

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESE

**Desenvolvimento e Validação de Metodologia na Detecção
e Quantificação de Ocratoxina A no Café Verde e Torrado
utilizando Cromatografia Líquida acoplada a
Espectrometria de Massas aplicando os Conceitos da
Metrologia Química**

Raquel Duarte da Costa Cunha Bandeira

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA NA
DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OCRATOXINA A NO CAFÉ
VERDE E TORRADO UTILIZANDO A TÉCNICA CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS
APLICANDO OS CONCEITOS DA METROLOGIA QUÍMICA**

RAQUEL DUARTE DA COSTA CUNHA BANDEIRA

Sob a Orientação do Professor
Ronoel Luiz de Oliveira Godoy

e Co-orientação do Pesquisador
Marcus Henrique Campino de la Cruz

Tese submetida como requisito para
obtenção do grau de **Doutor em
Ciências**, no Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos.

Seropédica, RJ
Setembro de 2010

633.73

B214d

T

Bandeira, Raquel Duarte da Costa Cunha,
1976-.

Desenvolvimento e validação de metodologia na detecção e quantificação de Ocratoxina A no café verde e torrado utilizando a técnica cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas aplicando os conceitos da metrologia química / Raquel Duarte da Costa Cunha Bandeira - 2010.

134 f.: il.

Orientador: Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 97-104.

1. Café - Teses. 2. Ocratoxina - Teses. 3. Micotoxinas - Teses. I. Godoy, Ronoel Luiz de Oliveira, 1951-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

RAQUEL DUARTE DA COSTA CUNHA BANDEIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

TESE APROVADA EM 24/09/ 2010.

Ronoel Luiz de Oliveira Godoy. DSc. UFRRJ
(Orientador)

Janaina Marques Rodrigues Caixeiro. DSc. INMETRO
(Membro)

Vanderléa de Souza. DSc. INMETRO
(Membro)

Renata Galhardo Borguini. DSc. EMBRAPA - CTAA
(Membro)

Tatiana Saldanha. DSc. UFRRJ
(Membro)

DEDICATÓRIA

A DEUS;

A minha família, em especial ao meu amigo, cúmplice e esposo Marcelo, por seu amor e por sempre acreditar em mim;

As minhas fontes inspiradoras, amores e razões da minha vida, meu filho João Marcelo e minha sobrinha Júlia.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA);

Ao Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro);

Ao professor e pesquisador, orientador e amigo Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, por ter acreditado em mim, pelos incentivos, ensinamentos e amizade;

Ao pesquisador, orientador e amigo Marcus Henrique Campino de la Cruz, pela paciência, ensinamentos e amizade;

A todos os componentes da banca que aceitaram prontamente o meu convite;

Aos pesquisadores André, Maria Heloisa e Rosana pelo carinho que sempre me acolheram, pela amizade, ensinamentos e por disponibilizarem a utilização da infra-estrutura do Laboratório de Micotoxinas no INCQS na Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ);

Aos colegas de trabalho Valnei Smarçaro Cunha, Vanderléa de Souza, Janaina Marques Caixeiro, Maria Cristina Quaresma, Cristiane Rodrigues Augusto, Claudia Cipriano Ribeiro, Eliane Rego, Thais Matsue Uekane, Carolina Passos da Cunha, Débora Andrade Costa e Luths Raquel de Oliveira Geaquinto, por termos trabalhado juntos, pela amizade e palavras de incentivo, enfim por toda contribuição dada na execução deste trabalho;

As amigas Thais e Carolina pela amizade, força de vontade, carinho e dedicação. Vocês foram de grande importância para concretização deste trabalho. Nenhuma palavra poderia expressar a minha eterna gratidão, muito obrigada por tudo.

Ao colega Daniel por ter cedido amostras de café verde;

A todos os professores, funcionários e colegas do Instituto de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ, que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu crescimento como profissional e pessoal. Em especial, a professora Arlene Gaspar, a secretária Lucimar e ao amigo Sidney, pela amizade e atenção dispensada.

Enfim agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

BANDEIRA, Raquel Duarte da Costa Cunha. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia na Detecção e Quantificação de Ocratoxina A no Café Verde e Torrado Utilizando Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas Aplicando os Conceitos da Metrologia Química.** 134 p. 2010. (Tese, Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

O café constitui uma matriz extremamente complexa e tem importante papel na economia mundial, especialmente nos países produtores e exportadores como o Brasil. No entanto tem sido alvo de barreiras técnicas devido a uma substância denominada ocratoxina A, micotoxina potencialmente nefrotóxica e nefrocarcinogênica encontrada em muitos alimentos inclusive o café. O presente trabalho tem como objetivo implantar os conceitos da metrologia química no desenvolvimento, e validação do método para identificação e quantificação de ocratoxina A no café verde e café torrado estimando a incerteza da medição e utilizando a técnica de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas em série (CLAE-EM/EM) seguindo os critérios da diretiva EC-657/2002 e o documento orientativo do Inmetro (DOC-CGCRE-2010). A metodologia de extração baseou-se em Pittet (1998) e os parâmetros cromatográficos foram: fluxo de 0,3 mL/min, fase móvel 80:20 água ácido trifluoroacético 0,05%: metanol ácido trifluoroacético 0,05 %, volume de injeção de 50 µL, com o modo de injeção *Full loop* e sistema de eluição isocrático. A coluna utilizada foi *Synergi Hydro C₁₈*. As condições do espectrômetro de massas foram otimizadas e a transição selecionada de acordo com suas energias de colisão foram m/z 404 >358 (-10,5 V) e m/z 404 >239 (-20,5 V). A partir da validação os métodos propostos foram considerados seletivos, a avaliação e comprovação do efeito matriz foi realizada através da comparação das variâncias e das médias através do teste F e teste t. O $F_{\text{calculado}}$ para o método café verde (25,2152) e café torrado (104,0353), apresentaram valores maiores que o F_{tabelado} (4,0426). O $t_{\text{calculado}}$ para o café verde (5,0214) e torrado (10,1997) apresentaram valores superiores ao t_{tabelado} (2,0106). Os métodos foram considerados lineares em toda a faixa de trabalho da curva de calibração com os coeficientes de determinação linear (r) de 0,98188 e 0,91754 para matriz café verde e café torrado, respectivamente. O limite de quantificação e detecção para os métodos propostos foram de 1,2 µg/kg e 3,0 µg/kg para café verde e 0,36 µg/kg e 1,0 µg/kg para café torrado. Os valores das recuperações médias, DPR_r e DPR_R variaram na faixa de 90,45 - 108,81 %, 5,39 - 9,94 % e 2,20 - 14,34 % para café verde; e de 89,02 - 108,85 %, de 2,43 - 13,73 % e 12,57 - 17,84 %, para café torrado. Todos os resultados obtidos encontram-se dentro dos limites comumente aceitáveis na literatura. Todos os resultados de medição e as incertezas expandidas (U) para ocratoxina A foram as frações mássicas $W = (11,50 \pm 1,11)$ µg/kg e $W = (4,63 \pm 0,63)$ µg/kg para café verde e café torrado, respectivamente. Os métodos desenvolvidos e validados utilizaram técnica de elevada sensibilidade, permitindo a detecção, confirmação e a quantificação de ocratoxina A no café verde e café torrado com cálculo da incerteza, podendo auxiliar futuramente na superação das barreiras técnicas para exportação do café brasileiro.

Palavras-chave: Café, CLAE-EM/EM, Metrologia Química, Ocratoxina A.

ABSTRACT

BANDEIRA, Raquel Duarte da Costa Cunha. **Development and Validation Approach for Detection and Quantification of Ochratoxin A in Green Coffee and Roasted using Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry applying the concepts of Chemical Metrology.** 2010. 134 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Coffee is an extremely complex food matrix and has an important role in the world's economy, especially in producing and exporting countries like Brazil. However this product may suffer from technical barriers imposed for exportation because of the possible presence of ochratoxin A, which is nephrotoxic and carcinogenic mycotoxin found in many foods including coffee. The aim of this study was to implement chemical metrology concepts in the development and validation of Liquid Chromatography with Mass Spectrometry in tandem (CLAE-EM/EM) method for identification and quantification of ochratoxin A in green and roasted coffee estimating uncertainty of measurement according to directive 2002/657/EC and Inmetro guidelines (DOC-CGCRE-2010). The extraction method was based on Pittet (1998) and chromatographic parameters were: flow rate of 0.3 mL/min, mobile phase 80:20 water trifluoroacetic acid 0.05 %: methanol trifluoroacetic acid 0.05 %, injection volume of 50 μ L, injection mode *Full loop*, isocratic mode. The column was *Synergi Hydro* C₁₈. The mass spectrometry parameters were optimized and transitions selected based on the collision energies monitored were m/z 404 >358 (-10.5 V) and m/z 404 >239 (-20.5 V). From the validation procedure, methods were considered selective. The evaluation and verification of matrix effect was performed by comparing variances and averages using F and t test. Value of $F_{\text{calculated}}$ for green coffee (25.2152) and roasted coffee (104.0353), were higher than F_{table} (4.0426). Value of $t_{\text{calculated}}$ for green (5.0214) and roasted coffee (10.1997) were higher than t_{table} (2.0106). Both methods were considered linear in the working range of calibration curve with linear correlation coefficients (r) of 0.98188 and 0.91754 for green and roasted coffee, respectively. The quantification and detection limits were 1.2 μ g/kg and 3.0 μ g/kg; 0.36 μ g/kg and 1.0 μ g/kg, for green and roasted coffee respectively. The average recoveries, RSD_r and RSD_R were in range of 90.45 – 108.81 %, 5.39 – 9.94 % and 2.20 – 14.34 % for green coffee and 89.02 – 108.85 %, 2.43 – 13.73 % and 12.57 – 17.84 % for roasted coffee. All results obtained were considered within acceptable levels according to literature. Measurement value and expanded uncertainties (U) for ochratoxin A were mass fraction $w = (11.50 \pm 1.11)$ and $w = (4.63 \pm 0.63)$ for green coffee and roasted coffee. Both methods developed and validated using a high sensitivity technique, that allowed detection, confirmation and quantification of ochratoxin A in green and roasted coffee with a estimated uncertainty of measurement, and in the future these methods can be used to help overcome possible technical barriers imposed for exportation of Brazilian coffee.

Key words: Coffee, HPLC-MS/MS, Chemical Metrology, Ochratoxin A.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química média em g/ 100g (base seca) dos grãos cru e torrado de café Arábica e Robusta	4
Tabela 2. Classificação dos diferentes graus de torrefação de acordo com o tempo de permanência e grau de escurecimento do grão no torrador, e números do disco de referências na AGTRON.	6
Tabela 3. Resultados disponíveis na literatura referentes a presença de OTA em café verde, café torrado e na bebida.	9
Tabela 4. Massa de solução padrão de ocratoxina A (g) para elaboração das curvas de calibração na fase móvel (Solução) para café verde e café torrado.	27
Tabela 5. Massa de solução padrão de ocratoxina A (g) para elaboração das curvas de calibração em matriz para café verde e café torrado.	27
Tabela 6. Média das absorvâncias para soluções padrão de OTA e OTB.	53
Tabela 7. Massa específica da mistura tolueno: ácido acético (99:1) para a solução padrão de ocratoxina A.	54
Tabela 8. Massa específica da mistura benzeno: ácido acético (99:1) para solução padrão de ocratoxina B.	54
Tabela 9. Massa específica da fase móvel água ácido trifluoroacético 0,05 %: metanol ácido trifluoroacético 0,05 % (20:80).	54
Tabela 10. Fases móveis utilizadas na análise de ocratoxina A por CLAE-EM.	55
Tabela 11. Intensidades dos sinais do Íon pseudo-molecular da ocratoxina A (m/z 404).	55
Tabela 12. Íons Monitorados no método MSI para OTA e OTB.	58
Tabela 13. Energias de colisão (V) das transições monitoradas no método MSR para OTA e OTB.	60
Tabela 14. Parâmetros de regressão das curvas de calibração em solução e em matriz do café verde e café torrado.	65
Tabela 15. Valores de recuperação, repetitividade (DPR_r) e precisão intermediária (DPR_R) para amostras de café verde utilizando CLAE-EM/EM.	68
Tabela 16. Valores de recuperação, repetitividade (DPR_r) e precisão intermediária (DPR_R) para amostras de café torrado utilizando CLAE-EM/EM.	69
Tabela 17. Massa de café (g), massa de alíquota (g), massa de solvente para extração (g), massa de reconstituído (g), áreas obtidas e média da injeção, para amostra de café verde e café torrado	70
Tabela 18. Fontes e tipos de incerteza definidos para a estimativa do cálculo de incerteza para café verde e café torrado.	71
Tabela 19. Resultados das derivadas da equação do mensurando (OTA) em função das grandezas de entrada para café verde e café torrado.	72
Tabela 20. Áreas, média (\bar{x}), desvio padrão (s), replicatas (n) e u_{AOTA} para café verde e café torrado.	73
Tabela 21. Carga, incerteza expandida (U), fator de abrangência (k) e incerteza imediata (u) obtidas através da balança PT-001 e PT-006.	74
Tabela 22. Resultados das derivadas da equação do mensurando (recuperação) em função das grandezas de entrada para café verde e café torrado.	76
Tabela 23. Concentração, média (\bar{x}), desvio padrão (s), replicatas (n) para café verde e café torrado.	76
Tabela 24. Resultados das incertezas combinadas para o valor experimental (ucV_{exp}) e o valor teórico (ucV_{teo}) para café verde e café torrado.	77

