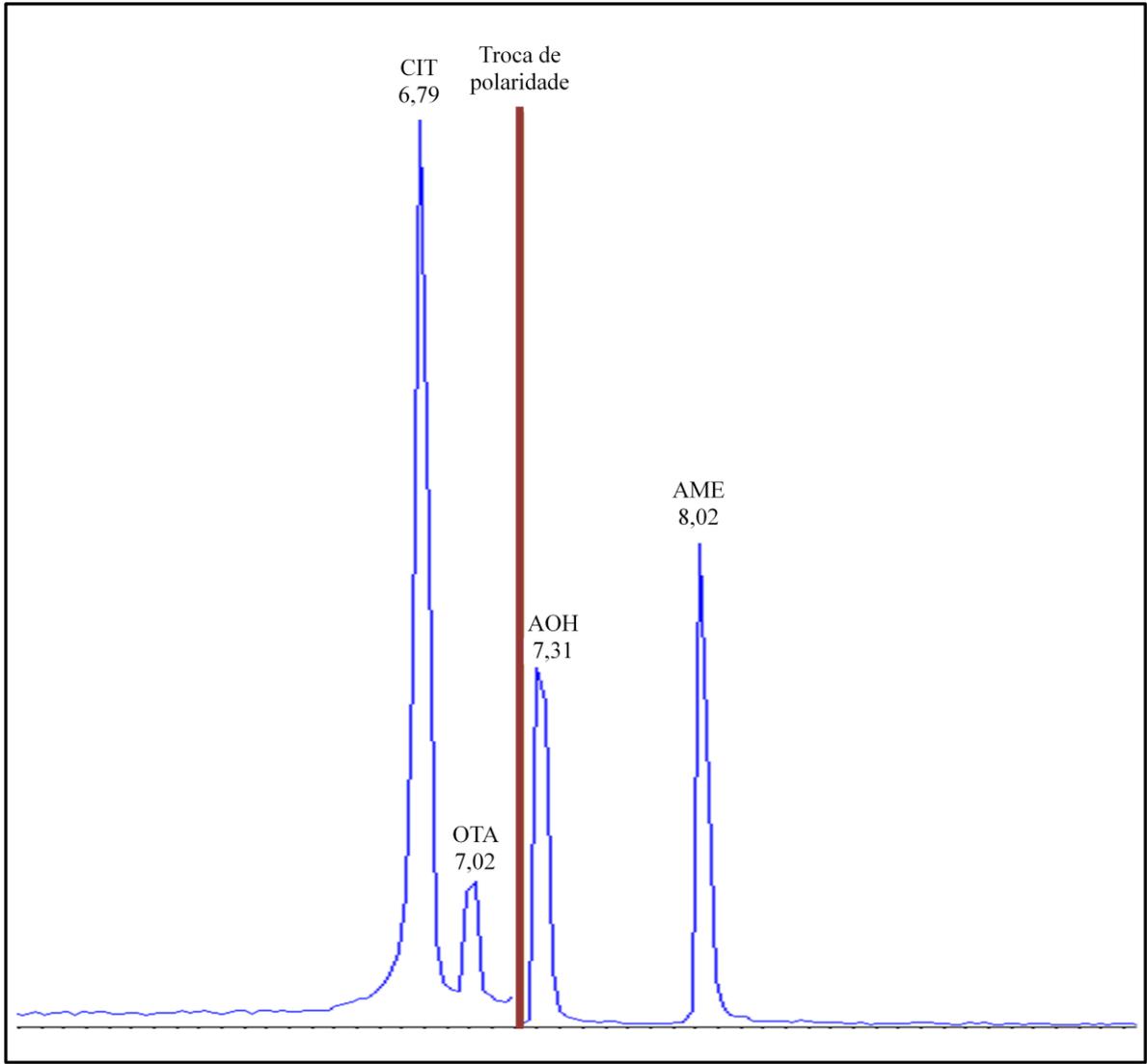


Tabela 1 – Íons precursores, íons produtos e parâmetros de massas correspondentes.

Analito	Íon precursor (m/z)	Íons produtos (m/z)	<i>Declustering potential</i> (V)	<i>Collision energy</i> (V)	<i>Collision cell exit potential</i> (V)	<i>Entrance potential</i> (V)
AOH	256,92	212,80	-85	-30	-17	-10
		214,80	-85	-34	-23	-10
		211,95	-85	-40	-23	-10
AME	270,97	255,80	-95	-30	-10	-10
		254,90	-95	-38	-10	-10
		227,80	-95	-38	-10	-10
CIT	251,02	233,10	46	21	12	10
		204,90	46	35	12	10
		191,00	46	33	12	10
OTA	404,03	239	66	31	12	10
		358	66	19	16	10
		220,9	66	47	12	10

Tabela 2 – Linearidade e sensibilidade do método para a determinação simultânea de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), citrinina (CIT) e ocratoxina A (OTA).

