



FEUP

CONTAMINAÇÃO TOXICOLÓGICA DE RESÍDUOS VITIVINÍCOLAS - OCRATOXINA A

Elisabete Aurora Rodrigues Ribeiro

**Mestrado em Engenharia do Ambiente
Faculdade de Engenharia Universidade do Porto**

Agosto, 2007

FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

CONTAMINAÇÃO TOXICOLÓGICA DE RESÍDUOS
VITIVINÍCOLAS – OCRATOXINA A

Elisabete Aurora Rodrigues Ribeiro

Licenciada em Engenharia Química
pela Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Dissertação submetida para satisfação parcial dos
Requisitos do grau de mestre em
Engenharia do Ambiente
(Ramo de Gestão e Tratamento de Resíduos Industriais)

Dissertação realizada sob a supervisão de
Professora Doutora Maria Arminda Costa Alves
do Departamento de Engenharia Química
da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Porto, Agosto de 2007

*“Of course the first thing to do was to make a grand survey of the
country she was going to travel through”*

Through the Looking Glass, Lewis Carroll

Aos meus pais e irmão

Este trabalho foi realizado no âmbito do
Projecto POCI/AGR/55996/2004
Segurança Toxicológica (Ocratoxina A) de sub-produtos de adegas vitivinícolas

FCT **Fundação para a Ciência e a Tecnologia**

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR


Ciência.Inovação
2010

Programa Operacional Ciência e Inovação 2010

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, INOVAÇÃO E ENSINO SUPERIOR

AGRADECIMENTOS

Agradecer é sempre um momento especial de comunicação e de entrega para com aqueles a quem pretendemos testemunhar a nossa gratidão.

Agradeço à **minha orientadora, Prof. Dr.^a Arminda Alves** ...que em tão pouco tempo de convívio foi muito fácil aprender a admirá-la e respeitá-la... A si, meu reconhecimento pela sua colaboração e apoio durante a execução deste trabalho, cuja dedicação foram de suma importância para o enriquecimento desta dissertação. Tê-la conhecido e poder trabalhar ao lado de uma pessoa tão generosa foi um grande orgulho e trouxe-me muito crescimento pessoal. Foi uma experiência muito valiosa tê-la como orientadora. Obrigada não só por engrandecer este trabalho, mas principalmente por torná-lo possível!

À **Professora Dr.^a Lúcia Santos**, agradeço o seu apoio científico, concretizado em valiosos ensinamentos e num interesse constante e atento neste trabalho. Obrigada pela receptividade demonstrada, e pela ajuda que me deu quando precisei.

Ao **Professor Dr. Fernando Braga** (UTAD) agradeço a sua receptividade demonstrada, e a valiosa colheita da amostragem dos resíduos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Professor Dr. José Sousa** (UTAD) agradeço a disponibilidade imediata para a recepção e transporte das amostras, para as instalações da FEUP.

Ao **Professor Dr. Armando Venâncio** (UM), agradeço por ter partilhado os seus preciosos conhecimentos teórico-práticos, que foram uma ajuda valiosíssima na concretização deste trabalho.

À **Maria de Fátima** e ao **Sr. Serafim** agradeço a receptividade demonstrada quando precisei dos seus conhecimentos técnicos e pelo material que sempre me forneceu quando eu mais precisei.

Agradeço ao **DEQ** pela disponibilização de instalações, ao **LEPAE** pela possibilidade de realização do trabalho no grupo de investigação, bem como o apoio administrativo da **D. Fátima Faustino**.

A todos os meus amigos o testemunho do meu apreço pela motivação que sempre me deram e pelos bons momentos que passamos. E para os Lobos Negros, aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa!

A todos aqueles que, embora não mencione explicitamente, colegas e amigos, mas que de algum modo ajudaram a realizar este trabalho que agora apresento, o meu sincero obrigada!

ABREVIATURAS

Latinas

a	Ordenada na origem da recta de calibração
a _{max}	Valor máximo da ordenada na origem da recta de calibração
a _{min}	Valor mínimo da ordenada na origem da recta de calibração
A.C.	Antes de cristo
ATP	Adenosina tri-fosfato
AOAC	<i>Association of Analytical Communities</i>
a _w	Actividade de água
b	Declive da recta de calibração
b _{max}	Valor máximo do declive da recta de calibração
b _{min}	Valor mínimo do declive da recta de calibração
Ca ²⁺	Ião cálcio
CE	Comunidade Europeia
CEN	<i>Comité Européen de Normalisation</i>
CV	Coefficiente de variação
C8-dG	C8-desoxiguanosina
dGMP	Desoxiguanosina monofosfato
dG	Desoxiguanosina
DL	Dose letal
DL ₅₀	Dose de composto, dado de uma só vez, que provoca a morte a 50% do grupo de teste
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOC	Denominação de Origem Controlada
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAO	Organização de Alimentos Agrícolas
Fe ²⁺	Ião ferroso
Fe ³⁺	Ião férrico

FL	Fluorescência
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HO•	Radical hidroxilo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSM	<i>HPLC System Manager</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
IAC	Colunas de imunoafinidade
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC _a	Intervalo de confiança para a ordenada na origem da recta de calibração
IC _b	Intervalo de confiança para o declive da recta de calibração
i.d.	Diâmetro interno
IFST	<i>Institute of Food Science & Technology</i>
IVDP	Instituto dos Vinhos do Douro e Porto
IVV	Instituto da Vinha e do Vinho
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
m _i	Valor medido do respectivo parâmetro
MS	Espectrometria de Massa
Mr	Peso molecular
N	Número de pontos experimentais
n	Número de injeções efectuadas para cada padrão
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	5-metiltetrahidrofolato
NaHCO ₃	Hidrogenocarbonato de sódio
n.d.	Não detectado
NTP	<i>National Toxicology Program</i>
OIV	Organização Internacional do Vinho
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B
OTC	Ocratoxina C
OT _α	Ocratoxina α
OT _β	Ocratoxina β
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
P1	Padrão 1 (0.47 µg.L ⁻¹ de OTA em metanol)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato

p.e.	Por exemplo
PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial hidrogeniónico
Phe	Fenilalanina
pKa	Constante de acidez
RDD	Região Demarcada do Douro
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Fase reversa
RSD _r	Desvio padrão relativo em condições de repetibilidade
RSD _R	Desvio padrão relativo em condições de reprodutibilidade
s _a	Desvio padrão associado à ordenada na origem da recta de calibração
s _b	Desvio padrão associado à declive da recta de calibração
s _{y/x}	Desvio padrão residual
Séc.	Século
SPE	Colunas em fase sólida
tRNA	RNA de transferência
Tyr	Tirosina
t _{1/2}	Tempo de meia vida
U ou U _{total}	Incerteza global do método
UE	União Europeia
UV	Ultravioleta
U ₁	Incerteza na preparação dos padrões de ocratoxina A (dependente das diluições realizadas e material utilizado)
U ₂	Incerteza associada à recta de calibração
U ₃	Incerteza associada à precisão
U ₄	Incerteza associada à exactidão
URL	Localização na Internet (<i>Uniform Resource Locator</i>)
V	Volume
V _{final}	Volume final
V _p	Volume pipetado
V _t	Volume total
WHO	<i>World Health Organization</i>
w/w	Relação massa/massa
$\bar{x}$	Média dos valores de concentração dos padrões
x _i	Concentração do padrão <i>i</i> (<i>i</i> ∈ [1;7])
x ₀	Valor da concentração dos padrões de OTA preparados

$\bar{y}$	Média dos valores das áreas obtidas experimentalmente
$y_{cal.}$	Valores das áreas de OTA calculadas, para cada valor de x_i , com base na recta de calibração
YES	<i>Yeast extract sucrose</i> (Meio agarizado de extracto de levedura e sacarose)
y_i	Valores das áreas de OTA obtidos experimentalmente
$y_{i\max}$	Valor máximo dos valores das áreas de OTA obtidos experimentalmente
$y_{i\min}$	Valor mínimo dos valores das áreas de OTA obtidos experimentalmente

Gregos

Δm_i	Erro associado à medição de um determinado parâmetro
ϵ	Emissividade
λ	Comprimento de onda

Índice superiores

MeOH	Metanol
------	---------

Índice inferiores

max	Máxima
-----	--------

A contaminação global dos subprodutos da vinificação com micotoxinas pode apresentar-se como um sério risco para a saúde humana e animal. As micotoxinas são metabolitos secundários de fungos com possíveis efeitos adversos em humanos, animais, e culturas, resultando em doenças e perdas económicas. Elas têm estado sob estudo contínuo na Europa mas, os aspectos regulamentares ainda estão por definir para os subprodutos da vinificação, e são necessários desde que os subprodutos podem ser um ingrediente das rações para animais.

Como não existe informação sobre o teor de ocratoxina A (OTA) em subprodutos da vinificação, o objectivo deste estudo é quantificá-la, em amostras de bagaços e borras correspondentes à colheita de 2006, da Região Demarcada do Douro.

A metodologia analítica recorre a uma extracção com solventes (acetato de etilo ou água:metanol (30:70, v/v)) e à determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Os métodos foram validados em termos de linearidade, precisão, recuperação, limite de detecção e incerteza global. O método desenvolvido foi comparado com o método de referência, que recorre à extracção com colunas de imunoafinidade.

Tendo sido utilizadas duas colunas similares no processo de validação, obtiveram-se limites de detecção da ordem de $0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0.05 \mu\text{g.L}^{-1}$, linearidade na gama de 0.47 a $18.8 \mu\text{g.L}^{-1}$ e 0.047 a $23.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de OTA, com precisão de 0.6-8.6% e 1.2-14.7%, em cada coluna. A percentagem de recuperação foi em média $23.5 \pm 3.6\%$ (extracção com acetato de etilo) ou $70.1 \pm 2.5\%$ (extracção com 70% metanol), nos dois métodos desenvolvidos para a análise de bagaços, e no caso das borras de vinho a recuperação foi de $70.4 \pm 4.7\%$ (extracção com 70% metanol).

A quantificação de níveis de OTA em 13 amostras de bagaço e 7 amostras de borra permite concluir que a concentração média de OTA, para os bagaços e para as borras, é de 0.07 e $1.23 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente. Concluindo, os métodos desenvolvidos para avaliar a contaminação de bagaços e borras, com OTA, são simples mas eficazes.

The worldwide contamination of winery by-products with mycotoxins may present a serious hazard to human and animal health. Mycotoxins are secondary metabolites of molds with possible adverse effects on humans, animals, and crops that result in illnesses and economic losses. They have been under continuous survey in Europe, but the regulatory aspects still need to be set up for winery by-products, and they are necessary since the winery by-products may be an ingredient for animal feed.

Since there is no information about the content of ochratoxin A (OTA) in winery by-products, the aim of this study is to quantify it, in samples of grape pomace and wine lees correspondent to 2006 harvest, from Região Demarcada do Douro.

The analytical methodology uses to an extraction with solvents (ethyl acetate and water:methanol (30:70, v/v)) and the determination by high-performance liquid-chromatographic with fluorescent detection. The methods were validated in terms of linearity, precision, recovery, detection limit and global uncertainty. The developed method was compared to the reference method that uses extraction with immunoaffinity columns.

Because two similar columns were used during the validation of the method, detection limits were $0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$ and $0.05 \mu\text{g.L}^{-1}$, linearity range of 0.47 to $18.8 \mu\text{g.L}^{-1}$ and 0.047 to $23.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ of OTA, with precision of 0.6-8.6% and 1.2-14.7%, in each column. The percentage of recovery was on average $23.5 \pm 3.6\%$ (extraction with ethyl acetate) or $70.1 \pm 2.5\%$ (extraction with 70% methanol), in the two methods developed to the analysis of grape pomace, and in the case of wine lees the recovery was $70.4 \pm 4.7\%$ (extraction with 70% methanol).

The quantification of OTA levels in 13 samples of grape pomace and 7 samples of wine lees allows to conclude that the average concentration of OTA, for grape pomace and for wine lees is 0.07 and $1.23 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectively. Concluding, the developed methods for evaluation of OTA in grape pomace and wine lees are simple but efficient.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xii
CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. Motivação	2
1.3. Objectivos	3
1.4. Micotoxinas.....	3
1.5. Ocratoxinas	4
1.6. Ocratoxina A	5
1.6.1. Toxicidade da ocratoxina A.....	6
1.6.2. Toxicocinética	6
1.6.2.1. Absorção.....	6
1.6.2.2. Distribuição	7
1.6.2.3. Excreção	7
1.6.2.4. Biotransformação	8
1.6.3. Toxicodinâmica	9
1.6.3.1 Interacções baseadas em ligações específicas	9
1.6.3.1.1 Interferências com sistemas metabólicos envolvendo a fenilalanina e as suas consequências toxicológicas	9
1.6.3.1.1.1. Inibição da fenilalanina-tRNA sintetase.....	10
1.6.3.1.1.2. Inibição da hidroxilase da fenilalanina	10
1.6.3.1.2. Danificação do fosfoenolpiruvato carboxicinase citosólico.....	11
1.6.3.2. Formação de espécies reactivas de oxigénio e as suas consequências toxicológicas...	11
1.6.3.3. Inibição da cadeia respiratória mitocondrial	12

1.6.3.4. Formação de adutos de DNA	12
1.7 Espécies produtoras de ocratoxina A	13
1.8. Exposição humana à ocratoxina A	15
CAPÍTULO 2 SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO	19
2.1. Influência do clima na proliferação de fungos ocratoxigénicos	22
2.2. Caracterização dos subprodutos da vinificação	23
2.2.1. Bagaço	24
2.2.2. Engaços	25
2.2.3. Folhelho	26
2.2.4. Grainhas	26
2.2.5. Borrás	27
2.2.6. Sarros	28
CAPÍTULO 3 MÉTODOS DE ANALÍTICOS PARA A DETECÇÃO DE OCRATOXINA A	29
3.1. Extracção de OTA em vinho	29
3.1.1. Métodos de extracção	29
3.1.2. Métodos de limpeza	30
3.1.3. Análise cromatográfica	31
3.1.4. Confirmação	31
3.1.5. Métodos de referência para análise de OTA em vinho	32
3.2. Determinação de OTA em uvas	32
3.2.1. Métodos de referência	33
CAPÍTULO 4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Metodologia de trabalho	34
4.2. Procedimentos de amostragem	34
4.3. Reagentes e materiais	37
4.4. Equipamento	37
4.5. Preparação de padrões de ocratoxina A	38
4.6. Optimização do método de extracção A, de OTA em bagaços	38
4.7. Método de extracção A dos bagaços	39
4.8. Método de extracção dos bagaços por IAC	39
4.9. Método de extracção B dos bagaços	40
4.10. Método de extracção de OTA em borras	40
4.11. Método de análise cromatográfica	41
4.12. Validação dos métodos analíticos	41
CAPÍTULO 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. Desenvolvimento dos métodos de análise de ocratoxina A em bagaços	42
5.1.1. Método de extracção A	43

5.1.1.1. Selecção do solvente para o método de extracção A.....	43
5.1.1.2. Determinação cromatográfica dos extractos de bagaço obtidos pelo método de extracção A.....	45
5.1.1.3. Validação do método analítico	47
5.1.1.4. Incerteza global do método A	49
5.1.1.5. Comparação com as colunas de imunoafinidade.....	51
5.1.2. Método de extracção B para bagaços	51
5.1.2.1. Determinação cromatográfica dos extractos de bagaço obtidos pelo método de extracção B.....	52
5.1.2.2. Validação do método analítico	52
5.1.2.3. Incerteza global do método	54
5.2. Rastreio das amostras de bagaço – teor de ocratoxina A	57
5.3. Análise de ocratoxina A em borras	58
5.3.1. Determinação cromatográfica dos extractos de borra	59
5.3.2. Incerteza global do método.....	60
5.4. Rastreio das amostras de borra – teor de ocratoxina A	62
CAPÍTULO 6 CONCLUSÕES.....	63
CAPÍTULO 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
CAPÍTULO 8 ANEXOS.....	79
Anexo A – Preparação das soluções de ocratoxina A.....	79
Anexo B – Resultados obtidos na quantificação dos padrões de ocratoxina A	81
B.1. Ensaio de precisão	88
Anexo C – Dados relativos à validação do método analítico de determinação de OTA em bagaços através do método cromatográfico I, e respectivo erro global do método de análise	90
C.1. Incerteza associada à preparação de padrões, U_1	90
C.2. Incerteza associada à recta de calibração, U_2	91
C.3. Incerteza associada à precisão, U_3	92
C.4. Incerteza associada à exactidão, U_4	93
C.5. Incerteza global associada, U	93
Anexo D – Dados relativos à validação do método analítico de determinação de OTA em bagaços através do método cromatográfico II, e respectivo erro global do método de análise	94
D.1. Incerteza associada à preparação de padrões, U_1	94
D.2. Incerteza associada à recta de calibração, U_2	95
D.3. Incerteza associada à precisão, U_3	95
D.4. Incerteza associada à exactidão, U_4	96
D.5. Incerteza global associada, U	96

Anexo E – Dados relativos à validação do método analítico de determinação de OTA em borras, e respectivo erro global do método de análise	97
E.1. Incerteza associada à exactidão, U_4	97
E.2. Incerteza global associada, U	98
Anexo F – Cálculo das recuperações	99
F.1. Recuperação na optimização do solvente de extracção de bagaços a 30°C.....	99
F.2. Cálculo da recuperação na extracção com colunas de imunoafinidade.....	100
Anexo G – Resultados obtidos para a validação de cada método de extracção	101
Anexo H – Resultados obtidos no rastreio de ocratoxina A em bagaços e borras	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura das principais ocratoxinas.	5
Figura 2 – Metabolitos da ocratoxina A (Adaptado de López de Cerain et al.).....	8
Figura 3 – Ocratoxina A na cadeia alimentar. Possíveis vias de contaminação de humanos pela OTA.	15
Figura 4 – Regiões vitivinícolas de Portugal continental e ilhas.....	20
Figura 5 – Região Demarcada do Douro.....	21
Figura 6 – Distribuição geográfica das amostras de bagaços colhidas na RDD.	36
Figura 7 – Efeito do pH na estrutura da OTA.	44
Figura 8 – Cromatogramas de um padrão 18.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ OTA (linha azul) e de uma amostra de bagaço contaminado com 1 mL de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ OTA (b) (linha rosa).	46
Figura 9 – Cromatograma da confirmação da identificação da OTA nos extractos de bagaço.....	46
Figura 10 – Recta de calibração da OTA com padrões de concentrações entre 0.47 e 18.80 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em metanol, e segundo as condições cromatográficas do Método I.....	47
Figura 11 – Variação da incerteza do resultado analítico com a concentração dos padrões.	50
Figura 12 – Cromatogramas de um padrão 18.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ OTA (linha azul) e de uma amostra de bagaço contaminado com 1 mL de 18.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ OTA (linha rosa).....	52
Figura 13 – Recta de calibração da OTA com padrões de concentrações entre 0.05 e 23.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em metanol, e segundo as condições cromatográficas do Método II.....	53
Figura 14 – Variação da incerteza do resultado analítico com a concentração dos padrões.	55
Figura 15 – Cromatogramas de um padrão 18.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ OTA (linha azul) e de uma amostra de borra contaminada com 1 mL de 28.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ OTA (linha rosa).	59
Figura 16 – Variação da incerteza do resultado analítico com a concentração dos padrões.	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Teores máximos estabelecidos pela União Europeia para diferentes géneros alimentícios (Directiva 2005/123/EC; Directiva 2006/576/EC).	18
Tabela 2 – Locais da RDD da colheita das amostras de bagaço.	36
Tabela 3 – Locais da colheita das amostras de borra, na RDD.	37
Tabela 4 – Optimização do solvente de extracção de bagaços a 30°C.	43
Tabela 5 – Resultados do cálculo das incertezas calculadas para os vários padrões.	49
Tabela 6 – Resultados do cálculo das incertezas calculadas para os vários padrões.	54
Tabela 7 – Ocorrência de ocratoxina A em bagaços, segundo os métodos A e B. Método A: extracção com 20 mL de acetato de etilo; Método B: extracção com 25 mL de 70% metanol.	57
Tabela 8 – Resultados do cálculo das incertezas calculadas para os vários padrões.	60
Tabela 9 – Ocorrência de ocratoxina A em borras.	62
Tabela 10 – Preparação dos padrões de OTA para a recta de calibração do método cromatográfico I.	79
Tabela 11 – Preparação dos padrões de OTA para a recta de calibração do método cromatográfico II.	80
Tabela 12 – Resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a obtenção da recta de calibração, no método cromatográfico I.	81
Tabela 13 – Resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a obtenção da recta de calibração, no método cromatográfico II.	81
Tabela 14 – Parâmetros necessários para o estudo da linearidade da resposta do HPLC-FL no método cromatográfico I.	82
Tabela 15 – Intervalos de confiança correspondentes ao declive e à ordenada na origem, para um nível de confiança de 95 %.	84
Tabela 16 – Parâmetros necessários para o estudo da linearidade da resposta do HPLC-FL no método cromatográfico II.	85
Tabela 17 – Intervalos de confiança correspondentes ao declive e à ordenada na origem, para um nível de confiança de 95 %.	87

Tabela 18 – Determinação da repetibilidade para os padrões de concentração de 0.47, 1.88 e 5.64 $\mu\text{g.L}^{-1}$, referentes à recta de calibração do método cromatográfico I, com determinações no mesmo dia.	88
Tabela 19 – Determinação da precisão intermédia para os padrões de concentração de 0.47, 1.88 e 5.64 $\mu\text{g.L}^{-1}$, referentes à recta de calibração do método cromatográfico I, com determinações em 3 dias diferentes.	88
Tabela 20 – Determinação da repetibilidade para os padrões de concentração de 0.047, 2.82 e 6.58 $\mu\text{g.L}^{-1}$, referentes à recta de calibração do método cromatográfico II, com determinações no mesmo dia.	89
Tabela 21 – Determinação da precisão intermédia para os padrões de concentração de 0.047, 2.82 e 6.58 $\mu\text{g.L}^{-1}$, referentes à recta de calibração do método cromatográfico II, com determinações em 3 dias diferentes.	89
Tabela 22 – Erros dos equipamento de medida.	90
Tabela 23 – Cálculo de incerteza relativa à preparação dos padrões intermédios preparados.	91
Tabela 24 – Cálculo de incerteza relativa à preparação dos padrões presentes na recta de calibração.	91
Tabela 25 – Parâmetros para o cálculo de U_2	91
Tabela 26 – Parâmetros para o cálculo de U_3	92
Tabela 27 – Parâmetros para o cálculo de U_4	93
Tabela 28 – Cálculo de incerteza relativa à preparação dos padrões constituintes da recta de calibração.	94
Tabela 29 – Parâmetros para o cálculo de U_2	95
Tabela 30 – Parâmetros para o cálculo de U_3	95
Tabela 31 – Parâmetros para o cálculo de U_4	96
Tabela 32 – Parâmetros para o cálculo de U_4	97
Tabela 33 – Dados relativos ao cálculo da recuperação.	99
Tabela 34 – Dados relativos ao cálculo da recuperação nos ensaios de imunoafinidade.	100
Tabela 35 – Dados relativos aos ensaios de recuperação em bagaços, com o método de extracção 1 e nas condições cromatográficas do método I.	101
Tabela 36 – Dados relativos aos ensaios de recuperação em bagaços, com o método de extracção 2 e nas condições cromatográficas do método II.	102
Tabela 37 – Dados relativos aos ensaios de recuperação em borras.	103
Tabela 38 – Dados relativos à ocorrência de OTA em bagaços com o método de extracção 1 e nas condições cromatográficas do método I.	104
Tabela 39 – Dados relativos à ocorrência de OTA em bagaços com o método de extracção 2 e nas condições cromatográficas do método II.	105
Tabela 40 – Dados relativos à ocorrência de OTA em borras.	105

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Enquadramento

A globalização dos mercados de alimentos obriga as nações a desenvolverem normas alimentares que sejam sensíveis às necessidades dos consumidores, bem como aceites e reconhecidas internacionalmente. Assim, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização de Alimentos Agrícolas (FAO) reconheceram que “o acesso a alimentos nutricionalmente adequados e seguros é um direito de cada indivíduo”¹. Os consumidores conscientes da inocuidade dos alimentos e dedicados ao longo da cadeia alimentar nacional poderão promover um comércio consistente e seguro de alimentos no âmbito nacional e internacional. Isso aumentará a segurança alimentar interna mediante um melhor acesso a alimentos inócuos e saudáveis e a resultante elevação da renda nacional devido ao aumento do comércio internacional de alimentos. O interesse pelos fungos e pelas micotoxinas é enorme, não só sob o ponto de vista científico, como pela perspectiva da economia e da saúde pública, devido à sua presença nos alimentos. Como são contaminantes naturais, não é possível eliminar a sua presença dos alimentos por completo, mas podem e devem ser reduzidos a níveis que não apresentem risco para as populações. Os efeitos prejudiciais das micotoxinas em humanos e animais têm sido reconhecidos desde a década de 60. A atenção dispensada ao entendimento das micotoxinas é necessária para que sejam tomadas medidas compensatórias relacionadas principalmente a minimização dos danos causados pela ingestão destes metabolitos. A detecção da micotoxina ocratoxina A (OTA) em vinhos fez com que a Comissão da

¹ FAO/OMS, *World Declaration on Nutrition*, Roma, 2001. Disponível na página de Internet: http://www.euro.who.int/Document/fos/GEMS_SCrpt.pdf (Acedido em Junho de 2007).

União Europeia (UE) em 2004, estabelece-se em conjunto com a Organização Internacional do Vinho (OIV), um limite máximo, a entrar em vigor na vindima de 2005, de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de OTA no vinho, pois o vinho foi considerado a segunda causa principal de ingestão da micotoxina, a seguir aos cereais. As causas da contaminação do vinho com a micotoxina não estão bem estabelecidas. Verificou-se que a frequência e os níveis de contaminação de OTA varia consoante o tipo de vinho e a origem geográfica. Levantou-se a hipótese de que a relação da OTA com a origem geográfica dos vinhos poderia ser devida a diferenças na distribuição e incidência de fungos produtores de OTA na micoflora das uvas.

A presente dissertação enquadra-se no estudo da detecção de ocratoxina A produzida por fungos filamentosos e a presença da mesma em subprodutos vitivinícolas.

1.2. Motivação

O presente trabalho traduz-se num esforço para avaliar a contaminação dos resíduos vitivinícolas com ocratoxina A, tendo em consideração a possível ingestão da micotoxina pelos animais e pelos humanos.

Portugal é um dos países onde o vinho atinge uma expressão económica considerável, onde segundo os dados disponibilizados pelo Instituto da Vinha e do Vinho (IVV)², a superfície vitícola de Portugal representa 27% do território nacional. Em 2005, Portugal produziu em média cerca de 7.5 milhões de hectolitros de vinho por ano, e consumiu-se cerca de 4.8 milhões de hectolitros por ano. Em 2005, exportaram-se cerca de 2.6 milhões de hectolitros de vinho, correspondentes a cerca de 544 milhões de euros. Desde os tempos mais remotos, o vinho tem vindo a desempenhar um papel de relevo em Portugal; "Fruto da videira e do trabalho do Homem". Assim, contribuir para a segurança alimentar do vinho e dos resíduos da vinificação é pois uma necessidade.

² Dados disponíveis na página de Internet do IVV: <http://www.ivv.min-agricultura.pt/estatistica/index.html> (Acedido em Junho de 2007).

1.3. Objectivos

O objectivo desta dissertação foi contribuir para a avaliação de risco de contaminação dos resíduos vitivinícolas com OTA na Região Demarcada do Douro (RDD). Desenvolveu-se métodos para análise de OTA em bagaços e borras com base em métodos descritos para vinho e uvas, e verificar a sua adequação à matriz dos resíduos em estudo.

1.4. Micotoxinas

O termo micotoxina é derivado da palavra grega “mycos” que significa fungo, e da palavra latina “toxicum” que significa veneno. As micotoxinas são metabolitos secundários de baixo peso molecular, de origem fúngica e são prejudiciais aos animais e aos humanos.

As micotoxinas estão presentes numa série de produtos destinados à alimentação humana e animal e originam inúmeras maleitas no Homem e nos animais (IFST, 2006). O contacto com as micotoxinas pode provocar toxicidades agudas e crónicas, que vão desde a morte a efeitos deletérios no sistema nervoso central, no aparelho cardiovascular e respiratório, assim como nos aparelhos digestivo e urinário. Podem também ter efeitos cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos e imunossupressores. O poder que algumas possuem de alterar as reacções imunitárias, e assim, de reduzir a resistência às infecções, é largamente considerado como o seu efeito mais importante, sobretudo nos países em desenvolvimento.

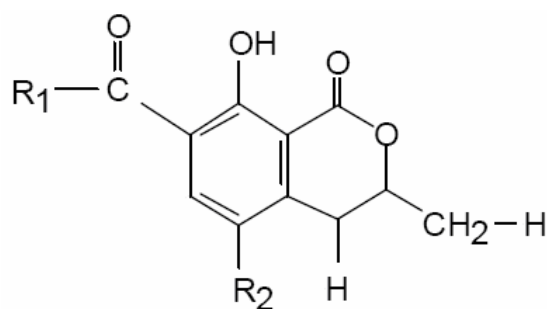
As micotoxinas retêm a atenção no mundo inteiro, devido às importantes perdas económicas que estão ligadas aos seus efeitos sobre a saúde do Homem, a produtividade animal e ao comércio nacional e internacional.

Os factores alimentares, em especial, são implicados na etiologia de certos cancros humanos. Numerosos dados epidemiológicos mostraram associações frequentes entre o consumo de certos alimentos e a incidência de certos cancros; por exemplo, a insuficiência hepática e o cancro do fígado ligados à aflatoxina B1 (Bastardo et al., 2006). Actualmente, a pergunta da implicação de outra micotoxina, a ocratoxina A, nos cancros das vias urinárias é colocada (Nikolov et al., 2002; Fuchs & Peraica, 2005; Pfohl-Leszkowicz et al., 2002).