Tabela 25. Matriz, derivadas, incertezas imediata, combinada (u_c) e relativa (u_r) para as grandezas de entrada definidas para determinação de OTA no café verde e no café torrado.	78
Tabela 26. Coeficientes angular (a), linear (b), de correlação entre a e b ($r_{a,b}$), incerteza do coeficiente angular (u_a), incerteza do coeficiente linear (u_b), coeficientes de sensibilidade (C_a e C_b) para café verde e café torrado.	79
Tabela 27. Incerteza da massa atômica, unidade de átomo e número de átomos de cada elemento da fórmula molecular da ocratoxina A.	80
Tabela 28. Massa inicial (m_i), massa adicionada (m_{ad}), concentração inicial (c_i) e concentração final (C_f) para diluição da solução padrão de ocratoxina.	82
Tabela 29. Resultados das derivadas da equação do mensurando (concentração final) em função das grandezas de entrada para café verde e café torrado.	82
Tabela 30. Resultados das incertezas combinadas para massa inicial (u_{cmi}), concentração inicial (u_{cci}) e massa adicionada (u_{cmad}) para o café verde e café torrado.	83
Tabela 31. Resultados das incertezas relativas para massa inicial (u_{rmi}), concentração inicial (u_{rci}) e massa adicionada (u_{rmad}) para o café verde e café torrado.	83
Tabela 32. Incertezas relativas das grandezas de entrada definidas para café verde e café torrado.	84
Tabela 33. Valor de Grau de liberdade efetivo (ν_{eff}) e fator de abrangência (k) para café verde e café torrado, respectivamente.	86
Tabela 34. Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) do teor de umidade para amostra de café verde e café torrado.	87
Tabela 35. Condições cromatográficas do método para determinação de pureza.	88
Tabela 36. Parâmetros de integração CLAE-DAD utilizando as colunas cromatográficas <i>Pursuit</i> C ₈ e C ₁₈ .	88
Tabela 37. Parâmetros de comparação entre a técnica CLAE-FLD e CLAE-EM/EM no café verde e café torrado.	90
Tabela 38. Valores de recuperação e repetitividade (DPR_r) para amostras de café verde utilizando CLAE-FLD.	93
Tabela 39. Valores de recuperação e repetitividade (DPR_r) para amostras de café torrado utilizando CLAE-FLD.	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução do consumo interno do café no Brasil (ABIC, 2010).	3
Figura 2. Kit de classificação de pontos de torra por discos colorimétricos AGTRON/SCAA.	6
Figura 3. Estrutura da ocratoxina A, ocratoxina B e ocratoxina C (Fonte: FUJJI <i>et al.</i> , 2002).	7
Figura 4. Esquema básico de espectrômetro de massas.	13
Figura 5. Diagrama de causa e efeito (Diagrama de <i>Ishikawa</i>) da análise de ocratoxina A no café verde e café torrado.	34
Figura 6. Diagrama de causa e efeito (Diagrama de <i>Ishikawa</i>) referente a concentração da solução padrão de ocratoxina A.	40
Figura 7. Diagrama de causa e efeito (Diagrama de <i>Ishikawa</i>) referente a repetitividade da absorbância da solução padrão de ocratoxina A.	41
Figura 8. Diagrama de causa e efeito (Diagrama de <i>Ishikawa</i>) referente a massa molecular da ocratoxina A.	46
Figura 9. Diagrama de causa e efeito (Diagrama de <i>Ishikawa</i>) referente a diluição da solução padrão de ocratoxina A.	48
Figura 10. Parâmetros otimizados do EM para ocratoxina A e ocratoxina B.	56
Figura 11. Varredura total de ions para ocratoxina A.	57
Figura 12. Varredura total de ions para ocratoxina B.	57
Figura 13. Cromatogramas da solução padrão de OTA (a) e OTB (b) na concentração de 5,0 µg/kg no Método MSI.	58
Figura 14. Curva de quebra da ocratoxina A.	59
Figura 15. Curva de quebra da ocratoxina B.	60
Figura 16. Solução Padrão 5,0 µg/kg (OTA e OTB) no Método MSR com segmento.	61
Figura 17. Extrato de café fortificado com 5,0 µg/kg de OTA e OTB no método MSR com segmento.	62
Figura 18. Extrato de café fortificado com OTA e OTB no método MSR sem segmento.	62
Figura 19. Cromatograma de extrato de café torrado (a) branco e (b) fortificado 3,0 µg/kg (b) no Método MSR.	64
Figura 20. Cromatograma de extrato de café torrado (a) branco e (b) fortificado 3,0 µg/kg (b) no método MSR.	64
Figura 21. Curva de calibração em fase móvel (solução) e matriz na faixa de trabalho de 3,0 a 23,0 µg/kg no café verde.	65
Figura 22. Curva de calibração em fase móvel (solução) e matriz na faixa de trabalho de 3,0 a 7,0 µg/kg no café torrado.	66
Figura 23. Distribuição dos resíduos na faixa de trabalho de 3,0 a 23,0 µg/kg para café verde.	67
Figura 24. Distribuição dos resíduos na faixa de trabalho de 3,0 a 7,0 µg/kg para café torrado.	67
Figura 25. Contribuições de fontes de incerteza para preparo de solução padrão de ocratoxina A.	81
Figura 26. Contribuições de cada fonte de incerteza para o cálculo da incerteza no café verde (13,0 µg/kg).	85
Figura 27. Contribuições de cada fonte de incerteza para o cálculo da incerteza no café torrado (5,0 µg/kg).	85

- Figura 28. Cromatogramas da solução padrão de ocratoxina A nas colunas *Pursuit C₈* (a) 89 e *Pursuit C₁₈* (b) na análise de determinação na pureza cromatográfica.
- Figura 29. Cromatograma de extrato de café verde fortificado com ocratoxina A na 91 concentração de 13,0 µg/kg através da técnica CLAE-FLD.
- Figura 30. Cromatograma de extrato de café torrado fortificado com ocratoxina A na 91 concentração de 5,0 µg/kg através da técnica CLAE-FLD.
- Figura 31. Cromatograma de extrato de café verde fortificado com ocratoxina A na 92 concentração de 13,0 µg/kg através da técnica CLAE-EM/EM.
- Figura 32. Cromatograma de extrato de café torrado fortificado com ocratoxina A na 92 concentração de 5,0 µg/kg através da técnica CLAE-EM/EM.

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SIMBOLOS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
CLAE-UV	Cromatografia Líquida com detector na região de Ultravioleta
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos.
CLAE-FLD	Cromatografia Líquida com Detector de Fluorescência.
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas.
CLAE-EM/EM	Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas em Linha/Série
IEN	Eletronebulização
MSI	Monitoramento Seletivo de Íons
MSR	Monitoramento Seletivo de Reação
OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B
DPR _r	Desvio Padrão Relativo referente a repetitividade
DPR _R	Desvio Padrão Relativo referente a reprodutibilidade
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
CG-DIC	Cromatógrafo Gasoso com Detector de Ionização de Chama
CG-EM	Cromatógrafo Gasoso acoplada à Espectrometria de Massas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1	O Café	2
2.2	Processamento do Café Torrado	4
2.3	Ocratoxina A: a Micotoxina	7
2.4	Metodologias	10
2.5	A Metrologia Química	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Amostras	20
3.2	Solventes e Reagentes	20
3.3	Equipamentos	21
3.4	Soluções	21
3.5	Determinação da Concentração Real da Solução Padrão de Ocratoxina A e Ocratoxina B	23
3.6	Análise Cromatográfica	25
3.7	Validação do Método	28
3.8	Estabilidade	50
3.9	Análise de Amostras de Café Torrado	50
3.10	Teor de Umidade da Matriz de Café Verde e Café Torrado	51
3.11	Pureza da Solução Padrão de Ocratoxina A	51
3.12	Comparação dos resultados obtidos através da técnica CLAE-FLD e CLAE-EM/EM	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	Solução Padrão de Ocratoxina A e Ocratoxina B	53
4.2	Massa Específica para Solução Padrão de Ocratoxina A e Ocratoxina B	53
4.3	Análise Cromatográfica para Determinação de Ocratoxina A no Café Verde e Café Torrado	55
4.4	Validação do Método	63
4.5	Estabilidade	87
4.6	Análise de Amostra de Café Torrado	87
4.7	Teor de Umidade da Matriz Café Verde e Café Torrado	87
4.8	Pureza da Solução Padrão de Ocratoxina A	87
4.9	Comparação dos resultados obtidos através das técnicas CLAE-FLD e CLAE-EM/EM	90
4.10	Publicações	94
5	CONCLUSÕES	95
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	96
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
8	ANEXOS	105

1 INTRODUÇÃO

A Ocratoxina A é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* que vem sendo detectada em diferentes tipos de alimentos: cereais (trigo, aveia, cevada, milho) e produtos de cereais, soja, frutas secas, cacau, chá, cerveja, vinho, frangos e nos diferentes lotes de cafés no Brasil e no mundo.

A exposição humana a micotoxina pelo consumo de alimento fortificado é questão de saúde pública no mundo todo. A ocratoxina A é tóxica para humanos e animais, afetando principalmente os rins e apresentando nefrocarcinogenicidade e nefrotoxicidade. Estima-se que 12 % da ocratoxina A consumida esteja relacionada à ingestão da bebida café.

O café é o segundo produto mais comercializado no mundo depois do petróleo, tendo um papel importante na economia mundial, principalmente para os países produtores e exportadores como o Brasil, que além de maior produtor, é também um grande consumidor desta bebida.

Tendo em vista o risco que representa a ocratoxina A como contaminante do café para a saúde do consumidor, que a produção de alimentos seguros e de alta qualidade tem sido uma exigência crescente principalmente pelas agências de controle e fiscalização, que o café é um produto de significativa importância para a economia brasileira e do mundo, que o número de laboratórios brasileiros que realizam análise de micotoxina no café é ainda insuficiente, que os níveis exigidos pelo comércio externo estão cada vez menores, tem sido cada vez mais relevante gerar metodologias rastreáveis, modernas, práticas, rápidas e eficientes de forma a melhorar a credibilidade dos resultados das medições e a capacidade de medição de laboratórios para a determinação desta micotoxina no café, prevenindo possíveis barreiras técnicas impostas na exportação deste produto.

O presente trabalho teve como objetivo implantar os conceitos da metrologia química no desenvolvimento e validação dos métodos analíticos para detectar e quantificar ocratoxina A em café verde e café torrado, adequando a metodologia de extração existente na literatura e introduzindo a estimativa do cálculo de incerteza de medição.

Os objetivos específicos deste trabalho foram: detectar e quantificar ocratoxina A no café verde e café torrado utilizando a técnica de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM/EM); Validar os métodos propostos para as duas matrizes como previsto na NBR ISO/IEC 17025 (2005) de acordo com a norma da EC. n. 657 (2002) e documento orientativo do Inmetro, DOC-CGCRE-008 (2010); comparar a metodologia consolidada na literatura para determinação de OTA, implantar os conceitos da metrologia química assegurando a confiabilidade e rastreabilidade metrológica e estimar a incerteza de medição.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Café

O café pertence à família *Rubiacea*, gênero *Coffea*, sendo que as principais espécies cultivadas economicamente no mundo e no Brasil são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, conhecidas internacionalmente como o café arábica e o café robusta, respectivamente, já que robusta é a variedade mais cultivada de *C. canephora*. No Brasil, a variedade de *C. canephora* mais cultivada é a Conillon.

O Brasil é o maior exportador mundial de grãos crus de café (verde) que ocupa lugar de significativa importância em sua balança comercial, sendo também o maior produtor de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Café (ABIC, 2010). Em 2008, sua produção alcançou 45 milhões de sacas de 60 kg de café, com participação de 34,28 % na produção mundial. As exportações brasileiras de café torrado e moído estão em franca expansão, tendo atingido um lucro aproximado de US\$ 20,4 milhões no primeiro semestre de 2008. Os principais mercados importadores são: a Alemanha (19,84 %), os Estados Unidos (17,47 %) e a Itália (11,039 %) e os Estados Unidos (63,59 %), a Itália (14,14 %) e a Argentina (8,71%) para café verde e torrado brasileiro. No Brasil, a produção de café arábica se concentra nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia e parte do Espírito Santo, enquanto que o café robusta é plantado principalmente nos estados de Espírito Santo e Rondônia. (ABIC, 2010; CECAFE, 2009)

O consumo interno brasileiro de café continua crescendo. No período compreendido entre novembro/2008 e outubro/2009, a ABIC registrou o consumo de 18,39 milhões de sacas, representando um acréscimo de 4,15 % em relação ao período anterior correspondente (Nov/07 a Out/08), que havia sido de 17,65 milhões de sacas. A Organização Internacional do Café (OIC) aponta o consumo anual por habitante sendo equivalente a 5,81 kg de café em grão cru ou 4,65 kg de café torrado, quase 78 litros para cada brasileiro por ano registrando uma evolução de 3,00 % em relação ao período anterior, consumo este semelhante ao da Alemanha (5,86 kg/hab/ano); superando os índices da França (5,07 kg/hab/ano) e da Itália (5,63 kg/hab/ano), países considerados grandes consumidores de café. No entanto, os campeões de consumo, ainda são os países nórdicos - Finlândia, Noruega, Dinamarca - com um volume próximo dos 13 kg/por habitante/ano.