Micotoxinas	LD* em solução padrão ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ** em solução padrão ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD* em vinho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ** em vinho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Curva de calibração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)
AOH	0,003	0,005	0,6	1,0	0,005 – 0,2	1,0 – 40,0
AME	0,003	0,005	0,6	1,0	0,005 – 0,2	1,0 – 40,0
CIT	0,050	0,100	10,0	20,0	0,1 – 2,0	20 – 400
OTA	0,003	0,005	0,6	1,0	0,005 – 0,2	1,0 – 40,0

*Limite de detecção. ** Limite de quantificação.

Tabela 3 – Recuperações e coeficientes de variação na determinação de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), citrinina (CIT) e ocratoxina A (OTA).

Micotoxinas	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Coeficiente de variação (%)
AOH	2	96,5	6,9
	4	94,1	5,0
	8	86,8	5,1
AME	2	98,3	3,2
	4	96,9	4,0
	8	93,2	5,4
CIT	40	100,3	2,7
	80	98,6	1,9
	100	94,6	6,8
OTA	2	96,1	0,8
	4	97,1	0,8
	8	95,3	10,6

Tabela 4 – Contaminação de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), citrinina (CIT) e ocratoxina A (OTA) em 111 amostras de vinhos analisadas.

Micotoxinas	Número de amostras contaminadas	Faixa de contaminação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Índice de positividade (%)
AOH	81	1,03 – 21,4	72,9
AME	48	1,01 – 5,03	43,2
CIT	0	0	0,0
OTA	2	1,04 – 1,58	1,8

3 DISCUSSÃO

Inicialmente, o projeto dessa pesquisa visava desenvolver um método que analisasse cinco micotoxinas em vinhos simultaneamente. Após realizar os primeiros testes de espectrometria, constatou-se que a fonte de ionização ESI não gerava espectros de massas de qualidade para a análise de PAT, enquanto que para as outras micotoxinas, a formação de íons era muito mais eficiente quando comparada à fonte de ionização APCI. Com isso, decidiu-se pelo desenvolvimento de dois métodos analíticos, uma vez que não é possível acoplar no equipamento espectrômetro de massas duas fontes de ionização concomitantemente.

É importante ressaltar que o desenvolvimento de um método para análise de patulina através de CLAE/MS/MS é de grande valia, pois além de permitir uma análise rápida, elimina o risco de interferência com hidroximetilfurfural, comum em métodos de análise de patulina por detecção ultravioleta, gerando resultados mais específicos.

Outro fator fundamental para a definição de dois métodos de análise foi a preparação de amostras. Como estudado na literatura e constatado em laboratório, a extração da PAT não é muito simples e exige vários cuidados durante o procedimento, uma vez que a molécula de PAT, por ser um composto muito instável, pode sofrer degradação antes da análise. Assim, desenvolveu-se um método analítico por espectrometria de massas para análise de PAT com várias etapas durante o processo de preparação das amostras para análise. O procedimento envolveu extração com solvente, agitação em equipamento vortex, congelamento por 24 horas, concentração em banho-maria, ressuspensão e, por fim, diluição. A etapa de congelamento de amostras, até então nunca citada na bibliografia para análise de patulina, foi um fator importantíssimo para a eficiência do método, uma vez que esse procedimento contribuiu para a diminuição de interferência no processo de ionização dos compostos causada por substâncias promotoras de efeito matriz.

Ao contrário, o método desenvolvido para análise das outras quatro micotoxinas (AOH, AME, CIT e OTA) envolveu espectrometria de massas com fonte de ionização por ESI e apenas uma etapa de preparação de amostra para análise, a diluição. Assim, o segundo método proposto permite análises mais rápidas que o primeiro, além de analisar quatro micotoxinas simultaneamente, em um curto intervalo de tempo. Além disso, diluição da amostra como única etapa de preparação permitiu redução no custo de análise, uma vez que dispensa o uso de solventes e de equipamentos para extração.

