



## Contaminante em Vinho: Análise de Ocratoxina A por Cromatografia Líquida de Ultraeficiência e Espectrometria de Massas Sequencial (UPLC®- MS/MS)

Izabela Miranda de Castro<sup>1</sup>  
Alessandra da Silva Teixeira<sup>2</sup>  
Rodrigo Cabral de Freitas<sup>3</sup>  
Ryan de Souza Nascimento<sup>4</sup>  
Maria de Lourdes Mendes de Souza<sup>5</sup>

### Introdução

A ocratoxina A (Figura 1) é um metabólito produzido principalmente por *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius*, sendo este último o maior responsável por sua produção em vinho. A contaminação de ocratoxina A em vinho tem recebido bastante atenção devido à atividade carcinogênica e mutagênica deste metabólito (EL KHOURY; ATOUI, 2010). Pode ser encontrada principalmente em: milho, cevada, feijão, amendoim, arroz, superfície de presunto, pimentões vermelhos, pimenta do reino, uvas e vinho. (SCUSSEL et al., 2008).

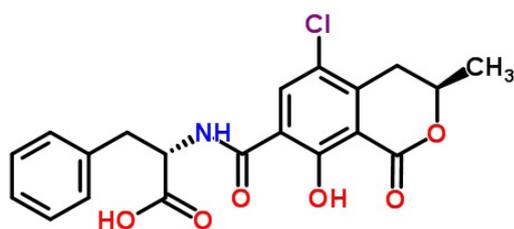


Figura 1. Estrutura química da ocratoxina A

Admite-se que a contaminação dos vinhos com ocratoxina A é feita antes da fermentação, pois se considera que as condições anaeróbicas que se geram nesta fase não favorecem o crescimento de fungos filamentosos. A presença de ocratoxina A em vinhos brancos é menos frequentemente e em menos concentrações que em vinhos roses e nestes, por sua vez, menos frequente que em vinhos tintos. Ao longo do processo de vinificação observa-se a remoção parcial de ocratoxina A. Esta micotoxina é adsorvida por partículas em suspensão no mosto e no vinho, sendo removida por esta via sempre que ocorrem etapas de clarificação e de separação sólido/líquido. (SCUSSEL et al., 2008).

O limite máximo tolerado no Brasil para ocratoxina A em vinho é de 2 µg/kg, estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2011). O objetivo deste trabalho foi caracterizar a incidência de ocratoxina A em vinho de diferentes regiões do mundo.

<sup>1</sup> Química, Ph.D. em Geoquímica Orgânica Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, [izabela.castro@embrapa.br](mailto:izabela.castro@embrapa.br)

<sup>2</sup> Engenheira de Alimentos, M.Sc. em Ciências e Tecnologia de Alimentos, técnica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, [alessandra.teixeira@embrapa.br](mailto:alessandra.teixeira@embrapa.br)

<sup>3</sup> Químico, bolsista CNPq-Brasil, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, [rodrigofreitas85@ig.com.br](mailto:rodrigofreitas85@ig.com.br)

<sup>4</sup> Químico, bolsista CNPq-Brasil, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, [ryan\\_nascimento@hotmail.com](mailto:ryan_nascimento@hotmail.com)

<sup>5</sup> Farmacêutica, D.Sc. em Química de Produtos Naturais, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, [marialourdes.msouza@embrapa.br](mailto:marialourdes.msouza@embrapa.br)

A incidência de ocratoxina A nas amostras de vinho foi verificada usando uma metodologia desenvolvida no laboratório na qual a etapa de extração foi baseada no método AOAC *Official Method 2001.01* (AOAC INTERNATIONAL, 2005). A quantificação foi feita por padronização externa em sistema de Cromatografia Líquida de Ultraeficiência UPLC<sup>®</sup>/MS.

## Material e Método

### Instrumental

#### SISTEMA UPLC<sup>®</sup>-MS/MS

As análises em UPLC<sup>®</sup>-MS/MS foram realizadas em um sistema Waters<sup>®</sup> Acquity UPLC<sup>®</sup> acoplado ao espectrômetro de massas de quadrupolo sequencial Waters<sup>®</sup> Quattro PremierTM XE (Waters, Manchester, UK). Os softwares MassLynx 4.1 e QuanLynx (Waters) foram usados para controlar os instrumentos e o processamento de dados.