1.5. Ocratoxinas

As ocratoxinas são micotoxinas produzidas por algumas espécies dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Existem três ocratoxinas reconhecidas, designadas por A, B e C (Fig. 1). A ocratoxina A é a mais tóxica delas todas, com efeitos nefrotóxicos, carcinogénicos, teratogénicos e imunossupressores, seguida por OTB (substituição do cloro por um átomo de hidrogénio), sendo pelo menos 10-20 vezes menos tóxica que a OTA, e por OTC, ou etil OTA, com potencial reduzido ou não tóxico (O'Brien & Dietrich, 2005). A OTA é formada por uma dihidroisocumarina unida pelo grupo 7-carboxilo a uma molécula de L-β-fenilalanina, segundo uma ligação amina. A sua estrutura química é: (R)-N-((5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il)carbonil)-L-fenilalanina. A ocratoxina α (OTα) e a ocratoxina β (OTβ) são produtos da hidrólise da OTA e da OTB, respectivamente, e como não possuem a molécula de fenilalanina, não são tóxicos.

A OTA é um composto branco, altamente solúvel em solventes orgânicos, ligeiramente solúvel em água e solúvel em soluções aquosas de hidrogeno carbonato de sódio. Os seus pontos de fusão são 90 e 169°C, quando recristalizada a partir do benzeno ou do xileno, respectivamente (NTP, 2005). A OTA exhibe absorção no UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm; ε) = 333(5500) (González-Peñas et al., 2004). A OTA ostenta um máximo de emissão de fluorescência a 465 nm em etanol. A OTA possui propriedades ácidas e tem dois grupos ionizáveis, o grupo carboxílico (pKa 4.4) da fenilalanina e o grupo 8-hidroxilo (pKa 7.0-7.3), podendo ambos existir na forma ionizada ou não ionizada (González-Peñas et al., 2004).



Abreviatura	R ₁	R ₂
OTA	Phe-CH ₂ CH(COOH)NH	Cl
OTB	Phe-CH ₂ CH(COOH)NH	H
OTC	Phe-CH ₂ CH(COOEt)NH	Cl

Figura 1 – Estrutura das principais ocratoxinas.

1.6. Ocratoxina A

A ocratoxina A é uma micotoxina importante e a mais prevalente entre todas as ocratoxinas, e é um metabolito secundário de *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* (Tjamos et al., 2006; Timperio et al., 2006), e tem recebido atenção crescente devido ao potencial perigo no Homem e nos animais. A OTA é conhecida pelas suas propriedades carcinogénicas, nefrotóxicas, teratogénicas, imunotóxicas e pelas possíveis propriedades neurotóxicas (Directiva 2002/472/EC). Tem sido ligada à nefropatia em humanos, e pode ter um tempo de meia-vida elevado no organismo (35 dias nos humanos) (Pena et al., 2005; Pascale & Visconti, 2000). Foi igualmente associada à nefropatia endémica dos Balcãs, doença caracterizada pelo desenvolvimento de tumores no tracto urinário e por uma deficiência renal (Tatu et al., 1998). Em 1993, a IARC (*International Agency for Research on Cancer*) classificou a OTA no grupo 2B como “potencialmente carcinogénica para o Homem” (Timperio et al., 2006; Voice et al., 2006; Bacaloni et al., 2005). O mecanismo pelo qual a toxina induz o cancro não é totalmente conhecido e tem sido objecto de debate (O'Brien & Dietrich, 2005; Manderville, 2005; Turesky, 2005).

1.6.1. Toxicidade da ocratoxina A

Geralmente, uma única micotoxina pode provocar mais do que um efeito tóxico. Os alvos da toxicidade da OTA nas espécies mamíferas são os rins, onde as lesões podem ser produzidas por exposição aguda e crónica. Os animais podem demonstrar susceptibilidades variadas à OTA dependendo de vários factores, tais como, espécie, sexo e via de administração. A DL_{50} é uma forma de medir o potencial de envenenamento a curto-prazo de um dado composto. DL significa “Dose Letal”, e DL_{50} a quantidade de composto, dado de uma só vez, que provoca a morte a 50% do grupo de teste. Desta forma, nos estudos de toxicidade aguda, a DL_{50} para a OTA, varia entre as espécies, desde a DL_{50} oral de 0.2 mg.kg^{-1} em cães a 30.3 mg.kg^{-1} em ratos machos (as fêmeas são mais sensíveis). Os valores de LD_{50} são influenciados pela via de administração (oral, injeção endovenosa ou intraperitoneal), sendo a via intraperitoneal a mais tóxica (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007).

1.6.2. Toxicocinética

Tanto a toxicocinética (alterações na concentração de um composto num organismo no decorrer do tempo) como a toxicodinâmica (as interações dinâmicas de um composto com células ou com locais específicos do organismo, e os seus efeitos biológicos subsequentes (alterações bioquímicas, morfológicas ou funcionais)) são factores que determinam a toxicidade da ocratoxina A.

1.6.2.1. Absorção

Os valores de pKa da OTA entre 4.4 e 7.0-7.3, respectivamente, do grupo carboxílico da fenilalanina e do grupo 8-hidroxilo, desempenham um papel importante na absorção da OTA. Nas espécies animais estudadas a primeira absorção da OTA é ao nível do estômago facilitada pela suas propriedades ácidas, seguida de uma absorção intestinal, seguindo para o sangue e, eventualmente, entra na distribuição nos tecidos (Berger et al., 2003). A ocratoxina A parece ser absorvida de forma passiva através da membrana lipídica do trato gastrointestinal, principalmente no duodeno e no jejuno, na sua forma não ionizada ou parcialmente ionizada (Fung & Clark, 2004).

A percentagem de absorção da OTA é: 66% em porcos, 56% em ratos e em coelhos, e 40% em galinhas (WHO, 2001).

1.6.2.2. Distribuição

Uma vez na corrente sanguínea, a ocratoxina A liga-se a pelo menos 99% das proteínas do plasma (principalmente albumina), o que facilita a absorção passiva na forma não ionizada e explica os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) muito longos (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007).

Existem vários estudos sobre as propriedades de ligação da OTA ao plasma e a toxicocinética em diversas espécies animais (Petzinger & Ziegler, 2000). Após uma administração oral ou endovenosa de 50 ng OTA/g peso corporal, a fracção da toxina não ligada varia consideravelmente e é de 0.02% em humanos e ratazanas, 0.08% em macacos, 0.1% em ratos e porcos e 22% em peixes (WHO, 2001). A fracção de OTA ligada à albumina e a outras macromoléculas existentes no plasma, constituem uma reserva móvel de micotoxina que pode ser libertada nos tecidos (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007).

O $t_{1/2}$ após ingestão oral de OTA é menor que após injeção endovenosa, provavelmente devido ao deslocamento pelo fígado e a subsequente eliminação pela biliar, antes de entrar na corrente sanguínea. Após administração oral os humanos possuem um $t_{1/2}$ de 840 h. No caso dos animais os $t_{1/2}$ são mais curtos (Petzinger & Ziegler, 2000).

1.6.2.3. Excreção

A OTA é um tóxico cumulativo com uma rápida absorção mas, com uma eliminação lenta. Em todas as espécies, as excreções fecais e urinárias desempenham um papel importante na eliminação da toxina do plasma. A contribuição relativa de cada via de excreção é influenciada por: via de administração, dose, grau de ligação com as proteínas do plasma e pela circulação enterohepática da OTA (WHO, 2001).

A ocratoxina A é excretada pelos túbulos renais recorrendo a proteínas orgânicas aniónicas. Mas a OTA pode ser reabsorvida nos segmentos nefron, atrasando a eliminação e consequentemente, aumentando o risco da acumulação da OTA nos tecidos (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007; Petzinger & Ziegler, 2000).

Em adição às vias de excreção fecal e urinária, a excreção pelo leite materno parece ser relativamente efectivo. A OTA já foi identificada em amostras de leite materno humano, tendo sido encontradas concentrações entre o mínimo de 0.01–0.04 ng/mL na Suécia e o máximo de 0.1-12 ng/mL na Itália. Desta forma, a presença de OTA no leite constitui uma ameaça para as crianças em amamentação (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007).

1.6.2.4. Biotransformação

A biotransformação da OTA ainda não foi totalmente elucidada. Até ao momento, os dados relativos ao metabolismo da OTA são controversos. Já foram caracterizados uma série de metabolitos *in vitro* e/ou *in vivo*, enquanto outros metabolitos continuam por ser caracterizados. A contribuição dos metabolitos na toxicidade da OTA continua por esclarecer. Os principais metabolitos da OTA são identificados na Figura 2 e incluem: derivados hidroxilados (4(R)-OH-OTA, 4(S)-OH-OTA e 10-OH-OTA) e a OT α .

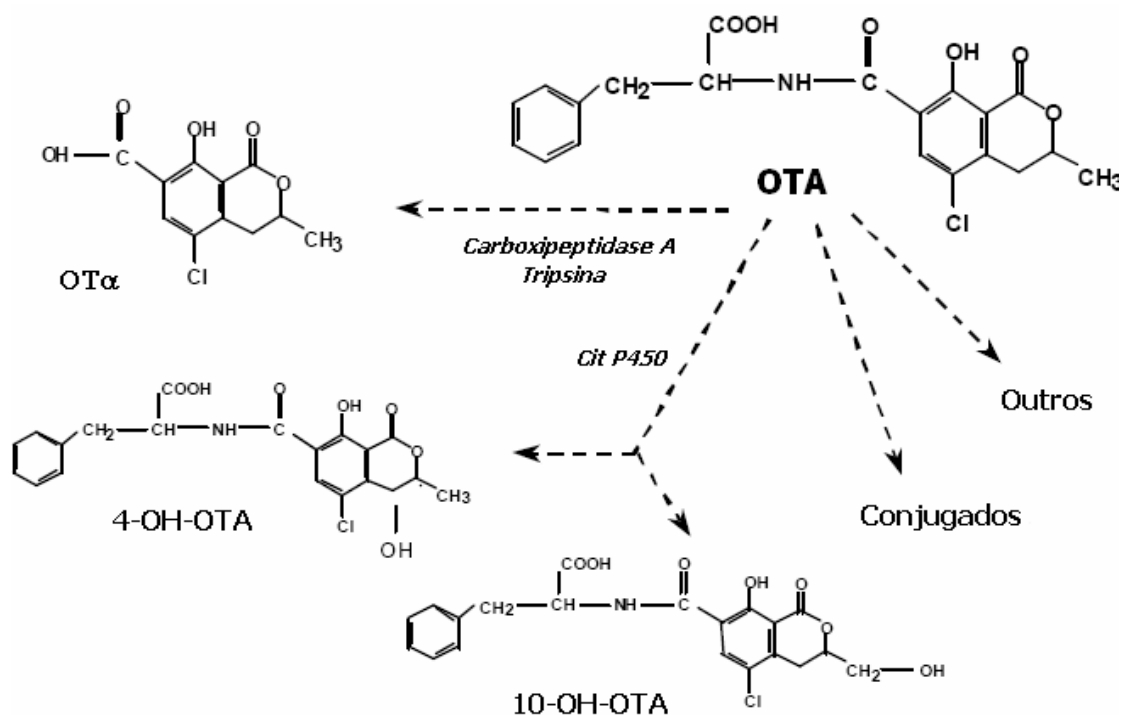


Figura 2 – Metabolitos da ocratoxina A (Adaptado de López de Cerain et al.).

A via metabólica principal da OTA é a hidrólise em compostos menos tóxicos, OT α , formados por ligações peptídicas. Esta ocorre principalmente a nível intestinal, por acção enzimática da micoflora local (Nogueira, 2005).

Nos ruminantes, a maior resistência aos efeitos tóxicos da OTA é atribuída à capacidade da micoflora do rúmen em degradar a toxina. Müller et al. (1998) e Özpınar et al. (1999) demonstraram que a capacidade do rúmen em hidrolisar a OTA é altamente dependente da dieta do animal, aumentando com a concentração de amido na dieta, devido ao maior número de protozoários existentes no rúmen.

1.6.3. Toxicodinâmica

De forma a explicar a toxicidade da OTA têm sido colocadas diversas hipóteses sobre a interacção da OTA e dos seus metabolitos com moléculas endógenas. Elas são relacionadas com interacções particulares, baseadas em ligações fortes e específicas em locais característicos da molécula alvo e, em ligações não específicas, baseadas na reactividade química da OTA e dos seus metabolitos com a vizinhança da molécula alvo.

1.6.3.1 Interacções baseadas em ligações específicas

1.6.3.1.1 Interferências com sistemas metabólicos envolvendo a fenilalanina e as suas consequências toxicológicas

Devido ao facto de existir um grupo fenilalanina (Phe), a OTA é um análogo estrutural de aminoácidos e por consequência pode entrar em todos os sistemas metabolitos envolvendo a fenilalanina. De facto, a OTA afecta principalmente a síntese proteica, mas prejudica igualmente a síntese de DNA e RNA em diversos organismos (Marquardt & Frohlich, 1992). Foram propostos dois principais mecanismos bioquímicos para explicar estas observações: inibição da síntese Phe-tRNA e inibição da Phe hidroxilase. Para além disso, e porque a OTA interrompe a síntese proteica, prejudica indirectamente a actividade de diversas enzimas celulares, e particularmente a actividade do fosfoenolpiruvato carboxicinase, a chave das vias de gluconeogénese enzimática.

1.6.3.1.1.1. Inibição da fenilalanina-tRNA sintetase

Könrad & Rösenthaller (1977) sugerem que a inibição competitiva pela OTA *versus* Phe na Phe-tRNA sintetase é a principal causa da toxicidade da OTA. Consequentemente, a reacção de aminoacilação e encadeamento peptídico são interrompidos, e portanto, a síntese proteica cessa ao nível pós-transcrição.

Mais tarde, num estudo dos efeitos tóxicos da OTA, OTB e 3S-OTA em culturas células embrionárias, Bruinink et al. (1997) demonstraram que todos os três compostos são tóxicos. No entanto, a toxicidade de OTB e 3S-OTA é, respectivamente, 19 e 10 vezes menor que a da OTA. O facto das alterações relativamente mais fracas ao nível da estrutura molecular da parte isocumarínica induzir diferenças na toxicidade, sugere que a isocumarina da OTA desempenha um papel importante na sua toxicidade. Recorrendo ao mesmo modelo experimental Bruinink & Sidler (1997) observaram que os efeitos tóxicos provocados pela OTA são atenuados pelas ligações proteicas, mas não pela adição de Phe. Então, estes autores concluíram que a dependência de Phe no processo, não desempenha um papel na toxicidade da OTA. Mais recentemente, num estudo computacional a cerca da interacção da Phe-tRNA sintetase com a OTA e com o fenilalanina adenilato monofosfato, o substrato enzimático natural com elevada afinidade, concluiu que o grupo fenilo não foi de maior importância para a toxicidade da micotoxina (McMaster & Vedani, 1999).

1.6.3.1.1.2. Inibição da hidroxilase da fenilalanina

A OTA inibe a hidroxilase da Phe e pode agir como substrato para a enzima. De facto, foi encontrado *in vivo* o complexo tirosina-OTA (Tyr-OTA) em células vivas de animais envenenados (Creppy et al., 1990). A hidroxilação irreversível de Phe a tirosina é a chave que controla o catabolismo deste aminoácido. É necessário um controlo da hidroxilase da Phe devido à rápida degradação no seu substrato que leva à depleção da Phe. Pelo contrário, a acumulação da Phe conduz a uma produção prejudicial de compostos derivados da Phe como no caso da doença fenilcetonúria (Krawczak & Zschocke, 2003). Interessantemente, Žanić-Grubišić et al. (2000) mostraram uma forte acção inibitória da OTA na Phe hidroxilase no fígado e não nos rins, recorrendo as experiências em ratos.

1.6.3.1.2. Danificação do fosfoenolpiruvato carboxicinase citosólico

Porque a OTA interrompe a síntese proteica, danifica a actividade de diversas enzimas celulares, e particularmente a actividade do fosfoenolpiruvato carboxicinase citosólico, a chave que regula a gluconeogénese, que pode ser quase completamente reduzida nos ratos (Meisner & Meisner, 1981).

1.6.3.2. Formação de espécies reactivas de oxigénio e as suas consequências toxicológicas

A inibição da síntese proteica é conseguida por causa do maior efeito tóxico da OTA, mas sozinho não consegue explicar a diversidade de efeitos tóxicos da micotoxina, tais como a peroxidação lipídica, alteração do DNA e interrupção da homeostase do cálcio. Existe diversos estudos que sugerem o envolvimento de *stress* oxidativo da toxicidade da OTA.

Os xenobióticos que induzem o *stress* oxidativo podem provocar danos oxidativos directos nas células, devido à produção de oxidantes fortes, tais como, anião radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), H_2O_2 e radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$), mas também envolve problemas na transdução e regulação da expressão dos genes via mecanismos redox. As espécies reactivas de oxigénio são ácidos nucleicos, proteínas e lípidos, mas também pequenas biomoléculas (ácido ascórbico, aminas biogénicas). O *stress* oxidativo pode ainda influenciar muitos processos redox, e portanto funciona como um mensageiro secundário que conduz a uma activação dos genes. Alguns destes genes são envolvidos na promoção da apoptose, a morte celular programada. Um sinal deste tipo é um mediador que amplifica o *stress* oxidativo primário.

Recorrendo, em conjunto, a estudos *in vitro* com microsomas hepáticos e renais, e a experiências *in vivo* em ratos, a OTA aumenta a peroxidação lipídica. Sugere-se que a OTA estimula a dependência de NADPH e de ascorbato na peroxidação lipídica, que ocorre nos microsomas, tendo como co-factor o Fe^{3+} . O complexo OTA- Fe^{3+} poderá ser formado, o que facilitaria a redução do Fe^{3+} na presença do sistema reductase NADPH-citocromo P450. O complexo resultante OTA- Fe^{2+} iria então produzir radicais hidroxilo, provocando a peroxidação lipídica nas membranas celulares (Soyöz et al., 2004; WHO, 2001, 1996).

A OTA provoca a peroxidação lipídica e afecta a permeabilidade da membrana plasmática ao Ca^{2+} e por consequência prejudica a homeostase: uma entrada excessiva de Ca^{2+} libertado da zona intracelular. Foi igualmente reportado que a administração de uma única dose ou de múltiplas doses mais pequenas de OTA em ratos, resulta num aumento da dependência do ATP no funcionamento da bomba de cálcio, no córtex renal. A OTA pode então perturbar todas as funções celulares que estão sob o controlo da concentração de cálcio (Dopp et al., 1999).

1.6.3.3. Inibição da cadeia respiratória mitocondrial

A disfunção mitocondrial é algo recente na toxicidade da OTA (Sava et al., 2006). Foi demonstrada que a OTA inibe a respiração em mitocôndrias hepáticas isoladas de rato (Meisner & Chan, 1974). Este facto, correlacionado com a depleção de ATP, tem sido considerado como uma consequência da inibição do transporte da fosfatase intramitocondrial através da inibição competitiva de proteínas transportadoras localizadas na membrana mitocondrial (Meisner & Chan, 1974) e/ou como um efeito directo na cadeia de transporte de electrões, através da inibição do transporte de electrões do succinato (Sava et al., 2006). A importância do mecanismo mitocondrial não está completamente esclarecida, devido ao facto da OT α , que é não-tóxica, ter sido igualmente capaz de inibir a respiração mitocondrial (Meisner & Chan, 1974).

1.6.3.4. Formação de adutos de DNA

Nos últimos anos, o debate sobre o envolvimento da OTA na formação dos adutos de DNA é controverso. O mecanismo de acção genotóxica tem sido postulado tendo em conta principalmente os resultados de experiências com marcadores radioactivos – ^{32}P -*postlabeling*, demonstrando que a dose de OTA e o tempo de permanência no organismo influenciam a formação de adutos de DNA. Após 5 dias da administração de OTA, todos os adutos desapareceram do fígado e no baço, enquanto que alguns adutos persistiram 16 dias nos rins (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007).

A estrutura química destes supostos adutos OTA-DNA ainda não foi totalmente elucidada e permanece a incerteza sobre o facto de serem adutos covalentes. Os adutos

de DNA têm sido detectados, utilizando o mesmo método ³²P-*postlabeling*, em experiências *in vitro* com diferentes culturas de células (Grosse et al., 1995, 1997) e com microsomas hepáticos e renais de coelhos tratados com OTA (Obrecht-Pflumio & Dirheimer, 2000). O número de adutos situa-se entre 1 a 2000×10⁹ nucleótidos. Obrecht-Pflumio & Dirheimer (2001) incubaram OTA com DNA e desoxiguanosina monofosfato (dGMP). Usando o método ³²P-*postlabeling* os autores detectaram diferentes adutos covalentes de DNA e dGMP e sugeriram que a OTA pode ser metabolizada pela peroxidase a espécies metabólicas activas que se ligam covalentemente ao DNA e ao dGMP. No entanto, do ponto de vista não específico da técnica utilizada, pode-se suspeitar que a OTA e os seus metabolitos não estão directamente envolvidos nestes adutos.

Recentemente, um aduto C8-desoxiguanosina (C8-dG) foi reportado por ter sido formado através de um radical fenólico da OTA (Dai et al., 2003). Este aduto foi produzido *in vitro* utilizando foto-irradiação da mistura OTA/dG no tampão fosfato e por consequência foi identificado por espectroscopia de massa e por ressonância magnética nuclear. Então, Dai et al. (2003) propuseram um mecanismo mutagénico por toxinas fenólicas: formação de espécies reactivas de oxigénio com subsequente danificação da cadeia de DNA e combinação de radicais fenólicos reactivos na posição C8 da guanosina para formar adutos covalentes de DNA. Em contraste, Mally et al. (2004) recorrendo a um técnica de espectroscopia de massa altamente sensível, não detectaram adutos de DNA após a administração de ¹⁴C-OTA em ratos.

1.7 Espécies produtoras de ocratoxina A

A ocratoxina A foi isolada pela primeira vez em 1965 a partir de uma cultura de *Aspergillus ochraceus* (van der Merwe et al., 1965). Posteriormente demonstrou-se a produção desta toxina por outros *Penicillium* e *Aspergillus*, incluindo sete espécies de *Aspergillus* pertencentes à secção *Circumdati* (*A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. melleus*, e *A. petrakii*) (Varga et al., 1996), *A. glaucus* (secção *Aspergillus*), *A. niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, e *A. carbonarius* (secção *Nigri*), e algumas espécies de *Penicillium* (Varga et al., 1996). Dentro do género *Aspergillus* é importante destacar a *A. niger* (Bennett & Klich, 2003; Magnoli et al., 2006) e *A. carbonarius* (Bennett & Klich, 2003; Magnoli et al., 2006) pertencentes à

secção *Nigri*. As espécies do género *A. niger* apresentam uma ampla distribuição, para além de ser utilizadas em diferentes processos industriais, pelo que se supõe a existência de um risco potencial muito importante. As espécies produtoras de OTA mais frequentemente detectadas nas uvas pertencem à secção *Nigri*, mais concretamente o agregado *A. niger* e *A. carbonarius*. Em uvas destinadas ao fabrico de vinho, foram detectadas estirpes produtoras de OTA das duas espécies mencionadas em Itália (Battilani et al., 2003) e Grécia (Tjamos et al., 2006). No entanto, noutros países europeus, *A. carbonarius* foi a única espécie produtora de OTA da secção *Nigri* a ser isolada, nomeadamente na Espanha (Bau et al., 2005) e França (Sage et al., 2002, 2004). Bellí et al. (2004b) reportaram que os *Aspergillus* da secção *Nigri* foram os produtores de OTA mais frequentemente detectados, mas não identificaram as espécies. Fora da Europa, foram detectadas estirpes produtoras de OTA do agregado *A. niger* e *A. carbonarius* no Brasil (Rosa et al., 2004). Na Argentina, a única espécie reportada da secção *Nigri* das uvas como produtor de OTA foi o agregado *A. niger* (Magnoli et al., 2003). A maioria das espécies de *A. carbonarius* é produtora de ocratoxinas (Cabañes et al., 2002). Outras espécies deste género são também capazes de produzir OTA (Abarca et al., 2003).

A maioria dos investigadores tem constatado dois factos: as estirpes do agregado *A. niger* são regra geral mais abundantes nas uvas que *A. carbonarius*; *A. carbonarius* parece ser muito mais relevante em termos de produção de OTA nas uvas, com uma maior proporção de estirpes produtoras da micotoxina, e em níveis mais elevados que as estirpes do agregado *A. niger*.

Os fungos ocratoxigénicos estão presentes no ambiente e, de uma forma geral, os alimentos estão sujeitos a albergarem estes fungos. Por sua vez, eles podem ou não germinar, crescer e produzir as toxinas de acordo as condições específicas exigidas pelo tipo de fungo, considerando-se que a variação regional e sazonal está directamente associada com o tipo de toxina produzida no campo. Estas condições óptimas para o crescimento do fungo são extremamente variáveis. Em geral, climas quentes e húmidos favorecem o desenvolvimento dos fungos ocratoxigénicos (Leong et al., 2006a; Bellí et al., 2006; Valero et al., 2006; Battilani et al., 2006; Blesa et al., 2006; Pardo et al., 2005b; Bellí et al., 2004a).

1.8. Exposição humana à ocratoxina A

As micotoxinas podem afectar a saúde humana e animal. Geralmente, os animais são expostos directamente às micotoxinas através de rações contaminadas. A exposição humana pode ser por duas vias; exposição directa através do consumo de géneros alimentícios contaminados, ou exposição indirecta através do consumo de produtos de origem animal, que contêm quantidades residuais de micotoxinas ingeridas pelos animais aquando da sua alimentação (Fig. 3). No entanto, os alimentos derivados de animais contribuem em menor escala para a exposição humana à ocratoxina A, com a excepção dos bebés e crianças, devido ao consumo de leite e produtos lácteos.

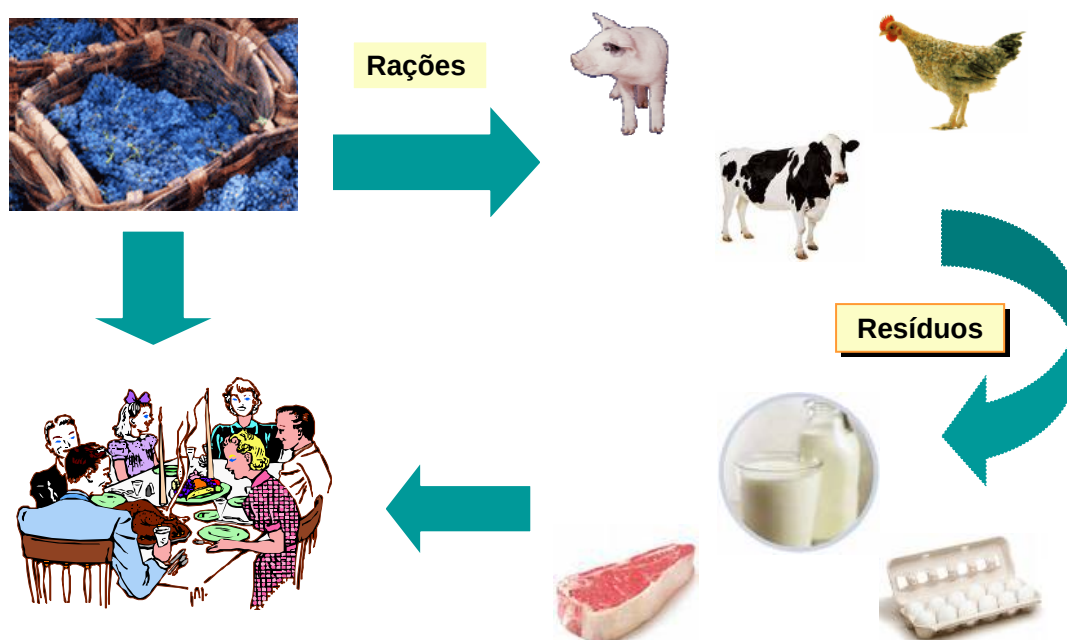


Figura 3 – Ocratoxina A na cadeia alimentar. Possíveis vias de contaminação de humanos pela OTA.

Actualmente, as doenças transmitidas por alimentos através de microrganismos constituem um grande problema para os órgãos de Saúde Pública. Apesar das doenças causadas por bactérias concentrarem a preocupação da maioria dos estudos em saúde humana e de se acreditar que o número total de pessoas afectadas por fungos ser menor que o número total de afectados por infecções bacterianas, virais e por protozoários, as doenças fúngicas são um problema sério de saúde no mundo, sendo que as micotoxinas relacionadas com alimentos são responsáveis por um grande número de mortes (Pitt, 2000; Bennett & Klich, 2003). Ainda que tenha importância internacional, as micotoxinas são geralmente pouco entendidas e ignoradas pelo público em geral

(Paterson et al., 2004) e o número de pessoas afectadas por micotoxicoses é ainda desconhecido (Bennett & Klich, 2003). Um problema grave envolvendo as micotoxinas que não será discutido aqui é o desenvolvimento e fabricação de armas biológicas (Bennett & Klich, 2003; Paterson et al., 2004).

Apesar da principal via de ingestão ser através de alimentos, a micotoxicose pode ser transmitida também por via respiratória e dérmica, entre outras. Ao contrário das micoses, as micotoxicoses são exemplos de intoxicação por via natural, tendo analogia com as patologias causadas pela exposição a resíduos de pesticidas ou metais pesados. Os sintomas de micotoxicoses dependem do tipo de micotoxinas, quantidade e duração da exposição, idade, saúde, e sexo do indivíduo exposto, e em menor grau, os efeitos sinérgicos envolvendo a genética, o estado nutricional e a interacção com outros tóxicos. Assim, a severidade da intoxicação por micotoxinas pode variar de acordo com factores como a deficiência de vitaminas, privação calórica, abuso de álcool, e estado da doença infecciosa. Ainda, as micotoxicoses podem aumentar a vulnerabilidade para doenças microbianas, agravar os efeitos da desnutrição e interagir sinergicamente com outras toxinas (Bennett & Klich, 2003).