Referente à cromatografia, os dois métodos igualam-se quanto ao tempo de corrida cromatográfica e quanto à fase móvel utilizada: os dois métodos separam os compostos em 10 minutos com gradiente de eluição utilizando água, acetato de amônio e metanol. As diferenças cromatográficas entre os dois métodos estão nas porcentagens de fase móvel ao longo da corrida cromatográfica e nas colunas utilizadas: coluna C₁₈ para PAT e coluna C₈ para AOH, AME, CIT e OTA.

Quanto às análises realizadas em amostras de vinhos, percebe-se que os vinhos não representam risco à saúde dos consumidores em relação à intoxicação por CIT e PAT. No entanto, os altos índices de positividade de AOH e AME revelam a necessidade de que haja um controle rigoroso durante a produção do vinho, com o propósito de evitar a presença desse contaminantes e consequentes danos à saúde humana. Além disso, é necessário estabelecer limites máximos toleráveis dessas micotoxinas em alimentos, a fim de controlar a qualidade dos vinhos comercializados no Brasil e assim, preservar a saúde dos consumidores.

Quanto à OTA, presume-se que a baixa contaminação (1,8%) demonstrada no estudo deve-se ao fato de que as amostras analisadas eram de vinhos produzidos no sul da América do Sul, onde o clima não é tão favorável ao crescimento dos fungos produtores quando comparado ao clima de regiões de baixa latitude, onde a ocorrência de OTA normalmente é maior.

Por fim, os métodos foram validados para análise de vinhos, mas poderão ser utilizados futuramente para análise em outras matrizes. O método de análise de PAT, por exemplo, pode ser adaptado e validado para análise em suco e polpa de maçã, enquanto que o método de AOH, AME, CIT e OTA pode ser adaptado para análise em suco de uva e polpa de tomate, matrizes onde essas micotoxinas também podem estar presentes.

4 CONCLUSÕES

- Foram desenvolvidos dois métodos analíticos para análise de micotoxinas em vinhos utilizando CLAE/MS/MS. O primeiro utilizou ionização química a pressão atmosférica para análise de patulina (PAT). O segundo utilizou ionização por electrospray para análise de alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), citrinina (CIT) e ocratoxina A (OTA).
- Os métodos foram validados conforme as recomendações do INMETRO.
- Os métodos propostos estão adequados para atender tanto à legislação brasileira como à legislação europeia quanto aos limites máximos permitidos para OTA e para PAT.
- Entre as amostras de vinhos analisadas, nenhuma apresentou contaminação com CIT ou com PAT, demonstrando que os vinhos não apresentam perigo à saúde dos consumidores por ocasião da intoxicação com esses compostos. No entanto, 72,9% apresentaram AOH e 43,2%, AME, evidenciando a necessidade de controle de qualidade em vinhos e da elaboração de uma legislação quanto à presença dessas micotoxinas.

REFERÊNCIAS

ARÉVALO, F. J. et al. Citrinin (CIT) determination in rice samples using a micro fluidic electrochemical immunosensor. **Talanta**, v. 83, n. 3, p. 966–973, 2011.

BACALONI, A. et al. Automated on-line solid phase extraction liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of ochratoxin A in wine and beer. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5518–5525, 2005.

BARKAI-GOLAN, R. & PASTER, N. **Mycotoxins in Fruits and Vegetables**. First edition. San Diego, CA, USA, 2008. 395 p.

BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 52–54, 2006.

BRASIL. Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em:
<<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>>. Acesso em 02 de outubro de 2011.

BULLERMAN, L. B; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 140–146, 2007.

CASTEGNARO, M. et al. Sex and strain specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlated with DNA adduction. **International Journal of Cancer**, v. 77, p. 70-75, 1998.

CHAN, W. H. Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts. **Biochemical Journal**, v. 404, p. 317–326, 2007.

CIGIC, I. K.; PROSEN, H. An over view of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 62–115, 2009.

COZZI, G. et al. Effect of *Lobesia botrana* damages on black aspergilli rot and ochratoxin A content in grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. S88–S92, 2006.

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

DRUSCH, S.; RAGAB, W. S. M. Mycotoxins in fruits, fruit juices and dried fruits. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 1514–1527, 2003.

FERREIRA, C. R. Princípios e aplicações da espectrometria de massas em produção animal. In: II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada a Produção Animal. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil 2009.

FLAJS, D.; PERAICA, M.; TOKSIKOL, A. H. R. Toxicological properties of citrinin. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 457–464, 2009.

GUPTA, R. C. **Veterinary toxicology. Basic and clinical principles**. First edition, San Diego, USA, 2007. 1159 p.