O café é o segundo produto mais comercializado no mundo depois do petróleo, tendo um papel importante na economia mundial, principalmente para os países produtores e exportadores como o Brasil, que além de maior produtor, é também um grande consumidor desta bebida. A Figura 1 apresenta a evolução do consumo interno de café no Brasil. O consumo de café deve-se basicamente ao efeito fisiológico causado pela presença de cafeína, e principalmente pelo prazer e satisfação que seu aroma e sabor são capazes de proporcionar (CLARKE; MACRAE, 1985).

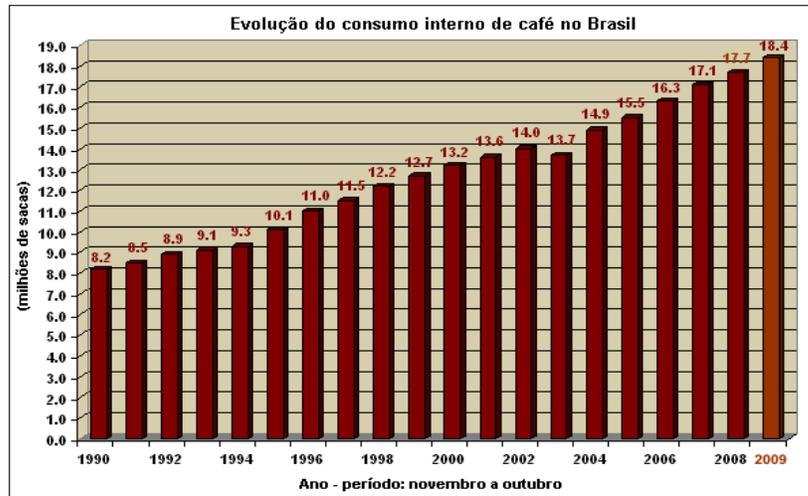


Figura 1. Evolução do consumo interno do café no Brasil (ABIC, 2010).

A espécie *C. arabica* é de grande importância econômica para as Américas e demais regiões que a cultivam. Seu produto é de qualidade superior e de melhor aceitação em todos os mercados consumidores. A espécie *C. arabica* é responsável por aproximadamente 75% da produção mundial exportável de café, sendo a *C. canephora* responsável pelo restante. O café Robusta ou Conillon possui características próprias, ou seja, cor, "corpo", sabor e acidez muito diferentes do café arábica, e atualmente faz concorrência aos cafés de melhor qualidade. Embora de qualidade inferior, o café Robusta vem tendo aceitação no mercado em virtude do seu preço reduzido e emprego na indústria de café solúvel, já que possui maior quantidade de sólidos solúveis e maior teor de cafeína (TOLEDO; BARBOSA, 1998).

A espécie *C. arabica* é originária das regiões montanhosas do sudeste da Etiópia, entre 1000 e 2000 metros de altitude. É uma espécie tetraplóide com 44 cromossomos, autofértil, apresentando de 7 a 15 % de fecundação cruzada, devido a insetos, ventos e outros agentes. A espécie *C. canephora* é diplóide com 22 cromossomos e auto-estéril. Capaz de adaptar-se a variadas condições climáticas, devido à sua ampla distribuição geográfica na África. Apresenta um desenvolvimento inicial mais lento que *C. arabica*, mas pode atingir até 5 metros de altura, nas regiões quentes e úmidas (TOLEDO; BARBOSA, 1998).

O café foi introduzido no Brasil em 1727, no Pará, por Francisco de Mello Palheta e, em poucos anos, espalhou-se por todo o país, tornando-se o principal produto de exportação da pauta brasileira e uma fonte geradora de renda e empregos em toda cadeia produtiva, desde a lavoura passando pela indústria e chegando ao comércio (TOLEDO; BARBOSA, 1998).

O café, desde seu cultivo até o produto final, chega às mesas de pessoas do mundo inteiro, gerando uma quantidade significativa de empregos e divisas para o Brasil. Desta forma, este produto ocupa um lugar de significativa importância em sua balança comercial. No entanto, esta posição de liderança vem sendo gradativamente ameaçada por países que têm investido amplamente em pesquisa e *marketing* visando melhorar a qualidade do seu produto. Pouco a pouco, o café brasileiro vem deixando de ser popularmente conhecido como o melhor café do mundo para dar lugar ao café da Colômbia e de outros países da América Central, África e Oceania. Um conhecimento detalhado da composição química do café e sua relação com a qualidade do café brasileiro tornam-se indispensáveis para a valorização do produto, tanto no mercado interno quanto no mercado externo (FARAH, 2004).

A composição química do café depende da espécie e da variedade em questão, e também de outros fatores como práticas agrícolas, grau de maturação do fruto do café e condições de estocagem.

Os compostos não voláteis do café podem ser divididos em substâncias de alto Massa Molecular, como proteínas, lipídeos e polissacarídeos e de baixo Massa Molecular como a cafeína, a trigonelina, a sacarose e os ácidos clorogênicos (TRUGO; MACRAE, 1989), representando importantes precursores de *flavor* no café cru podendo ter um grande efeito na qualidade do produto final torrado (DE MARIA *et al.*, 1994; MELLO, 1998).

A Tabela 1 apresenta a composição química média em base seca dos grãos crus e torrados de café arábica e robusta. (CLARKE; MACRAE, 2003).

Tabela 1. Composição química média em g/ 100g (base seca) dos grãos cru e torrado de café Arábica e Robusta.

Componentes	Café Arábica		Café Robusta	
	Cru	Torrado	Cru	Torrado
Minerais	4,2	4,5	4,4	4,7
Cafeína	1,2	1,3	2,2	2,4
Trigonelina	1,0	0,7	0,7	0,4
Lipídeos	16,0	17,0	10,0	11,0
Ácidos clorogênicos totais	6,5	2,5	10,0	3,8
Sacarose	8,0	0,0	4,0	0,0
Aminoácidos	0,5	0,0	0,8	0,0
Proteínas	11,0	7,5	11,0	7,5

Fonte: CLARKE; MACRAE, 2003.

Existem diversos alcalóides presentes no café. Estes podem ser divididos em dois grupos, os que quase não sofrem alterações térmicas durante a torra e aqueles que são degradados, gerando os compostos voláteis do café de significativa relevância sensorial, além de outros compostos (CLARKE; MACRAE, 1985). No primeiro grupo está a cafeína e no segundo a trigonelina.

Com relação às espécies e a qualidade da bebida, sabe-se que o café arábica apresenta concentrações mais elevadas de sacarose, lipídeos e trigonelina, sendo considerado de melhor qualidade, enquanto que as variedades de café robusta são tidos como de menor qualidade e com maiores teores de compostos fenólicos e cafeína (CLARKE; MACRAE, 1985).

2.2 Processamento do Café Torrado

A colheita é de suma importância e influi muito no custo da produção e na qualidade do café. Existem três formas de colheita, dentre elas: mecânica, a dedo e derriça. A colheita mecânica corresponde ao uso de maquinários, que balançam mecanicamente os galhos da planta do café a fim de que os frutos caiam e sejam posteriormente recolhidos. Esta técnica não é muito usada no Brasil por exigir áreas planas para a movimentação dos maquinários. A colheita “a dedo” como o próprio nome diz, seleciona os frutos individualmente,

colhendo-os no ponto de maturação desejado, obtendo-se assim um café de qualidade superior, mas de custo elevado. Já a derriça, técnica mais usada no Brasil, devido à grande demanda de produção, é extremamente rápida, sendo realizada com a mão semi-fechada que percorre o ramo da sua base para a ponta arrancando todos os frutos (e folhas) sem haver qualquer seleção. Os frutos são colhidos em diferentes pontos de maturação, densidade e, conseqüentemente, diferentes teores de umidade, que prejudicam os aspectos sensoriais da bebida (TOLEDO; BARBOSA, 1998). O café colombiano, bem como o de outros países da América Central e da África, são colhidos “a dedo”. Por isso, apresentam maior uniformidade do produto, o que gera uma bebida de boa qualidade e diferenciada da brasileira.

Após a colheita, os frutos passam então por algumas etapas de processamento, tais como: limpeza, descascamento, classificação por tamanho e separação dos grãos por densidade e colorimetria, obtendo assim o café cru, que possui um aroma muito diferente do aroma típico da bebida de coloração marrom-escura, pois o café adquire seu aroma e sabor característico após a torrefação. A obtenção do café torrado provém da etapa que corresponde à exposição do grão cru ao ar aquecido em um processo rápido o suficiente para liberar a água livre. Os grãos são aquecidos à temperatura de 200 °C, onde ocorrem acentuadas transformações físicas e químicas, que desenvolvem a cor e os compostos responsáveis pelo sabor e aroma de café. Nesta etapa, a qualidade do café também pode ser afetada, uma vez que a composição dos voláteis e de seus precursores pode ser alterada conforme o grau de torrefação. Dentre as reações envolvidas neste processo estão: condensação entre grupamentos aminados e grupos carboxilas (reação de *Maillard*), caramelização da sacarose e reações degradativas de trigonelina, ácidos clorogênicos, proteínas e polissacarídeos. Embora os mecanismos dessas complexas transformações ainda não estejam completamente elucidados, essas reações são indispensáveis para a formação do aroma e sabor característicos da bebida do café (TRUGO, 1986).

O processo físico da torra foi descrito por Coelho (2000) de forma simplificada. Os grãos de café são torrados e tornam-se amarelados, perdendo grande parte de água já quando expostos a 100 °C. A partir de 120 - 130 °C, a cor do grão passa a ser castanha. Com o continuar do processo de torra, na temperatura de 150 °C, ocorre o desprendimento de um odor de óleo. Quando se atinge a temperatura de 180 °C, os gases de combustão começam a se desenvolver sob a forma de uma fumaça branco-azulada com desprendimento de dióxido (CO₂) e monóxido (CO) de carbono. A cor muda para marrom e o volume dos grãos aumenta. Estes se tornam porosos e quebradiços. De acordo com o grau de torra, ocorre maior ou menor perda de peso dos grãos e aumento do volume. Na torrefação brasileira (escura), ocorre normalmente uma perda de peso de 20 %, sendo que deste total, de 9 - 10 % são decorrentes da perda de água, cerca de 1 % devido à eliminação de cascas e de 10 a 12 % são decorrentes das perdas de substâncias voláteis. Esta etapa é de suma importância, pois dependendo do tempo e da temperatura em que o grão é exposto, o aroma é definido. A maioria das substâncias aumenta em concentração durante a torrefação dos grãos enquanto outras diminuem devido à degradação (CLARKE, 1985).

A padronização dos pontos de torra tanto para fins comerciais quanto para fins científicos é subjetiva, variando de indivíduo para indivíduo. Para auxiliar na padronização da medida colorimétrica, a SCAA (*Specially Cup Association of América*) utiliza um sistema de discos colorimétricos obtido após experimentos científicos sob condições controladas de torrefação (Figura 2), nos quais foi determinada uma progressão linear, baseada na caramelização do açúcar e nos pontos de torra mais comumente encontrados no mercado. Este sistema foi denominado AGTRON/SCAA *Roast Classification Color Disc System* (Sistema de classificação de pontos de torra por discos colorimétricos). A Tabela 2 apresenta os diferentes graus de torrefação, com denominações diferentes encontradas no mercado

nacional e internacional, de acordo com o tempo de permanência do café no torrador (FARAH, 2004).

Tabela 2. Classificação dos diferentes graus de torrefação de acordo com o tempo de permanência e grau de escurecimento do grão no torrador, e números do disco de referências na AGTRON.

Classificação da torra	Nome correspondente no mercado nacional	Nome correspondente ao mercado internacional	No. referência na escala Agtron/SCAA
Muito Clara	-----	-----	95
Clara	-----	Cinamon	85
Moderadamente clara	Americana	American	75
Média-clara ou moderadamente clara	Convencional-menos	<i>City</i>	65
Média	Convencional ou torrado e moído Convencional-menos	<i>Full city</i>	55
Média escura ou moderadamente escura	Convencional-mais	<i>Vienna</i>	45
Escura- Coloração marrom escuro, começando a soltar óleo.	Extra Forte	<i>French or Italian</i>	35
Muito escura, grãos quase pretos e bem oleosos	Extra forte/queimado	<i>Spanish</i>	25

Fonte: Adaptado de Farah (2004).