A ocratoxina A entra na cadeia alimentar do Homem, devido a ser uma molécula moderadamente estável que sobrevive à maioria dos tipos de processamento dos alimentos e, portanto, aparece naturalmente em cereais e seus derivados, café, vinho, cerveja e sumo de uva, entre outros (Araguás et al., 2005; Berente et al., 2005; Lobeau et al., 2005; Pardo et al., 2005a); a OTA é igualmente detectada em produtos de origem animal (Araguás et al., 2005; Berente et al., 2005; Battilani et al., 2003). Estando a exposição humana à OTA claramente demonstrada pela sua detecção no sangue, leite materno (Muñoz et al., 2006; Boudra & Morgavi, 2006; Berger et al., 2003), e na urina (Pena et al., 2006), a presença da OTA em alimentos é francamente indesejável.

A presença da OTA no sangue é mais acentuada em países com clima temperado; mas felizmente ainda não há registos de intoxicações agudas em humanos. As maiores concentrações de OTA registadas no sangue foram as obtidas em regiões onde a doença endémica dos Balcãs ocorre e está associada ao aumento da incidência de tumores nas vias urinárias. Não obstante, foram detectadas concentrações semelhantes em alguns países europeus onde esta doença não foi registada (Bakker & Pieters, 2002).

Devido aos seus vários efeitos tóxicos e sua grande estabilidade frente ao aquecimento, a presença de micotoxinas em alimentos e rações é potencialmente perigosa para a saúde do Homem e dos animais. Embora a saúde humana seja o factor

mais justificável para o estabelecimento dos programas de monitorização para as micotoxinas nos alimentos, o factor económico tem sido largamente considerado pelos países que começam a implantar limites para a ocorrência destas micotoxinas (Caldas et al., 2002; Paterson et al., 2004). Este impacto na economia provém de perdas causadas directamente sobre os animais de produção e no seu manuseamento em geral ou sobre os géneros alimentícios.

Vários factores poderiam influenciar as decisões tomadas pelas autoridades sanitárias para estabelecer os limites aceitáveis para certas micotoxinas. Esses factores não se apresentam necessariamente suportados por conhecimentos científicos (Bennett & Klich, 2003). Alguns destes factores podem estar relacionados com a disponibilidade de dados toxicológicos, a disponibilidade de dados analíticos de inspecções nos produtos, a distribuição das micotoxinas sobre os géneros alimentícios, a disponibilidade de métodos para a análise, a existência de legislação em países com os quais se relacionam comercialmente, o suprimento suficiente de alimentos, entre outros.

A avaliação de risco da ocratoxina A em alimentos ocorre oficialmente através de uma junta de especialistas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS) que se reúne regularmente para as reavaliações pertinentes. Desde 1970, os contaminantes nos alimentos têm sido avaliados pelos comités dos órgãos mundiais, entre eles, o *Codex Alimentarius*. São as resoluções tomadas a partir destes encontros que estabelecem os níveis a serem seguidos pela comunidade internacional para o comércio dos seus produtos (WHO, 2001).

Em relação à ocratoxina A, tem-se dado atenção especial desde 1993, quando a *International Agency for Research on Cancer* classificou esta toxina, no Grupo 2B, como potencialmente carcinogénica em humanos, baseado em suficientes evidências para carcinogenicidade em estudos em animais de laboratório (IARC, 1993; Dragacci et al., 1999).

Em 2002, a Comissão da Comunidade Europeia, estabeleceu uma taxa de ingestão tolerável de ocratoxina A, considerando que “é prudente reduzir a exposição à ocratoxina A o mais possível, assegurando que as exposições estejam no nível mais baixo da gama das dose diárias toleráveis de 1.2-14 ng/kg peso corporal” (Directiva 2002/472/EC). De forma a harmonizar a legislação existente em todos os estados membros a União Europeia estabeleceu limites para diversos géneros alimentícios (Tabela 1).

Tabela 1 – Teores máximos estabelecidos pela União Europeia para diferentes géneros alimentícios (Directiva 2005/123/EC; Directiva 2006/576/EC).

Produto	Teor máximo ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ou $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Método de amostragem e método oficial de análise
Cereais (incluindo arroz e trigo) e produtos à base de cereais	5.0	Directiva 2002/26/EC
Cereais em grão (incluindo arroz em grão e trigo)	5.0	Directiva 2002/26/EC
Todos os produtos derivados de cereais (incluindo produtos à base de cereais e grãos de cereais destinados a consumo humano directo)	3.0	Directiva 2002/26/EC
Uvas passas	10.0	Directiva 2002/26/EC
Café torrado em grão e moído	5.0	Directiva 2002/26/EC
Café solúvel (café instantâneo)	10.0	Directiva 2002/26/EC
Vinho e bebidas à base de mosto de uva	2.0	Directiva 2002/26/EC
Sumo de uva, ingredientes de sumo de uva noutras bebidas, incluindo néctar de uvas e sumo de uva concentrado	2.0	Directiva 2002/26/EC
Mosto de uva e concentrado de mosto de uva, destinados ao consumo humano directo	2.0	Directiva 2002/26/EC
Alimento para bebés e alimentos processados à base de cereais destinados a lactantes e crianças	0.50	Directiva 2002/26/EC
Alimentos dietéticos com fins medicinais, destinados às crianças	0.50	Directiva 2002/26/EC
Ração animal:	12% humidade	Directiva 2006/576/EC
1) Matéria para rações:		
-Cerais e derivados	0.25×10^{-3}	
2) Ração final e complementos:		
- Para porcos	0.05×10^{-3}	
- Para aves	0.1×10^{-3}	

O aumento da consciência do potencial risco, que a exposição da OTA traz em termos de saúde, através do consumo de vinho e de géneros alimentícios, requer que cada país desenvolva medidas sistemáticas de detecção da OTA em vinhos e subprodutos vitivinícolas, presentes no mercado. Devido à toxicidade e presença em alimentos e rações para animais, a Comunidade Europeia emitiu diversas directivas que contêm os níveis máximos de OTA permitidos em diversas matrizes alimentares (Directiva 2005/123/EC; Directiva 2006/576/EC). No entanto, não existe legislação relativa ao teor de OTA em resíduos vitivinícolas, apesar do seu potencial risco. É então necessário disponibilizar novos métodos de confiança, de forma a forçar a introdução de novos regulamentos. Os subprodutos vitivinícolas devem ser controlados de forma a serem regulados em termos de consumo.

CAPÍTULO 2

SUBPRODUTOS DA VINIFICAÇÃO

O cultivo da vinha é feito em Portugal desde os tempos mais remotos da História, pois já no séc. II A. C. os historiadores da antiga Roma se referiram à viticultura na Península Ibérica. Apesar de constituir um sector tradicional, a vitivinicultura tem sido um dos sectores mais dinâmicos da agricultura portuguesa, no qual continuam a ser realizados grandes investimentos ao longo de toda a fileira vitivinícola, com vista à obtenção de uma melhoria de qualidade e de ganhos de competitividade na comercialização do vinho nos mercados internacionais.

O território nacional contém 32 regiões com classificação de Denominação de Origem Controlada (DOC). São estas as regiões em que os critérios de vinificação são mais limitativos, isto com o objectivo de vincar a tipicidade dos vinhos de cada uma, onde a qualidade ou características dos vinhos se devem essencial ou exclusivamente ao meio geográfico, incluindo os factores naturais e humanos. Entre estas regiões estão também abrangidos determinados vinhos produzidos nas regiões autónomas. As regiões DOC são tradicionalmente vinificadoras e têm, ao longo dos anos, vindo a confirmar as suas aptidões extraordinárias para o cultivo da vinha.

As castas utilizadas, os métodos de vinificação, as características organolépticas são apenas alguns dos elementos cujo controlo permite a atribuição de Denominações de Origem, cabendo às Comissões Vitivinícolas Regionais proceder a esse controlo de forma a garantir a genuinidade e qualidade dentro das suas regiões demarcadas (Lei nº. 8/85, de 4 de Junho).

A agricultura portuguesa, para além de ter de utilizar mais racionalmente os seus próprios recursos, terá também de se adaptar, a curto prazo, a soluções novas, quando não de procurá-las ou, até, de inventá-las.

A utilização de recursos subaproveitados, com o objectivo de aumentar a produtividade e criar riqueza, terá de merecer, cada vez mais, a nossa atenção. O tratamento de subprodutos agrícolas está a merecer cada vez maior atenção, tendo em vista o seu aproveitamento, a despoluição do ambiente e, em numerosos casos, e sempre que possível, com ambas as finalidades.

Estão definidas 32 denominações de origem e 8 indicações geográficas, o que dá uma ideia da diversidade de vinhos produzidos em Portugal. É um dos países onde o vinho atinge uma elevada expressão económica. Com cerca de 240000³ hectares de vinha (Fig. 4), Portugal é responsável pela produção anual de aproximadamente 150 a 250 mil toneladas de subprodutos vitivinícolas, segundo as estatísticas do INE nos anos de 1996 a 1998 (Braga et al., 2002).

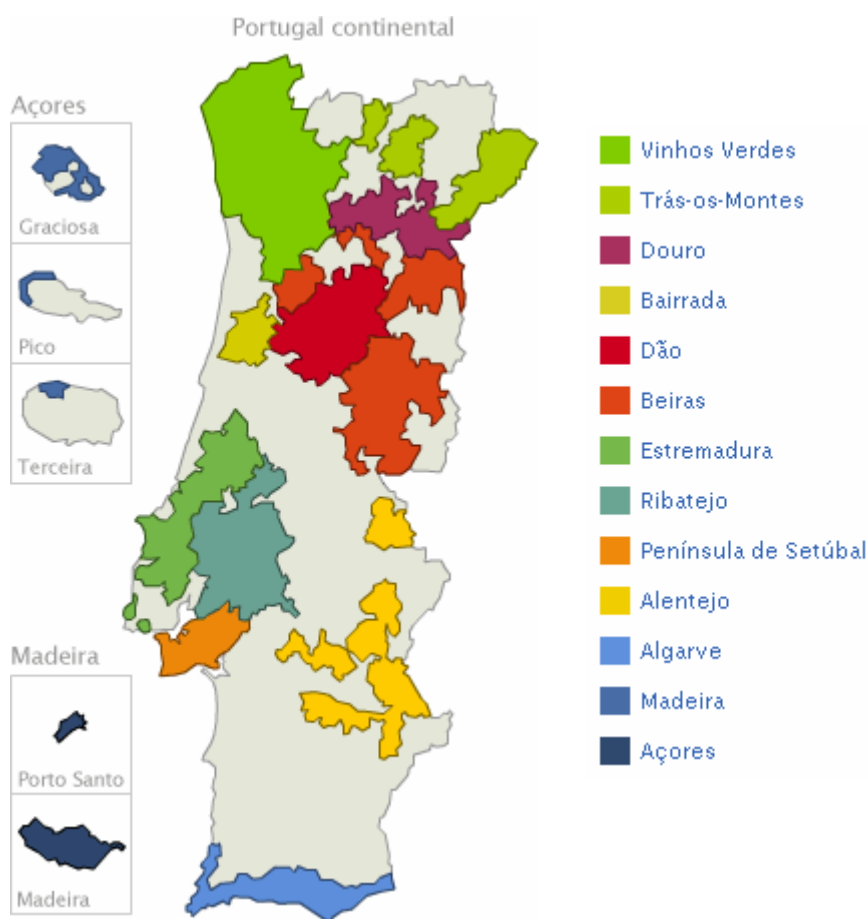


Figura 4 – Regiões vitivinícolas de Portugal continental e ilhas⁴.

³ Dados de 2002, disponíveis na página de Internet do IVV: <http://www.ivv.min-agricultura.pt/estatistica/index.html> (Acedido em Junho de 2007).

⁴ Disponível na página de Internet da INFOVINI: <http://www.infovini.com/> (Acedido em Junho de 2007).

A Região Demarcada do Douro (Fig. 5) abrange cerca de 250000 ha., distribuídos pelos distritos Vila Real, Bragança, Guarda e Viseu, encontrando-se actualmente uma área de cerca de 39000 ha ocupados por vinhedos. A região Duriense está dividida em três sub-regiões que diferem entre si no clima⁵. Existindo um limite de produção de 5500 L de vinho por hectare, estando 50% da produção total destinada à produção de Vinho do Porto, a RDD produziu 50 mil toneladas subprodutos vitivinícolas, nos anos de 1996 a 1998 (Braga et al., 2002).



Figura 5 – Região Demarcada do Douro⁵.

Na RDD a distribuição da área das vinhas não é uniforme. No Baixo Corgo a área de vinha ocupa cerca de 14000 hectares e o número de produtores é de quase 16000, isto é, em média cada produtor detém menos de um hectare de vinha. O Douro Superior é uma região mais desértica e o número de produtores é inferior ao número de hectares de vinha (quase 8000 hectares para pouco mais de 7900 produtores). No Cima Corgo a área de vinha ocupa cerca de 17000 hectares^{5,6}.

O Douro é das regiões mais antigas do país. Localiza-se no nordeste de Portugal, na bacia hidrográfica do Douro, rodeada de montanhas que lhe dão características climáticas particulares. A região estende-se por área total de cerca de 39000 ha, estando dividida em três sub-regiões naturalmente distintas, por factores climáticos e socio-económicos: Baixo Corgo, Cima Corgo e Douro Superior.

A individualidade do Douro deve-se à sua localização, sendo grande a influência que exercem as serras do Marão e de Montemuro, servindo como barreira à penetração dos ventos húmidos de oeste. Situada em vales profundos, protegidos por montanhas, a região caracteriza-se por ter Invernos muito frios e Verões muito quentes e secos.

O Douro pertence à Zona Vitícola Europeia CIIIb (Regulamento CE nº 1493/1999, de 17 de Maio de 1999). Nesta região produz-se vinho do Douro e o vinho do Porto, que é produzido por paragem da fermentação com adição de aguardente vínica

⁵ Dados disponível na página de Internet da INFOVINI. URL: <http://www.infovini.com/> (Acedido em Junho de 2007).

⁶ Dados disponíveis na página de Internet do IVDP. URL: <http://www.ivp.pt/pagina.asp?idioma=0&codPag=16&codSeccao=4&> (Acedido em Junho de 2007).

a 77%. O vinho do Porto é um vinho licoroso, e a doçura do vinho advém de açúcares naturais nas uvas não fermentados, sem qualquer concentração prévia. O tempo de fermentação e maceração é muito curto comparado com os outros vinhos (2 a 3 dias).

2.1. Influência do clima na proliferação de fungos ocratoxigénicos

Em cada sub-região há ligeiras alterações climáticas, devido à altitude e à exposição solar nos vales profundos. De um modo geral, o clima é bastante seco e os conjuntos montanhosos oferecem às vinhas protecção contra os ventos. No Baixo Corgo o ar é mais húmido e fresco, pois recebe ainda alguma influência atlântica. Além disso, a pluviosidade é mais elevada, ajudando a fertilizar os solos e a aumentar a produção. No Cima Corgo, o clima é mediterrâneo e no Douro Superior chega mesmo a ser desértico (as temperaturas chegam aos 50°C no Verão).

A RDD apresenta tipicamente um clima Mediterrânico, que se caracteriza por ter uma época estival longa, quente e seca e um Inverno moderado, com um total de precipitações atmosféricas relativamente baixo. Este tipo de clima ajuda a proliferação de fungos ocratoxigénicos nas uvas.

A distribuição geográfica dos fungos na natureza é muito ampla. Os fungos que produzem ocratoxina A, como os do género *Penicillium*, usualmente desenvolvem-se em alimentos a baixas temperaturas, e portanto, são os maiores produtores de ocratoxina A nas áreas de baixa temperatura, predominante em regiões de clima temperado, como é o caso da RDD. Já o *Aspergillus ochraceus* é, provavelmente, o produtor mais importante de ocratoxina A em países de clima tropical. Os requisitos para crescimento e produção de OTA por *A. carbonarius* começaram a ser estudados recentemente. As estirpes de *A. carbonarius* testadas foram isoladas de uvas de vários países. Para as estirpes *A. carbonarius* a temperatura óptima de crescimento, num meio sintético de composição semelhante ao da uva, situava-se entre 30 a 35°C, não existindo crescimento a menos de 15°C, e a actividade de água (a_w) óptima para crescimento situa-se entre 0.93 e 0.987 (Battilani et al., 2006). Num meio de cultura YES (*yeast extract sucrose* – meio agarizado de extracto de levedura e sacarose), Esteban et al. (2004) verificaram que estirpes de *A. carbonarius* são capazes de crescer entre 10 a 40°C. Em termos de produção de OTA, verificou-se que os requisitos para a produção da micotoxina eram mais específicos que para o crescimento. As condições óptimas para a produção de OTA variam consoante a estirpe (Esteban et al., 2004). Algumas

estirpes produziram níveis máximos de OTA entre 15-20°C a a_w entre 0.95-0.98. A produção máxima de OTA verifica-se nos estados iniciais de crescimento, ao fim de 5 dias de incubação em meio de composição semelhante à uva (Bellí et al., 2004a).

Geralmente a a_w óptima para o crescimento e germinação do *Aspergillus ochraceus* varia entre 0.96 a 0.99 a 20°C com limite mínimo de 0.99 (Battilani et al., 2006).

2.2. Caracterização dos subprodutos da vinificação

Produzindo-se em Portugal uma grande quantidade de vinho, o aproveitamento dos subprodutos secundários da vinificação tem nestes últimos anos merecido a atenção dos responsáveis pela política vitivinícola. Assim sendo, torna-se importante conhecer a sua contribuição e a respectiva composição dos subprodutos.

A produção de uvas e de vinho gera diversos resíduos e subprodutos. Estes materiais incluem bagaços, engaços, folhelho, grainhas, borras e sarros. Todos estes materiais são valorizáveis. Os bagaços são utilizados na produção de bebidas alcoólicas enquanto que as borras e os tartaratos são usados para a recuperação de etanol e ácido tartárico. A tradição, a experiência e o senso comum explica que não há nada a desperdiçar. Todos os subprodutos podem tornar-se fertilizantes, ração para animal ou combustível, entre outras aplicações.

As problemáticas ambientais e económicas dos subprodutos vitivinícolas estão a ser consideradas, pois torna-se cada vez mais óbvio que a deposição em aterros destes resíduos apresentam inconvenientes ambientais. Ao mesmo tempo, os avanços na química moderna e na biotecnologia, a tomada de consciência deste problema e o interesse industrial, permitiram o estudo destes “resíduos”. Novas tecnologias foram propostas não só para a sua reutilização na agricultura, mas também na produção de produtos diferentes para outros sectores. Hoje em dia, eles podem ser usados para compostagem, rações para animais e suplementos, alimentos e suplementos nutricionais (alimentos funcionais), bebidas alcoólicas, produtos para cabelo e pele, entre outras aplicações.

2.2.1. Bagaço

O bagaço é o principal subproduto da vinificação, e tem interesse económico não só pela sua riqueza alcoólica e tartárica, mas também devido a alguns dos seus componentes físicos.

O bagaço, como é do conhecimento geral, é o produto resultante da prensagem das massas vínicas, constituídas pelas partes sólidas das uvas e pelo mosto ou pelo conjunto mosto/vinho que as embebe. O Regulamento CE 1493/99 define-o como sendo o resíduo da prensagem das uvas frescas, fermentado ou não.

O bagaço é composto pelos engaços e folhelhos, e representa cerca de 11-15% em peso da matéria vínica inicial (Amico et al., 2004), com 70% em média de humidade e, contém açúcar, fibras, pectinas, minerais e ácidos orgânicos. Para além destes constituintes, contém também compostos fenólicos, tornando este resíduo perigoso para o ambiente, principalmente devido ao impedimento da germinação das plantas (Amico et al., 2004).

O bagaço da uva é um abundante subproduto (cerca de 30000 toneladas/ano) da nossa indústria vitivinícola.

Podem existir dois tipos de bagaço, consoante a tecnologia utilizada no fabrico do vinho. São eles:

(i) O bagaço doce ou fresco – é o bagaço que provém da elaboração de vinhos de “bica aberta”. Não fermenta com os mostos, contendo essencialmente líquido açucarado e pouco ou nenhum álcool. Assim, antes de submeter os bagaços brancos à destilação, torna-se indispensável deixá-los fermentar, a fim de que haja transformação do açúcar em álcool.

(ii) O bagaço tinto ou fermentado – é aquele que completou a fermentação alcoólica junto com o mosto durante a vinificação em tinto, portanto, o mosto é fermentado em contacto com as partes sólidas, estas, depois de prensadas, contêm uma certa quantidade de vinho e, por consequência, de álcool.

A incorporação de bagaços em terra arável, é uma prática comum devido ao seu teor de matéria orgânica e nutrientes. No entanto, acarreta sérios problemas pois os seus produtos de degradação podem inibir o crescimento da raiz das plantas (fenóis, taninos) (Diaz et al., 2002). Se os bagaços não forem previamente tratados, podem dar início a

uma série de problemas ambientais desde a poluição de águas superficiais às subterrâneas, traduzida em maus odores. As soluções de taninos e de outros compostos, oriundas do bagaço podem provocar a depleção do oxigénio no solo e nas águas subterrâneas (Arvanitoyannis et al., 2006). Uma alternativa de tratamento destes resíduos é a compostagem (Diaz et al., 2002).

Os bagaços são também normalmente processados de forma a produzir etanol, tartaratos, malatos e ácido cítrico (Kammerrer et al., 2005), resultando destes processos subprodutos com lignocelulose designados por “bagaços esgotados”. Este produto pode ser usado como combustível, adubo vegetal, corrector orgânico para a compostagem com outros resíduos orgânicos e, como alimento para animais (Nogales et al., 2005; Su & Silva, 2006).

Os bagaços podem ser usados para a recuperação de ingredientes alimentares e de alimentos funcionais (Hang, 1988), que fornecem benefícios fisiológicos demonstrados ou reduzem o risco de doenças crónicas (óleo de grainha, antioxidantes entre outros) (Su & Silva, 2006; Kammerrer et al., 2005; Llobera & Cañellas, 2007).

Os subprodutos vitivinícolas como os bagaços, grainhas e engaços são conhecidos como fontes de antioxidantes (ácidos fenólicos, flavonóides, etc.), contrariando os efeitos das gorduras saturadas e reduzindo a probabilidade de doenças coronárias. Estas substâncias possuem igualmente actividade anti-inflamatória, anti-cancerígena e anti-mutagénica (Shrikhande, 2000, Llobera & Cañellas, 2007). Existe uma quantidade considerável de artigos científicos referentes à recuperação destes produtos de subprodutos vitivinícolas e de novos métodos que melhoram a recuperação e a actividade antioxidante dos compostos isolados (Palenzuela et al., 2004; Yilmaz & Toledo, 2006).

Os extractos de bagaços, grainhas e folhelho apresentam resultados antibacterianos efectivos quando testados em espécies bacterianas com uma concentração relativa de 5%. Os extractos podem ser usados em formulações para proteger alimentos contra ataques bacterianos (Özkan et al., 2004).

2.2.2. Engaços

Os engaços correspondem à parte verde e lenhosa do cacho que serve de suporte aos bagos da uva. Quando estão presentes nos vinhos dão-lhes aromas e sabores herbáceos. Os engaços representam cerca de 2.5-7.5% em peso da matéria vínica inicial,

e contém 78 a 80% de água (Silva, 2006). Na sua composição estão contempladas as fibras (lignina e celulose) e uma elevada percentagem de minerais, especialmente nitrogénio e potássio (Bertran et al., 2004).

Os engaços podem ser usados como adubo para os solos, adicionando-os a lamas vitivinícolas digeridas aerobicamente e centrifugadas (Bertran et al., 2004). Eles têm um enorme valor agronómico e é particularmente apropriado para solos de vinhas que possuem baixo teor de matéria orgânica.

A utilização de engaços em rações para animais ou como componente de rações já foi proposto após a fermentação em estado sólido (Nicolini et al., 1993). Foram também utilizados com sucesso na remoção de iões metálicos de soluções aquosas (Villaescusa et al., 2004).

2.2.3. Folhelho

Pode-se definir folhelho como a pele da uva: fundamento da qualidade dos vinhos, porque nela se encontram os pigmentos, os aromas e os taninos. No folhelho depositam-se as leveduras que transformam o mosto em vinho. Geralmente, apresenta na sua composição química teores de humidade entre 78 e 80% (Silva, 2006).

O folhelho constitui cerca de 40 a 50% do peso do bagaço fresco. Pode ser utilizado como adubo húmico (tanto seco, como húmido) ou incorporado em alimentos compostos para animais.

2.2.4. Grainhas

A grainha constitui aproximadamente 30% do peso do bagaço húmido e cerca de 40% do bagaço fortemente prensado e desengaçado. Representa 3% em relação ao peso da uva.

As grainhas consistem principalmente em 35% fibras, 29% compostos nitrogenados (por exemplo, polifenóis), 15% lípidos, 11% proteínas, 3% matéria inorgânica e 7% água (Mayer et al., 2006). Contém ainda entre 10 e 20% de óleo. O óleo de grainha é caracterizado pelo seu elevado teor em ácidos gordos, como o ácido linoleico (72-76%, w/w) (Martinello et al., 2007). Este ácido é conhecido por aumentar o HDL (lipoproteínas de alta densidade) e por baixar o LDL (lipoproteínas de baixa

densidade). Podem ser também utilizadas nas indústrias de rações e adubos, extracção de taninos para as indústrias enológica e farmacêutica.

O óleo de grainha é igualmente utilizado como ingrediente cosmético em tecidos danificados, devido às suas propriedades regenerativas e reconstrutivas⁷.

2.2.5. Borrás

O Regulamento CE 1493/99 define borra de vinho como o resíduo que fica depositado nos recipientes que contenham vinho após a fermentação, ou aquando da armazenagem, ou após tratamento autorizado, bem como o resíduo obtido pela filtração e/ou pela centrifugação deste produto. São também consideradas borras de vinho os resíduos que ficam depositados nos recipientes que contenham mostos de uvas.

As borras apresentam-se na forma de uma massa heterogénea que se deposita após actividade fermentativa dos mostos (“primeiras borras” ou “borras de fermentação”), e ao longo dos vários processos tecnológicos empregues no fabrico de vinho. Obtêm-se, ainda, as borras de defecação, as resultantes das colagens efectuadas nos vinhos, as das várias trasfegas e as borras de decantação.

Uma quantidade de 140 kg de uvas produz, aproximadamente, 1 hL de vinho, dando 5.5 kg de borras líquidas com 4.5% de álcool (Cabras et al., 1997). Desta forma, as borras representam cerca de 4% da massa vínica inicial.

As borras são susceptíveis de recuperação da sua componente líquida. Por destilação directa obtém-se a aguardente vínica ou álcool etílico, produto com diversas utilizações, nomeadamente na produção de vinhos licorosos. Pode-se também extrair o tartarato de cálcio, a partir do qual se obtém o ácido tartárico.

Os resíduos vitivinícolas podem ser usados como uma fonte de tartaratos (Braga et al., 2002). Os resultados indicam valores desde 100 a 150 kg/t (borras) e 50 a 75 kg/t (bagaços) relativamente à produção potencial de tartarato de cálcio.

Após extracção do álcool e ácido tartárico, as borras podem ser utilizadas como fertilizante. Podem, ainda, ser aproveitadas para a extracção de leveduras e de matéria corante, e também para a alimentação animal.

⁷ Dados disponíveis na página de Internet: http://en.wikipedia.org/wiki/Grape_seed_oil (Acedido em Junho de 2007).

As leveduras representam aproximadamente 60 a 70% do conteúdo das borras. As leveduras de borras têm sido utilizadas como suplementos probióticos (a 0.1%) em alimento para peixes (Lara-Flores et al., 2003) e como ração para animais. Elas contêm proteínas, hidratos de carbono e vitaminas.

Aproximadamente 20% do peso seco total das leveduras é devido às paredes celulares, que contêm cerca de 30-60% de 1,3-β-D-glucanos, em peso seco. As β-1,3-glucanos são não-tóxicas e são estimuladores da resposta imunitária não específica (contra doenças infecciosas, cancro, vírus, radiações, etc.). Novos métodos de produção de 1,3-β-D-glucanos através de leveduras de borras de vinho já estão disponíveis (Freimund et al., 2003).

2.2.6. Sarros

Os sarros correspondem ao tartarato bruto, produzido pelo vinho, que forma uma sedimentação cristalina nas paredes dos recipientes que os contêm, formando um revestimento bastante duro.

O ácido tartárico é o que figura em maior quantidade no vinho (2 g/L a 5 g/L). O ácido tartárico, duro e adstringente, provém da uva e pode originar inofensivos depósitos nos vinhos pouco estabilizados. Os produtores eliminam esses depósitos arrefecendo os vinhos e filtrando-os depois. Em casos de vinhos com pouca acidez, é desejável que o ácido tartárico seja adicionado, contribuindo para a qualidade global do vinho⁸.

Nos vinhos normais os sarros apresentam a seguinte composição: bitartarato de potássio, tartarato de cálcio, substâncias diversas.

A valorização dos sarros está precisamente no ácido tartárico que possuem, na forma de tartaratos brutos, sais de cálcio e de potássio, que a indústria purifica na forma de “cremor tártaro”⁹ (hidrogenotartarato de potássio), tartarato de potássio ou de tartarato de cálcio, o intermédio habitual na produção de ácido tartárico.

⁸ Dados disponíveis na página da Internet da Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes: <http://www.vinhoverde.pt/en/vinhoverde/glossario/glossario.asp?letra=T> (Acedido em Junho de 2007).

⁹ Referência retirada na página da Internet: http://pt.wikipedia.org/wiki/Cremer_t%C3%A1rtaro (Acedido em Junho de 2007).