O Sistema ACQUITY UPLC<sup>®</sup> foi composto por uma bomba binária, injetor automático e forno para coluna. A separação cromatográfica foi feita em uma coluna Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 (1,7 µm, 2,1 × 100 mm; Waters). A eluição foi realizada utilizando o seguinte gradiente: fase móvel A (água + 0,2% de ácido fórmico) e fase móvel B (acetonitrila + ácido fórmico 0,2%): 0–1 min (10% B); 10 min (50% B) : 10,5 min (85% B); 11 min (10% B), e 12 min (10% B). O fluxo foi de 0,4 mL/min, temperatura de 40°C e o tempo total de corrida de 12 min. O injetor foi programado para injeção total do loop de 10 µL.

#### PARÂMETROS MS/MS

O espectrômetro de massas de quadrupolo sequencial Quattro Premier XE foi operado com fonte de ionização por eletrospray (ESI) em modo positivo. Os parâmetros de operação foram otimizados para as seguintes condições: voltagem do capilar 3,5 kV (modo positivo); temperatura da fonte de ions, 120°C; temperatura de dessolvatação, 450°C; fluxo do gás no cone, 50 L/h; fluxo do gás dessolvatação, 700 L/h (ambos os gases foram nitrogênio); fluxo do gás de colisão, 0,3 mL/min (argônio). No modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) foram aplicados 25 V na voltagem do cone e 22 eV de energia de colisão para ambas as transições:  $m/z$  404,0→239,0 (quantificação) e  $m/z$  406,0→241,0 (confirmação).

### Procedimento analítico

#### PADRÕES E SOLVENTES

O padrão de ocratoxina A utilizado foi adquirido da Sigma. Todos os solventes utilizados, como metanol, acetonitrila, foram grau HPLC fornecidos pela Tedia, enquanto que o ácido fórmico foi da Merck, bicarbonato

de sódio da FMaia e o polietilenoglicol da Vetec. As colunas de imunoafinidade OchraTest<sup>™</sup> foram produzidas pela Vicam.

#### AMOSTRAS

Foram adquiridas 25 amostras de vinho tinto no mercado varejista do Rio de Janeiro. Todas as amostras estavam condicionadas em garrafas de vidro e adequadamente fechadas.

#### EXTRAÇÃO

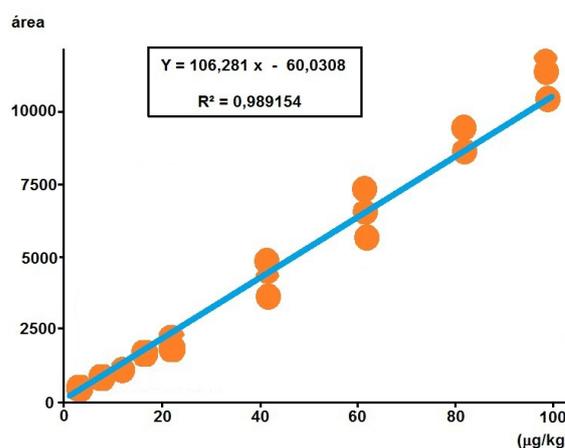
Foram homogeneizados 10 mL da amostra de vinho juntamente com 10 mL de solução polietilenoglicol (1%) e bicarbonato de sódio (5%).

#### PURIFICAÇÃO DE OCRATOXINA A

A solução da amostra diluída foi filtrada a vácuo em fibra de vidro e membrana HFL (MILLIPORE). Em seguida 10 mL da solução foram passados pela coluna de imunoafinidade OchraTest<sup>™</sup> com fluxo de aproximadamente 2-3 mL/min. A seguir as colunas foram lavadas com 5 mL de uma solução com cloreto de sódio (2,5%) e bicarbonato de sódio (0,5%). A ocratoxina A foi eluída com 2 mL de metanol. O eluato foi evaporado sob fluxo de nitrogênio em banho-maria a 40°C e ressuspensão com a 250 µL da fase móvel inicial (ACN:H<sub>2</sub>O: ácido fórmico; 10:90:0,2%). Após agitar em vortex por 30 segundos, toda a solução foi transferida para o vial e 10 µL desta solução foram injetados no sistema UPLC<sup>®</sup>/MS/MS.