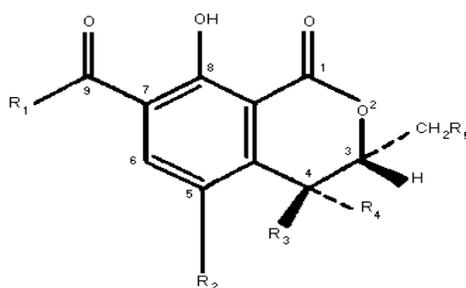
Figura 2. Kit de classificação de pontos de torra por discos colorimétricos AGTRON/SCAA

Após a torrefação e moagem dos grãos, o produto é comercialmente chamado no Brasil de café torrado e moído.

2.3 Ocratoxina A: a Micotoxina

As micotoxinas são toxinas produzidas pelo metabolismo secundário de fungos que ocorrem nos alimentos e rações, produzidas sob condições ambientais específicas, no campo, no período pós-colheita, durante o armazenamento, processamento e distribuição. Estima-se que 25 % da produção mundial de alimentos e 20 % da produção europeia podem estar fortificados com micotoxinas, gerando perdas na produção agrária, custos veterinários, de saúde e regulatórios (ALMEIDA *et al.*, 2007; CUNHA, 2005).

Entre as ocratoxinas e análogos que compõem o grupo, já foram relatadas a ocorrência de Ocratoxina A, Ocratoxina B e Ocratoxina C apresentadas na Figura 3. A substituição de um átomo de hidrogênio por cloro converte a OTB em OTA. A OTA destaca-se pela maior toxicidade e ocorrência natural em produtos de origem vegetal e animal. (ALMEIDA *et al.*, 2007; BULLERMAN, 2003; FUJJI *et al.*, 2002; FURLANI; SOARES, 1998; FUJJI, *et al.*, 2007)



	R1	R2	R3	R4	R5	Ocratoxinas
Fenilalanina		Cl	H	H	H	Ocratoxina A
Fenilalanina		H	H	H	H	Ocratoxina B
Fenilalanina éster etílico		Cl	H	H	H	Ocratoxina C

Figura 3. Estrutura da ocratoxina A, ocratoxina B e ocratoxina C (Fonte: FUJJI *et al.*, 2002).

A fórmula molecular da OTA é $C_{20}H_{18}ClNO_6$, contendo grupos cromofóricos que lhe conferem propriedade fluorescente sob luz UV a 335 nm. O grupo da isocumarina lhe confere o caráter tóxico (FUJJI *et al.*, 2002, BULLERMAN, 2003).

A OTA é um metabólito secundário produzido por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. As principais espécies de fungos *Aspergillus* produtores de OTA no café são *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* e, mais recentemente identificado, *A. westerdijkiae*, que anteriormente era identificado como *A. ochraceus* (GILBERT; ANKLAM, 2002; MORELLO *et al.*, 2007). Dentre as espécies do gênero *Penicillium*, as produtoras de OTA são *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. olsonii* e *P. oxalicum*, sendo a principal *P. verrucosum*. (VEGA *et al.*, 2006; GOLLUCKE *et al.*, 2004). A OTA é uma micotoxina nefrotóxica e nefrocarcinogênica potente que tem sido encontrada em muitos alimentos como cereais (trigo, aveia, cevada, milho) e produtos de cereais, vinho, suco de uva, cerveja, frutas secas (passas), soja, cacau, chá, temperos, produtos de origem animal e café verde, torrado e instantâneo (ZOLLNER; MAYER-HELM, 2006; MONACI; PALMISANO, 2004; RODRIGUA-AMAYA; SABINO, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2007; FUJJI *et al.*, 2007; SFORZA; DALL'ASTA; MARCELLI, 2006; MASOUD; KALTOFT, 2006; GOLLUCKE; TANIWAKI; TAVARES, 2004; TANIWAKI *et al.*, 2003; BULLERMAN, 2003; MANTLE, 2002; FUJJI; ONO; HIRROKA, 2002; BUCHELLI; TANIWAKI, 2002;

PRADO *et al.*, 2000; BRESH *et al.*, 2000; FURLANI; SOARES, 1998; BECKER *et al.*, 1998; PATEL *et al.*, 1997; STUDER ROHR *et al.*, 1995; POHLAND *et al.*, 1992).

2.3.1 Toxicidade e limites estabelecidos

Os efeitos tóxicos das micotoxinas vão desde afecções renais e do fígado a toxicidade aguda podendo chegar a morte. Podem causar redução da produção de leite e ovos, supressão da função imune, resistência reduzida à infecções, câncer e outras doenças crônicas, além de mutagenicidade e teratogenicidade (BAYMAN; BAKER, 2006).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) afirma que os dados obtidos a partir de animais de laboratório não são suficientes para calcular o grau de carcinogenicidade da OTA em humanos e por esta razão a toxina foi classificada como um possível carcinógeno para humanos (grupo 2B). Baseando-se em estudos promovidos pelo *Nordic Council of Ministers*, o *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), calculou-se o nível tolerável provisório de ingestão diária para OTA como 14µg por kg de peso corpóreo por dia. Este composto é nefrotóxico, teratogênico, imunotóxico e carcinogênico de acordo com classificação da IARC.

Os limites máximos para ocratoxina A são regulamentados em diversos países, mas não no Brasil. Em 2004, alguns países como a República Tcheca, Finlândia, Grécia, Hungria, Itália, Suíça, Portugal e Espanha estabeleceram limites para OTA no café verde e este limite varia de 5,0 a 20,0 µg/kg. Os principais mercados para o café verde brasileiro, o Estados Unidos e a Alemanha ainda não estabeleceram limites oficiais para a presença desta micotoxina neste produto. A União Européia (UE) recomenda níveis máximos de tolerância de 5,0 µg/kg para OTA no café torrado e moído e 10,0 µg/kg no café solúvel destinado a comercialização. Por não ter limites de tolerância de OTA no café, o Brasil segue os limites preconizados pela UE se adequando as exigências de mercado (CODEX, 2007; FAO, 2009; EC, 2005).

2.3.2 Ocorrência

A presença de um contaminante como a OTA no café tem importância tanto para a saúde pública quanto para a exportação. Para uma melhor compreensão desta toxina, têm-se estudado aspectos como toxidez, incidência, análise química, legislação e efeitos de processamento (FURLANI, 1998).

O primeiro relato de contaminação de café por OTA, foi descrito por LEVI *et al.* (1974), em níveis de 0,2 e 360 µg/kg em amostras naturalmente contaminadas (MANTLE, 2002). Pesquisas em todo o mundo confirmaram a presença da OTA em café verde, torrado e solúvel em níveis variando de 20 a 360 µg/kg em café verde e 3,2 a 17 µg/kg em café torrado. Esta diferença de teores entre o café verde e torrado pode ser explicado pela redução de OTA durante o processo de torrefação relatado em alguns estudos que pode chegar a 90 % (MASOUD; KALTOFT, 2006). A maior frequência da contaminação por OTA tem sido observada em algumas áreas com climas semi-tropicais e temperados, entretanto nenhum país produtor está totalmente livre de contaminação, incluindo o Brasil (ALMEIDA *et al.*, 2007; CODEX, 2007; FURLANI, 1998).

A ocorrência de OTA em café verde tem sido muito relatada. Pouco se sabe com relação às condições de contaminação e as espécies de fungos responsáveis pela sua produção ou propagação. Os fatores ambientais, as características químicas inerentes a matriz, as condições inadequadas de armazenamento de grãos, a secagem e as condições de torrefação podem contribuir para o aparecimento, propagação e controle da OTA apresentando grande preocupação em relação aos produtos de café (FAO, 1999; LEONI *et al.*, 2001).

A Tabela 3 apresenta alguns estudos disponíveis na literatura referente a presença de OTA no café (verde, solúvel e torrado). Através destes dados é possível observar a necessidade de investimento de pesquisas para minimizar a contaminação desta matriz, que tem sido alvo de barreiras técnicas, principalmente no Brasil, produtor, consumidor e exportador de café. Desta forma, podemos verificar que o consumo regular de café pode contribuir para a exposição humana a OTA.

Tabela 3. Resultados disponíveis na literatura referentes a presença de OTA em café verde, café torrado e na bebida.

Ano	País	Matriz	Contaminação	Amostras analisadas/ Contaminadas	Referência Bibliográfica
1989	Itália	Café torrado	0,2-15 µg/kg	58% contaminadas	MICO <i>et al.</i> , (MORELLO <i>et al.</i> , 2007)
1995	----	Café verde	< 5,0 µg/kg	25/13	STUDER-ROHR <i>et al.</i> , 1995
		Bebida	0,4 a 7,8 µg /kg	40/18	
1998	Brasil (MG)	Café torrado	0,98-5,87 µg/kg	47/41	PRADO <i>et al.</i> , (FAO, 1999)
1999	Brasil	Café verde	7,1 µg/kg	132/27	BRASIL, 2000
2000	Brasil	Café	> 5,0 µg/kg	135/9	TANIWAKI, 2003
2004	Brasil (SP)	Café solúvel	0,17 –6,29 µg/kg	82/81	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2007

Na torrefação do café existe uma inconsistência de dados na literatura com relação à estabilidade de OTA. Foi verificada a destruição da toxina pela torrefação de grãos de café fortificados e observadas perdas de 49,0 a 87,0 % e de 90,0 a 100,0 % em amostras artificial e naturalmente contaminadas, respectivamente. Foi descrito que a bebida preparada com grãos fortificados apresentava resíduos de OTA (MICCO *et al.*, 1989). Outros autores analisaram todas as etapas de processamento, desde a recepção do café verde até o produto final, objetivando verificar o comportamento da OTA no processo industrial de fabricação de café solúvel. Foi constatado que a contaminação em um lote de café verde por OTA é muito heterogênea, como acontece com outras micotoxinas em outros tipos de grãos. Observou-se também que houve pequena redução da toxina durante a limpeza do café verde (retirada de materiais estranhos) e que a maior parte da OTA foi eliminada durante a torrefação (84%). Além disso, foi observado que 80 % do residual de OTA no café torrado é transferido para a água fervente da extração e que na fase de evaporação do extrato para a manufatura do café solúvel há uma perda insignificante da toxina (BLANC *et al.*, 1998). Em outro estudo, foram analisadas 18 amostras de café arábica, artificialmente contaminadas

com OTA e submetidas a diferentes binômios de tempo e temperatura. O nível de destruição foi distinto para cada binômio tempo/temperatura: a 200 °C esteve entre 22 e 48 %; a 210 °C entre 39 e 65 % e a 220 °C entre 89 e 94 %. Os resultados mostraram que a torrefação foi um procedimento efetivo na destruição de OTA somente na temperatura em torno de 220 °C e o tempo acima de 10 minutos. No entanto, este binômio pode comprometer as características sensoriais do café.

2.3.3 Teor de umidade

O alto teor de umidade é um fator que influencia na qualidade do café, pois facilita a atividade de microorganismos e enzimas, afetando a preservação do produto e alterando suas características, como aroma e sabor (MORGANO *et al.*, 2008). De acordo com a portaria nº 377, de 26 de abril de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o limite máximo permitido do teor de umidade é de 10,0-13,0 % e 5,0 % para café verde e torrado, respectivamente (ANVISA, 2009; CLARKE, 1985).

Existem diversos métodos diretos para a determinação do teor de umidade em alimentos, são eles os métodos físicos, por exemplo, os que determinam a quantidade de água pela perda de massa, como é o caso dos métodos de perda por dessecação do Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO *et al.*, 2008) mais comumente chamado na literatura de método de secagem em estufa, e o de secagem em estufa à vácuo da AOAC (MARTIN, 2005) ou métodos químicos, que se baseiam em reação específica da água, como exemplo, a titulação Karl Fischer (BRUTTEL, 2009). Estes métodos também podem ser utilizados de forma combinada (ISENGARD, 2001; MORGANO *et al.*, 2008), como é o caso da titulação Karl Fischer Coulométrica combinado à secagem em forno.

Para análises de teor de umidade em alimentos em geral, os métodos de secagem em estufa ainda são os mais utilizados por se tratarem de métodos que utilizam material comumente encontrado em laboratórios de análises químicas (FARBER, 1999; ISENGARD, 2001; MORGANO *et al.*, 2008).

2.4 Metodologias

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para determinação de ocratoxina A em diferentes alimentos. Para a matriz café, utilizam-se técnicas como Ensaio Imunoenzimáticos (ELISA), Cromatografia em Camada Delgada, Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massas e de Cromatografia Líquida com Detector de Fluorescência.