MÉTODOS DE ANALÍTICOS PARA A DETECÇÃO DE OCRATOXINA A

A análise de compostos vestigiais deve ser simples e rápida de forma a prevenir a distribuição de compostos perigosos, e suficientemente económica para permitir o desenvolvimento de programas de monitorização de OTA em diferentes matrizes. No entanto, apenas alguns métodos disponíveis na literatura compreendem todas as premissas citadas.

Até ao dia de hoje não existem metodologias desenvolvidas para avaliar o teor de ocratoxina A em subprodutos vitivinícolas. Desta forma uma revisão bibliográfica de métodos de análise de OTA só poderá ser realizada de acordo com matrizes aquosas (como é o caso do vinho) e com matrizes sólidas (como o caso da uva).

3.1. Extracção de OTA em vinho

3.1.1. Métodos de extracção

Tipicamente, a extracção de OTA do vinho é realizada através de procedimentos de extracção líquido-líquido. Esses procedimentos envolvem diluição da amostra com uma solução salina acidificada, seguida de extracção com solventes clorados, como o clorofórmio, depois de um passo de acidificação – necessário para a determinação de OTA, devido à ligação da OTA com as proteínas (Valenta, 1998).

3.1.2. Métodos de limpeza

Com o desenvolvimento de métodos analíticos, a determinação de OTA em vinhos, tendeu para a utilização das IAC e para as colunas SPE (p.e. C-18 SPE (Festas et al., 2000; Zöllner et al., 2000; Leitner et al., 2002)), como método de limpeza e concentração da amostra. As colunas IAC foram usadas na análise de vinhos inicialmente por Zimmerli & Dick (1995), com extracção prévia líquido-líquido. Desta forma, a redução ou eliminação de solventes nos processos de extracção e a obtenção de limites de detecção e quantificação mais baixos, foram alcançados. Recorrendo às IAC, utilizam-se tipicamente soluções de diluição de PBS e NaHCO_3 . Visconti et al. (1999) verificaram que para análise de vinho era necessário adicionar à solução de diluição polietileno glicol (PEG), particularmente em amostras de vinho tinto, para reduzir o efeito de compostos pigmentados que interferiam no processo de ligação dos anticorpos com a OTA. A lavagem da coluna faz-se com água e/ou uma solução salina (p.e. NaCl), e a eluição da OTA faz-se com um solvente, tipicamente metanol ou metanol acidificado. O método de limpeza com IAC apresenta como principal desvantagem o preço, não esquecendo que é um método extremamente demoroso (Berente et al., 2005), e as IAC não são totalmente específicas, devido à presença do etil éster da OTA ser igualmente retido, e existe a possibilidade das colunas já estarem previamente contaminadas com a micotoxina, e em alguns casos reportados, as IAC originam baixas recuperação e reprodutibilidade (Berente et al., 2005; González-Peñas et al., 2004).

Recentemente, estão a ser descritos métodos que envolvem micro-extracção em fase líquida com 1-octanol imobilizado em poros numa fibra porosa oca, sendo uma alternativa às IAC pois esta técnica é barata, tendo como vantagem a não reutilização das fibras usadas (González-Peñas et al., 2004). No entanto, tem como desvantagem um limite de detecção mais elevado. Para os vinhos, a precisão, a repetibilidade e a reprodutibilidade das IAC, para a determinação da OTA está bem estabelecida (Ratola et al., 2004, 2005). No entanto, quando as uvas são a matéria inicial, as IAC são impraticáveis.

3.1.3. Análise cromatográfica

A análise da OTA é tipicamente realizada recorrendo à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa, com diversas fases móveis, sendo compostas por metanol ou acetonitrilo acidificado e água. A detecção por fluorescência (FL) é a forma de detecção mais frequentemente reportada na literatura, e permite limites de detecção nas amostras da ordem dos $0.02 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Berente et al., 2005). Alternativamente utiliza-se a detecção por espectrómetro de massa (MS). A derivatização pós-coluna com amónia provou aumentar a resposta do detector à OTA e o seu metil-ester (Leitner et al., 2002; Shephard et al., 2003).

3.1.4. Confirmação

A análise da OTA por HPLC-FL permite uma identificação ambígua da sua identidade. A confirmação da identidade com este método de detecção faz-se presuntivamente na comparação do tempo de retenção do pico cromatográfico observado com o do padrão. Uma forma simples de confirmar a identidade do metabolito é através da adição duma quantidade de padrão conhecida à amostra. Se a resposta do detector aumentar proporcionalmente à quantidade de padrão adicionado é provável que o metabolito em questão seja o mesmo do padrão. Pelo contrário, se surgem dois picos cromatográficos distintos, então trata-se de metabolitos diferentes. A confirmação da presença da OTA em diversas matrizes é frequentemente alcançada através de derivatização, um processo químico que resulta no aparecimento de um novo composto num dado tempo de retenção. Os métodos de derivatização da OTA consistem na formação do metil-ester da OTA, para o qual existem dois processos distintos: adição de BF_3 em metanol ou adição de metanol e ácido clorídrico, com tempo de reacção durante a noite. Outra alternativa consiste em clivar enzimaticamente a OTA em $\text{OT}\alpha$ através duma carboxipeptidase. Desta forma, a detecção por MS-MS é mais vantajosa, visto que não são necessários passos de confirmação adicionais, evitando erros na derivatização, e segundas corridas cromatográficas (Leitner et al., 2002).

3.1.5. Métodos de referência para análise de OTA em vinho

O método de Visconti et al. (1999) foi validado num estudo interlaboratorial (Visconti et al., 2001) e adoptado como método oficial para propósitos de comércio internacional pela AOAC Internacional (Gilbert & Anklam, 2002), e foi proposto como método de referência para análise de OTA em vinhos, aceite pelo CEN em 2003 (Norma Europeia EN 14133) e pela OIV (OIV, 2004). Este método utiliza o processo de extracção por colunas de imunoafinidade seguido de determinação cromatográfica (HPLC-FL).

3.2. Determinação de OTA em uvas

Os métodos mais bem documentados no que dizem respeito ao desempenho são os de análise a uvas passas. Em 2003, Anderson et al. (2003) analisaram a OTA em uvas passas por um método que envolvia uma hidratação prévia da amostra, homogeneização e extracção com metanol acidificado. A mistura foi filtrada, diluída e aplicada em colunas IAC. A amostra eluída foi analisada por HPLC-FL. A taxa de recuperação do método foi entre 69 e 74%, e o RSD_r e RSD_R de 6.8% e 21%, respectivamente, concluindo os autores que o método é eficaz e de confiança para a análise deste contaminante nesta matriz. Investigadores portugueses (Serra et al., 2004) analisaram uvas por um método semelhante ao de Visconti et al. (1999) para o vinho, com extracção da OTA das uvas com solução bicarbonada e PEG, e obtiveram taxas de recuperação, na ordem dos 76%.

Apesar do desenvolvimento em termos de sensibilidade e selectividade atingido nos métodos analíticos mais recentes, as técnicas de separação com solventes de extracção, são necessários para ultrapassar as influências adversas dos componentes da matriz e dos analitos coexistentes nos sinais analíticos. Para além disso, a capacidade de detecção instrumental por vezes necessita de ser aumentada recorrendo a técnicas de pré-concentração.

Considerando que nas uvas a ocratoxina A surge principalmente na película (Timperio et al., 2006) um potencial método de extracção de OTA é através de solventes, onde a técnica de separação é utilizada para mover as espécies presentes na fase sólida para a fase líquida (tipicamente uma fase orgânica) através do contacto intenso de ambas as fases, de tal forma que exista um eficiente transporte das espécies

através da interface das duas fases, devido à grande área interfacial. A extracção da OTA é geralmente realizada através de solventes clorados (Valenta, 1998). A substituição dos solventes halogenados é francamente recomendada de forma a diminuir potenciais riscos ocupacionais e ambientais.

3.2.1. Métodos de referência

Neste momento, não existem métodos de referência para análise de uvas ou resíduos sólidos resultantes do processamento das uvas. Um dos problemas que se coloca na análise de uvas é o da amostragem. Existem directivas comunitárias para o processo de colheita de amostras e de análise de uvas passas para o controlo oficial do teor de OTA (Directiva 2002/26/CE). De acordo com a massa do lote (em toneladas), está especificado o número de amostras elementares e a amostra global de peso. Para lotes com menos de 15 toneladas, devem ser retiradas entre 10 a 100 amostras elementares, num peso global de 1 a 10 kg. Como não está prescrito a nível comunitário nenhum método específico para a determinação do teor de OTA nestas matrizes, os laboratórios podem escolher o método a utilizar, desde que o método respeite critérios de precisão e taxa de recuperação especificados, consoante o teor estimado da OTA na amostra. Para amostras com concentrações de OTA inferiores a 1 $\mu\text{g/kg}$, o RSD_r deve ser menor ou igual que 40%, o RSD_R menor ou igual que 60% e a taxa de recuperação situar-se entre 50 a 120%. Se a amostra tiver uma concentração de OTA entre 1 a 10 $\mu\text{g/kg}$, o RSD_r e RSD_R devem ser iguais ou inferiores a 20 e 30%, respectivamente, e a taxa de recuperação ser entre 70 a 110%.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Metodologia de trabalho

O trabalho experimental envolveu duas fases distintas – a implementação, optimização e validação de novas metodologias analíticas, simples mas suficientemente fiáveis, que pudessem permitir um rápido rastreio de um elevado número de amostras, e a avaliação da contaminação de borras e bagaços com OTA.

Para a implementação de metodologias analíticas recorreu-se sempre ao processo de extracção com solventes como etapa única de extracção/purificação, tendo-se utilizado dois métodos distintos de extracção para os bagaços, e um método para as borras. Todos os métodos foram comparados com o único método de referência, que no entanto, é adoptado para uvas, mostos e vinhos. Além disso, todos os métodos foram objecto de uma validação, incluindo a avaliação da incerteza global de acordo com a metodologia de cálculo estatístico preconizada pela Eurachem (2000).

4.2. Procedimentos de amostragem

O processo de selecção e de recolha de amostras para análise de ocratoxina A esteve a cargo do Professor Doutor Fernando Braga, da UTAD, parceiro do projecto de investigação subjacente a esta tese de mestrado.

A amostragem incidiu na Região Demarcada do Douro (RDD) tendo sido obtidas amostras de bagaços e borras, correspondentes à colheita de 2006. Dentro da RDD seleccionaram-se 13 e 7 locais para a análise de ocratoxina A em bagaços (Figura 6) e borras, respectivamente (Tabelas 2 e 3).

Os procedimentos de amostragem utilizados variaram consoante a natureza do subproduto. Dado o seu carácter sazonal, as datas de início da recolha de amostras foram escolhidas de modo a coincidir com as vindimas na Região do Douro e também com os picos de produção característicos de cada subproduto. De igual modo, houve a preocupação de obter amostras cuja origem assegurasse uma boa distribuição geográfica dentro da Região Demarcada do Douro.

As amostras de bagaços foram colhidas manualmente, a uma profundidade média de 40 cm, quando ainda estavam nos camiões que efectuaram o seu transporte até as instalações do Centro de Aproveitamento de Subprodutos da Região Demarcada do Douro (Subvidouro, C. R. L.). Este cuidado foi necessário devido à possibilidade de alteração da composição química e física das camadas exteriores dos bagaços por exposição ao ar.

Em cada amostragem colheram-se cerca de 500 g do respectivo bagaço, sendo esta quantidade dividida em dois sacos de polietileno bem fechados e identificados. Estas amostras foram então congeladas a -18°C até a altura de serem analisadas.

Quanto ao procedimento utilizado para as amostras de borras de vinho, quando uma remessa proveniente de uma adega chegava a Subvidouro, era colhida uma amostra com um litro pela parte superior do camião-tanque. As amostras eram seguidamente fraccionadas e congeladas a -18°C em recipientes de polietileno com meio litro de capacidade, devidamente identificados.

O transporte das amostras para o laboratório do LEPAE realizou-se em condições de frio, não tendo havido descongelação até ao momento da análise.

Tabela 2 – Locais da RDD da colheita das amostras de bagaço.

Local[¶]	Designação da Empresa	Data da amostragem	Tipo de vinho
1	Caves Raposeira	25/09/2006	Mistura para espumantes
2	Quinta de São Domingos	29/09/2006	Vinho tinto
3	Caves de Sta. Marta	06/10/2006	Vinho tinto
4	Caves de Sta. Marta	06/10/2006	Vinho branco
5	Adega Cooperativa de Favaios	08/09/2006	Moscatel
6	Adega Cooperativa de Alijó	11/09/2006	Moscatel
7	Quinta de La Rosa	09/10/2006	Vinho do Porto
8	Adega Cooperativa São João da Pesqueira	02/10/2006	Vinho tinto
9	Adega Cooperativa de Murça	02/10/2006	Vinho tinto
10	Quinta do Ventozelo	02/10/2006	Vinho tinto
11	Quinta das Avelerias	29/09/2006	Vinho branco
12	Quinta das Avelerias	29/09/2006	Vinho tinto
13	Adega Cooperativa de Vila Nova de Foz Côa	09/10/2006	Vinho tinto

[¶] Os números indicados estão evidenciados na Figura 6.

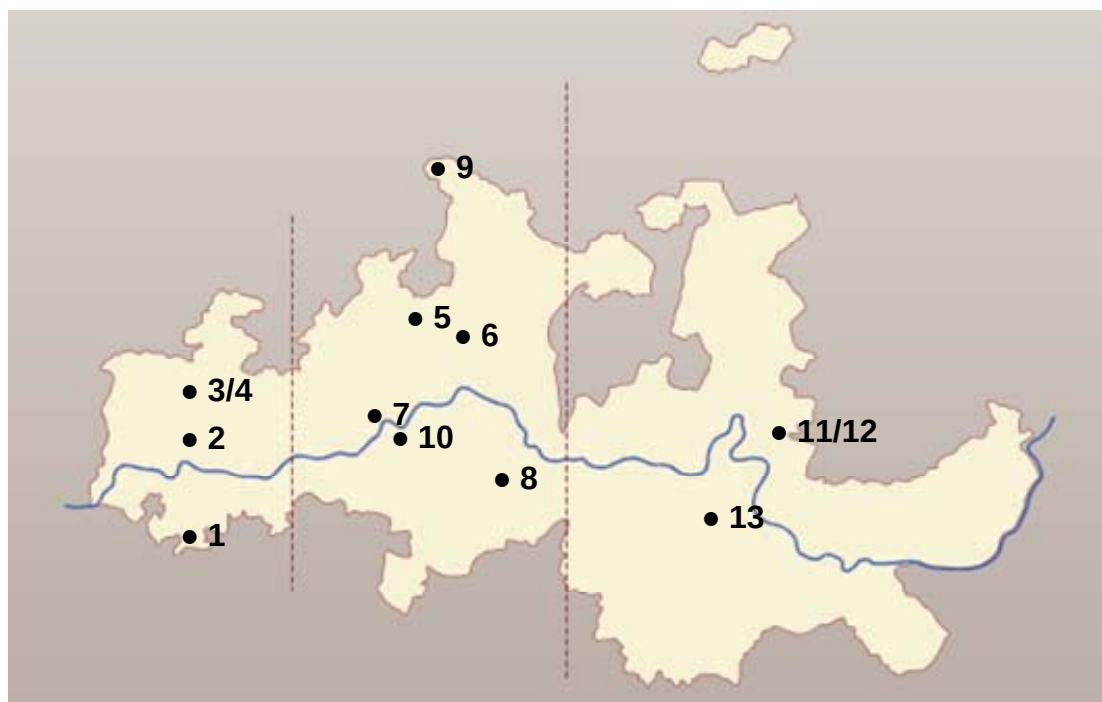


Figura 6 – Distribuição geográfica das amostras de bagaços colhidas na RDD.

Tabela 3 – Locais da colheita das amostras de borra, na RDD.

Designação da Empresa	Data da amostragem	Tipo de vinho
Quinta do Côtto	17/10/2006	Vinho tinto
Caves de Sta. Marta	15/12/2006	Vinho tinto
Adega Cooperativa São João da Pesqueira	15/01/2007	Vinho tinto
Adega Vitivinícola do Peso da Régua	22/12/2006	Vinho tinto
Adega Cooperativa de Freixo de Numão	15/01/2007	Vinho tinto
Quinta do Sol	23/04/2007	Vinho do Porto
Quinta do Zimbrow	27/04/2007	Vinho tinto

4.3. Reagentes e materiais

A ocratoxina A foi adquirida à Sigma (St. Louis, MD, USA). Todos os reagentes são grau de pró-análise. Os solventes, acetonitrilo, ácido acético, éter dietílico, clorofórmio, metanol e acetato de etilo, grau de HPLC, foram comprados à Merck ou à VWR (Portugal), de acordo com as necessidades de detecção por fluorescência. Para preparar a fase móvel foi utilizada água destilada, previamente filtrada num filtro de Nylon de 0.45 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

As colunas de imunoafinidade foram as Ochratest WB da Vicam.

4.4. Equipamento

Para as extracções com IAC, recorreu-se a um multi-extractor Whatman de 12 entradas, com uma bomba de vácuo D-79112 da KNF Neuberger. Foram também utilizados um rota-vapor RE-111, um banho de água B-461, todos da Büchi, um banho termostatzado JPSelecta.

Para liofilizar as amostras de borra de vinho utilizou-se um liofilizador Benchtop K (Virtis, USA). Utilizou-se igualmente uma centrífuga refrigerada (5804R da VWR) para uma melhor separação das fases sólida e líquida nas extracções com IAC. E ainda uma incubadora orbital Certomat[®]R da B. Braun para os ensaios de optimização do método de extracção A, de OTA em bagaços.

O HPLC utilizado é um Merck–Hitachi L-7250 (Tokyo, Japão), equipado com um detector de fluorescência Merck-Hitachi F-1080, um injectador automático L-7250 e

uma interface Merck-Hitachi D-7000. Os dados foram adquiridos recorrendo ao programa HPLC System Manager (HSM) versão 3.1 (Hitachi). A coluna cromatográfica foi uma *Macherey–Nagel end-capped Superspher reversed-phase* (RP-18), (250 × 4 mm i.d.; 5 µm), com uma pré-coluna C18, e foi usado um *loop* de 118 µL. A coluna operou à temperatura ambiente.

4.5. Preparação de padrões de ocratoxina A

Uma solução de 9.4 mg.L⁻¹ de OTA em metanol foi preparada e a concentração foi verificada espectrofotometricamente (Mr: 403.8, $\epsilon_{333\text{ nm}}$ 5500 M⁻¹.cm⁻¹) (González-Peñas et al. 2004). As soluções de contaminação dos bagaços e borras, e os padrões utilizados nas rectas de calibração (Método I – padrões de 0.47 a 18.80 µg.L⁻¹; Método II – 0.05 a 23.50 µg.L⁻¹ - para explicação do Método I e II consultar a página 41) foram preparados a partir da solução mãe através de diluições apropriadas em metanol. Todos os padrões foram preservados no frigorífico a 4°C.

4.6. Optimização do método de extracção A, de OTA em bagaços

Procedeu-se à optimização do solvente de extracção, da temperatura e do pH. Foram preparadas soluções padrão de 9.4, 28.2, 47.0 e 94.0 µg.L⁻¹ em metanol, e adicionou-se 1 mL de cada padrão a 5 g de bagaço, para avaliar estes parâmetros.

Inicialmente, realizou-se a selecção do solvente, efectuando quatro tentativas, com: solução aquosa de (5% NaHCO₃ + 1% PEG) seguida de éter dietílico; 5% NaHCO₃ seguido de acetato de etilo; clorofórmio; acetato de etilo. Contaminaram-se 5 g de bagaço com 1 mL de um padrão de OTA 94.0 µg.L⁻¹ em metanol, e deixou-se secar à temperatura ambiente durante 1 dia. A extracção foi realizada sob as seguintes condições: volume de solvente de 20 mL, velocidade de agitação de 100 rpm (numa incubadora orbital), temperatura de extracção de 30°C, tempo de extracção de 1 hora.

Após a extracção, o sobrenadante foi filtrado sob vácuo, recorrendo a um cadinho G4 auxiliado por uma bomba de vácuo, e de seguida transferido para um balão periforme e evaporado à secura num rota-vapor. O resíduo foi reconstituído em 1 mL de metanol e agitado num *vortex* durante 30 s, sendo filtrado num filtro de seringa PTFE 0.45 µm, antes da análise por HPLC-FL, onde foram injectadas alíquotas de 118 µL.

Realizaram-se todos os ensaios em duplicado; a área total do pico cromatográfico da OTA foi utilizada na escolha do melhor solvente.

Subsequentemente, avaliou-se o efeito do valor de pH, utilizando como solvente de extracção o acetato de etilo adicionado de 400µL de ácido orto-fosfórico. E finalmente, a temperatura de extracção (4-20°C) foi optimizada.

4.7. Método de extracção A dos bagaços

Após optimização, as condições adoptadas para o método A de extracção de OTA em bagaços foram as seguintes: as amostras de bagaço foram colocadas à temperatura ambiente. Após escolha aleatória, 5 g de cada amostra foram pesadas e transferidas para um frasco e extraídos com 20 mL de acetato de etilo num banho de gelo, a 4°C, durante 1 hora e a 100 rpm (num agitador magnético). Após a extracção, a fase orgânica foi filtrada num cadinho G4 e de seguida evaporada até à secura. O resíduo foi reconstituído em 1mL de metanol e injectado no sistema cromatográfico, sempre em duplicado.

4.8. Método de extracção dos bagaços por IAC

De forma a comparar o método de extracção de OTA com solventes, realizaram-se ensaios com IAC. Para analisar o bagaço, os métodos descritos no documento *European Standard* prEN 14133 (CEN, 2003) foram utilizados, mas com adaptação. Em vez de se usar 10 mL de vinho, usou-se 5 g de bagaço.

Duas amostras de bagaço foram contaminadas com 1 mL de 94.0 µg.L⁻¹ e extraídas com 20 mL de uma solução aquosa (5% NaHCO₃ + 1% PEG) durante 1 hora a 30°C, e de seguida centrifugadas a 4°C. De seguida, 10 mL da solução de extracção foram diluídos numa solução aquosa similar, como recomendado para a determinação de OTA em cervejas e vinhos. O resto da análise foi realizado como recomendado. Mas após a evaporação até à secura o resíduo foi reconstituído em 1 mL de metanol em vez de 500 µL de fase móvel.

4.9. Método de extracção B dos bagaços

Após a determinação do teor de ocratoxina A nos bagaços seleccionados na amostragem, desenvolveu-se um novo método tendo como referência o ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* - ELISA), conforme recomendado no kit comercial Ridascreen[®]Fast (da empresa Alemã R-biopharm), para análise quantitativa de OTA em cereais e rações¹⁰.

A análise de OTA foi conseguida através da extracção com uma solução água-metanol (30:70, v/v), durante 3 min sob agitação vigorosa. Neste método, manteve-se a quantidade de bagaço utilizado (5 g) e a quantidade de solvente de extracção passou para 25 mL, tendo-se assim uma proporção de 1:5 (p:v).

Após a extracção, filtrou-se o sobrenadante sob vácuo com o auxílio de um cadinho G4. De seguida, filtrou-se o extracto num filtro de seringa PTFE 0.45 µm para a quantificação da OTA por HPLC-FL, onde foram injectadas alíquotas de 118 µL.

4.10. Método de extracção de OTA em borras

Para se poder tratar as amostras de borras como um sólido, liofilizou-se toda a amostragem durante 2 dias a -90°C.

À semelhança dos bagaços, utilizou-se como fase aceitadora a solução de água-metanol (30:70, v/v). Para a extracção, manteve-se a proporção de 1:5 (p:v), ou seja, utilizou-se 500 mg de borra liofilizada e 2.5 mL de 70% metanol e, agitou-se vigorosamente a mistura durante 3 min.

Após a extracção, filtrou-se o sobrenadante sob vácuo, com o auxílio de um cadinho G4. De seguida, filtrou-se o extracto num filtro de seringa PTFE 0.45 µm para a quantificação da OTA por HPLC-FL, onde foram injectadas alíquotas de 118 µL.

¹⁰ Para descrição detalhada do ensaio imunoenzimático, consultar a página da R-biopharm. URL: http://www.r-biopharm.com/foodandfeed/pdf/fast_ota_02_10_22_a6.pdf (Acedido em Maio de 2007).

4.11. Método de análise cromatográfica

Os extractos de borras e bagaços foram analisados por HPLC-FL em condições isocráticas, a um caudal de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, tendo havido ligeiras alterações na fase móvel devido à mudança de coluna cromatográfica (mesma marca) ao longo do trabalho. A optimização, a validação do método de detecção da OTA em bagaços pelo método de extracção A foi realizada com a fase móvel do Método I. Os rastreios dos bagaços (pelo método A e B), e a validação do método de análise em borras, e respectivo rastreio, foram realizadas sob as condições cromatográficas do Método II.

Os dois métodos correspondem às seguintes composições de fase móvel:

- Método I – água-acetonitrilo-ácido acético (49.5:49.5:1, v/v/v);
- Método II – água-acetonitrilo-ácido acético (59.4:39.6:1, v/v/v).

A fase móvel foi desgaseificada com uma corrente de hélio. O tempo total da análise cromatográfica foi de 15 e de 30 min, nos métodos I e II, respectivamente, e a OTA foi detectada a 333 nm de excitação e a 460 nm de emissão.

4.12. Validação dos métodos analíticos

Relativamente aos três métodos desenvolvidos, nomeadamente a extracção de bagaços com acetato de etilo e com 70% metanol, e a extracção de borras com 70% metanol, com liofilização prévia, seguidos da determinação cromatográfica por HPLC-FL, procedeu-se à avaliação dos parâmetros de validação mais significativos – a linearidade, a precisão, a exactidão, o limite de detecção e a incerteza global dos métodos.

A quantificação foi realizada sempre pelo método de padrão externo, recorrendo a curvas de calibração por injeção directa de padrões de OTA.

O processo de cálculo das incertezas seguiu o preconizado pela Eurachem (2000).

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento dos métodos de análise de ocratoxina A em bagaços

O bagaço de uva é uma matriz extremamente complexa que contém alguma percentagem de etanol e água, bem como compostos fenólicos que podem interferir na determinação cromatográfica. Desta forma a purificação da matriz por um processo adequado que reduza os compostos interferentes é sempre necessária. Contudo, os processos de purificação descritos para a extracção de OTA na matriz têm-se revelado dispendiosos. Por outro lado, dado que a maioria das matrizes vitivinícolas apresenta teores não detectáveis de OTA, procurou-se obter uma metodologia mais expedita e barata que pudesse funcionar como método de rastreio de um elevado número de amostras, sendo que as amostras “positivas”, isto é, aquelas com teores de OTA detectáveis, ou acima dos limites legais quando estes existirem, devem ser confirmadas por um método alternativo (como a extracção com colunas de imunoafinidade).

Relativamente aos bagaços de uvas, procurou-se otimizar a metodologia de extracção para depois se proceder à validação e consequente análise da incerteza, e finalmente realizou-se o rastreio nas amostras seleccionadas.

5.1.1. Método de extracção A

5.1.1.1. Selecção do solvente para o método de extracção A

Considerando que nas uvas a ocratoxina A surge principalmente na película (Timperio et al., 2006) um potencial método de extracção de OTA é através de solventes. O solvente de extracção deve satisfazer os seguintes requisitos: deve possuir baixa volatilidade, deve extrair convenientemente o analito, e os picos devem estar bem separados de analitos coexistentes nos sinais analíticos do cromatograma. Desta forma, a escolha do melhor solvente de extracção é muito importante para se alcançar boa sensibilidade, precisão e selectividade no analito em causa. Realizaram-se quatro tentativas de solventes de extracção (Tabela 4), onde os ensaios de recuperação foram efectuados com contaminação de 5 g de bagaço com 1 mL de uma solução de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de OTA em metanol.

Sendo a OTA uma molécula medianamente polar, realizaram-se extracções com solventes de diferentes polaridades. Mas estes devem possuir polaridade similar à OTA. A escolha da solução (5% NaHCO_3 + 1% PEG) em água, deve-se ao facto de ser utilizada no método IAC, descrito no documento *European Standard* prEN 14133 (CEN, 2003). Já o clorofórmio, um solvente halogenado e com potenciais riscos ocupacionais e ambientais, foi tomado em consideração, pois é referido por diversos autores como um excelente solvente de extracção de OTA em bebidas alcoólicas, o que não se veio a verificar no caso dos bagaços. Provavelmente por ser uma matriz sólida e muito complexa em termos de interferentes.

Entre todos os solventes testados, o acetato de etilo parece ser o mais apropriado em termos de recuperação de OTA e em termos cromatográficos, permitindo a identificação e a quantificação da OTA em bagaços.

Tabela 4 – Optimização do solvente de extracção de bagaços a 30°C.

Solvente de extracção	[OTA] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Éter dietílico seguido de solução aquosa (5% NaHCO_3 + 1% PEG)	n.d.	-
5% NaHCO_3 seguido de acetato de etilo	0.5	0.5
Clorofórmio	15.3	15.1
Acetato de etilo	18.4	18.2
Acetato de etilo + 400 μL de ácido o-fosfórico	17.9	17.8

De seguida realizou-se um teste em que se variou o pH, pois é sabido que a alteração do valor de pH pode aumentar a selectividade do processo, melhorando a eficiência. A OTA tem dois grupos ionizáveis, o grupo ácido carboxílico (pK_a 4.4) e o grupo 8-hidroxilo (pK_a 7.0-7.3), e ambos podem existir sob a forma ionizada ou não-ionizada sob determinadas condições (González-Peñas et al., 2004). Para além disso, a estrutura da OTA pode estar na sua forma ionizada ou neutra dependendo do valor de pH da amostra. Então, a influência do pH é esperada. De forma a ionizar a molécula e a promover a extracção, o pH da fase dadora deve estar na forma ácida (Fig. 7) (González-Peñas et al., 2004). De forma a simplificar a variável “valor de pH” foi realizada uma tentativa onde foram adicionados 400 μ L de ácido orto-fosfórico ao acetato de etilo. A variação do pH não resultou em nenhuma melhoria em termos de recuperação de OTA como era esperado (Tabela 4). Como as alterações em termos de recuperação, aquando da utilização de acetato de etilo ou do acetato de etilo adicionado de ácido orto-fosfórico, não são relevantes, escolheu-se como solvente de extracção, o acetato de etilo.