#### CURVA ANALÍTICA

A linearidade do método foi verificada para uma determinada faixa de trabalho correspondente ao intervalo de concentrações de ocratoxina A usadas na composição da curva analítica. A curva analítica obtida para a ocratoxina A no sistema UPLC<sup>®</sup>-MS/MS se encontra na Figura 2. Neste estudo, as determinações de ocratoxina A foram feitas por padronização externa e a curva analítica foi realizada com dez pontos em triplicata com a concentração variando de 1,0 a 100,0 µg/L. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido foi  $R^2=0,989$  e a equação da reta foi  $y=106,281x - 60,0308$ .



**Figura 2.** Curva analítica de ocratoxina A obtida no sistema UPLC<sup>®</sup>-MS/MS

O efeito matriz foi investigado através de uma curva de adição da matriz, e não houve diferença no coeficiente angular na curva com a adição do analito. A avaliação da curva mostra que o limite de detecção foi de 0,005 µg/kg e o limite de quantificação foi de 0,015 µg/kg.

## Avaliação do Método de Análise Proposto

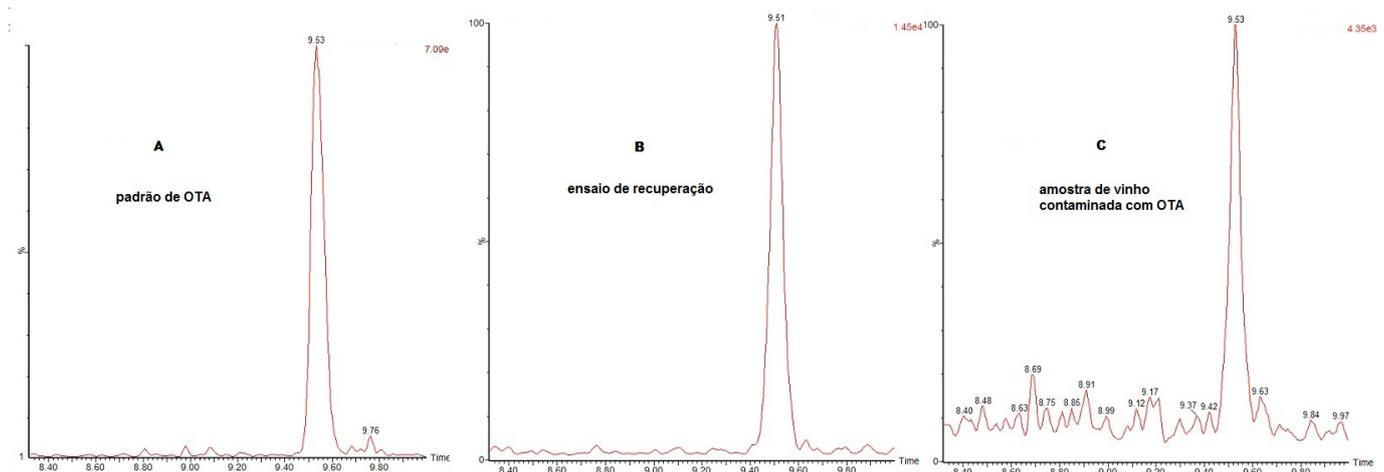
### ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

Para se verificar a adequação do método as normas, foram efetuados ensaios de recuperação de ocratoxina A nesta matriz. A recuperação foi avaliada em amostra de vinho comercial e foram realizadas em triplicata em dois níveis de concentração, 2 µg/L e 5 µg/L. Os resultados dos ensaios de recuperação nas amostras de vinho fortificadas com 2 µg/L e 5 µg/L foram de 109% e 90%, respectivamente. Desse modo, verificou-se que a recuperação encontra-se dentro da faixa

aceitável, de 70 a 120%, recomendada pela DG SANCO (METHOD..., 2012), revelando que o método é eficiente para a recuperação da ocratoxina A em vinho nos limites estabelecidos.