Fujji *et al.* (2002), elaborou uma revisão sobre ocratoxina A em café na qual descreveu diversas metodologias analíticas para detecção dessa micotoxina. Dentre elas podemos destacar as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e diferentes modalidades de ensaio imunoenzimático com ênfase em cromatografia de imunoafinidade. Para a extração da OTA comumente são utilizados solventes orgânicos puros ou combinados com soluções de bicarbonato de sódio ou outros sais nos quais a extração ocorre através de uma mistura de metanol e solução de bicarbonato de sódio. O extrato diluído com tampão fosfato é aplicado em coluna de imunoafinidade e em seguida a coluna é lavada com água finalizando com a eluição da OTA com metanol. O eluato é injetado em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção por fluorescência e utilização de coluna analítica de fase reversa C₁₈. Estudos recentes têm otimizado técnicas de *clean up* por extração em fase sólida para análise de ocratoxina no café torrado por CLAE, reduzindo a presença de

possíveis interferentes e melhorando a resolução dos picos obtidos de OTA (SIBANDA *et al.*, 2002).

Para extração da amostra de café torrado é utilizada a extração líquido-líquido com água, solventes orgânicos, mistura de sais e ácidos, seguida de *clean up* com cartuchos recheados por fase sólida (EFS), no qual são utilizados principalmente as colunas de imunoafinidade. Devido à complexidade da matriz café, faz-se necessário um *clean up* adequado do extrato a fim de remover as substâncias interferentes como os lipídeos, que podem prejudicar a extração da substância de interesse (SFORZA *et al.*, 2006; ABIC, 2010, FUJJI *et al.*, 2007; EC, 2005; VARGAS *et al.*, 2005).

A CLAE foi introduzida por Cantafora *et al.* (1983) para separar e quantificar OTA no café verde, utilizando uma extração com bicarbonato de sódio e metanol, seguida de etapa desengordurante, partição e passagem por coluna de celite, tendo sido empregada a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, cujo limite de detecção foi de aproximadamente 0,2 µg /kg (TANIWAKI *et al.*, 2003).

Terada *et al.* (1986) descreveram um método para análise de café verde, torrado, instantâneo em pó e café coado, utilizando extração com bicarbonato de sódio e metanol, seguida de partição e eluição por coluna de fase reversa (octadecilsilano) e CLAE com detecção de fluorescência, cujo limite de detecção foi de aproximadamente de 2 µg /kg para grãos de café, 5 µg/kg para café instantâneo e 0,2 µg/kg para café coado (BULLERMAN, 2003; TANIWAKI *et al.*, 2003).

Estudos realizados utilizando a CLAE demonstraram que esta técnica é sensível, apresentando alto poder de separação e cuja eficiência depende da etapa de pré-limpeza e do tipo de detector utilizado. Apesar desta técnica quando acoplada ao detector de fluorescência ser sensível, esta pode apresentar problemas analíticos como a coeluição dos analitos com interferentes e também deslocamento do tempo de retenção, que pode gerar resultados errôneos. Entretanto, estes problemas podem ser solucionados com ajuste cromatográfico adequado (TANIWAKI *et al.*, 2003).

Atualmente a metodologia oficial da *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC) para o café verde e torrado é a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Esta técnica é a mais utilizada, devido à fluorescência natural da ocratoxina A (VARGAS *et al.*, 2005; VEGA *et al.*, 2006).

O método utilizado para análise de OTA em café verde pelo Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (BRASIL, MAPA., 2000), baseia-se na extração com solventes orgânicos, purificação da toxina com coluna de imunoafinidade e a detecção e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. No entanto, a crescente demanda para a detecção e a quantificação da OTA em alimentos, em especial no café, devido às barreiras técnicas nos quais este produto vem sendo submetido, requer a utilização de técnicas analíticas cada vez mais sensíveis e seletivas a fim de evitar um resultado falso-positivo durante as análises. Desta forma, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas é a técnica que combina a alta capacidade de separação com elevada seletividade e sensibilidade.

2.4.1 CLAE

A cromatografia é caracterizada por ser uma técnica de separação utilizando uma fase estacionária e uma fase móvel, que dependendo da natureza de cada uma dessas podem ser classificadas diferentemente.

Dentre as mais variadas modalidades de cromatografia, é necessário escolher a que melhor atende às necessidades do método analítico pretendido. Nesse trabalho, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a que melhor preenche os requisitos

para a análise de ocratoxina, apresentando os resultados mais satisfatórios, devido às características físico-químicas dessas substâncias (INDEX MERCK, 1996).

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de umas das técnicas analíticas de melhor desempenho (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Existem muitos tipos de detectores disponíveis, tais como, detector por absorvância na região do visível, por fluorescência, por índice de refração, eletroquímico e por espectrometria de massas (EM). A utilização deste último caracteriza o sistema CLAE-EM, no qual sua complexidade e peculiaridade serão mencionadas adiante.

2.4.2 CLAE-DAD

A CLAE-DAD é uma técnica analítica importante para análises qualitativas e quantitativas. Na indústria farmacêutica tem sido muito empregada na determinação de pureza, usando também a detecção por espectrometria de massas. O principal objetivo da análise de pureza por cromatografia é separar todas as possíveis impurezas do componente principal e, se possível, identificá-las (WIBERG *et al.*, 2004).

Nenhum sistema de detecção, normalmente associado a cromatografia líquida, tem se demonstrado apropriado para a determinação de pureza, por não possuir fator de resposta equivalente para todos os materiais orgânicos, com sensibilidade adequada. No caso específico da CLAE-DAD, outra questão é que nem todos os compostos orgânicos absorvem na região visível no ultravioleta. Além disso, a intensidade de resposta é muito sensível a pequenas variações na estrutura das moléculas, o que dificulta a quantificação das impurezas, a menos que se conheçam todas elas e seus respectivos fatores de resposta (NIST, 2004).

2.4.3 CLAE-EM

O acoplamento de um cromatógrafo líquido com o detector espectrômetro de massas (CLAE-EM) combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural e aumento da seletividade). A espectrometria de massas utiliza o movimento de íons em campos elétricos, magnéticos ou de frequência para classificá-los de acordo com sua razão massa / carga (m/z) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; NIESSEN; TINKEN, 1995).

A EM oferece informação qualitativa e quantitativa sobre a composição molecular de materiais orgânicos, permite caracterizar inequivocamente uma determinada substância, sendo capaz de detectar fragmentos do analito e uma vez conhecendo-se as partes, pode-se chegar à molécula como um todo através do estudo da fragmentação específica da substância, levando a elucidação estrutural da mesma, minimizando o risco de falso positivo (NIESSEN; TINKEN, 1995; DE GRANDE; AQUINO NETO, 1990).

A técnica de espectrometria de massas consiste basicamente de 5 etapas: introdução de amostra, fonte de íons, analisador de massas, detector e processamento de dados. A amostra é introduzida no sistema diretamente, através de bomba infusora ou indiretamente após ter passado por um sistema de separação, como cromatógrafo gasoso ou líquido. A ionização ocorre na fonte de íons e dentre elas as mais comumente utilizadas são Impacto de Elétrons (IE) e Ionização Química (IQ), para Cromatografia Gasosa; e Ionização por Eletronebulização (IEN) e Ionização Química a Pressão Atmosférica (IQPA) para

Cromatografia Líquida. A técnica IQPA para análise de ocratoxina A demonstrou menor sensibilidade, quando comparada com a técnica de IEN (BECKER *et al.*, 1998).

Os íons resultantes são selecionados e analisados nos analisadores de massa, que atualmente podem ser o duplo foco, tempo de voo, captura de íons e quadrupolo (Q). Este último é o mais utilizado pelo seu alto poder de aplicação. A resposta obtida por cada íon ocorre através da multiplicação do sinal dos elétrons no detector (DE GRANDE; AQUINO NETO, 1990).

A Figura 4 apresenta o resumo esquemático de um espectrômetro de massas (EM).

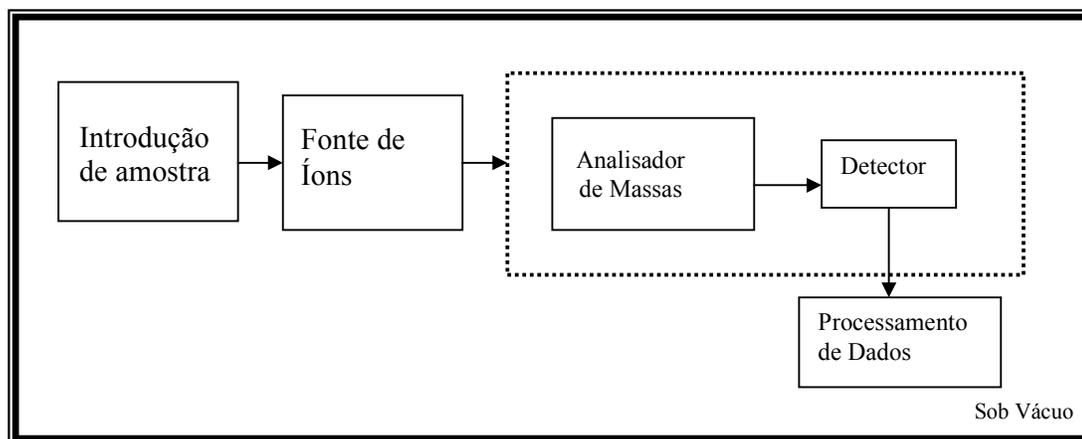


Figura 4. Esquema básico de espectrômetro de massas.

Há disponíveis comercialmente vários tipos de espectrômetros de massas e, dependendo da natureza do que se deseja analisar, pode-se escolher o mais adequado. Os espectrômetros de massas podem ser acoplados (EM-EM, espectrometria de massas em linha), gerando sistemas ainda mais sensíveis, como, por exemplo, o CLAE-EM/EM.

2.4.4 CLAE-EM/EM

A CLAE-EM/EM é um sistema no qual há dois estágios de separação de massas. No caso do analisador triplo quadrupolo, existem três quadrupolos colocados em seqüência, onde o primeiro (Q1) é um analisador no qual seleciona um ou mais íons de interesse (precursores), o segundo (Q2) é uma câmara de colisão em que ocorre a fragmentação (nova formação de íons) e o terceiro (Q3) também é um analisador de íons, onde ocorre a seleção de íons (íons produtos). Neste sistema, a amostra é introduzida na fonte iônica ou sonda (*probe*) e os íons resultantes são selecionados no primeiro analisador de massas (Q1). Os íons correspondentes à massa especificamente selecionada (íons precursores) são então fragmentados através da colisão com gás inerte (Q2), resultando em íons produtos, os quais são detectados separadamente (Q3). Os dois estágios de separação de massas (EM-EM) resultam em uma maior seletividade, sensibilidade e precisão da análise do que se poderia obter com apenas um estágio. A sensibilidade é maior porque se obtém maior razão sinal/ruído, já que o primeiro estágio de separação de massas filtra o ruído químico (sinal medido no espectro de massas devido à geração de íons de outros componentes da amostra ou do sistema de separação) (DE GRANDE; AQUINO NETO, 1990).

O acoplamento da técnica de Cromatografia Líquida a dois ou mais analisadores de massas em série (CLAE-EM/EM) é considerada uma das técnicas de maior impacto e aplicação das últimas décadas para análise de misturas complexas, uma vez que combina

alta resolução na separação cromatográfica com sensibilidade e especificidade (BECKER *et al.*, 1998; DE GRANDE; AQUINO NETO, 1990; ZOLLNER; MAYER-HELM, 2006).

Existem diversas formas de se trabalhar com o detector EM/EM, como, por exemplo, utilizando varredura total de íons (*Full Scan*), monitoramento seletivo de íons (MSI) e monitoramento seletivo de reação (MSR). A maior seletividade está relacionada com o modo MSR, que permite o monitoramento de transições específicas para cada estrutura molecular servindo para identificação inequívoca da substância de interesse.

O tipo de ionização por eletronebulização (IEN) é um método de ionização leve, obtendo pouca fragmentação e íon pseudo-molecular intacto, podendo ser aplicado a compostos polares. A ocratoxina A é uma molécula termicamente instável, de polaridade média e de fácil ionização. Desta forma, o modo de ionização IEN foi utilizado para obtenção de resultados que concordem com a detecção de CLAE-FLD em matrizes complexas, método já estabelecido na literatura para determinação de ocratoxina A.

Análises quantitativas por CLAE-EM oferecem grande sensibilidade em uma variedade de alimentos, como por exemplo, vinho, uva, farinhas, cervejas, temperos e outros. A alta sensibilidade apresentada por esse tipo de detector se faz necessária principalmente em se tratando de matrizes complexas como o café, produto alvo de barreiras técnicas cada vez mais exigentes. Esta técnica também proporciona a superação do problema relacionado à coeluição de possíveis picos interferentes encontrados com o uso de outros detectores como o de fluorescência, ocorrendo determinação inequívoca com elucidação estrutural do mensurando alvo, descartando os falsos positivos como já mencionado anteriormente (ALMEIDA *et al.*, 2007; BECKER *et al.*, 1998).

Desta forma, métodos analíticos para determinação de micotoxinas devem ser validados para serem utilizados no monitoramento e estudos de avaliação de riscos. No entanto, para OTA no café verde e torrado são inexistentes métodos validados utilizando a técnica CLAE-EM/EM. Além disto, há pouca informação na literatura atrelada a validação do métodos utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Fluorescência. Desta forma, há necessidade da obtenção de métodos validados para determinação de ocratoxina A no café (BATISTA *et al.*, 2001).