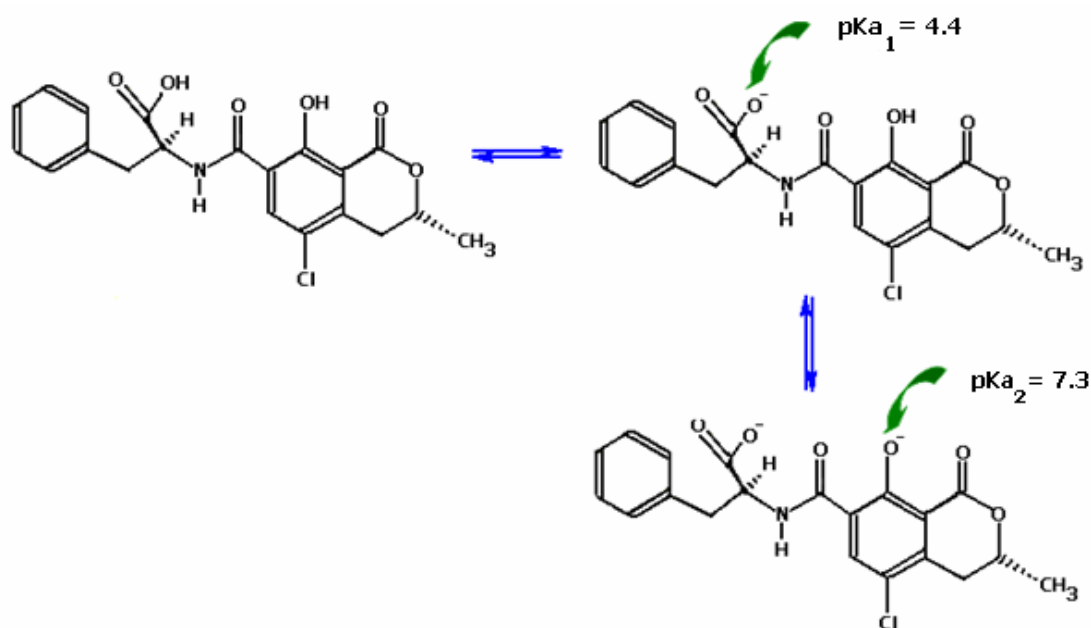


Figura 7 – Efeito do pH na estrutura da OTA.

Em diversos processos de extracção, a temperatura tem um papel importante na eficiência de extracção. Desta forma, a temperatura de extracção foi igualmente tomada em consideração. Realizaram-se, assim, extracções a 4°C que provaram ser mais

eficientes, produzindo uma recuperação média de 23.5%, e ao mesmo tempo reduziu o número de interferentes da matriz bagaço.

Após a optimização dos parâmetros, descritos acima, estabeleceu-se para as amostras de bagaço o seguinte método de extracção: extracção de 5 g de bagaço com 20 mL de acetato de etilo num banho de gelo, a 4°C, durante 1 hora e a 100 rpm. Após a extracção, o sobrenadante foi filtrado e de seguida evaporada até à secura. O resíduo foi reconstituído em 1mL de metanol e injectado no sistema cromatográfico.

Apesar da recuperação de OTA em bagaços, através deste método, não ser elevada, até este momento, este método de extracção foi o melhor que se alcançou. Mas sendo um método simples, barato e sensível, é passível de ser utilizado no rastreio de uma grande quantidade de amostras de bagaço, podendo-se confirmar de seguida a presença da OTA nas amostras positivas, através do método IAC.

5.1.1.2. Determinação cromatográfica dos extractos de bagaço obtidos pelo método de extracção A

A fase inicial deste trabalho compreendeu ensaios de optimização do método analítico aplicável à determinação do teor de OTA em bagaços.

A Figura 8 evidencia os cromatogramas de uma solução padrão de 18.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de OTA e uma amostra de bagaço contaminada artificialmente, com 1 mL de um padrão 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Como se pode observar, a extracção com acetato de etilo é adequada para fornecer cromatogramas suficientemente claros de forma a garantir a identificação e a quantificação da OTA nos extractos de bagaços, recorrendo ao método da desconvolução do programa HSM.

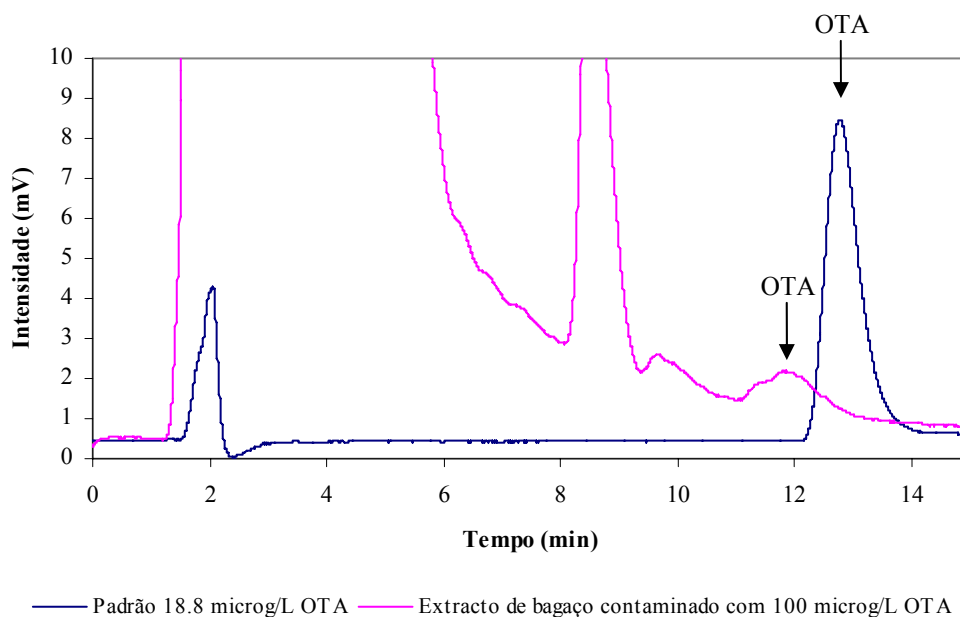


Figura 8 – Cromatogramas de um padrão 18.8 µg.L⁻¹ OTA (linha azul) e de uma amostra de bagaço contaminado com 1 mL de 100 µg.L⁻¹ OTA (b) (linha rosa).

Como se pode observar, o tempo de retenção da OTA nos extractos é diferente do tempo de retenção do padrão em metanol. Isto pode-se dever à interferência gerada pelos outros constituintes dos extractos, que podem fazer eluir a OTA com uma velocidade maior do que é esperada. Para despistar qualquer dúvida relativamente à localização do analito, realizaram-se adições de padrão a extractos de bagaços, e verificou-se que o pico cromatográfico identificado como OTA na Figura 8 é efectivamente OTA (Figura 9), apesar do tempo de retenção ser diferente do padrão injectado sozinho.

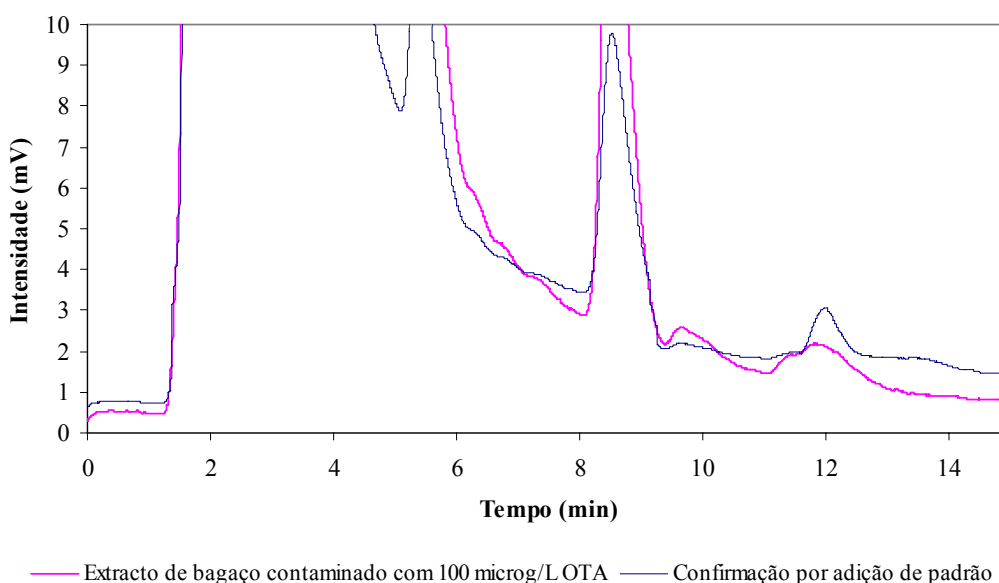


Figura 9 – Cromatograma da confirmação da identificação da OTA nos extractos de bagaço.

5.1.1.3. Validação do método analítico

Sob as condições ótimas, a linearidade, a precisão, a exactidão, o limite de detecção e a recuperação do método de extracção proposto foram estudados. A linearidade foi avaliada traçando a curva de calibração da área do pico cromatográfico *versus* a concentração da OTA (com as condições cromatográficas do método I). A recta de calibração (7 padrões de OTA em metanol) foi construída com concentrações de OTA de 0.47 a 18.80 $\mu\text{g.L}^{-1}$, apresentada na Figura 10, sendo a recta obtida adequada à quantificação da OTA, pois os parâmetros de validação da recta são aceitáveis, estando estes descritos no Anexo B.

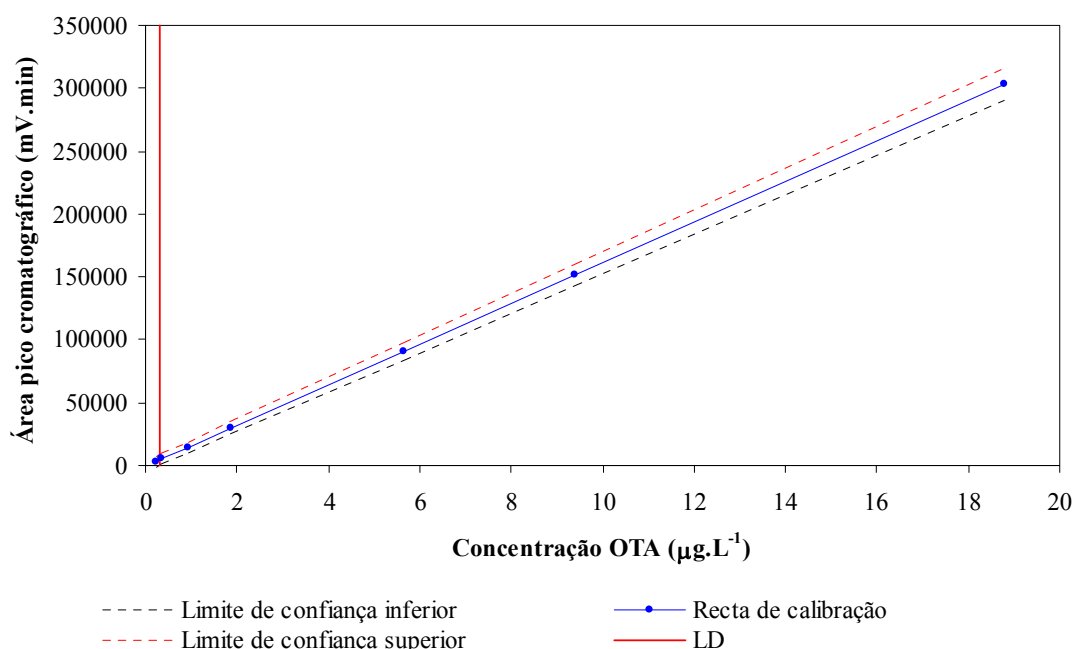


Figura 10 – Recta de calibração da OTA com padrões de concentrações entre 0.47 e 18.80 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em metanol, e segundo as condições cromatográficas do Método I.

O coeficiente de correlação de linearidade (R^2) obtido é 0.9993. Desta forma, o método apresenta uma excelente linearidade. Com base na recta de calibração acima, o limite de detecção do método é 0.3 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

A precisão foi avaliada pela repetibilidade (coeficiente de variação de 2 ensaios independentes realizados sob as mesmas condições analíticas no menor tempo possível) e a reprodutibilidade (coeficiente de variação de 4 ensaios independentes realizados em 2 dias diferentes). A precisão determinou-se através da repetibilidade, a média de 2

determinações consecutivas de cada um dos três padrões de 0.47, 1.88 e 5.64 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de OTA e a reprodutibilidade que corresponde à média de 6 determinações em três dias diferentes dos mesmos padrões. Os coeficientes de variação, calculados como a razão do desvio padrão pelo valor médio obtido em 2 ou 6 amostras, foram respectivamente, de 1.9% e 7.1%, para o padrão de 0.47 $\mu\text{g.L}^{-1}$, de 2.5% e 8.6% para o padrão de 1.88 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e de 0.6% e 3.2% para o padrão de 5.64 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Para a contaminação artificial de bagaços, os resultados de precisão são com o padrão de 9.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 1.3 e 7.7%, com o padrão de 28.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 3.7 e 3.9%, com o padrão de 47.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 2.1 e 2.2%, e com o padrão de 94 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 1.5 e 2.2%, correspondendo a cada contaminação uma massa de OTA de 9.4×10^{-3} , 2.8×10^{-2} , 4.7×10^{-2} e 9.4×10^{-2} μg . Como se pode verificar não existem diferenças acentuadas entre a precisão a baixos e a altos níveis de OTA em bagaços.

A recuperação é expressa pela massa de OTA correspondente à área do pico cromatográfico da OTA obtida na amostra contaminada, a dividir pela massa de OTA adicionada relativa à área obtida na determinação de cada padrão utilizado nas contaminações. A recuperação média (4 ensaios a cada nível) obtida foi de $23.5 \pm 3.6\%$.

Apesar da recuperação de OTA em bagaços, através deste método ser baixa, é um método simples, barato e sensível. O factor de recuperação de OTA deve ser tomado em conta no resultado final dos teores de OTA. Tendo em conta o limite de detecção da recta de calibração e a percentagem de recuperação, o limite de detecção nas amostras de bagaço é 0.26 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

O método de extracção desenvolvido em termos de limite de detecção é menos sensível que outros trabalhos realizados, mas em matrizes diferentes. Ratola et al. (2004) obtiveram LD para vinho e mosto, na ordem das 0.08 e 0.11 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Festas et al. (2000) obtiveram para vinhos, um LD de 0.02 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Mas estes limites de detecção mais baixos do que encontrado no método de extracção A, são justificáveis pela complexidade da matriz bagaço. Esta possui muitos interferentes, que são igualmente retidos pelo solvente de extracção utilizado.

5.1.1.4. Incerteza global do método A

A incerteza global do método, U , inclui todos os parâmetros de linearidade, precisão, exactidão e limite de detecção, de forma a que o resultado final seja afectado de um erro associado ao método desenvolvido. Recorreu-se ao método de cálculo da incerteza global preconizado pela Eurachem (2000), em que se consideraram as seguintes componentes, expressas em termos de desvio-padrão relativo:

- U_1 – incerteza na preparação dos padrões de ocratoxina A (dependente das diluições realizadas e material utilizado),
- U_2 – incerteza associada à recta de calibração,
- U_3 – incerteza associada à precisão e,
- U_4 – incerteza associada à exactidão.

A forma de determinação do erro global, devido à sua complexidade, está descrita no Anexo C. Na Tabela 5 estão apresentadas as incertezas relativas calculadas para cada padrão.

Tabela 5 – Resultados do cálculo das incertezas calculadas para os vários padrões.

[OTA] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	U_1	U_2	U_3	U_4	U	U (%)
0.47	0.0137	0.2574	0.0588	0.0379	0.2812	28.12
0.658	0.0125	0.1997	0.0048	0.0379	0.1968	19.68
0.94	0.0207	0.1863	0.0382	0.0379	0.1437	14.37
1.88	0.0113	0.0775	0.0192	0.0379	0.0775	7.75
5.64	0.0062	0.0252	0.0025	0.0379	0.0433	4.33
9.40	0.0205	0.0152	0.0015	0.0379	0.0450	4.50
18.80	0.0109	0.0125	0.0014	0.0379	0.0408	4.08

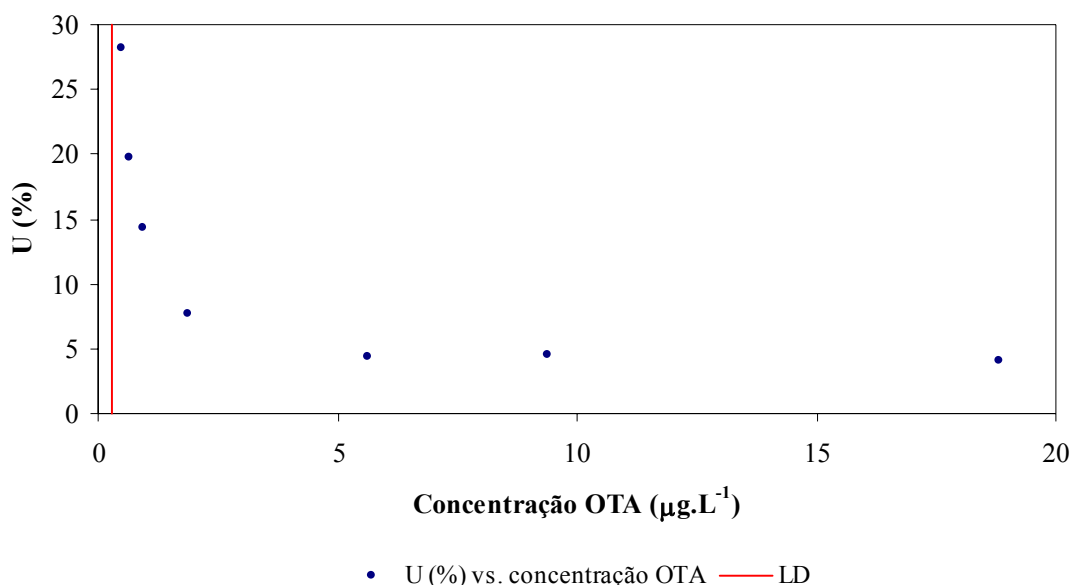


Figura 11 – Variação da incerteza do resultado analítico com a concentração dos padrões.

Como evidenciado na Figura 11, a incerteza global é altamente dependente da concentração de ocratoxina A. Para valores de teores de OTA acima de $1.8 \mu\text{g.L}^{-1}$, a incerteza global é cerca de 4% mas, para concentrações sucessivamente inferiores, aumenta exponencialmente até cerca de 28% perto do limite de detecção. Ou seja, aquando da avaliação da contaminação de bagaços com OTA, com teores iguais ou inferiores a $0.26 \mu\text{g.kg}^{-1}$, correspondente à concentração de $0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$ de OTA, a incerteza dos valores encontrados é de 28%. No entanto, a incerteza para teores de OTA nos bagaços acima de $1.6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ é de apenas 8%.

Comparando a incerteza global do método, com outros autores, verifica-se que a incerteza é satisfatória, apesar da complexidade da matriz bagaço. Ratola et al. (2005) obtiveram uma incerteza global de 50%, para concentrações de OTA em vinho e mosto inferiores aos limites de detecção de 0.08 e $0.11 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Em 2004, Ratola et al. determinaram uma incerteza global de 70% para concentrações na vizinhança do LD de $0.084 \mu\text{g.L}^{-1}$, para os vinhos.

5.1.1.5. Comparação com as colunas de imunoafinidade

Embora o método de referência de determinação de OTA seja aplicável a cervejas e vinhos (*European Standard* prEN 14133 (CEN, 2003)), realizou-se alguma adaptação para o utilizar na determinação de bagaços de uva. Duas amostras de bagaço (5 g) foram contaminadas com 1 mL de $94.0 \mu\text{g.L}^{-1}$ e extraídas com 20 mL de uma solução aquosa (5% NaHCO_3 + 1% PEG) durante 1 hora a 30°C , e de seguida centrifugadas a 4°C . De seguida, 10 mL da solução de extracção foram diluídos numa solução aquosa similar, como recomendado para a determinação de OTA em cervejas e vinhos, segundo o documento. O resto da análise foi realizado como recomendado. Os resultados obtidos demonstraram uma recuperação de $16.7 \pm 7.6\%$. Consequentemente, a extracção dos bagaços com acetato de etilo apresenta-se mais eficaz para a detecção e quantificação de OTA, do que recorrendo às IAC.

5.1.2. Método de extracção B para bagaços

De seguida desenvolveu-se um método de análise de OTA em bagaços mais simples que o anterior, mas igualmente sensível, tendo como referência o ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* - ELISA). As condições do novo método são: 5 g de bagaço extraídos com 25 mL de 70% metanol, durante 3 minutos. Após extracção a amostra o extracto é filtrado e de seguida injectado directamente no HPLC.

5.1.2.1. Determinação cromatográfica dos extractos de bagaço obtidos pelo método de extracção B

A Figura 12 evidencia os cromatogramas de uma solução padrão de $18.8 \mu\text{g.L}^{-1}$ e uma amostra de bagaço contaminada artificialmente, com 1 mL de um padrão $18.8 \mu\text{g.L}^{-1}$. Como se pode observar, a extracção com 70% metanol é adequado para fornecer cromatogramas suficientemente claros, de forma a garantir a identificação e a quantificação da OTA nos extractos de bagaços.

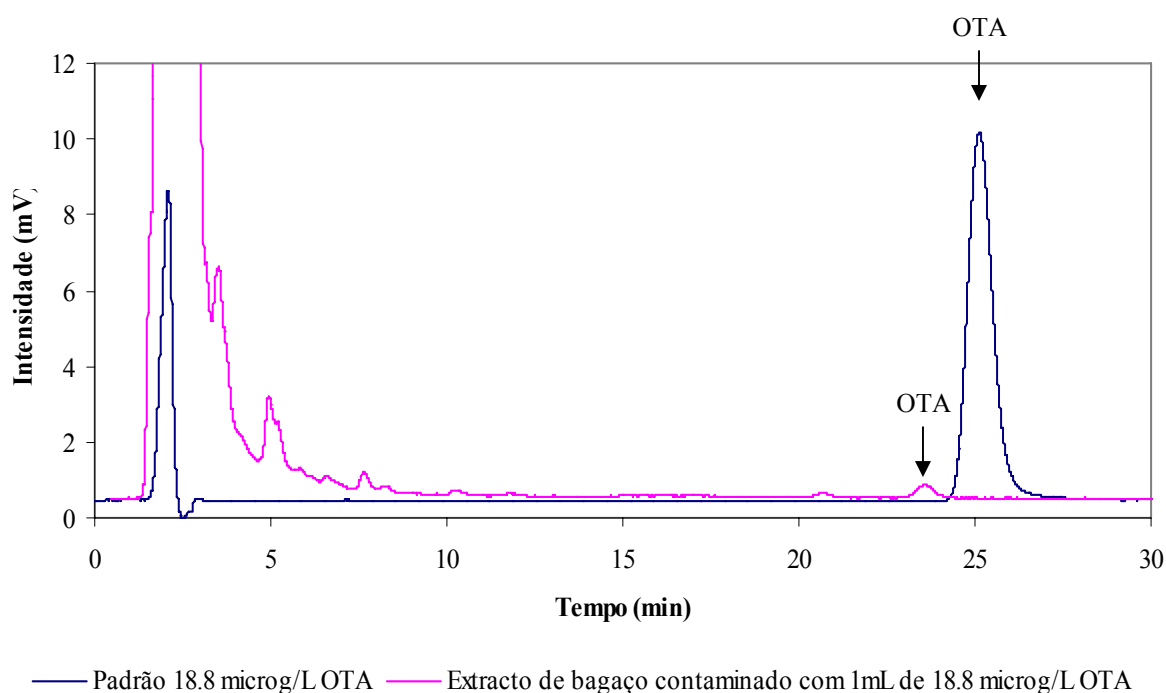


Figura 12 – Cromatogramas de um padrão $18.8 \mu\text{g.L}^{-1}$ OTA (linha azul) e de uma amostra de bagaço contaminado com 1 mL de $18.8 \mu\text{g.L}^{-1}$ OTA (linha rosa).

5.1.2.2. Validação do método analítico

Procedeu-se então, à validação do método analítico, que envolveu o estudo da linearidade e parâmetros associados, precisão, exactidão, limite de detecção e a recuperação do método de extracção proposto. A linearidade foi avaliada por injeção directa de 11 padrões de ocratoxina A em metanol para concentrações de 0.05 a $23.50 \mu\text{g.L}^{-1}$. A recta de calibração (Figura 13), obtida a partir do gráfico da área do pico cromatográfico em função da concentração de OTA, conduziu ao coeficiente de correlação (R^2) de 0.9996 e ao limite de detecção (LD) de $0.05 \mu\text{g.L}^{-1}$. Apesar de existirem métodos oficiais para determinar o limite de detecção, optou-se por

estabelecer o LD como sendo a concentração mínima possível de ser quantificada, sendo esta, a concentração do padrão mais baixo da recta de calibração. Os parâmetros que permitem a aceitação da recta de calibração foram todos cumpridos, estando estes descritos no Anexo B.

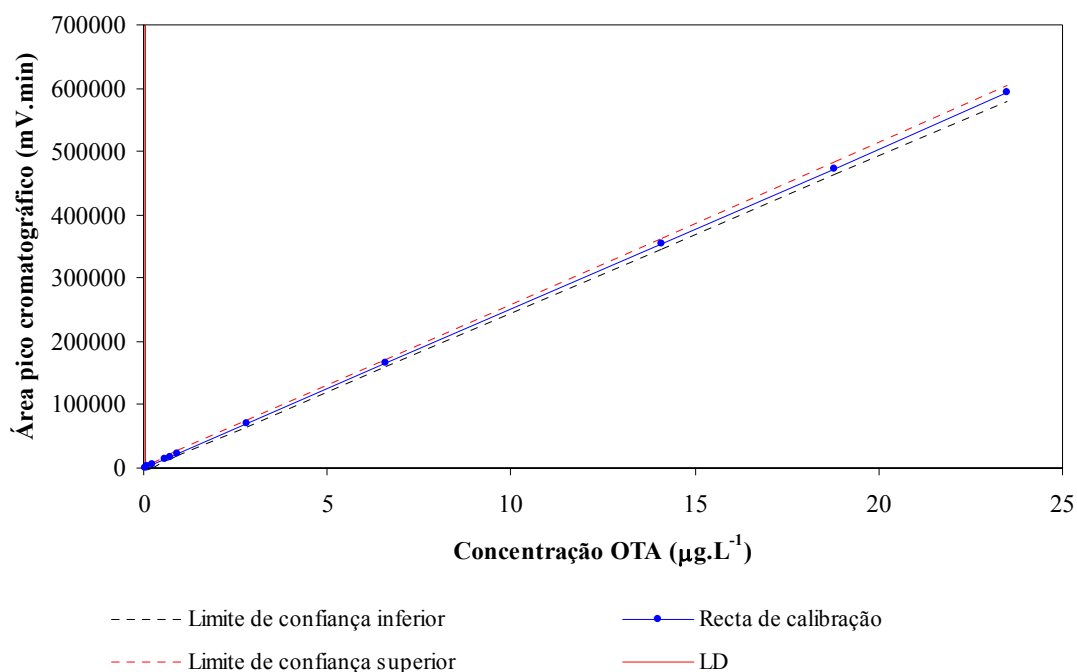


Figura 13 – Recta de calibração da OTA com padrões de concentrações entre 0.05 e 23.5 µg.L⁻¹ em metanol, e segundo as condições cromatográficas do Método II.

A precisão determinou-se através da repetibilidade, a média de 2 determinações consecutivas de cada um dos três padrões de 0.05, 2.82 e 6.58 µg.L⁻¹ de OTA e a reprodutibilidade que corresponde à média de 6 determinações em três dias diferentes dos mesmos padrões. Os coeficientes de variação, calculados como a razão do desvio padrão pelo valor médio obtido em 2 ou 6 replicados, foram respectivamente, de 4.3% e 14.7 %, para o padrão de 0.05 µg.L⁻¹, de 0.4% e 1.7% para o padrão de 2.82 µg.L⁻¹ e de 1.3% e 2.1% para o padrão de 6.58 µg.L⁻¹.

A exactidão foi avaliada pela repetibilidade (coeficiente de variação de 2 ensaios independentes realizados sob as mesmas condições analíticas no menor tempo possível) e a reprodutibilidade (coeficiente de variação de 6 ensaios independentes realizados em 3 dias diferentes). Para a contaminação artificial de bagaços, os resultados são, com o padrão de 9.4 µg.L⁻¹, 1.1 e 3.5%, com o padrão de 18.8 µg.L⁻¹, 5.6 e 8.1%, com o padrão de 28.2 µg.L⁻¹, 6.1 e 4.9% e, com o padrão de 94 µg.L⁻¹, 2.5 e 7.8%,

correspondendo a cada contaminação uma massa de OTA de 9.4×10^{-3} , 1.9×10^{-2} , 2.8×10^{-2} e $9.4 \times 10^{-2} \mu\text{g}$.

A recuperação média (4 ensaios a cada nível) obtida foi de $70.1 \pm 2.5\%$.

Com o valor da recuperação média, e entrando em conta com o limite de detecção da resposta do detector, o limite de detecção em amostras de bagaços situa-se para este método em $0.33 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

5.1.2.3. Incerteza global do método

À semelhança da forma de cálculo do erro global do método, descrita no ponto 5.1.1.4, a incerteza global do método (ver anexo D) está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados do cálculo das incertezas calculadas para os vários padrões.