HARWIG, J.; BLANCHFIELD, B. J.; SCOTT, P. M. Patulin production by *Penicillium roqueforti* from grape. Canadian Institute Food Science Technology Journal, v. 11, p. 149–151, 1978.

HETHERINGTON, A. C.; RAISTRICK, H. Studies in biochemistry of microorganism XI. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum*. **Biological Sciences**, v. 220, p. 269–297, 1931.

IARC - International Agency for Research on Cancer (IARC), 2006. Disponível em: <http://www.iarc.fr>. Acesso em 15 de outubro de 2011.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia**, 2011. 19 p.

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.

LAU, B. P. Y. et al. Liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages. **Journal of Chromatography A**, v. 998, p. 119–131, 2003.

LEHMANN, L.; WAGNER, J.; METZLER, M. Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 398–408, 2006.

LI, F. et al. Study on the production of citrinin by *Monascus* strains used in food industry. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 32, p. 602–605, 2003.

LIU, G. T. et al. Relationships between *Alternaria alternata* and esophageal cancer. In: O'Neill, I.K.; Chen, J.; Bartsch, H. (Eds.), Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, p. 258–262, 1991.

LIU, B. et al. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, p. 255–263, 2003.

LIU, B. et al. Induction of Oxidative Stress Response by the mycotoxin patulin in Mammalian Cells. **Toxicological Sciences**, v. 95, p. 340–347, 2007.

LUGAUSKAS, A.; RAUDONIENE, V.; VEISTYTÈ, L. Toxin producing micromycetes on imported products of plant origin. **Annals of Agricultural Environmental Medicine**, v. 12, p. 109–118, 2005.

MAJERUS, P.; HAIN, J.; KÖLB, C.; Patulin in grape must and new, still fermenting wine (Federwißer). **Mycotoxin Research**, v. 24, p. 135-139, 2008.

MALLMANN. C. A.; DILKIN. P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos**. Santa Maria: Editora Palotti, 2007. 240 p.

MARTINS JÚNIOR, H. A. **Estudo de determinação de resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em amostras de soja e água usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem com ionização por electrospray**, 2005. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.

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

MOAKE, M. M.; PADILLA-ZAKOUR, O. I.; WOROBO, R. W. Comprehensive Review of Patulin Control (p. 1–21) – In: **Methods in Foods Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Vol.1- Institute of Food Technologists, 2005.

MONBALIU, S. et al. Development of a multi-mycotoxin liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis. **Rapid Communications Mass Spectrometry**, v. 23, p. 3–11, 2009.

NIKOLOV, I. G. et al. Molecular and epidemiological approaches to the etiology of urinary tract tumors in an area with Balkan endemic nephropathy. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 15, p. 201–207, 1996.

NUNES, E. O. **População de fungos filamentosos e sua relação com micotoxinas presentes na uva e no vinho de Santa Catarina**. 2008. 198 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2008.

OLIVEIRA, M. S. **Validação de metodologia analítica para análise de aflatoxina M₁ e sua ocorrência em leite bovino comercializado no sul do Brasil**, 2010. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

PFOHL-LESZKOWICZ, A. et al. Sex and strain specific expression of cytochrome P450s in ochratoxin A induced genotoxicity and carcinogenicity in rats. **Molecular Carcinogenesis**, v. 23, p. 76–85, 1998.

PIEMONTESE, L.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. Occurrence of patulin in conventional and organic fruit products in Italy and subsequent exposure assessment. **Food Additives & Contaminants**, v. 22, p. 437–442, 2005.

POSE, G. et al. Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 348–353, 2010.

PRAKASH, C.; SHAFFER, C. L.; NEDDERMAN, A. Analytical strategies for identifying drug metabolites. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, p. 340–369, 2007.

RADIC, B. et al. Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. **Toxicological Letters**, v. 91, p. 105–109, 1997.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771–778, 2004.

SCOTT, P. M. Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. **Journal of AOAC International**, v. 84, p. 1809–1817, 2001.

SCOTT, P. M. **Other mycotoxins**. In: Magan, N.; Olsen, M. *Mycotoxins in Food: Detection and Control*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, p. 406–440, 2004.

SCOTT, P. M.; LAWRENCE, G. A.; LAU, B. P. Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for *Alternaria* toxins. **Mycotoxin Research**, v. 22, p. 142–147, 2006.

SERRA, R.; BRAGA, A.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 515–521, 2005.

SIMON, T. T. **Influência das condições fitossanitárias da uva no teor de ocratoxina A em vinhos brancos**. 2006. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

SINGH, N. D. et al. Citrinin and endosulfan induced teratogenic effects in Wistar rats. **Journal Applied Toxicology**, v. 27, p. 143–151, 2007.