2.5 A Metrologia Química

A metrologia química é um tema complexo, abrangente, estratégico e imprescindível em diversas áreas, tais como farmacêutica, petroquímica e na área de alimentos, pois além das implicações econômicas naturais, um erro analítico pode gerar problemas graves e muitas vezes irremediáveis. Como exemplo, a quantificação equivocada de substâncias tóxicas em um alimento, pode levar ao comprometimento da eficácia no controle de barreiras técnicas, favorecendo a disseminação de alimentos que não sejam seguros ao consumidor (FROTA, 1998).

Etimologicamente, a palavra Metrologia vem do grego metro (medida) e logos (tratado), e é definida como a ciência da medição e suas aplicações, abrangendo todos os aspectos teóricos e práticos relativos às medições, qualquer que seja a incerteza, em quaisquer campos da ciência e da tecnologia e tem como foco principal prover confiabilidade, credibilidade e uniformidade aos resultados das medições (INMETRO, VIM, 2008). Como as medições estão presentes, direta ou indiretamente, em praticamente todos os processos de tomada de decisão, a abrangência da metrologia é imensa, envolvendo a indústria, o comércio, a saúde e o meio ambiente, entre outras.

A relevância da metrologia na confiabilidade e exatidão dos resultados gerados é incontestável para as medições em química, física ou físico-química e devem ser rastreáveis ao Sistema Internacional de Unidades (SI). Este sistema ainda é pouco utilizado no dia-a-dia dos laboratórios. Os laboratórios normalmente expressam os resultados das análises químicas em unidades de concentração como ppm, g/L, % e etc., o que dificulta muitas vezes a rastreabilidade direta ao mol (FROTA, 1999).

Os padrões nacionais e internacionais são mantidos em Institutos Nacionais de Metrologia (INM), que estão no topo da hierarquia metrológica em um determinado país e são os responsáveis por disseminar as unidades de medida aos usuários, sejam estas instituições de pesquisa, órgãos governamentais, laboratórios ou indústrias. Se o INM tiver condições de realizar ou reproduzir a unidade SI para uma determinada grandeza, o padrão nacional será idêntico ao padrão primário que realiza a unidade. Se o INM não tiver essa condição, ele precisa garantir que as suas medições sejam rastreáveis ao padrão primário, calibrando seus padrões de referência em um INM de outro país, que mantenha o padrão primário dessa grandeza (DIAS, 1998).

A rastreabilidade significa que há uma cadeia contínua de comparações e/ou calibrações ligando os resultados de medição a padrões nacionais ou internacionais conhecendo a incerteza de medição que deva ser avaliada devendo ser estabelecida a um ponto comum de referência claramente identificado, o qual pode ser um método estabelecido, um material de referência ou unidade de medição. Ser rastreável em química é realizar o mol como isto é impossível uma vez que por definição o mol é a quantidade de matéria de um sistema que contém tantas entidades elementares quantos são os átomos contidos em 0,012 quilograma de carbono 12, a unidade de medida que mais se aproxima da área química é o kg (FROTA, 1998).

2.5.1 Histórico

A necessidade de padronização das medidas levou à criação do BIPM, *Bureau International des Poids et Mesures*, em 1875. O BIPM, situado em Paris, França, está vinculado exclusivamente ao Comitê Internacional de Pesos e Medidas (CIPM) o qual, por sua vez, responde à Conferência Geral de Pesos e Medidas (CGPM) que em 1960, adotou o Sistema Internacional de Unidades (SI). Levando em conta as vantagens da adoção de um sistema prático e único, a ser adotado mundialmente nas relações internacionais, no ensino e no trabalho científico, a CGPM decidiu basear o SI em sete unidades de grandeza perfeitamente definidas, consideradas como independentes sob o ponto de vista dimensional, denominadas unidades de base: comprimento (metro), massa (quilograma), tempo (segundo), temperatura termodinâmica (Kelvin), intensidade luminosa (candela), corrente elétrica (ampère) e quantidade de matéria (mol) (FROTA, 1999).

A expansão das necessidades de padronização que se seguiram as do comprimento e massa, levou à diversificação das atividades do BIPM e sua complexidade levou a criação de vários comitês consultivos, dentre eles o Comitê Consultivo para a Quantidade da Matéria (CCQM) em 1993 (FROTA, 1999).

No Brasil, em 1961, foi criado o Instituto Nacional de Pesos e Medidas, que implantou a Rede Brasileira de Metrologia Legal e Qualidade, os atuais Institutos de Pesos e Medidas (IPEM), e instituiu o Sistema Internacional de Unidades (SI) em todo o território nacional. Logo, verificou-se que isso não era o bastante. Era necessário acompanhar o mundo na sua corrida tecnológica, no aperfeiçoamento, na exatidão e, principalmente, no atendimento às exigências do consumidor (DIAS, 1998).

Em 1973, iniciava-se o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro), que no âmbito de sua ampla missão institucional, objetiva fortalecer as empresas nacionais, aumentando a sua produtividade por meio da adoção de mecanismos destinados à melhoria da qualidade de produtos e serviços (DIAS, 1998).

A Metrologia Científica e Industrial é uma das principais unidades do Instituto Nacional de Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro), criado pela lei n.º 5966 de 11/12/1973, que instituiu o Sistema Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Sinmetro), definindo como seu órgão máximo o Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Conmetro). Este é um colegiado interministerial do qual participam oito Ministros, o Presidente da Confederação Nacional da Indústria (CNI), o Presidente da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e o Presidente do Instituto de Defesa do Consumidor (IDEC) sendo secretariado pelo INMETRO (DIAS, 1998; FROTA, 1998).

Reconhecendo a importância estratégica para a competitividade dos produtos e serviços brasileiros da área de química, o Inmetro criou em junho de 2000 a Divisão de Metrologia Química (DQUIM), que atua nos campos da Eletroquímica, Química Orgânica, Química Inorgânica, Gases e Motores. Na busca contínua do aperfeiçoamento e desenvolvimento de suas atividades, a DQUIM firmou convênios e parcerias com órgãos de fomento, universidades, centros de pesquisa, redes metrológicas e Institutos Nacionais de Metrologia de diversos países, visando ao apoio financeiro e o intercâmbio técnico-científico.

Dentre as diversas atividades da Dquim destacam-se: a implantação de métodos primários de medição (gravimetria, coulometria, titulometria, espectrometria de massas com diluição isotópica (EMDI), calorimetria diferencial exploratória (DSC), depressão do ponto de congelamento (*freezing-point depression*), medição de pH), o desenvolvimento, produção e certificação de Materiais de Referência (MR), a participação em comparações internacionais, a organização de Ensaios de Proficiência (EP) e a disseminação da cultura metrológica no País. Os Métodos Primários de Medição (MPM) são “métodos que possuem as mais altas qualidades metrológicas para o qual uma declaração completa de incerteza pode ser realizada em termos de unidades SI e cujos resultados são, portanto, aceitos sem referência a um padrão ou grandeza sob medição, de acordo com o Comitê Consultivo para a Quantidade de Matéria (CCQM)”. Como há poucos métodos primários disponíveis então são utilizados Materiais de Referência Certificados (MRC) (ISO GUIDE 35, 2006).

É fundamental que o mundo científico disponha de meios e critérios objetivos para demonstrar que as medições realizadas conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Ao empregar métodos de medição preconizados por organismos de normalização, organizações reconhecidas na sua área de atuação ou publicados em livros e/ou periódicos de grande credibilidade na comunidade científica, necessita-se demonstrar que se tem condições de operar de maneira adequada estes métodos normalizados, dentro das condições específicas existentes nas suas instalações antes de implantá-los. Somando-se a isto, devem-se ter procedimentos de controle de qualidade para monitorar a validade dos ensaios realizados. Os dados resultantes devem ser registrados de forma que tendências sejam detectáveis e, quando praticável, devem ser aplicadas técnicas estatísticas para a análise crítica dos resultados. Esta monitorização deve ser planejada e analisada criticamente

e este é o conceito que prevalece na norma ABNT, NBR ISO/IEC 17025, requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração.

Sempre que um profissional recebe uma amostra para ser analisada, é fundamental que ele questione, saiba e reflita sobre o trabalho de medição: o que se pretende medir, o porquê desta necessidade e qual a melhor maneira de realizar esta medição. Ele deve verificar se para esta medição existem materiais de referência certificados adequados, como atribuir o valor da incerteza desta análise e qual a rastreabilidade para todas as etapas do processo (desde a amostragem até o resultado final). Iniciar uma análise com o processo analítico bem definido é fundamental, porque muitas vezes pela falta de uma avaliação adequada do processo de medição a ser realizado, há a necessidade de repetição na análise, o que significa aumento de custos e desperdício de tempo (DIAS, 1998).

É importante que os resultados das medições gerados sejam bases para decisões e acordos comerciais. Para se ter confiabilidade, um dos mais importantes pré-requisitos é o conhecimento da incerteza de medição, a qual é baseada na rastreabilidade a referências conhecidas, como materiais de referência certificados ou a métodos de alto valor metrológico ou, outras, relacionadas ao Sistema Internacional de Unidades – SI (SILVA, 1997).

O objetivo de uma medição é determinar o valor do mensurando, isto é, o valor da grandeza específica a ser medida. Uma medição começa, portanto, com especificação apropriada do mensurando, do método de medição e do procedimento de medição. Em muitos casos nas análises químicas, o mensurando será a concentração de um analito. Em geral, o resultado de uma medição é somente uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando e, assim, só é completa quando acompanhada pela declaração da incerteza dessas estimativas (FROTA, 1998).

Quando se relata o resultado de medição de uma grandeza, é obrigatório que seja dada alguma indicação quantitativa da qualidade do resultado, de forma tal que aqueles que o utilizam possam avaliar sua confiabilidade. Sem essa indicação, resultados de medição não podem ser comparados, seja entre eles mesmos ou com valores de referência fornecidos em uma especificação ou em uma norma. É, portanto, necessário que haja um procedimento prontamente implementado, facilmente compreendido e de aceitação geral para caracterizar a qualidade de um resultado de uma medição, isto é, para avaliar e expressar sua incerteza (AUGUSTO, 2007).

Considerando que a missão do Inmetro, no âmbito da Divisão de Metrologia Química é assegurar a confiabilidade metrológica e prover a rastreabilidade ao Sistema Internacional de Unidades das medições químicas realizadas no Brasil, o desenvolvimento e validação de procedimentos de referência, a produção de Materiais de Referência Certificados (MRC) e a organização de Ensaio de Proficiência (EP), contribuem para a implantação da metrologia.

A defasagem tecnológica que o Brasil se encontra em termos de metrologia aplicada às medições químicas, em relação aos Estados Unidos, é de aproximadamente 100 anos. Isto pode ser evidenciado pelo fato de que o órgão metrológico daquele país, o *National Institute of Standards and Technology* (NIST), iniciou a produção de materiais de referência para atender o setor industrial no início do século XX. Sem sombra de dúvidas as normalizações metrológicas que existem em todos os setores industriais dos Estados Unidos promoveram a tecnologia, a produtividade e a qualidade dos produtos americanos e a consequência direta foi a conquista do mercado mundial (DIAS, 1998).

2.5.2. Metrologia Química nos alimentos

A crescente necessidade do Brasil de se firmar no mercado internacional como exportador de alimentos está provocando mudanças nos conceitos de produção da classe empresarial brasileira. Aspectos referentes à qualidade são decisivos em um mercado globalizado e só participarão deste mercado países que produzirem segundo normas e especificações técnicas rigorosamente determinadas por organismos internacionais.

A qualidade dos alimentos é imprescindível para a adequada manutenção da saúde coletiva, uma vez que fornecem todas as substâncias (minerais, vitaminas, proteínas, lipídeos e carboidratos) necessárias para o pleno funcionamento do organismo. Por outro lado, estes alimentos podem afetar negativamente a saúde do indivíduo se estiverem fortificados por agentes biológicos (bactérias, fungos, protozoários ou toxinas) ou químicos (agrotóxicos, contaminantes ambientais ou medicamentos de uso veterinário).

A fim de garantir a qualidade dos produtos destinados ao consumo, políticas sanitárias nacionais devem ser estabelecidas visando sempre a obtenção de alimentos inócuos, seguros e nutritivos. Em 1999, o Ministério da Saúde implantou a Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN) através da aprovação da Portaria nº 710 publicada no Diário Oficial da União (DOU) em 25/11/99 (BRASIL, 1999). A adoção desta política foi importante para ampliar o conceito de segurança alimentar, pois além de garantir o valor nutricional dos alimentos, agregou valores quanto a necessidade de uma vigilância sanitária contínua e atuante em todo o país, para garantir efetivamente a qualidade do produto que chega ao consumidor final.

Dentre as medidas que asseguram os laboratórios na produção de resultados confiáveis, estão: o uso de métodos de analíticos validados, o estabelecimento de procedimentos sistematizados, a participação em ensaios de proficiência e comparações interlaboratoriais, credenciamento junto aos órgãos acreditadores, a produção de materiais de referência (MR) e o estabelecimento da rastreabilidade aos padrões nacionais e internacionais.