[OTA] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	U_1	U_2	U_3	U_4	U	U (%)
0.05	0.100	2.096	5.83×10^{-4}	0.033	2.099	209.86
0.12	0.041	0.837	3.95×10^{-4}	0.033	0.839	83.86
0.24	0.022	0.417	3.56×10^{-4}	0.033	0.419	41.91
0.59	0.012	0.165	5.37×10^{-4}	0.033	0.169	16.91
0.71	0.012	0.137	2.70×10^{-4}	0.033	0.142	14.19
0.94	0.021	0.102	2.65×10^{-4}	0.033	0.110	10.95
2.82	0.009	0.033	7.97×10^{-5}	0.033	0.047	4.73
6.58	0.006	0.014	2.72×10^{-5}	0.033	0.036	3.62
14.10	0.040	0.007	1.68×10^{-5}	0.033	0.053	5.25
18.80	0.011	0.006	1.89×10^{-5}	0.033	0.035	3.53
23.50	0.009	0.006	2.20×10^{-5}	0.033	0.035	3.47

Como evidenciado na Figura 14, a incerteza global é altamente dependente da concentração de ocratoxina A. Esta incerteza é desfavorável quando as amostras de bagaço contêm teores de ocratoxina A na ordem das $0.33 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ou inferiores. Mas, para teores de OTA sucessivamente superiores a incerteza global diminui até 4%.

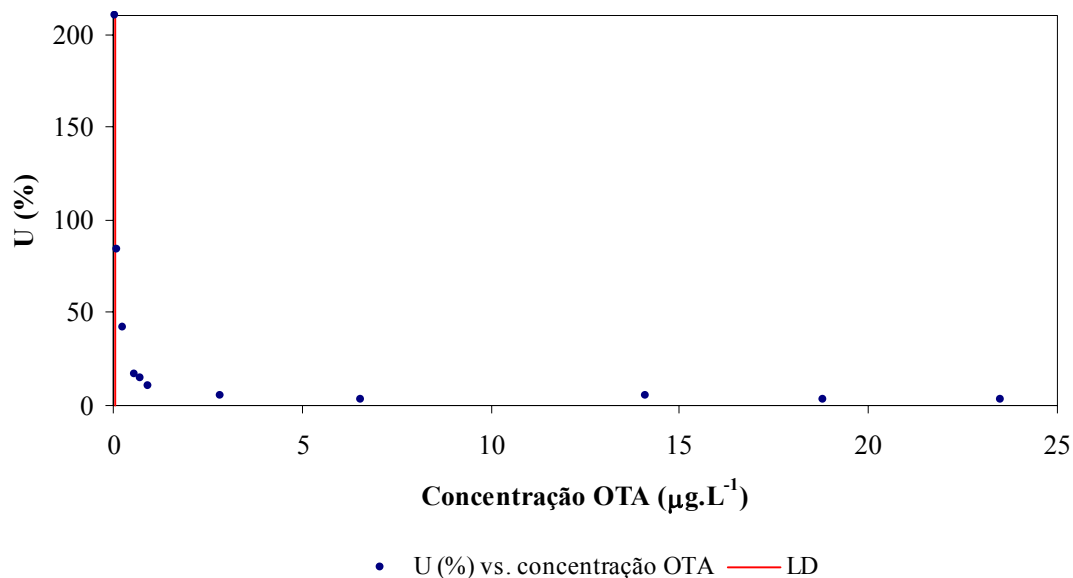


Figura 14 – Variação da incerteza do resultado analítico com a concentração dos padrões.

Apesar deste método possuir incertezas de 210% para níveis de OTA em bagaços, inferiores a $0.33 \mu\text{g.kg}^{-1}$ é útil para o rastreio de amostras de bagaço. Pois o limite de detecção de nas amostras é inferior ao limite legal, imposto pela Directiva 123/2005/CE, para uvas passas ($10 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e para os vinhos, sumos de uva, mostos ($2 \mu\text{g.L}^{-1}$). Ou seja, se as amostras de bagaço possuírem teores de OTA acima de $0.33 \mu\text{g.kg}^{-1}$, e contabilizando uma incerteza de 210%, o teor de OTA estaria mesmo assim, abaixo do limite legal.

Comparando o método de extracção B com o método A, pode-se verificar que o primeiro apresenta-se com uma incerteza global superior, mas cumpre os requisitos da Directiva 2002/26/CE, onde se a amostra tiver uma concentração de OTA entre 1 a $10 \mu\text{g/kg}$, o RSD_r e RSD_R devem ser iguais ou inferiores a 20 e 30%, respectivamente, e a taxa de recuperação ser entre 70 a 110%. E é igualmente sensível na detecção de OTA em bagaços, e menos trabalhoso do que o método A, pois após a extracção com 70% metanol, não existem passos adicionais antes da análise por HPLC-FL.

Para confirmar a presença de OTA nos bagaços, tentou-se implementar um método com detecção por GC-MS (Varian), com derivatização prévia com uma solução de acetato de etilo:BSTFA (1:1) como proposto por Soleas et al. (2001). Para testar, a fiabilidade da reacção de derivatização, realizaram-se ensaios com padrões de OTA em

metanol. Para isso, secou-se 200 μL de um padrão ($9.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $94 \mu\text{g.L}^{-1}$) de OTA sob uma corrente de azoto. De seguida efectuou-se a derivatização com 100 μL de acetato de etilo:BSTFA (1:1, v/v) durante 2 horas a 70°C . Uma alíquota de 1 μL do derivatizado foi injectada em modo *splitless* no injector para uma coluna CP-Sil 8 CB *Low Bleed*, de $60 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.} \times 0.25 \mu\text{m}$ espessura, da Varian.

O programa do forno do GC é inicialmente 150°C e aumenta a uma velocidade de 8°C/min até 220°C , permanece a esta temperatura durante 5 min e volta a aumentar até 290°C a uma velocidade de 25°C/min . Desta forma o tempo total da corrida é de 17.55 min. O fluxo foi de 1 mL/min e a detecção por MS foi realizada em modo de varrimento total (*full scan*).

Com as condições da reacção de derivatização e da análise por GC-MS descritas acima não se obtiveram resultados satisfatórios, pois a OTA derivatizada não surgiu no espectro de massa.

Para reduzir o número de massas no detector (*trap*), efectuaram-se análises do derivatizado no modo de monitorização selectiva de iões (SIS), seleccionando apenas as massas dos iões de 528, 529, 530, 531, 532, 604, 606 e 619, como Soleas et al. (2000). No entanto, o espectro de massa obtido continuou a ser inconclusivo.

Para despistar a possibilidade de a OTA ter um tempo de retenção superior a 17.55 min, realizou-se um ensaio, com um fluxo de 1.5 mL/min, e o programa de temperatura foi: a coluna está inicialmente a 150°C durante 1 min, aumenta até 290°C a 8°C/min , e permanece a esta temperatura durante 180 min, prefazendo assim um tempo total de análise de 198.5 min. Mas a OTA continuou a não surgir no cromatograma, pelo que se abandonou este procedimento.

5.2. Rastreio das amostras de bagaço – teor de ocratoxina A

Após a validação dos métodos de extracção A e B, optou-se por realizar o rastreio de OTA em bagaços pelos dois métodos, não só porque o rastreio dos bagaços pelo método A foi realizado antes de se ter desenvolvido o método de extracção B, mas porque também, ambos os métodos, que apresentam características diferentes, em termos de recuperação e incerteza global, são capazes de detectar a OTA nos bagaços. Assim, os resultados obtidos da análise do teor de OTA nas amostras de bagaços colhidas são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Ocorrência de ocratoxina A em bagaços, segundo os métodos A e B. Método A: extracção com 20 mL de acetato de etilo; Método B: extracção com 25 mL de 70% metanol.

I.D.	Origem da amostra	Tipo	Teor de OTA ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) Método A	Teor de OTA ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) Método B	Teor de OTA ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) Método A [‡]	Teor de OTA ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) Método B [‡]
1	Caves Raposeira	Mistura para espumantes	0.14	n.d.	0.61 ± 0.17	n.d.
2	Quinta de São Domingos	Vinho tinto	0.03	n.d.	0.13 ± 0.04	n.d.
3	Caves de Sta. Marta	Vinho tinto	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	Caves de Sta. Marta	Vinho branco	0.18	0.41	0.78 ± 0.22	0.59 ± 0.12
5	Adega Cooperativa de Favaios	Moscatel	0.05	n.d.	0.22 ± 0.06	n.d.
6	Adega Cooperativa de Alijó	Moscatel	0.06	0.32	0.26 ± 0.07	0.46 ± 0.09
7	Quinta de La Rosa	Vinho do Porto	0.06	0.31	0.26 ± 0.07	0.44 ± 0.09
8	Adega Cooperativa São João da Pesqueira	Vinho tinto	0.03	n.d.	0.13 ± 0.04	n.d.
9	Adega Cooperativa de Murça	Vinho tinto	0.04	n.d.	0.17 ± 0.05	n.d.
10	Quinta do Ventozelo	Vinho tinto	0.05	n.d.	0.22 ± 0.06	n.d.
11	Quinta das Avelerias	Vinho branco	0.07	n.d.	0.30 ± 0.09	n.d.
12	Quinta das Avelerias	Vinho tinto	0.06	n.d.	0.26 ± 0.07	n.d.
13	Adega Cooperativa de Vila Nova de Foz Côa	Vinho tinto	0.06	n.d.	0.26 ± 0.07	n.d.

[‡] Valores calculados tendo em conta a percentagem de recuperação e incerteza global associada ao nível detectado na amostra.

Segundo o método A, a OTA foi detectada em 12 das 13 amostras de bagaço, com especial incidência na região de Baixo Corgo. A concentração média de OTA encontrada na RDD é de $0.07 \mu\text{g.kg}^{-1}$. A particular incidência de OTA na região Baixo Corgo é devida às condições climáticas nesta região de Portugal, sendo elas temperatura e humidade altas. Segundo o método B, a região de Cima Corgo é tão afectada pela presença de OTA como a região Baixo Corgo.

Através da Tabela 7, se tomarmos em consideração a percentagem de recuperação e a incerteza global do método, dependente da concentração de OTA da amostra, pode-se concluir que o teor de OTA encontrado em cada amostra em que foi detectada, é equivalente. Por exemplo, a amostra de bagaço das Caves Sta. Marta (Vinho branco), segundo os métodos A e B, possui um teor de OTA de $0.56\text{-}1.00 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0.70\text{-}0.34 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. No entanto, para garantir que o factor de recuperação dos métodos de extracção A e B seja da ordem da percentagem estimada, para toda a gama de concentrações, deverão ser realizados mais ensaios de recuperação com matrizes de bagaços de diversa composição química, pois a matriz crucial no processo de análise. Apesar de tudo, os resultados obtidos são satisfatórios.

5.3. Análise de ocratoxina A em borras

As borras de vinho apresentam-se na forma de uma massa heterogénea composta por água, etanol, tartaratos e matéria corante, que pode interferir na análise por HPLC-FL. Sendo uma matriz semi-líquida, que contém para além de mosto, películas, entre outros, torna-se difícil manuseá-la da mesma forma que um líquido. Por este motivo, liofilizaram-se as amostras de borra, para serem manipuladas como uma matriz sólida.

Como o método de extracção de bagaços com 70% metanol foi bem sucedido, aplicou-se o mesmo método às borras liofilizadas.

À semelhança dos bagaços, extraiu-se 500 mg de borra com 2.5 mL de 70% metanol, mantendo-se assim a proporção de 1:5 (p:v). Só se utilizou 500 mg de borra, pois após liofilização a quantidade de borra disponível numa só amostra não seria suficiente para validar o método de extracção, com a mesma amostra, utilizando mais do que 500 mg.

5.3.1. Determinação cromatográfica dos extractos de borra

A Figura 15 evidencia os cromatogramas de uma solução padrão de $18.8 \mu\text{g.L}^{-1}$ de OTA e uma amostra de bagaço contaminada artificialmente, com 1 mL de um padrão $28.2 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Como se pode observar, a extracção com 70% metanol é adequado para fornecer cromatogramas suficientemente claros de forma a garantir a identificação e a quantificação da OTA nos extractos de borras, recorrendo ao método da desconvolução do programa HSM.

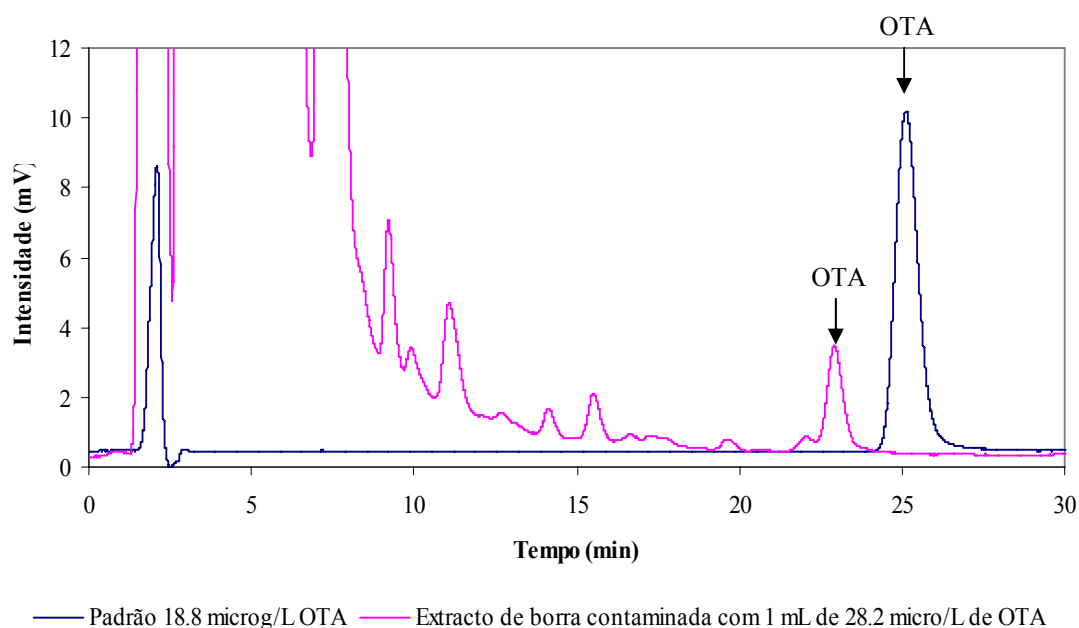


Figura 15 – Cromatogramas de um padrão $18.8 \mu\text{g.L}^{-1}$ OTA (linha azul) e de uma amostra de borra contaminada com 1 mL de $28.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ OTA (linha rosa).

Todos os parâmetros de validação do método analítico, tais como, o estudo da linearidade, precisão e limite de detecção já foram apresentados na secção 5.1.2.2. da presente dissertação, pois a recta de calibração utilizada na determinação do teor de ocratoxina A nas borras foi a mesma que a usada nos bagaços. Só a recuperação do método de extracção proposto, é que é diferente.

A exactidão foi avaliada pela repetibilidade (coeficiente de variação de 2 ensaios independentes realizados sob as mesmas condições analíticas no menor tempo possível) e a reprodutibilidade (coeficiente de variação de 6 ensaios independentes realizados em 3 dias diferentes). Para a contaminação artificial de borras, os resultados são, com o

padrão de 9.4 µg.L⁻¹, 1.5 e 6.8%, com o padrão de 18.8 µg.L⁻¹, 1.0 e 5.0%, com o padrão de 28.2 µg.L⁻¹, 3.8 e 5.2%, e com o padrão de 94 µg.L⁻¹, 4.0 e 2.3%.

A recuperação média (4 ensaios a cada nível) obtida foi de 70.4 ± 4.7%.

O método de extracção para as borras é equivalente ao método dos bagaços, pois atingiu-se a mesma recuperação, apesar de se tratar de matrizes diferentes, mas sólidas.

Tendo em conta a recuperação média e o limite de detecção da resposta do detector, o limite de detecção em amostras de borra situa-se para este método em 0.03 µg.kg⁻¹.

5.3.2. Incerteza global do método

À semelhança da forma de cálculo do erro global do método, descrita no ponto 5.1.1.4., a incerteza global do método (ver anexo E) está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados do cálculo das incertezas calculadas para os vários padrões.

[OTA] (µg.L ⁻¹)	U ₁	U ₂	U ₃	U ₄	U	U (%)
0.05	0.100	2.096	5.83×10 ⁻⁴	0.028	2.098	209.85
0.12	0.041	0.837	3.95×10 ⁻⁴	0.028	0.838	83.84
0.24	0.022	0.417	3.56×10 ⁻⁴	0.028	0.419	41.87
0.59	0.012	0.165	5.37×10 ⁻⁴	0.028	0.168	16.81
0.71	0.012	0.137	2.70×10 ⁻⁴	0.028	0.141	14.07
0.94	0.021	0.102	2.65×10 ⁻⁴	0.028	0.108	10.81
2.82	0.009	0.033	7.97×10 ⁻⁵	0.028	0.044	4.38
6.58	0.006	0.014	2.72×10 ⁻⁵	0.028	0.031	3.15
14.10	0.040	0.007	1.68×10 ⁻⁵	0.028	0.049	4.94
18.80	0.011	0.006	1.89×10 ⁻⁵	0.028	0.030	3.05
23.50	0.009	0.006	2.20×10 ⁻⁵	0.028	0.030	2.98

Como evidenciado na Figura 16, a incerteza global é altamente dependente da concentração de ocratoxina A. Pode-se afirmar que a incerteza, para concentrações inferiores ao LD do método ronda os 210%, tornando-se assim um contra na determinação de teores de OTA em borra ao níveis das 0.03 µg.kg⁻¹. No entanto, as

amostras com teores superiores a $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ são determinadas com uma incerteza global de apenas 4%.

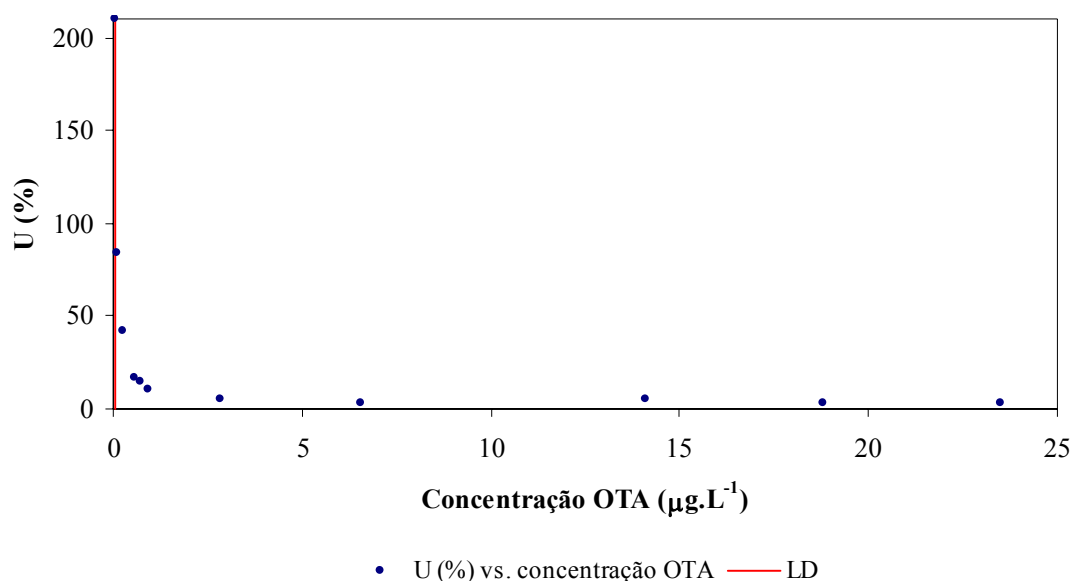


Figura 16 – Variação da incerteza do resultado analítico com a concentração dos padrões.

Estando definido um limite de legal (Directiva 123/2005/CE) para uvas passas de $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$, e para o vinho, sumos de uva e mostos de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$, e contabilizando o erro global, qualquer amostra positiva com teores de OTA de $0.03 \mu\text{g.kg}^{-1}$, estará sempre abaixo do limite legal, mesmo contabilizando a incerteza de 210%. Para além disso, o método desenvolvido para a quantificação de OTA em borras, previamente liofilizadas, cumpre os requisitos da Directiva 2002/26/CE, onde se a amostra tiver uma concentração de OTA entre 1 a $10 \mu\text{g/kg}$, o RSD_r e RSD_R devem ser iguais ou inferiores a 20 e 30%, respectivamente, e a taxa de recuperação ser entre 70 a 110%.

5.4. Rastreio das amostras de borra – teor de ocratoxina A

Os resultados obtidos da análise do teor de OTA nas amostras de borra colhidas são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Ocorrência de ocratoxina A em borras.

Designação da Empresa	Região	Tipo	Teor de OTA ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Teor de OTA ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) [‡]
Quinta do Côtto	Baixo corgo	Vinho tinto	0.98	1.39 ± 0.15
Caves de Sta. Marta	Baixo corgo	Vinho tinto	0.61	0.87 ± 0.14
Adega Cooperativa São João da Pesqueira	Cima Corgo	Vinho tinto	2.81	3.99 ± 0.18
Adega Vitivinícola do Peso da Régua	Baixo corgo	Vinho tinto	1.19	1.69 ± 0.07
Adega Cooperativa de Freixo de Numão	Douro Superior	Vinho tinto	1.60	2.27 ± 0.10
Quinta do Sol	Cima Corgo	Vinho do Porto	0.82	1.16 ± 0.16
Quinta do Zimbro	Baixo corgo	Vinho tinto	0.58	0.82 ± 0.14

Recorrendo ao método de extracção com 70% metanol, foi detectada OTA todas as amostras de borra, com uma concentração média na RDD de $1.23 \mu\text{g.kg}^{-1}$. De um modo geral, a região de Cima Corgo é a mais afectada pela presença de OTA nas borras ($1.23 \mu\text{g.kg}^{-1}$, em média), e a região de Baixo Corgo, em média, é a que apresenta teores de OTA mais baixos ($0.84 \mu\text{g.kg}^{-1}$), estando a região do Douro Superior, igualmente afectada pela presença de OTA nas borras.

[‡] Valores calculados tendo em conta a percentagem de recuperação e incerteza global associada ao nível detectado na amostra.

Os objectivos delineados para esta tese de mestrado contemplavam a implementação de uma metodologia analítica expedita, que pudesse funcionar como processo de rastreio para um elevado número de amostras, já que a alternativa existente era a utilização de um método de extracção por colunas de imunoafinidade extremamente dispendiosas, que apesar de ser um método excelente para bebidas alcoólicas, quando os subprodutos vitivinícolas são a matéria inicial, as IAC são impraticáveis.

Pretendendo encontrar uma solução simples, barata, mas viável na quantificação de OTA em subprodutos vitivinícolas, implementaram-se e validaram-se dois métodos de extracção por solventes para a análise de bagaços, recorrendo à extracção por acetato de etilo ou por uma mistura de metanol e água, e um método para a análise de borras com extracção por 70% metanol, seguida de determinação cromatográfica por HPLC com detecção por fluorescência.

Relativamente às características dos dois métodos analíticos para a análise de bagaços, a gama de linearidade situou-se entre 0.47 e 18.80 $\mu\text{g.L}^{-1}$, a precisão, avaliada pela repetibilidade, a vários níveis de concentração, e expressa em termos de coeficiente de variação, não excedeu 9% e a percentagem de recuperação foi em média de $23.5 \pm 3.6\%$ (extracção com acetato de etilo) ou $70.1 \pm 2.5\%$ (extracção com 70% metanol). Tendo em consideração a percentagem de recuperação, como reflexo do factor de extracção, o limite de detecção em amostras de bagaço ronda 0.3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, o que é considerado um valor compatível com a legislação comunitária adoptada para vários produtos alimentares. A incerteza global associada à determinação analítica de

OTA em bagaços pode atingir 210% para valores na proximidade do limite de detecção, mas baixa significativamente para valores da ordem de 4% quando os teores de OTA são superiores a $20.1 \mu\text{g.L}^{-1}$, no caso da extracção com 70% metanol. Os métodos de extracção desenvolvidos são menos sensíveis que outros trabalhos realizados com vinho e mosto (Ratola et al., 2004; Festa et al., 2000), mas é compreensível porque bagaço de uva é uma matriz extremamente complexa que contém alguma percentagem de etanol e água, bem como compostos fenólicos que são igualmente retidos pelos solventes de extracção, e que podem interferir na quantificação da OTA nos extractos.

Comparando os dois métodos de extracção, a extracção com 70% metanol é preferível, pois apresenta recuperações superiores, é igualmente sensível e, é menos trabalhoso, devido à redução de passos necessários até à análise por HPLC-FL.

O método analítico para a análise de borras, apresenta uma gama de linearidade entre 0.047 e $23.50 \mu\text{g.L}^{-1}$, uma precisão que não ultrapassa os 14% para níveis baixos de OTA e a percentagem de recuperação foi em média de $70.4 \pm 4.7\%$. Contabilizando a percentagem de recuperação, o limite de detecção em amostras de borra ronda os $0.03 \mu\text{g.kg}^{-1}$, o que é considerado um valor compatível com a legislação comunitária adoptada para vários produtos alimentares. A incerteza global associada à determinação analítica de em borras é semelhante à dos bagaços, atingindo 210% na proximidade do limite de detecção, diminuindo até os 4%. Estes valores de incerteza são satisfatórios quando comparados com os encontrados para vinhos e mostos, sendo estes no máximo 50-70% no limiar do limite de detecção (Ratola et al., 2004, 2005).

A validação destes resultados para efeitos de aplicação prática efectiva deveria incluir, no futuro, um estudo da variabilidade das características físico-químicas dos resíduos vitivinícolas, através de uma amostragem alargada, de forma a prever os intervalos de confiança reais das taxas de recuperação encontradas.

A quantificação de níveis de OTA em 13 amostras de bagaço e 7 amostras de borra permite concluir que a concentração média de OTA, para os bagaços e para as borras, é de 0.07 e $1.23 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente. Concluindo, os métodos desenvolvidos para avaliar a contaminação de bagaços e borras, com OTA, são simples mas eficazes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Abarca, M.L.; Accensi, F.; Bragulat, M.R.; Castellá, G.; Cabañes, F.J.; *Aspergillus carbonarius as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market*. Journal of Food Protection, Vol. 66, No. 3, pp. 504-506, **2003**.
- [2] Amico, V.; Napoli, E.M.; Renda, A.; Ruberto, G.; Spatafora, C.; Tringali, C.; *Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar 'Nerello Mascalese'*. Food Chemistry, Vol. 88, pp. 599–607, **2004**.
- [3] Anderson, S.; Wood, R.; MacDonald, S. J.; Brereton, P.; *Determination of ochratoxin A in currants, raisins, sultanas, mixed dried fruit, and dried figs by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study*. Journal of AOAC International, Vol. 86, No. 6, pp. 1164–1171, **2003**.
- [4] Araguás, C.; González-Peñas, E.; López de Cerain, A.; *Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain*. Food Chemistry, Vol. 92, pp. 459–464, **2005**.
- [5] Arvanitoyannis, I.S.; Ladas, D.; Mavromatis, A.; *Wine waste treatment methodology*. International Journal of Food Science and Technology, Vol. 41, pp. 1117–1151, **2006**.
- [6] Bacaloni, A.; Cavaliere, C.; Faberi, A.; Pastorini, E.; Samperi, R.; Lagana, A.; *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 and Food Chemistry, Vol. 53, pp. 5518-5525, **2005**.
- [7] Bakker, M.; Pieters, M.N.; *Risk assessment of ochratoxin A in the Netherlands*. RIVM report 388802025/**2002**.

- [8] Bastardo, H.; Sofia, S.; Nava, L.; Rangel, C.; *Efeitos da concentração de aflatoxina B1 e tempo de exposição sobre a condição hepática da truta arcoiris*. INCI [online], Vol.31, No.6, pp.437-440, **2006**. Disponível em: http://www2.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037818442006000600010&lng=pt&nrm=iso. ISSN 0378-1844.
- [9] Battilani, P.; Giorni, P.; Pietri, A.; *Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape*. European Journal of Plant Pathology, Vol. 109, pp. 715–722, **2003**.
- [10] Battilani, P.; Magan, N.; Logrieco, A.; *European research on ochratoxin A in grapes and wine*. International Journal of Food Microbiology, Vol.111, pp. S2–S4, **2006**.
- [11] Bau, M.; Bragulat, M.R.; Abarca, M.L.; Minguez, S.; Cabañes, F.J.; *Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes*. International Journal of Food Microbiology, Vol. 98, pp. 125–130, **2005**.
- [12] Bellí, N.; Ramos, A.J.; Sanchis, V.; Marín, S.; *Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by Aspergillus section Nigri strains isolated from grapes*. Letters in Applied Microbiology, Vol. 38, pp. 72–77, **2004a**.
- [13] Bellí, N.; Pardo, E.; Marín, S.; Farré, G.; Ramos, A.J.; Sanchis, V.; *Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes*. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 84, pp. 541–546, **2004b**.
- [14] Bellí, N.; Ramos, A.J.; Sanchis, V.; Marín, S.; *Effect of photoperiod and day–night temperatures simulating field conditions on growth and ochratoxin A production of Aspergillus carbonarius strains isolated from grapes*. Food Microbiology, Vol. 23, pp. 622–627, **2006**.
- [15] Bennett, J.W.; Klich, M.; *Mycotoxins*. Clinical Microbiology Reviews, Vol. 16, No. 3, pp. 497–516, **2003**.
- [16] Berente, B.; Móricz, A.; H-Otta, K.; Záray, G.; Lékó, L.; Rácz, L.; *Determination of ochratoxin A in Hungarian wines*. Microchemical Journal, Vol. 79, pp. 103–107, **2005**.