SOMMER, N. F.; BUCHANAN, J. R.; FORTLAGE, R. J. Production of patulin by *Penicillium expansum*. **Applied Microbiology**, v. 28, p. 589–593, 1974.

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

USFDA (2004). Compliance policy guidance for FDA staff. Apple juice, apple juice concentrates, and apple juice products – Adulteration with patulin. U.S. Food and Drug Administration. Disponível em:

<http://www.fda.gov/ora/compliance_ref/cpg/cpgfod/cpg510-150.htm> Acesso em 15 de outubro de 2011.

VAN DER MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. **Nature**, v. 205, p. 1112–1113, 1965.

VINAS, I.; DADON, J.; SANCHIS, V. Citrinin producing capacity of *Penicillium expansum* strains from apple packinghouses of Lerida (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 19, p. 153–156, 1993.

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

XU, B. et al. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. **Food Control**, v. 17, p. 271–285, 2006.

ZAIED, C. et al. Occurrence of patulin in apple based foods largely consumed in Tunisia. **Food Control**, v. 31, p. 263–267, 2013.

ANEXO

Anexo A - Normas para publicação

NORMAS DE PUBLICAÇÃO para a Revista Química Nova

GERAL - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos em Português, Inglês e Espanhol, que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc., além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais: refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Artigos de Revisão: destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida e lista de publicações, acompanhados de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de *QN*, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.

O Corpo Editorial de *QN* poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

Artigos sobre Educação: trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Notas Técnicas: trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Assuntos Gerais: abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química. etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato *.pdf*, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line de QN*. A revista não aceita a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser

em alta resolução (*800 dpi/bitmap para traços*). No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm).

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento. A publicação de figuras coloridas na versão online é isenta de custos.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de *QN* junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um(a).

Referências

Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/content/references/corejournals>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, 67, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79 73,771* **1979**. (CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004* **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI 9.604.468-3*, **1999**.

Livros:

com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.s bq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em QN. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

SUBMISSÃO DOS ARTIGOS – A QN oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.s bq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada

a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato .pdf. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo *.pdf*, a partir de arquivo *.doc* ou *.rtf*, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

Material Suplementar – Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica.

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento *.pdf*, incluindo o material suplementar.

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

MANUSCRITOS REVISADOS – Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de trinta dias ou serão considerados retirados,

sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento *.pdf* completo da versão revisada. Deve ser redigida uma carta de encaminhamento, em *pdf*, aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão *on line* de *QN*.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

VERSÃO FINAL – Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc.). Arquivos em formato *.pdf* não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (*800 dpi/bitmap para traços*) com extensão *tif* ou *jpg*, desde que nas dimensões especificadas pelos Editores. As fotos ou desenhos com cor (*300 dpi/grayscale*) deverão ser enviadas com extensão *tif/jpg*, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: *cdr*, *eps*, *cdx* ou *opj*. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.

Copyright ©2012 Sociedade Brasileira de Química

Para publicação, requer-se que os manuscritos submetidos a esta revista não tenham sido publicados anteriormente e não sejam submetidos ou publicados simultaneamente em outro periódico. Ao submeter o manuscrito, os autores concordam que o copyright de seu artigo seja transferido à Sociedade Brasileira de Química (SBQ), se e quando o artigo for aceito para publicação. O copyright abrange direitos exclusivos de reprodução e distribuição dos artigos, inclusive separatas, reproduções fotográficas, microfilmes ou quaisquer outras reproduções de natureza similar, inclusive traduções. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em bancos de dados ou transmitida sob qualquer forma ou meio, seja eletrônico, eletrostático, mecânico, por fotocópia, gravação, mídia magnética ou algum outro modo, sem permissão por escrito da detentora do copyright. Embora todo esforço seja feito pela SBQ, Editores e Conselho Editorial para garantir que nenhum dado, opinião ou afirmativa errada ou enganosa apareçam nesta revista, deixa-se claro que o conteúdo dos artigos e propagandas aqui publicados são de responsabilidade, única e exclusiva, dos respectivos autores e anunciantes envolvidos. Conseqüentemente, a SBQ, o Conselho Editorial, os Editores e respectivos funcionários, diretores e agentes isentam-se, totalmente, de qualquer responsabilidade pelas conseqüências de quaisquer tais dados, opiniões ou afirmativas erradas ou enganosas.