### RESULTADOS DAS ANÁLISES

Dentre as 25 amostras de vinho avaliadas, todas mostraram a presença de ocratoxina A. Neste estudo, foi observado que a concentração média de ocratoxina A foi de 0,115 µg/kg e variaram na faixa de 0,059 - 0,455 µg/kg. De acordo com nova legislação brasileira (BRASIL, 2011), que estabelece o limite máximo permitido de 2 µg/kg para esta toxina em vinho, todas as amostras analisadas estão dentro dos padrões recomendados pela legislação vigente. As respostas obtidas no sistema cromatográfico UPLC®-MS/MS para o padrão, ensaio de recuperação e amostra naturalmente contaminada com ocratoxina A são apresentadas na Figura 3.



**Figura 3.** Cromatogramas obtidos no sistema UPLC®-MS/MS usando as condições descritas no método: (A) do padrão de ocratoxina A (OTA) em solução ACN: H<sub>2</sub>O:ácido fórmico (20:79:1 v/v/v); (B) do ensaio de recuperação do padrão de ocratoxina A em vinho; (C) de uma amostra de vinho naturalmente contaminada com ocratoxina A.

## Considerações Finais

O método desenvolvido e aplicado para análise de ocratoxina A em vinho, estabelecido neste estudo, demonstrou boa recuperação desse analito nessa matriz além de uma execução facilitada e rápida, comprovando ser bastante adequado para monitorar a presença deste contaminante nestas amostras. A purificação dos extratos utilizando colunas de imunoafinidade e posterior análise por UPLC®-MS/MS demonstrou ser bastante conveniente. A utilização deste sistema cromatográfico acoplada ao espectrômetro de massas sequencial (3Q) permitiu a separação dos extratos das amostras e a obtenção

de limites de detecção e de quantificação apropriados para quantificação de ocratoxina A dentro de faixas de concentração bem baixas, utilizando o modo MRM (Multiples Reactions Monitoring). Dentre as 25 amostras de vinho analisadas, a incidência de ocratoxina A foi de 100% e a concentração média observada foi de 0,115 µg/kg que está plenamente dentro dos padrões (LMT) definidos pela legislação (BRASIL, 2011) que é de 2 µg/kg.

## Referências

AOAC INTERNATIONAL. Official method 2001.001: ocratoxin A in wine and beer. In: \_\_\_\_\_. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18th ed. Gaithersburg, MD, 2005. 1 v.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 mar. 2011.

EL KHOURY, A; ATOUI, A. Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 461-493, 2010.

METHOD validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed: document n. SANCO/12495/2011: supersedes document n. SANCO/10684/2009: implemented by 01/01/2012. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol_en.pdf)>. Acesso em: 7 jul. 2012.

SCUSSEL, V. M.; ROCHA, M. U. J. da; LORINI, I.; SABINO, M.; ROSA, C. A. da R.; CARVAJAL, M. M. (Ed.). **Atualidades em micotoxinas e armazenagem qualitativa de grãos II**. Florianópolis: Imprensa Universitária, 2008. 586 p.

### Comunicado Técnico, 201

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Agroindústria de Alimentos**

**Endereço:** Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba  
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ

**Fone:** (21) 3622-9600 / **Fax:** (21) 3622-9713

**Home Page:** [www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos](http://www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos)

**SAC:** [www.embrapa.br/fale-conosco](http://www.embrapa.br/fale-conosco)

**1ª edição**

1ª impressão (2014): tiragem (50 exemplares)

### Comitê de Publicações

**Presidente:** Virgínia Martins da Matta

**Membros:** Ana Iraidy Santa Brígida, André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda Machado de Araujo, Daniela de Grandi Castro Freitas de Sá, Leda Maria Fortes Gottschalk, Luciana Sampaio de Araújo, Renata Torrezan e Rogério Germani

### Expediente

**Supervisão editorial:** Daniela De Grandi C. F. de Sá

**Revisão de texto:** Janine Passos Lima da Silva

**Normalização bibliográfica:** Luciana S. de Araújo

**Editoração eletrônica:** André Luis do N. Gomes e Marcos Moulin