- [17] Berger, V.; Gabriel, A.-F.; Sergent, T.; Trouet, A.; Larondelle, Y.; Schneider, Y.-J.; *Interaction of ochratoxin A with human intestinal Caco-2 cells: possible implication of a multidrug resistance-associated protein (MRP2)*. Toxicology Letters, Vol.140–141, pp. 465–476, **2003**.
- [18] Bertran, E.; Sort, X.; Soliva, M.; Trillas, I.; *Composting winery waste: sludges and grape stalks*. Bioresource Technology, Vol. 95, pp. 203–208, **2004**.
- [19] Blesa, J.; Soriano, J.M.; Moltó, J.C.; Mañes, J.; *Factors affecting the presence of ochratoxin A in wines*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol. 46, pp. 473–478, **2006**.
- [20] Boudra, H.; Morgavi, D.P.; *Development and validation of a HPLC method for the quantitation of ochratoxins in plasma and raw milk*. Journal of Chromatography B, Vol. 843, pp. 295–301, **2006**.
- [21] Braga, F.G.; Lencart e Silva, F.A.; Alves, A.; *Recovery of winery by-products in the Douro Demarcated Region: production of calcium tartrate and grape pigments*. American Journal of Enology and Viticulture, Vol. 53, No. 1, pp. 41–45, **2002**.
- [22] Bruinink, A.; Sidler, C.; *The Neurotoxic Effects of ochratoxin-A are reduced by protein binding but are not affected by l-Phenylalanine*. Toxicology and Applied Pharmacology, Vol. 146, pp. 173–179, **1997**.
- [23] Bruinink, A.; Rasonyi, T.; Sidler, C.; *Reduction of ochratoxin A toxicity by heat-induced epimerization. In vitro effects of ochratoxins on embryonic chick meningeal and other cell cultures*. Toxicology, Vol. 118, pp. 205–210, **1997**.
- [24] Cabañes, F.J.; Accensi F.; Bragulat, M.R.; Abarca, M.L.; Castellá, G.; Minguez, S.; Pons, A.; *What is the source of ochratoxin A in wine?* International Journal of Food Microbiology, Vol. 79, pp. 213–215, **2002**.
- [25] Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V.L.; Minelli, E.V.; Melis, M.; Pirisi, F.M.; *Pesticides in the distilled spirits of wine and its byproducts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 45, pp. 2248–2251, **1997**.

- [26] Caldas, E.D.; Silva, S.C.; Oliveira, J.N.; *Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana*. Revista Saúde Pública, Vol. 36, No. 3, pp.319–323, **2002**.
- [27] Castegnaro, M.; Mohr, U.; Phohl-Leszkowicz, A.; Esteve, J.; Steinmann, J.; Tillmann, T.; Michelom, J.; Bartsch, H.; *Sex- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction*. International Journal of Cancer, Vol. 77, pp. 70–75, **1998**.
- [28] Comité Européen de Normalisation (CEN), *Foodstuffs – determination of ochratoxin A in wine and beer – HPLC method with immunoaffinity column clean-up*, EN 14133:2003, Brussels, Belgium, **2003**.
- [29] Creppy, E.E.; Chakor, K.; Fisher, M.J.; Dirheimer, G.; *The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxylase in isolated rat hepatocytes and in vivo*. Archives of Toxicology, Vol. 64, No. 4, pp. 279–284, **1990**.
- [30] Dai, J.; Wright, M.W.; Manderville, R.A.; *Ochratoxin A forms a carbon-bonded C8-deoxyguanosine nucleoside adduct: implications for C8 reactivity by a phenolic radical*. Journal of the American Chemical Society, Vol. 125, pp. 3716–3717, **2003**.
- [31] Diaz, M.J.; Madejón, E.; López, F.; López, R.; Cabrera, F.; *Optimization of the rate vinasse/grape marc for co-composting process*. Process Biochemistry, Vol. 37, pp. 1143–1150, **2002**.
- [32] Dopp, E.; Müller, J.; Hahnel C.; Schiffmann, D.; *Induction of genotoxic effects and modulation of the intracellular calcium level in syrian hamster embryo (SHE) fibroblasts caused by ochratoxin A*. Food and Chemical Toxicology, Vol. 37, pp. 713–721, **1999**.
- [33] Dragacci, S.; Grosso, F.; Bire, R.; Fremy, J.M.; Coulon, S.; *A French Monitoring Programme for Determining Ochratoxin A Occurrence In Pig Kidneys*. Natural Toxins, Vol. 7, pp. 167–173, **1999**.
- [34] Esteban, A.; Abarca, L.M.; Bragulat, M.R.; Cabañes, F.J.; *Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli*. Research in Microbiology, Vol. 155, pp. 861–866, **2004**.

- [35] EURACHEM/CITAC Guide, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. Ellison S.L.R.; Rosslein M.; Williams A.; UK, 2^a Edição, **2000**.
- [36] FAO/OMS, World Declaration on Nutrition; *Global Environmental Monitoring System (GEMS)/Food*. Europe Report of the 1st Advisory Committee Meeting, Roma, **2001**. Disponível em: http://www.euro.who.int/Document/fos/GEMS_SCrpt.pdf (Acedido em Junho de 2007).
- [37] Festas, I.; Herbert, P.; Santos, L.; Cabral, M.; Alves, A.; *Ochratoxin A in Some Portuguese Wines: Method Validation and Screening in Port Wine and Vinho Verde*. American Journal of Enology and Viticulture, Vol. 51, No. 2, pp. 150-154, **2000**.
- [38] Freimund, S.; Sauter, M.; Käppeli, O.; Dutler, H.; *A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae**. Carbohydrate Polymers, Vol. 54, pp. 159–171, **2003**.
- [39] Fuchs, R.; Peraica, M.; *Ochratoxin A in human kidney diseases*. Food Additives and Contaminants, Suplemento 1, pp. 53–57, **2005**.
- [40] Fung, F.; Clark, R.F.; *Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview*. Journal of Toxicology. Clinical Toxicology, Vol. 42, No. 2, pp. 217–234, **2004**.
- [41] Gilbert, J.; Anklam, E.; *Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs*. Trends in analytical chemistry, Vol. 21, No. 6+7, pp. 468–486, **2002**.
- [42] González-Peñas, E.; Leache, C.; Bizcarte, M.; Pérez de Obanos, A.; Araguás, C.; López de Cerain, A.; *Determination of ochratoxin A in wine using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography with fluorescence detection*. Journal of Chromatography A, Vol. 1025, pp. 163–168, **2004**.
- [43] Grosse, Y.; Baudrimont, I.; Castegnaro, M.; Betbeder, A.-M.; Creppy E.E.; Dirheimer, G.; Phohl-Leszkowicz, A.; *Formation of ochratoxin A metabolites and DNA-adducts in monkey kidney cells*. Chemico-Biological Interactions, Vol. 95, pp. 175–187, **1995**.
- [44] Grosse, Y.; Chekir-Ghedira, L.; Huc, A.; Obrecht-Pflumio, S.; Dirheimer, G.; Hacha, H.; Phohl-Leszkowicz, A.; *Retinol, ascorbic acid and α -tocopherol prevent DNA*

adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. Cancer Letters, Vol. 114, pp. 225–229, **1997**.

- [45] IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Summary of Data Reported and Evaluation*, Vol. 56, pp. 489, **1993**.
- [46] IFST. Institute of Food Science and Technology, Information Statement. *Mycotoxins*. Páginas 1–14, **2006**. Disponível em: www.ifst.org (Acedido em Junho de 2007).
- [47] Kammerer, D.; Claus, A.; Schieber, A.; Carle, R.; *A novel process for the recovery of polyphenols from grape (Vitis vinifera L.) pomace*. Journal of Food Science, Vol. 70, No. 2, pp. C157–C163, **2005**.
- [48] Könräd, I.; Röschenthaler, R.; *Inhibition of phenylalanine tRNA syntetase from Bacillus Subtilis by ochratoxin A*. Febs Letters, Vol. 83, No. 2, pp. 341–347, **1977**.
- [49] Krawczak, M.; Zschocke, J.; *A role for overdominant selection in phenylketonuria? Evidence From Molecular Data*. Human Mutation, Vol. 21, pp. 394–397, **2003**.
- [50] Lara-Flores, M.; Olvera-Novoa, M.A.; Guzmán-Méndez, B.E.; López-Madrid, W.; *Use of the bacteria Streptococcus faecium and Lactobacillus acidophilus, and the yeast Saccharomyces cerevisiae as growth promoters in Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. Aquaculture, Vol. 216, pp. 193–201, **2003**.
- [51] Legislação Nacional, Lei No. 8/85, de 4 de Junho.
- [52] Legislação Comunitária, Directiva No. 1493/1999 do Conselho de 17 Maio de **1999**.
- [53] Legislação Comunitária, Directiva 2002/26/CE da Comissão de 13 de Março de **2002**.
- [54] Legislação Comunitária, Directiva 2002/472/CE da Comissão de 12 de Março de **2002**.
- [55] Legislação Comunitária, Directiva 2005/123/CE da Comissão de 26 de Janeiro de **2005**.

- [56] Legislação Comunitária, Recomendação da Comissão, Directiva 2006/576/CE da Comissão de 17 de Agosto de **2006**.
- [57] Leitner, A.; Zöllner, P.; Paolillo, A.; Stroka, J.; Papadopoulou-Bouraoui, A.; Jaborek, S.; Anklam, E.; Lindner, W.; *Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine*. Analytica Chimica Acta, Vol. 453, pp. 33–41, **2002**.
- [58] Leong, S.L.; Hocking, A.D.; Pitt, J.I.; Kazi, B.A.; Emmett, R.W.; Scott, E.S.; *Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A*. International Journal of Food Microbiology, Vol. 111, pp. S10–S17, **2006a**.
- [59] Leong, S.L.; Hocking, A.D.; Varelis, P.; Giannikopoulos, G.; Scott, E.S.; *Fate of ochratoxin A during vinification of semillon and shiraz grapes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 54, pp. 6460–6464, **2006b**.
- [60] Llobera, A.; Cañellas, J.; *Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (Vitis vinifera): pomace and stem*. Food Chemistry, Vol. 101, pp. 659–666, **2007**.
- [61] Lobeau, M.; De Saeger, S.; Sibanda, L.; Barna-Vetró, I.; Van Peteghem, C.; *Development of a new clean-up tandem assay column for the detection of ochratoxin A in roasted coffee*. Analytica Chimica Acta, Vol. 538, pp. 57–61, **2005**.
- [62] López de Cerain, A.; Jiménez, A.M.; Ezpeleta, O.; Bello, J.; *Efectos tóxicos de la ocratoxina A*. Disponível na Internet, URL: http://www.unav.es/bromatologia/toxicologia/documentos/art_OTa_1.pdf (Acedido em Junho de 2007).
- [63] Magnoli, C.; Violante, M.; Combina, M.; Palácio, G.; Dalcero, A.; *Mycoflora and ochratoxin-producing strains of Aspergillus section Nigri in wine grapes in Argentina*. Letters in Applied Microbiology, Vol. 37, pp. 179–184, **2003**.
- [64] Magnoli, C.; Astoreca, A.; Ponsone, L.; Fernández-Juri, M.G.; Chiacchiera, S.; Dalcero, A.; *Ochratoxin A and the occurrence of ochratoxin A-producing black aspergilli in stored peanut seeds from Córdoba, Argentina*. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 86, pp. 2369–2373, **2006**.

- [65] Mally, A.; Zepnik, H.; Wanek, P.; Eder, E.; Dingley, K.; Ihmels, H.; Völkel, W.; Dekant, W.; *Ochratoxin A: lack of formation of covalent DNA adducts*. Chemical Research in Toxicology, Vol.17, pp. 234–242, **2004**.
- [66] Manderville, R.A.; *A case for the genotoxicity of ochratoxin A by bioactivation and covalent DNA adduction*. Chemical Research in Toxicology, Vol. 18, pp. 1091–1097, **2005**.
- [67] Marquardt, R.R.; Frohlich, A.A.; *A review of recent advances in understanding ochratoxicosis*. Journal of Animal Science, Vol. 70, pp. 3968–3988, **1992**.
- [68] Martinello, M.; Hecker, G.; Pramparo, M.C.; *Grape seed oil deacidification by molecular distillation: Analysis of operative variables influence using the response surface methodology*. Journal of Food Engineering, Vol. 81, pp. 60–64, **2007**.
- [69] Mayer, R.; Stecher, G.; Sultana, T.; Trojer, L.; Abel, G.; Popp, M.; Bonn, G.K.; *Qualitative and quantitative analysis of grape seeds by HPLC-MS*. Planta Medica, Vol. 72, Assunto 11, **2006**.
- [70] McMasters, D.R.; Vedani, A.; *Ochratoxin binding to phenylalanyl-tRNA synthetase: computational approach to the mechanism of ochratoxicosis and its antagonism*. Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 42, pp. 3075–3086, **1999**.
- [71] Meisner, H.; Chan, S.; *Ochratoxin A, na inhibitor of mitochondrial transport systems*. Biochemistry, Vol. 13, No. 14, pp. 2795–2800, **1974**.
- [72] Meisner, H.; Meisner, P.; *Ochratoxin A, an in vivo inhibitor of reanl phosphoenolpyruvate carboxykinase*. Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 208, Assunto 1, pp. 146–153, **1981**.
- [73] Müller, H.-M.; Lerch, C.; Müller, K.; Eggert, W.; *Kinetic profiles of ochratoxin A and ochratoxin α during in vitro incubation in buffered forestomach and abomasal contents from cows*. Natural Toxins, Vol. 6, pp. 251–258, **1998**.
- [74] Muñoz, K.; Veja, M.; Rios, G.; Muñoz, S.; Madariaga, R.; *Preliminary study of Ochratoxin A in human plasma in agricultural zones of Chile and its relation to food consumption*. Food and Chemical Toxicology, Vol. 44, pp. 1884–1889, **2006**.

- [75] Nikolov, I.G.; Chernozemsky, I.N.; Petkova-Bocharova, T.; Vrabcheva, T.; Stojchev, I.; Bankov, B.; Castegnaro, M.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Dragacci, S.; Day, N.; Gill, C.; Useleber, E.; Dietrich, R.; Martlbauer, E.; *Review of the cooperative studies of the national oncological center in Bulgária on balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumors (1991–2001)*. Facta Universitatis, Series: Medicine and Biology, Vol. 9, No. 1, pp. 119–122, **2002**.
- [76] Nogales, R.; Cifuentes, C.; Benítez, E.; *Vermicomposting of winery wastes: a laboratory study*. Journal of Environmental Science and Health Part B, Vol. 40, pp. 659–673, **2005**.
- [77] Nogueira, Sofia; *Validação de um método analítico para a quantificação de ocratoxina A em cerveja*. Tese de Mestrado em Controlo de Qualidade, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, **2005**.
- [78] NTP (National Toxicology Program); *11th Report on Carcinogens. Ochratoxin A. CAS No. 303-47-9. Reasonably anticipated to be a human carcinogen. First Listed in the Sixth Annual Report on Carcinogens (1991)*, **2005**. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov> (Acedido em Junho de 2007).
- [79] Obrecht-Pflumio, S.; Dirheimer, G.; *In vitro DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A*. Chemico-Biological Interactions, Vol. 127, pp. 29–44, **2000**.
- [80] Obrecht-Pflumio, S.; Dirheimer, G.; *Horseradish peroxidase mediates DNA and deoxyguanosine 3'-monophosphate adduct formation in the presence of ochratoxin A*. Archives of Toxicology, Vol. 75, pp. 583–590, **2001**.
- [81] O'Brien, E.; Dietrich, D.R.; *Ochratoxin A: the continuing enigma*. Critical Reviews in Toxicology, Vol. 35, pp. 33–60, **2005**.
- [82] OIV; *Compendium of international methods of wine and must analysis, Volume 2*. (pp. MA-E-AS315-10-OCHRAT). Paris: OIV, **2004**.
- [83] Özkan, G.; Sagdiç, O.; Baydar, N.G.; Kurumahmutoglu, Z.; *Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts*. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 84, pp. 1807–1811, **2004**.

- [84] Özpinar, H.; Augonyte, G.; Drochner, W.; *Inactivation of ochratoxin in ruminal fluid with variation of pH-value and fermentation parameters in an in vitro system*. Environmental Toxicology and Pharmacology, Vol. 7, pp. 1–9, **1999**.
- [85] Palenzuela, B.; Arce, L.; Macho, A.; Muñoz, E.; Rios, A.; Valcarcel, M.; *Bioguided extraction of polyphenols from grape marc by using an alternative supercritical-fluid extraction method based on a liquid solvent trap*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 378, pp. 2021–2027, **2004**.
- [86] Pardo, E.; Marín, S.; Sanchis, V.; Ramos, A.J.; *Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic Aspergillus ochraceus isolates on grapes*. Food Microbiology, Vol. 22, pp. 383–389, **2005a**.
- [87] Pardo, E.; Lagunas, U.; Sanchis, V.; Ramos, A.J.; Marín, S.; *Influence of water activity and temperature on conidial germination and mycelial growth of ochratoxigenic isolates of Aspergillus ochraceus on grape juice synthetic medium. Predictive models*. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 85, pp. 1681–1686, **2005b**.
- [88] Pascale, M.; Visconti, A.; *Rapid method for the determination of ochratoxin A in urine by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography*. Mycopathologia, Vol. 152, pp. 91–95, **2000**.
- [89] Paterson, R.R.M.; Venâncio, A.; Lima, N.; *Solutions to Penicillium taxonomy crucial to mycotoxin research and health*. Research in Microbiology, Vol. 155, pp. 507–513, **2004**.
- [90] Pena, A.; Cerejo, F.; Lino, C.; Silveira, I.; *Determination of ochratoxin A in Portuguese rice samples by high performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 382, pp. 1288–1293, **2005**.
- [91] Pena, A.; Seifrtová, M.; Lino, C.; Silveira, I.; Solich, P.; *Estimation of ochratoxin A in portuguese population: New data on the occurrence in human urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Food and Chemical Toxicology, Vol. 44, pp. 1449–1454, **2006**.

- [92] Petzinger, E.; Ziegler, K.; *Ochratoxin A from a toxicological perspective*. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Vol. 23, pp. 91–98, **2000**.
- [93] Pfohl-Leszkowicz, A.; Manderville, R.A.; *Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans*. Molecular Nutrition & Food Research, Vol. 51, pp. 61–99, **2007**.
- [94] Pfohl-Leszkowicz, A.; Bartsch, H.; Azémar, B.; Mohr, U.; Estève, J.; Castegnaro, M.; *Mesna protects rats against nephrotoxicity but not carcinogenicity induced by ochratoxin A, implicating two separate pathways*. Facta Universitatis, Series: Medicine and Biology, Vol. 9, No. 1, pp. 57–63, **2002**.
- [95] Pitt, J.I.; Basílico, J.C.; Abarca, M.L.; López, C.; *Mycotoxins and toxigenic fungi*. Medical Mycology, Vol. 38, Suplemento 1, pp. 41–46, **2000**.
- [96] Ratola, N.; Martins, L.; Alves, A.; *Ochratoxin A in wines-assessing global uncertainty associated with the results*. Analytica Chimica Acta, Vol. 513, pp. 319–324, **2004**.
- [97] Ratola, N.; Abade, E.; Simões, T.; Venâncio, A.; Alves, A.; *Evolution of ochratoxin A content from must to wine in Port Wine microvinification*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 382, pp. 405–411, **2005**.
- [98] Rosa, C.A.R.; Magnoli, C.E.; Fraga, M.E.; Dalcerro, A.M.; Santana, D.M.N.; *Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil*. Food Additives and Contaminants, Vol. 21, No. 4, pp. 358–364, **2004**.
- [99] Sage, L.; Krivobok, S.; Delbos, É.; Seigle-Murandi, F.; Creppy, E.E.; *Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 50, pp. 1306–1311, **2002**.
- [100] Sage, L.; Garon, D.; Seigle-Murandi, F.; *Fungal microflora and ochratoxin A risk in french vineyards*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 52, pp. 5764–5768, **2004**.
- [101] Sava, V.; Reunova, O.; Velásquez, A.; Harbison, R.; Sánchez-Ramos, J.; *Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A*. NeuroToxicology, Vol. 27, pp. 82–92, **2006**.

- [102] Serra, R.; Mendonça, C.; Abrunhosa, L.; Pietri, A.; Venâncio, A.; *Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation*. Analytica Chimica Acta, Vol. 513, pp. 41–47, **2004**.
- [103] Shepard, G.S.; Fabiani, A.; Stockenström, S.; Mshicileli, N.; Sewram, V.; *Quantitation of Ochratoxin A in South African Wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 51, pp. 1102–1106, **2003**.
- [104] Shrikhande, A.J.; *Wine by-products with health benefits*. Food Research International, Vol. 33, pp. 469–474, **2000**.
- [105] Silva, J.M.R.; *Composição da uva, do mosto e do vinho*. Em 100.º Curso Intensivo de Vinificação da Estação Vitivinícola da Bairrada, Anadia, de 4 a 8 Setembro de **2006**. Organizado por: Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral; Comissão Vitivinícola da Bairrada; Confraria dos Enófilos da Bairrada.
- [106] Soleas, G.J.; Yan, J.; Goldberg, D.M.; *Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection*. Journal of Food Chemistry, Vol. 49, pp. 2733–2740, **2001**.
- [107] Soyöz, M.; Özçelik, N.; Kiliç, İ.; Altuntaş, İ.; *The effects of ochratoxin A on lipid peroxidation and antioxidant enzymes: a protective role of melatonin*. Cell Biology and Toxicology, Vol. 20, pp. 213–219, **2004**.
- [108] Su, M.-S.; Silva, J.L.; *Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (Vaccinium ashei) by-products as affected by fermentation*. Food Chemistry, Vol. 97, pp. 447–451, **2006**.
- [109] Tatu, C.A.; Orem, W.H.; Finkelman, R.; Feder, G.L.; *The etiology of balkan endemic nephropathy: still more questions than answers*. Environmental Health Perspectives, Vol. 106, pp. 689–700, **1998**.
- [110] Timperio, A.M.; Magro, P.; Chilosi, G.; Zolla, L.; *Assay of ochratoxin A in grape by high-pressure liquid chromatography coupled on line with an ESI–mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, Vol. 832, pp. 127–133, **2006**.

- [111] Tjamos, S.E.; Antoniou, P.P.; Tjamos, E.C.; *Aspergillus spp., distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece*. International Journal of Food Microbiology, Vol. 111, pp. S61–S66, **2006**.
- [112] Turesky, R.J.; *Perspective: Ochratoxin A is not a genotoxic carcinogen*. Chemical Research in Toxicology, Vol. 18, pp. 1082–1090, **2005**.
- [113] Valenta, H.; *Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids*. Journal of Chromatography A, Vol. 815, pp. 75–92, **1998**.
- [114] Valero, A.; Farré, J.R.; Sanchis, V.; Ramos, A.J.; Marín, S.; *Effects of fungal interaction on ochratoxin A production by A. carbonarius at different temperatures and a_w* . International Journal of Food Microbiology, Vol. 110, pp. 160–164, **2006**.
- [115] Van der Merwe, K.J.; Steyn, P.S.; Fourie, L.; *Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B and C, metabolites of Aspergillus ochraceus Wilh.*. Journal Chemical Society [Perkin 1], pp. 7083–7088, **1965**.
- [116] Varga, J.; Kevei, É.; Rinyu, E.; Téren, J.; Kozakiewicz, Z.; *Ochratoxin Production by Aspergillus Species*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 62, No. 12, pp. 4461–4464, **1996**.
- [117] Villaescusa, I.; Fiol, N.; Martínez, M.; Miralles, N.; Poch, J.; Serrarlos, J.; *Removal of copper and nickel ions from aqueous solutions by grape stalks wastes*. Water Research, Vol. 38, pp. 992–1002, **2004**.
- [118] Visconti, A.; Pascale, M.; Centonze, G.; *Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, Vol. 864, pp. 89–101, **1999**.
- [119] Visconti, A.; Pascale, M.; Centonze, G.; *Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis with fluorometric detection: collaborative study*. Journal of AOAC International, Vol. 84, No. 6, pp. 1818–1827, **2001**.

- [120] Voice, T.C.; Long, D.T.; Radovanović, Z.; Atkins, J.L.; Mcelmurry, S.P.; Niagolova, N.D.; Dimitrov, P.; Petropoulos, E.A.; Ganev, V.S.; *Critical evaluation of environmental exposure agents suspected in the etiology of balkan endemic nephropathy*. International Journal of Occupational and Environmental Health, Vol. 12, pp. 369–376, **2006**.
- [121] WHO; *Ochratoxin A (Food Additives Series 35)*, **1996**. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je15.htm> (Acedido em Junho de 2007).
- [122] WHO; *Ochratoxin A (JECFA Food Additives Séries 47)*, **2001**. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm> (Acedido em Junho de 2007).
- [123] Yilmaz, Y.; Toledo, R.T.; *Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols*. Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 19, pp. 41–48, **2006**.
- [124] Žanic-Grubišić, T.; Zrinski, R.; Čepelak, I.; Petrik, J.; Radić, B.; Pepeljnjak, S.; *Studies of Ochratoxin A-Induced Inhibition of Phenylalanine Hydroxylase and Its Reversal by Phenylalanine*. Toxicology and Applied Pharmacology, Vol. 167, pp.132–139, **2000**.
- [125] Zimmerli, B.; Dick, R.; *Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data*. Journal of Chromatography B, Vol. 666, pp. 85-99, **1995**.
- [126] Zöllner, P.; Leitner, A.; Lubda, D.; Cabrera, K.; Lindner, W.; *Application of a chromolith speedROD RP18e HPLC column: determination of ochratoxin A in different wines by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Chromatographia Vol. 52, No. 11/12, pp. 818–820, **2000**.

Anexo A – Preparação das soluções de ocratoxina A

Neste anexo são apresentados os cálculos para a preparação dos padrões de OTA em metanol utilizados para a obtenção das duas rectas de calibração.

Solução mãe de OTA: Retirou-se o conteúdo do frasco original de OTA (que continha 1 mg de OTA) para um balão de 100 mL e verificou-se espectrofotometricamente (M_r : 403.8, $\epsilon_{333\text{ nm}}$ 5500 $M^{-1}.cm^{-1}$) a concentração, sendo esta 9.4 $mg.L^{-1}$ de OTA em metanol.

Para realizar os padrões presentes nas rectas de calibração, prepararam-se duas soluções intermédias em metanol: 0.94 $mg.L^{-1}$ e 94 $\mu g.L^{-1}$ de OTA em metanol (Tabela 10).

Tabela 10 – Preparação dos padrões de OTA para a recta de calibração do método cromatográfico I.

Padrão	[OTA] da solução utilizada na preparação ($\mu g.L^{-1}$)	Volume a pipetar da solução (mL)	Quantidade de padrão preparado (mL)	Concentração ($\mu g.L^{-1}$)
1	18.8	0.25	10.0	0.47
2	18.8	0.35	10.0	0.658
3	94.0	0.10	10.0	0.94
4	94.0	0.20	10.0	1.88
5	94.0	0.60	10.0	5.64
6	940.0	0.10	10.0	9.4
7	940.0	0.20	10.0	18.8
8	940.0	1.00	10.0	94.0
9	9400.0	1.00	10.0	940.0

A título de exemplo, o padrão 1 foi preparado retirando 0.25 mL do padrão 7, e colocando esse volume num balão volumétrico de 10 mL e preenchido com metanol.

$$[\text{OTA}]_{\text{p1}} = \frac{18.8 \times 0.25}{10} = 0.47 \mu\text{g.L}^{-1}$$

Tabela 11 – Preparação dos padrões de OTA para a recta de calibração do método cromatográfico II.

Padrão	[OTA] da solução utilizada na preparação ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Volume a pipetar da solução (mL)	Quantidade de padrão preparado (mL)	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
1	23.5	0.02	10.0	0.047
2	23.5	0.05	10.0	0.1175
3	23.5	0.10	10.0	0.235
4	23.5	0.25	10.0	0.5875
5	23.5	0.30	10.0	0.705
6	94.0	0.10	10.0	0.94
7	94.0	0.30	10.0	2.82
8	94.0	0.70	10.0	6.58
9	940.0	0.15	10.0	14.1
10	940.0	0.20	10.0	18.8
11	940.0	0.25	10.0	23.5
12	940.0	1.00	10.0	94.0
13	9400.0	1.00	10.0	940.0

Anexo B – Resultados obtidos na quantificação dos padrões de ocratoxina A

Nas tabelas seguintes apresentam-se os resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a realização das rectas de calibração.

Tabela 12 – Resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a obtenção da recta de calibração, no método cromatográfico I.

[OTA] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área média do pico cromatográfico (mV.min)	Desvio padrão	CV (%)
0.47	7469.3	532.6	7.1
0.658	9718.0	72.1	0.7
0.94	14226.9	1058.1	7.4
1.88	30868.5	2668.4	8.6
5.64	85922.0	2788.8	3.2
9.40	156620.0	5533.5	3.5
18.80	301724.3	18798.8	6.2

Tabela 13 – Resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a obtenção da recta de calibração, no método cromatográfico II.