Além do ganho em qualidade que a normalização metrológica propicia para o setor industrial de um país, devemos ainda considerar o benefício econômico obtido pela redução do retrabalho e desperdício na cadeia de produção, que atualmente representa 10 % do PIB dos países em desenvolvimento como o Brasil (INMETRO, 2010).

O Brasil como produtor e exportador de produtos agroindustriais está passando por momentos críticos em sua economia e vive o dilema na produção e exportação de seus produtos, que têm sido alvo de barreira técnica, devido ao não atendimento dos limites toxicológicos estabelecidos para contaminantes, como a ocratoxina A no café.

Desta forma, a disseminação da cultura metrológica no país é fundamental para a obtenção de produtos e serviços de alta qualidade e confiabilidade, implicando diretamente na qualidade de vida de todos os cidadãos. A metrologia na área de alimentos se torna uma área estratégica para o Brasil. Há necessidade de se gerar ferramentas tecnológicas que garantam a qualidade de produtos e processos industriais alimentícios.

2.5.3 Incerteza de medição

A todo resultado de medição deve-se considerar a incerteza de medição, pois o valor medido de um resultado está relacionado a um número infinito de valores dispersos em relação a este resultado. Desta forma, quando uma medição é realizada, este resultado é somente uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando. Para que se tenha a expressão completa e confiável que representará o valor de tal mensurando deverá incluir a

incerteza de medição, verificando cuidadosamente a contribuição quantitativa de cada uma das fontes estimadas (AUGUSTO, 2007; DE LA CRUZ *et al.*, 2010).

A rastreabilidade é a “propriedade do resultado de uma medição ou de um valor de um padrão estar relacionado a referências estabelecidas, geralmente a padrões nacionais ou internacionais, através de uma cadeia contínua de comparações, todas tendo incertezas estabelecidas”(INMETRO, VIM, 2008).

Cada passo da cadeia de rastreabilidade deve ser realizado de acordo com procedimentos documentados e reconhecidos como adequados. Para se ter rastreabilidade em uma medição, deve-se definir: o que deve ser medido, o escopo da medição e a incerteza requerida (AUGUSTO, 2007).

A incerteza de medição é um parâmetro associado a um resultado de medição e é definida como a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando (ABNT, INMETRO, 2003). O mensurando é a grandeza que se pretende medir. Já o termo grandeza é definido como a propriedade de um fenômeno, de um corpo ou de uma substância, que se pode expressar quantitativamente sob a forma de um número e de uma referência (INMETRO, VIM, 2008).

O resultado de uma medição é somente uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando e, assim, só é completo quando acompanhado pela declaração da incerteza dessa estimativa. Deste modo, os resultados de medição só podem ser comparados quando há declaração da incerteza associada a este resultado (ABNT, INMETRO, 2003; WILLIAMS, 1996).

O conceito de incerteza de medição é relativamente novo na história da medição e não deve ser confundido com erro, definido como a diferença entre um resultado individual e o valor verdadeiro do mensurando. A incerteza estimada de um procedimento analítico está relacionada a uma faixa e não deve ser utilizada a fim de corrigir o resultado de uma medição (WILLIAM, 1996; EURACHEM, 2000).

O processo de estimativa da incerteza de medição utilizando o método clássico envolve 4 (quatro) etapas: definição do mensurando, identificação das fontes de incerteza (diagrama de *Ishikawa*), quantificação dos componentes de incerteza e cálculo da incerteza padrão combinada (DE OLIVEIRA; DE AGUIAR, 2009., HORWITZ, 1998; HORWITZ, 1999; ABNT, INMETRO, 2003; EURACHEM, 2000).

Definir o mensurando é declarar objetivamente aquilo que se pretende medir, relacionando-o com as grandezas de entrada (DE LA CRUZ *et al.*; 2010).

Uma vez identificadas as fontes de incerteza e consideradas as suas contribuições pode-se estimar a incerteza padrão combinada (u_c). A incerteza padrão combinada é a raiz quadrada da soma quadrática das que são os componentes que contribuem para a estimativa da incerteza de medição.

A incerteza expandida (U) é obtida quando a incerteza padrão combinada é multiplicada por uma constante k , denominada fator de abrangência e que depende do nível de confiança e dos graus de liberdade, sendo o resultado de medição expresso por $y \pm U$, onde o y corresponde ao mensurando. Para o cálculo da incerteza expandida é necessário avaliar a contribuição da incerteza encontrada para cada fonte. Se a incerteza de maior contribuição for do tipo B, considera-se um nível de confiança de 95,0 % e graus de liberdade infinitos, atribuindo ao fator de abrangência (k) o valor igual a 2. No entanto, se a fonte de incerteza de maior contribuição for do tipo A, o valor de k deve ser calculado (HORWITZ, 1998; HORWITZ, 1997; AUGUSTO, 2007).

Os componentes da incerteza podem ser classificados em Tipo A, quando a avaliação é realizada pela análise estatística de uma série de observações da grandeza medida (medições) e do Tipo B, quando se assume que cada grandeza de entrada tem uma distribuição e um intervalo de dispersão. Essas distribuições podem ser uniforme, retangular, triangular e normal (AUGUSTO, 2007).

Estimar a incerteza de medição para os resultados de análises químicas é extremamente complexo, uma vez que a medição química geralmente depende de uma combinação de medições físicas, da separação química do composto de interesse e da seleção apropriada da porção do material retirada para medição (amostragem) (MÁRCO *et al.*, 2007).

Não existem na literatura estimativa de incerteza de medição para a análise cromatográfica onde o mensurando é a ocratoxina A na matriz café. Desta forma, descrever este procedimento contribuirá substancialmente não apenas para a análise de ocratoxina A no café verde e café torrado como para a área de alimentos como um todo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais utilizados foram garrafa de vidro *Schott* de 250 mL, proveta de 100, 250, e 500 mL, frascos de 10 mL com tampa de teflon, balão volumétrico de 5, 10, 100 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL, funil, seringa de plástico de 5 mL e 60 mL, ponteira de 100 – 1000 µL, pipeta graduada de 5 mL, tudo de ensaio de 10 mL, vial âmbar de 2 mL, pipeta pasteur, frascos âmbar de 50 mL, filtro Qualitativo para filtragem rápida JP41, faixa preta, Quantity, 15 cm, filtro de fibra de vidro GF 50-A, 47 mm, 1µm, filtro em éster de celulose 0,45 µm de poro, 47 mm de diâmetro, dessecador, bandejas para descontaminação de material, espátula, luvas de nitrila e de látex descartável, óculos de proteção, coluna de imunoafinidade Ochratest (Vicom Ltda), cronômetro, papel alumínio.

3.1 Amostras

As amostras de café verde em grãos foram colhidas através da técnica de derriça e classificadas como sendo da espécie Arábica, bebida dura, variedade Mundo Novo e Catuaí obtidas do Leste de Minas Gerais, no município de São Domingos das Dores a 80 km de Caratinga

3.1.1 Torrefação e moagem

As torrefações foram realizadas em torrador elétrico (Cael Ltda), no Laboratório de Bioquímica Nutricional de Alimento (IQ-UFRJ). As condições estabelecidas foram a temperatura de 280 °C por 35 minutos para a obtenção do ponto de torra convencional mais (médio escuro), torrefação mais comercializada no país. Os padrões de torra na escala AGTRON foram utilizados para determinação da cor.

A moagem foi realizada utilizando moinho da marca Leogap, modelo M-50, com granulometria fina número 1.

3.2 Solventes e Reagentes

Os solventes e reagentes utilizados foram: bicarbonato de sódio (Tedia Brazil, Brasil, 99,7 %), dihidrogeno fosfato de potássio (Merck, Alemanha, 99,0 %), hidrogeno fosfato dissódico anidro (Merck, Alemanha, 99,0 %), cloreto de sódio (Spectrum, E.U.A., 99,0 %), cloreto de potássio (Merck, Alemanha, 99,5 %), dicromato de potássio (Merck, Alemanha, 99,5 %), ácido sulfúrico (Merck, Alemanha, 97,0 %), metanol grau HPLC (Tedia Brazil, E.U.A., 99,9 %), ácido trifluoroacético grau HPLC (Tedia Brazil, E.U.A., 99,8 %), acetona grau pesticida (Tedia Brazil, E.U.A., 99,8 %), ácido acético glacial (Tedia Brazil, E.U.A., 99,9 %), tolueno grau HPLC (Tedia Brazil, E.U.A., 99,8 %), benzeno (Merck, Alemanha,

99,5 %), acetona ACS (Tedia Brazil, E.U.A., 99,8 %), álcool etílico (Quimes, Brasil, 95,0 %), acetonitrila grau HPLC (Tedia Brazil, 99,9 %), ácido fosfórico (Tédia Brazil, 85,0 %), hipoclorito de sódio (Invema, Brasil, 12,0 %), extran alcalino (Merck, Alemanha).

Foi utilizado o sistema de purificação de água (Millipore Inc., Paris, França, Tipo I), água ultra pura com condutividade de $0,056 \text{ mScm}^{-1}$.

Para extração das amostras de café verde e torrado foram utilizadas solução Tampão Fosfato Salino (PBS) com pH 7 e colunas de imunoafinidade Ochratest WB (Vicom Inc, Watertown, EUA).

Os padrões utilizados foram: ocratoxina A e ocratoxina B, ambos da Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A com pureza de 98,0 % para ambos, conforme estabelecido pelo certificado do fabricante.

Foi utilizado para calibração do CLAE-EM/EM uma solução padrão de polipropilenoglicol (ppg), fornecida pela Varian, Walnut Creek, CA, EUA.

3.3 Equipamentos

- ✓ Balanças analíticas de resolução 0,001 g e 0,00001 g, Modelos XP205 e PR1203 respectivamente, Mettler Toledo.
- ✓ Blender com duas velocidades, Waring.
- ✓ Bomba de vácuo, Modelo 0511, GoldSun.
- ✓ Manifold, Modelo Vac Elut 20, Varian.
- ✓ Evaporador de amostra (N_2), Modelo Reacti-Vap IIITM, Pierce.
- ✓ Vórtex, Modelo AP56, Phoenix.
- ✓ Ultrassom, Modelo USC 1400, Unique.
- ✓ Espectrofotômetro de Ultravioleta, Modelo UV-1601PC, Shimadzu.
- ✓ Pipetadores automáticos, volume 100-1000 μL e 20-200 μL , Transferpette, Brand.
- ✓ Estufa, Modelo 400-3 ND, Nova Ètica.
- ✓ Densímetro digital, Modelo DE51, Mettler Toledo.
- ✓ Moinho, Modelo M-50, Leogap.
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a Espectrômetro de massas em linha (CLAE-EM/EM), modelo 1200L, Varian.
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD), modelo LC20AT-SPDM20A, Shimadzu.
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência (CLAE-FLD), modelo Waters Alliance 2695/detector 475, Waters.

3.4 Soluções

A) Fase Móvel

Todas as fases móveis foram preparadas em balão volumétrico calibrado e homogeneizadas vertendo o balão tampado de cima para baixo. Para eliminar qualquer possibilidade de interferentes no sistema, foram filtradas através de membrana e degaseificada através do sistema de ultra-som.

B) Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) - 3,0 % p/v

Pesou-se 15,0 g de bicarbonato de sódio, transferindo quantitativamente com água Tipo 1 para balão volumétrico de 500 mL e completou-se até o menisco. Homogeneizou-se vertendo o balão tampado de cima para baixo.

C) Tampão Fosfato Salino (PBS)

Pesou-se 0,20 g de dihidrogênio fosfato de potássio, 1,10 g de hidrogênio fosfato dissódico anidro, 8,00 g de cloreto de sódio, 0,20 g de cloreto de potássio. Dissolveu-se os cristais dos sais com água Tipo 1 e transferiu-se quantitativamente para um balão de 1000 mL. Completou-se com água Tipo 1 até o menisco e homogeneizou-se vertendo o balão tampado de cima para baixo.

D) Benzeno: ácido acético (99:1 v/v)

Em um balão volumétrico calibrado de 100 mL, mediu-se 99 mL de benzeno, adicionou-se 1,0 mL de ácido acético glacial.

E) Tolueno: Ácido acético (99:1 v/v)

Em um balão volumétrico calibrado de 100 mL, mediu-se 99 mL de tolueno, adicionou-se 1,0 mL de ácido acético glacial.

F) Solução padrão

Por se tratar de substâncias tóxicas e apresentar risco de contaminação o preparo destas soluções padrão, ocratoxina A e ocratoxina B foram preparados de uma forma diferenciada, cuidadosamente em capela sob exaustão com utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) como luvas e óculos de proteção (TRUCKNESS, 2005).

Após preparo destas soluções todas as vidrarias e utensílios foram descontaminados com etanol e acetona, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio 5,0 % e extran por 30 minutos cada. Em seguida foram enxagadas com água tipo 1.