[OTA] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área média do pico cromatográfico (mV.min)	Desvio padrão	CV (%)
0.047	1147.3	168.2	14.7
0.1175	2698.8	233.7	8.7
0.235	5595.8	267.5	4.8
0.5875	14388.8	180.7	1.3
0.705	16608.7	344.7	2.1
0.94	24018.5	379.5	1.6
2.82	72307.8	1214.6	1.7
6.58	165630.0	3398.1	2.1
14.10	347141.2	6150.0	1.8
18.80	467971.8	6505.6	1.4
23.50	601139.5	6953.4	1.2

A partir dos dados da Tabela 12 pode-se construir a recta de calibração, indicada abaixo, e calcular os parâmetros da Tabela 14.

$$\text{Área do pico cromatográfico (mV.min)} = 16149.897 \times [\text{OTA}] - 531.910$$

Tabela 14 – Parâmetros necessários para o estudo da linearidade da resposta do HPLC-FL no método cromatográfico I.

	x_i	y_i	$y_{\text{cal.}}$	x_i^2	$(x - \bar{x})^2$	$(y - \bar{y}_{\text{cal.}})^2$
	0.47	7469.30	7058.54	0.22	24.29	168681.44
	0.658	9718.00	10094.72	0.43	22.47	141919.61
	0.94	14226.86	14648.99	0.88	19.88	178198.83
	1.88	30868.50	29829.90	3.53	12.38	1078697.34
	5.64	85922.00	90553.51	31.81	0.06	21450880.66
	9.40	156620.00	151277.12	88.36	16.01	28546338.48
	18.80	301724.33	303086.16	353.44	179.61	1854559.29
Média	5.40	-	-	-	-	-
Soma	-	-	-	478.68	22.47	53419275.65

Com,

$$y_{\text{cal}} = 16149.897 \times x_i - 531.910$$

e,

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}{N - 2}} = 3268.617$$

sendo,

$y_{\text{cal.}}$ $\equiv$ valores das áreas de OTA calculadas, para cada valor de x_i , com base na recta de calibração;

y_i $\equiv$ valores das áreas de OTA obtidos experimentalmente;

x_i $\equiv$ concentração do padrão i ($i \in [1;7]$);

$s_{y/x} \equiv$ desvio padrão residual;

$N \equiv$ número de pontos experimentais ($N=7$);

$\bar{x} \equiv$ média dos valores de concentração dos padrões;

$\bar{y} \equiv$ média dos valores das área obtidas experimentalmente.

Os parâmetros do estudo da linearidade foram determinados para um nível de confiança de 95% e com base nas seguintes equações:

$$s_a = s_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} = 1630.858$$

$$a + s_a = 1098.947$$

$$a - s_a = -2162.768$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} = 197.216$$

$$\frac{s_b}{b}(\%) = \frac{197.216}{16149.897} \times 100 = 1.2\%$$

$$t_{\text{student}} = 2.45$$

onde, s_a e s_b são, respectivamente, o desvio padrão associado à ordenada na origem e o desvio padrão associado ao declive da recta de calibração.

Com base nos valores das equações anteriores e nas equações que se seguem, estabelecem-se os intervalos de confiança para o declive b , IC_b e para a ordenada na origem a , IC_a , que se apresentam na Tabela 15.

$$IC_b = t_{\text{student}} \times S_b$$

$$IC_a = t_{\text{student}} \times S_a$$

Tabela 15 – Intervalos de confiança correspondentes ao declive e à ordenada na origem, para um nível de confiança de 95%.

	Intervalo de confiança	Valor determinado	Mínimo	Máximo
Declive (b)	483.119	16149.897	15666.718	16633.076
Ordenada na origem (a)	3995.601	-531.910	-4527.511	3463.691

A partir dos resultados acima obtiveram-se as bandas de confiança para cada valor de concentração da recta de calibração, permitindo o traçado das rectas limite máximo e mínimo representadas na Figura 10.

$$y_{i\text{max}} = b_{\text{max}} \times x_i + a_{\text{max}}$$

$$y_{i\text{min}} = b_{\text{min}} \times x_i + a_{\text{min}}$$

O limite de detecção do método, foi determinado por:

$$LD = a + 3 \times s_a = 4360.66 \text{ mV.s} \rightarrow x_{LD} = 0.30 \mu\text{g.L}^{-1}$$

A partir dos dados da Tabela 13 pode-se construir a recta de calibração, indicada abaixo e, calcular os parâmetros da Tabela 16.

$$\text{Área do pico cromatográfico (mV.min)} = 25232.326 \times [\text{OTA}] - 732.071$$

Tabela 16 – Parâmetros necessários para o estudo da linearidade da resposta do HPLC-FL no método cromatográfico II.

	x_i	y_i	$y_{\text{cal.}}$	x_i^2	$(x - \bar{x})^2$	$(y - \bar{y}_{\text{cal.}})^2$
	0.047	1147.25	453.85	0.0022	38.12	480805.31
	0.1175	2698.83	2232.73	0.0138	37.25	217254.41
	0.235	5595.83	5197.53	0.0552	35.83	158648.65
	0.5875	14388.83	14091.92	0.3452	31.74	88156.84
	0.705	16608.67	17056.72	0.4970	30.43	200751.35
	0.94	24018.50	22986.32	0.8836	27.89	1065403.36
	2.82	72307.83	70423.09	7.9524	11.57	3552258.01
	6.58	165630.00	165296.64	43.2964	0.13	111130.82
	14.10	347141.17	355043.73	198.8100	62.08	62450533.16
	18.80	467971.83	473635.66	353.4400	158.23	32078997.30
	23.50	601139.50	592227.60	552.2500	298.56	79421965.17
Média	6.22	-	-	-	-	-
Soma	-	-	-	1157.5458	731.82	179825904.38

Com,

$$y_{\text{cal}} = 25232.326 \times x_i - 732.071$$

e,

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}{N - 2}} = 4469.973$$

Os parâmetros do estudo da linearidade foram determinados para um nível de confiança de 95% e com base nas seguintes equações:

$$s_a = s_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} = 1695.018$$

$$a + s_a = 962.947$$

$$a - s_a = -2427.088$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} = 165.235$$

$$\frac{s_b}{b}(\%) = \frac{165.235}{25232.326} \times 100 = 0.66\%$$

$$t_{\text{student}} = 2.23$$

onde, s_a e s_b são, respectivamente, o desvio padrão associado à ordenada na origem e o desvio padrão associado ao declive da recta de calibração.

Com base nos valores das equações anteriores e nas equações que se seguem, estabelecem-se os intervalos de confiança para o declive b , IC_b e para a ordenada na origem a , IC_a , que se apresentam na Tabela 17.

Tabela 17 – Intervalos de confiança correspondentes ao declive e à ordenada na origem, para um nível de confiança de 95%.

	Intervalo de confiança	Valor determinado	Mínimo	Máximo
Declive (b)	368.474	25232.326	24863.853	25600.800
Ordenada na origem (a)	3779.89	-732.071	-4511.960	3047.819

A partir dos resultados acima obtiveram-se as bandas de confiança para cada valor de concentração da recta de calibração, permitindo o traçado das rectas limite máximo e mínimo representadas na Figura 13.

B.1. Ensaios de precisão

Tabela 18 – Determinação da repetibilidade para os padrões de concentração de 0.47, 1.88 e 5.64 $\mu\text{g.L}^{-1}$, referentes à recta de calibração do método cromatográfico I, com determinações no mesmo dia.

Padrão	[OTA] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área pico cromatográfico (mV.min)	Média das áreas (mV.min)	Desvio padrão	CV (%)
1	0.47	7882 7668	7775.0	151.3	1.95
4	1.88	33993 32794	33393.5	847.8	2.54
5	5.64	83318 84074	83696.0	534.6	0.64

Tabela 19 – Determinação da precisão intermédia para os padrões de concentração de 0.47, 1.88 e 5.64 $\mu\text{g.L}^{-1}$, referentes à recta de calibração do método cromatográfico I, com determinações em 3 dias diferentes.

Padrão	[OTA] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área do pico cromatográfico (mV.min)	Média das áreas (mV.min)	Desvio padrão	CV (%)
1	0.47	6687 7640 7882 7668	7469.3	532.6	7.13
4	1.88	27363 27976 32076 31009 33993 32794	30868.5	2668.4	8.64
5	5.64	89124 89692 85387 83937 83318 84074	85922.0	2788.8	3.25

Tabela 20 – Determinação da repetibilidade para os padrões de concentração de 0.047, 2.82 e 6.58 $\mu\text{g.L}^{-1}$, referentes à recta de calibração do método cromatográfico II, com determinações no mesmo dia.

Padrão	[OTA] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área pico cromatográfico (mV.min)	Média das áreas (mV.min)	Desvio padrão	CV (%)
1	0.047	973 1034	1003.5	43.1	4.30
7	2.82	73418 73846	73632.0	302.6	0.41
8	6.58	169461 166424	167942.5	2147.5	1.28

Tabela 21 – Determinação da precisão intermédia para os padrões de concentração de 0.047, 2.82 e 6.58 $\mu\text{g.L}^{-1}$, referentes à recta de calibração do método cromatográfico II, com determinações em 3 dias diferentes.

Padrão	[OTA] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área do pico cromatográfico (mV.min)	Média das áreas (mV.min)	Desvio padrão	CV (%)
1	0.047	1277 1305 973 1034	1147.3	168.2	14.66
4	2.82	71292 70654 72247 72390 73418 73846	72307.8	1214.6	1.68
5	6.58	159644 164230 167653 166368 169461 166424	165630.0	3398.1	2.05

Anexo C – Dados relativos à validação do método analítico de determinação de OTA em bagaços através do método cromatográfico I, e respectivo erro global do método de análise

C.1. Incerteza associada à preparação de padrões, U_1

As incertezas são calculadas recorrendo à expressão:

$$\text{Incerteza} = \sqrt{\sum_i \left(\frac{\Delta m_i}{m_i} \right)^2}$$

sendo, Δm_i o erro associado à medição de um determinado parâmetro, e m_i o valor medido do respectivo parâmetro.

A incerteza associada à preparação da solução mãe de OTA (0.94 mg.L^{-1}) é indicada a seguir.

$$\text{Incerteza relativa} = \sqrt{0.001^2 + \left(\frac{0.1}{100} \right)^2} = 1.41 \times 10^{-3}$$

Os padrões utilizados para a obter a recta de calibração foram preparados a partir da solução mãe supracitada.

Tabela 22 – Erros dos equipamento de medida.

Equipamento		Erro
Balão volumétrico 10 ml		0.025 mL
Balão volumétrico 100 ml		0.1 mL
Pipeta 10-100 µl	10 µl	0.001 µl
	50 µl	0.003 µl
	100 µl	0.002 µl
Pipeta 100-1000 µl	100 µl	0.006 µl
	500 µl	0.002 µl
	1000 µl	0.002 µl
Pipeta 500-5000 µl	100 µl	0.006 µl
	500 µl	0.0025 µl
	1000 µl	0.0015 µl
Espectrofotómetro		0.001

Na tabela seguinte apresentem-se os volumes medidos daquela solução para cada padrão, a incerteza associada.

Tabela 23 – Cálculo de incerteza relativa à preparação dos padrões intermédios preparados.

Padrão	Medição	Incerteza relativa
Padrão intermédio 0.94 mg.L ⁻¹	V _p = 1 mL V _t = 10 mL	$\sqrt{(1.41 \times 10^{-3})^2 + \left(\frac{0.025}{10}\right)^2 + \left(\frac{0.002}{1}\right)^2} = 3.5 \times 10^{-3}$
Padrão intermédio 94 µg.L ⁻¹	V _p = 1 mL V _t = 10 mL	$\sqrt{(3.5 \times 10^{-3})^2 + \left(\frac{0.025}{10}\right)^2 + \left(\frac{0.002}{1}\right)^2} = 4.6 \times 10^{-3}$

Tabela 24 – Cálculo de incerteza relativa à preparação dos padrões presentes na recta de calibração.

[OTA] (µg.L ⁻¹)	V total (mL)	V pipetado (mL)	Erro do balão (mL)	Erro da pipeta (mL)	U ₁
0.47	10.0	0.25	0.025	0.002	0.0137
0.658	10.0	0.35	0.025	0.002	0.0125
0.94	10.0	0.1	0.025	0.002	0.0207
1.88	10.0	0.2	0.025	0.002	0.0113
5.64	10.0	0.6	0.025	0.002	0.0062
9.40	10.0	0.1	0.025	0.002	0.0205
18.80	10.0	0.2	0.025	0.002	0.0109

C.2. Incerteza associada à recta de calibração, U₂

Tabela 25 – Parâmetros para o cálculo de U₂.

x	(y-y _{médio})	(y-y _{cal}) ²	S _{x0}	x ₀	U ₂
0.47	-79180.6	168681.4	0.1	0.47	0.2713
0.658	-76931.8	141919.6	0.1	0.658	0.1926
0.94	-72423.0	178198.8	0.1	0.94	0.1332
1.88	-55781.3	1078697.3	0.1	1.88	0.0640
5.64	-727.8	21450880.7	0.1	5.64	0.0200
9.40	69970.2	28546338.5	0.1	9.40	0.0132
18.80	215074.5	1854559.3	0.2	18.80	0.0105

Com,

$$S_{x0} = \frac{S_{y/x}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y_i - \bar{y})^2}{b^2 \times \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$U_2 = \frac{S_{x0}}{x_0}$$

Sendo,

$n \equiv$ número de injeções efectuadas para cada padrão

$a \equiv$ ordenada na origem da recta de calibração

$b \equiv$ declive da recta de calibração

C.3. Incerteza associada à precisão, U_3

Tabela 26 – Parâmetros para o cálculo de U_3 .

x	CV (%)	x_0	U_3
0.47	7.13	0.47	0.0619
0.658	0.74	0.658	0.0046
0.94	7.44	0.94	0.0323
1.88	8.64	1.88	0.0188
5.64	3.25	5.64	0.0023
9.40	3.53	9.40	0.0015
18.80	6.23	18.80	0.0014

Sendo, $U_3 = CV \times \sqrt{n \times x_0}$

C.4. Incerteza associada à exactidão, U_4

Tabela 27 – Parâmetros para o cálculo de U_4 .

Padrão	Recuperação (%)	Média (%)	Desvio padrão	Desvio relativo	U_4
9.4	22.6	24.4	1.848	0.076	0.0379
	23.0				
	26.2				
	25.8				
28.2	24.5	23.5	0.944	0.040	0.0201
	23.8				
	22.3				
	23.5				
47	23.9	23.5	0.395	0.017	0.0084
	23.5				
	23.7				
	22.9				
94	23.8	24.4	0.560	0.023	0.0132
	-				
	24.4				
	24.9				

C.5. Incerteza global associada, U

Para o cálculo da incerteza global, utilizou-se o U_4 como sendo o mesmo para todas as concentrações. Optou-se pelo valor mais elevado calculado em C.4. – $U_4 = 0.0379$.

$$U_{\text{total}} = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + U_4^2}$$

Anexo D – Dados relativos à validação do método analítico de determinação de OTA em bagaços através do método cromatográfico II, e respectivo erro global do método de análise

D.1. Incerteza associada à preparação de padrões, U_1

Na tabela seguinte apresentem-se os volumes medidos daquela solução para cada padrão, a incerteza associada.

Tabela 28 – Cálculo de incerteza relativa à preparação dos padrões constituintes da recta de calibração.

[OTA] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	V total (mL)	V pipetado (mL)	Erro do balão (mL)	Erro da pipeta (mL)	U_1
0.047	10.0	0.02	0.025	0.002	0.1004
0.1175	10.0	0.05	0.025	0.002	0.0411
0.235	10.0	0.1	0.025	0.002	0.0221
0.5875	10.0	0.25	0.025	0.002	0.0124
0.705	10.0	0.3	0.025	0.002	0.0115
0.94	10.0	0.1	0.025	0.002	0.0207
2.82	10.0	0.3	0.025	0.002	0.0086
6.58	10.0	0.7	0.025	0.002	0.0061
14.10	10.0	0.15	0.025	0.006	0.0402
18.80	10.0	0.2	0.025	0.002	0.0109
23.50	10.0	0.25	0.025	0.002	0.0091

D.2. Incerteza associada à recta de calibração, U_2

Tabela 29 – Parâmetros para o cálculo de U_2 .

x	(y-y_{médio})	(y-y_{cal})²	S_{x0}	x₀	U₂
0.047	-155093.5	480805.3	0.1	0.047	2.0959
0.1175	-153541.9	217254.4	0.1	0.1175	0.8370
0.235	-150644.9	158648.6	0.1	0.235	0.4172
0.5875	-141851.9	88156.8	0.1	0.5875	0.1654
0.705	-139632.1	200751.4	0.1	0.705	0.1375
0.94	-132222.3	1065403.4	0.1	0.94	0.1024
2.82	-83932.9	3552258.0	0.1	2.82	0.0328
6.58	9389.3	111130.8	0.1	6.58	0.0137
14.10	190900.4	62450533.2	0.1	14.1	0.0073
18.80	311731.1	32078997.3	0.1	18.8	0.0064
23.50	444898.8	79421965.2	0.1	23.5	0.0062

D.3. Incerteza associada à precisão, U_3

Tabela 30 – Parâmetros para o cálculo de U_3 .

x	CV (%)	x₀	U₃
0.047	14.66	0.047	0.0006
0.1175	8.66	0.1175	0.0004
0.235	4.78	0.235	0.0004
0.5875	1.26	0.5875	0.0005
0.705	2.08	0.705	0.0003
0.94	1.58	0.94	0.0003
2.82	1.68	2.82	7.97×10^{-5}
6.58	2.05	6.58	2.72×10^{-5}
14.10	1.77	14.10	1.68×10^{-5}
18.80	1.39	18.80	1.89×10^{-5}
23.50	1.16	23.50	2.20×10^{-5}

D.4. Incerteza associada à exactidão, U_4

Tabela 31 – Parâmetros para o cálculo de U_4 .

Padrão	Recuperação (%)	Média (%)	Desvio padrão	Desvio relativo	U_4
9.4	69.75	68.38	2.39	0.0349	0.0143
	70.38				
	67.45				
	68.50				
	64.05				
	70.14				
18.8	69.88	68.73	5.55	0.0807	0.0330
	72.07				
	68.16				
	62.99				
	76.95				
	62.36				
28.2	69.94	71.58	3.01	0.0420	0.0172
	73.98				
	67.73				
	73.84				
	74.86				
	69.10				
94.0	70.77	71.30	4.37	0.0613	0.0250
	70.77				
	74.67				
	77.38				
	64.71				
	69.52				

D.5. Incerteza global associada, U

Para o cálculo da incerteza global, utilizou-se o U_4 como sendo o mesmo para todas as concentrações. Optou-se pelo valor mais elevado calculado em D.4. – $U_4 = 0.0330$.

$$U_{\text{total}} = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + U_4^2}$$

Anexo E – Dados relativos à validação do método analítico de determinação de OTA em borras, e respectivo erro global do método de análise

As incertezas U_1 , U_2 e U_3 são as mesmas que as referenciadas no Anexo D.

E.1. Incerteza associada à exactidão, U_4

Tabela 32 – Parâmetros para o cálculo de U_4 .

Padrão	Recuperação (%)	Média (%)	Desvio padrão	Desvio relativo	U_4
9.4	77.36	68.16	4.63	0.0679	0.0277
	67.11				
	65.74				
	67.84				
	66.06				
	64.85				
18.8	72.95	75.15	3.73	0.0496	0.0203
	71.52				
	70.98				
	78.43				
	79.09				
	77.95				
28.2	67.39	70.06	3.63	0.0518	0.0212
	67.32				
	67.26				
	75.45				
	69.18				
	73.76				
94.0	68.62	68.25	1.59	0.0233	0.0095
	67.41				
	67.63				
	68.59				
	70.98				
	66.28				

E.2. Incerteza global associada, U

Para o cálculo da incerteza global, utilizou-se o U_4 como sendo o mesmo para todas as concentrações. Optou-se pelo valor mais elevado calculado em E.1. – $U_4 = 0.0277$.

$$U_{\text{total}} = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + U_4^2}$$

Anexo F – Cálculo das recuperações

F.1. Recuperação na optimização do solvente de extracção de bagaços a 30°C.

Tabela 33 – Dados relativos ao cálculo da recuperação.

Solvente de extracção	Área média do ensaio branco (mV.min)	Área média do ensaio contaminado (mV.min)	Massa OTA no ensaio branco (µg.L ⁻¹)	Massa OTA no ensaio contaminado (µg.L ⁻¹)	Recuperação (%)
Éter dietílico seguido de solução aquosa (5% NaHCO ₃ + 1% PEG)	-	-	-	-	-
5% NaHCO ₃ seguido de acetato de etilo	3403	7598	0.00024	0.00050	0.5
Clorofórmio	246785	282250	0.01531	0.01751	15.1
Acetato de etilo	12110	297025	0.00078	0.01842	18.2
Acetato de etilo + 400 µL de ácido o-fosfórico	-	287814	-	0.01785	17.8

A massa de OTA esperada é 0.102 µg.L⁻¹ mais a massa detectada no ensaio branco.

A recuperação é dada pela razão entre a massa obtida e a massa de OTA esperada após a extracção do bagaço contaminado artificialmente.

Exemplo,

$$\text{Recuperação(\%)} = \frac{0.00078}{0.01842 + 0.102} \times 100 = 18.2\%$$

F.2. Cálculo da recuperação na extracção com colunas de imunoafinidade

Tabela 34 – Dados relativos ao cálculo da recuperação nos ensaios de imunoafinidade.

Ensaio	Volume final (mL)	Área média (mV.min)	[OTA] (µg.L ⁻¹)	Massa OTA (µg)	Massa OTA esperada (µg)	Recuperação (%)
Branco	13	1814.0	0.14	0.000378	-	-
Cont.	15.5	91589.5	5.70	0.017683	0.100378	17.6
Cont.	16.5	90932.5	5.66	0.018689	0.100378	15.8

Sendo, Cont. o ensaio de contaminação, de 5 g de bagaço com 1 mL de uma solução de 100 µg.L⁻¹ em metanol.

$$\text{Massa OTA (}\mu\text{g)} = [\text{OTA}] \times V_{\text{final}} \times \frac{0.001}{5}$$

$$\text{Recuperação(\%)} = \frac{0.018689}{0.000378 + 0.1} \times 100 = 15.8\%$$

Anexo G – Resultados obtidos para a validação de cada método de extração

Tabela 35 – Dados relativos aos ensaios de recuperação em bagaços, com o método de extração 1 e nas condições cromatográficas do método I.

Padrão	Área 1 (mV.min)	Área 2 (mV.min)	Área média (mV.min)	Desvio padrão	CV (%)	[OTA] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Massa (μg)	Massa esperada (μg)	Recuperação (%)
9.4	40181	39785	43186.8	3318.6	7.68	2.71	0.00271	0.01109	24.4
	40542	40882							
	45624	47268							
	47828	43384							
28.2	114916	113175	109263.3	4254.7	3.89	6.80	0.00680	0.02989	22.7
	110541	110617							
	103620	103333							
	111048	106856							
47.0	184804	189647	184224.4	4113.6	2.23	11.44	0.01144	0.04869	23.5
	180685	187922							
	188755	182120							
	180519	179343							
94.0	367708	-	378377.0	8397.7	2.22	23.46	0.02346	0.09569	24.5
	378996	375205							
	379055	390921							

Tabela 36 – Dados relativos aos ensaios de recuperação em bagaços, com o método de extracção 2 e nas condições cromatográficas do método II.

Padrão	Área 1 (mV.min)	Área 2 (mV.min)	Área média (mV.min)	Desvio padrão	CV (%)	[OTA] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Massa (μg)	Massa esperada (μg)	Recuperação (%)
Branco	1279	1438	1358.5	112.4	8.28	0.08	0.00207	-	-
9.4	8052	8087	7440.4	575.9	7.74	0.35	0.00872	0.01250	69.7
	8147	8153				0.35	0.00880	0.01250	70.4
	7292	7122				0.31	0.00787	0.01166	67.5
	7241	7421				0.32	0.00799	0.01166	68.5
	6457	6732				0.29	0.00726	0.01133	64.1
	7583	6998				0.32	0.00795	0.01133	70.1
18.8	14001	14811	13984.5	1259.1	9.00	0.60	0.01500	0.02146	69.9
	14797	14965				0.62	0.01547	0.02146	72.1
	13266	13984				0.57	0.01422	0.02087	68.2
	12715	12360				0.53	0.01315	0.02087	63.0
	15497	16095				0.66	0.01638	0.02128	76.9
	12911	12412				0.53	0.01327	0.02128	62.4
28.2	20789	20485	21136.3	1046.9	4.95	0.85	0.02117	0.03027	69.9
	21758	21987				0.90	0.02240	0.03027	74.0
	19972	19949				0.82	0.02050	0.03027	67.7
	20747	22907				0.89	0.02235	0.03027	73.8
	22884	21396				0.91	0.02266	0.03027	74.9
	20589	20173				0.84	0.02092	0.03027	69.1
94.0	67809	67965	68165.0	4408.0	6.47	2.72	0.06799	0.09607	70.8
	66382	66506				2.66	0.06656	0.09607	70.8
	68096	75254				2.87	0.07174	0.09607	74.7
	73866	74727				2.97	0.07434	0.09607	77.4
	62206	61819				2.49	0.06217	0.09607	64.7
	67569	65781				2.67	0.06679	0.09607	69.5

Tabela 37 – Dados relativos aos ensaios de recuperação em borras.

Padrão	Área 1 (mV.min)	Área 2 (mV.min)	Área média (mV.min)	Desvio padrão	CV (%)	[OTA] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Massa (μg)	Massa esperada (μg)	Recuperação (%)
Branco	4239	4257	4248	12.7	0.30	0.20	0.00049	-	-
9.4	39249	39144	34450.4	2286.7	6.64	1.58	0.00396	0.005114	77.4
	33732	34084.5				1.37	0.00343	0.005114	67.1
	33381	33023				1.34	0.00336	0.005114	65.7
	34384	34189				1.39	0.00347	0.005114	67.8
	33003.5	33730				1.35	0.00338	0.005114	66.1
	32980	32505				1.33	0.00332	0.005114	64.9
18.8	71936	71846	74086.0	3556.5	4.80	2.88	0.00720	0.009864	72.9
	70851	70085				2.82	0.00705	0.009864	71.5
	70135.5	69726				2.80	0.00700	0.009864	71.0
	77742.5	76960				3.09	0.00774	0.009864	78.4
	77596.5	78411				3.12	0.00780	0.009864	79.1
	77212	76530				3.08	0.00769	0.009864	77.9
28.2	102058.5	103012.5	106625.3	5501.0	5.16	4.09	0.01023	0.015183	67.4
	103765	101096				4.09	0.01022	0.015183	67.3
	105207	99461				4.08	0.01021	0.015183	67.3
	115328.5	114435				4.58	0.01145	0.015183	75.4
	104552	105995				4.20	0.01050	0.015183	69.2
	113044	111549				4.48	0.01120	0.015183	73.8
94.0	341377	335185	336464.5	7791.9	2.32	13.44	0.03359	0.04895	68.6
	332222	332388				13.20	0.03300	0.04895	67.4
	330392	336383.5				13.24	0.03310	0.04895	67.6
	337425.5	338810				13.43	0.03357	0.04895	68.6
	351742	348152				13.90	0.03474	0.04895	71.0
	325112.5	328384				12.98	0.03245	0.04895	66.3

Anexo H – Resultados obtidos no rastreio de ocratoxina A em bagaços e borras

Tabela 38 – Dados relativos à ocorrência de OTA em bagaços com o método de extracção 1 e nas condições cromatográficas do método I.

I.D.	Origem da amostra	Área média (mV.min)	Massa OTA (µg)	Massa de bagaço (µg)	Teor de OTA (µg.kg ⁻¹)
1	Caves Raposeira	16689.0	0.00069	5070.5	0.14
2	Quinta de São Domingos	3358.5	0.00016	5063.8	0.03
3	Caves de Sta. Marta	-	-	5118.0	n.d.
4	Caves de Sta. Marta	22399.5	0.00092	5156.6	0.18
5	Adega Cooperativa de Favaíós	5320.0	0.00024	5053.2	0.05
6	Adega Cooperativa de Alijó	6540.0	0.00029	5008.9	0.06
7	Quinta de La Rosa	6682.5	0.00029	5191.1	0.06
8	Adega Cooperativa São João da Pesqueira	3212.0	0.00016	5021.3	0.03
9	Adega Cooperativa de Murça	4489.5	0.00021	5100.2	0.04
10	Quinta do Ventozelo	5902.0	0.00026	5036.2	0.05
11	Quinta das Avelerias	8607.0	0.00037	5073.3	0.07
12	Quinta das Avelerias	7161.0	0.00031	5067.4	0.06
13	Adega Cooperativa de Vila Nova de Foz Côa	7256.0	0.00032	5033.2	0.06

Tabela 39 – Dados relativos à ocorrência de OTA em bagaços com o método de extracção 2 e nas condições cromatográficas do método II.

I.D.	Origem da amostra	Área média (mV.min)	Massa OTA (µg)	Massa de bagaço (µg)	Teor de OTA (µg.kg ⁻¹)
1	Caves Raposeira	-	-	5013.4	n.d.
2	Quinta de São Domingos	-	-	5037.2	n.d.
3	Caves de Sta. Marta	-	-	5077.0	n.d.
4	Caves de Sta. Marta	1358.5	0.00207	5026.3	0.41
5	Adega Cooperativa de Favaíes	-	-	5006.2	n.d.
6	Adega Cooperativa de Alijó	921.0	0.00164	5043.1	0.32
7	Quinta de La Rosa	845.5	0.00156	5038.9	0.31
8	Adega Cooperativa São João da Pesqueira	-	-	5150.5	n.d.
9	Adega Cooperativa de Murça	-	-	5097.5	n.d.
10	Quinta do Ventozelo	-	-	5095.8	n.d.
11	Quinta das Avelerias	-	-	5030.6	n.d.
12	Quinta das Avelerias	-	-	5066.5	n.d.
13	Adega Cooperativa de Vila Nova de Foz Côa	-	-	5018.2	n.d.

Tabela 40 – Dados relativos à ocorrência de OTA em borras.

Designação da Empresa	Área média (mV.min)	Massa OTA (µg)	Massa de bagaço (µg)	Teor de OTA (µg.kg ⁻¹)
Quinta do Côtto	4248	0.00049	501.9	0.98
Caves de Sta. Marta	2622.5	0.00033	541.5	0.61
Adega Cooperativa São João da Pesqueira	14273.5	0.00149	528.5	2.81
Adega Vitivinícola do Peso da Régua	5373.5	0.00060	510.2	1.19
Adega Cooperativa de Freixo de Numão	7364	0.0080	502.5	1.60
Quinta do Sol	3532	0.0042	514.1	0.82
Quinta do Zimbro	2375.5	0.00031	527.8	0.58