O preparo das soluções padrões de ocratoxina A e ocratoxina B estão descritas a seguir:

Ocratoxina A

A solução padrão estoque (Solução 1) e intermediária (Solução 2) de ocratoxina A foram preparadas em tolueno e ácido acético glacial (99:1), de acordo com a concentração recomendada pela AOAC (TRUCKNESS, 2005), 200 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Para a solução padrão de trabalho, uma solução de concentração 100 $\mu\text{g/kg}$ foi preparada pesando-se um apropriado volume da Solução intermediária (solução 2), como descrito a seguir. Em um frasco de vidro de 4,0 mL, previamente tarado, uma massa de 0,15063 g da Solução 2 de OTA foi pesada. Em outro frasco de vidro âmbar de 250 mL, previamente descontado a tara, pesou-se 100,102 g de fase móvel. Em seguida, cuidadosamente, inseriu-se o frasco de 4,0 mL contendo a massa de 0,12063 g da solução 2 no interior do frasco âmbar contendo a fase móvel, vertendo a garrafa tampada de cima para baixo obtendo uma solução final na concentração de 99,21554 $\mu\text{g/kg}$ de OTA (Solução 3).

Ocratoxina B

Para OTB seguiu-se o mesmo procedimento descrito para ocratoxina A na mesma concentração recomendada pela AOAC (TRUCKNESS, 2005), utilizando a mistura de solvente benzeno: ácido acético (99:1).

As soluções padrões de ocratoxina A e ocratoxina B foram estocadas em freezer a -18 °C.

G) Ácido sulfúrico 0,018 N

Transferiu-se 1,0 mL de ácido sulfúrico P.A para balão volumétrico de 2000 mL, contendo um pouco de água destilada e completou-se o volume até o menisco com água Tipo 1, dissolvendo completamente. Homogeneizou-se a solução.

H) Dicromato de potássio

Em uma balança previamente descontada a tara e calibrada pesou-se 78,0 mg de dicromato de potássio transferindo quantitativamente para balão volumétrico de 1000 mL. Dissolveu-se o sal e completou-se com solução de ácido sulfúrico 0,018 N, obtendo-se uma concentração de 0,25 mM (Solução 1). Sonicou-se a solução de dicromato de potássio por 5 minutos em ultra-som.

Retirou-se uma alíquota de 25 mL da solução 0,25 mM de dicromato de potássio (Solução 1), e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Dissolveu-se e completou-se com a solução de ácido sulfúrico 0,018 N, obtendo-se a solução de concentração de 0,125 mM (Solução 2).

Para a obtenção da Solução 3, retirou-se uma alíquota de 25 mL da solução 0,125 mM de dicromato de potássio (Solução 2) e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Completou-se com solução de ácido sulfúrico 0,018 N.

As soluções de dicromato de potássio (0,25 mM, 0,125 mM e 0,0625 mM) em ácido sulfúrico 0,018 N foram preparadas para a determinação da concentração da solução de OTA e OTB através do equipamento de Espectrofotômetro na região de UV.

3.5 Determinação da Concentração Real da Solução Padrão de Ocratoxina A e Ocratoxina B

As soluções de dicromato de potássio (0,25 mM, 0,125 mM e 0,0625 mM) em ácido sulfúrico 0,018 N foram utilizadas para a determinação do fator de correção (FC) do Espectrofotômetro de UV e esse foi empregado no cálculo da concentração das soluções padrão.

Foi realizada a leitura da absorvância das soluções de dicromato de potássio nas três concentrações no comprimento de onda de absorção máxima (350 nm), usando a solução de ácido sulfúrico como branco. Calculou-se a absorvidade molar específica (ϵ) para cada uma das soluções usando a equação a seguir.

$$\varepsilon = \frac{A \times 1000}{\text{concentração}(mM)} \quad (1)$$

A = absorvância medida pelo espectrofotômetro
1000 = volume da cubeta (μL)

Para o cálculo da concentração (mM) considerou-se a massa real pesada de dicromato e suas respectivas diluições.

Após os cálculos referentes a absorvância molar específica (ε), o Fator de correção (FC) foi obtido através da determinação da média dos valores encontrados para a absorvância molar das três soluções de dicromato de potássio, conforme fórmula abaixo, onde o número 3160 é o valor teórico para a absorvância molar da solução de dicromato de potássio. O critério de aceitação do fator de correção foi a faixa de 0,95 a 1,05 (AOAC, 2005).

$$FC = \frac{3160}{\varepsilon} \quad (2)$$

Para determinação da concentração de ocratoxina A e ocratoxina B foram preparadas soluções na concentração aproximadamente 40 μg/mL, conforme estabelecido pela AOAC (TRUCKNESS, 2005) e realizada leitura em triplicata no espectrofotômetro de UV.

As concentrações destas soluções padrões foram calculadas através da equação:

$$\text{Concentração}(ug / mL) = \frac{A \times PM \times 1000 \times FC}{\varepsilon} \quad (3)$$

A = absorvância média medida no espectrofotômetro;
PM = 403 (Ocratoxina A) e 369 (Ocratoxina B);

Os coeficientes de absorvância molar (ε) e seus respectivos comprimentos de onda monitorados foram 5440 M⁻¹cm⁻¹ (333 nm) e 6000 M⁻¹cm⁻¹ (320 nm) para ocratoxina A e ocratoxina B, respectivamente.

Todo o material utilizado no preparo de soluções e extração foi devidamente descontaminado.

Para obtenção dos resultados da concentração das soluções padrões em massa/massa (p/p) foi determinada a massa específica da mistura de solventes nos quais os padrões estavam dissolvidos, utilizando o densímetro digital e corrigindo os valores de massa através do certificado de calibração do equipamento, conforme a equação a seguir.

$$PI = a_0 + a_1 \times T_i + a_2 \times PI_i \quad (4)$$

PI = Massa específica do líquido corrigida medida na temperatura T_i em g/cm³;
 $a_0 = 6,730932E-04$;
 $a_1 = 3,037804E-05$;

Ti = Temperatura indicada no densímetro digital (20 °C);
a₂ = 1,000061;
Pli = Massa específica do líquido indicada no densímetro digital.

Os valores das constantes a₀, a₁ e a₂ foram fornecidos pelo certificado de calibração do densímetro digital.

A análise da massa específica da fase móvel selecionada para desenvolvimento de método foi realizada para posterior cálculo referente à concentração real das soluções.

3.6 Análise Cromatográfica

3.6.1 CLAE-FLD

A separação cromatográfica ocorreu através da coluna Nucleosil RP 18 C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Macherey-Nagel, Alemanha) em forno de temperatura a 25 °C com fluxo de fase móvel 0,9 mL/min. O modo de eluição estabelecido foi o gradiente, no qual foram utilizadas três soluções de fase móvel: ácido acético 1 % em água (A), ácido acético 1 % em acetonitrila (B), ácido acético 1 % em metanol (C). A programação de fluxo das fases móveis eluído no modo gradiente: Inicialmente 30 % de A e 70 % C, permanecendo por 5 minutos. Em seguida, o percentual foi de 25 % de A e 75 % C, permanecendo por 1 minuto e após este tempo, o percentual das fases variou para 25 % A, 30 % B e 45 % C, permanecendo por 9 minutos e retornado ao percentual inicial de 30 % A e 70 % C. O volume de injeção foi de 20 µL. Os picos de ocratoxina A foram detectados através de cromatógrafo líquido acoplado ao detector de fluorescência (CLAE-FLD) com excitação de 333 nm e emissão de 460 nm. Estas condições foram obtidas através da metodologia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000) implantada pela Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Os extratos foram preparados no Inmetro e injetados simultaneamente no CLAE-FLD e no CLAE-EM/EM. Os resultados obtidos através das duas técnicas foram avaliados estatisticamente através da ferramenta estatística teste F e teste t, através do Software do Microsoft Excel a fim de se verificar a equivalência entre os métodos.

3.6.2 CLAE-EM/EM

As análises foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia líquida acoplado a um analisador triplo quadrupolo (CLAE-EM/EM) modelo 1200L (Varian, Walnut Creek, CA, EUA).

Para CLAE, foi utilizado um auto injetor ProStar 410, termostato de coluna e duas bombas ProStar 210 para fase móvel. A separação cromatográfica foi através da coluna Synergi Hydro C₁₈ (75 mm x 2,0 mm, 4 µm, Phenomenex, Torrance, C.A., E.U.A.) com forno a temperatura de 25 °C. O modo de eluição estabelecido foi o isocrático e o volume de injeção foi de 50 µL.

A composição da fase móvel utilizada foi determinada em função da intensidade do sinal produzido no espectrômetro de massas, do formato do pico cromatográfico, do tempo de retenção e da separação cromatográfica das ocratoxinas. A fase móvel utilizada no sistema CLAE-EM/EM consistiu em ácido trifluoracético em água Tipo 1 (0,05 %, Solvente

A) e ácido trifluoracético em metanol (0,05 %, Solvente B) (20: 80) com fluxo de 0,3 mL/min.

O espectrômetro de massas foi operado em modo de ionização por eletronebulização positivo (IEN+) e com Monitoramento Seletivo de Reações (MSR).

Inicialmente, para determinação de ocratoxina A, foram otimizadas as condições do espectrômetro de massas, através da infusão direta de soluções padrões individuais (OTA e OTB) em fase móvel na concentração de 20 µg/mL utilizando gás argônio (gás de colisão) para Monitoramento Seletivo de Reações (MSR), no modo positivo utilizando a molécula protonada $[M+H]^+$ m/z 404 para OTA e m/z 370 para OTB.

Foi possível realizar a otimização do espectrômetro de massas para a Ocratoxina A e Ocratoxina B, pois a variação de cada parâmetro em separado (temperatura, pressão e posicionamento da agulha) com a introdução direta de cada substância individualmente gera gráficos default do equipamento, que indicam o melhor resultado para cada parâmetro em questão. A medida que o parâmetro avaliado atinge o seu melhor resultado, maior intensidade. É possível aumentar ou diminuir manualmente a intensidade de cada parâmetro e otimizá-lo, a fim de se verificar qual o melhor resultado obtido deste parâmetro para cada substância de interesse. As voltagens também podem ser otimizadas. Desta forma, os parâmetros otimizados utilizados para o EM/EM foram: voltagens da agulha de ionização (*needle*, 5000 V), do escudo (*shield*, 600 V), do capilar (50 V) e do detector (1600 V), temperatura e pressão do gás de secagem (340 °C, 21 psi), da câmara da interface (*housing*, 40 °C), do gás de nebulização (40 psi), agulha 7 mm, posicionamento vertical e horizontal de 6 mm e 3 mm, respectivamente.

A diretiva da União Européia 2002/657/EC preconiza para a confirmação de substâncias orgânicas número de pontos de identificação de acordo com cada técnica cromatográfica de análise, seus detectores. Desta forma, toda vez que os fragmentos forem medidos por outra técnica que não a varredura total de íons (*Full Scan*) deve-se utilizar o sistema de identificação para interpretar os resultados obtidos. Para cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas em linha CLAE-EM/EM, com 1 (um) íon precursor e 2 (dois) íons produtos ou 2 (dois) íons precursores e 1 (um) íon produto. Cada íon precursor equivale a 1 (um ponto) enquanto cada íon produto para esta técnica equivale a 1,5 (um ponto e meio). Desta forma, as combinações devem obter no mínimo de 4 (quatro) pontos de identificação.

Curva de calibração

As curvas de calibração foram preparadas gravimetricamente na fase móvel (Solução) e na matriz, partindo da diluição gravimétrica da solução de trabalho OTA (99, 21554 µg/kg) para obtenção da concentração desejada para o café verde (3,0; 8,0; 13,0; 18,0 e 23,0 µg/kg) e para o café torrado (3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 µg/kg), conforme estabelecido na faixa de trabalho do método proposto, utilizando balança analítica calibrada.

a) Fase Móvel (Solução)

Em um frasco de vidro de 10 ml, previamente tarado, pesaram-se as massas estabelecidas da solução de trabalho contendo 99, 21554 µg/kg de ocratoxina A para cada curva de calibração para os métodos café verde e torrado, conforme a Tabela 4, e completou-se com volume de fase móvel (massa final de 2,0 g) para obtenção da concentração alvo para cada ponto, respectivamente. Homogeneizou-se em vórtex por 30 segundos.

Tabela 4. Massa de solução padrão de ocratoxina A (g) para elaboração das curvas de calibração na fase móvel (Solução) para café verde e café torrado.

Massa Solução Padrão de OTA (g)		Concentração Final (µg/kg)
Curva de Calibração		
Café verde	Café torrado	
0,06047	0,06047	3,0 µg/kg
0,16127	X	8,0 µg/kg
0,26206	X	13,0 µg/kg
0,36285	X	18,0 µg/kg
0,46364	X	23,0 µg/kg
X	0,08063	4,0 µg/kg
X	0,10079	5,0 µg/kg
X	0,12095	6,0 µg/kg
X	0,14111	7,0 µg/kg

b) Matriz

Inicialmente foram realizados testes na matriz, verde e torrado, a fim de se verificar a existência de branco de café, ou seja, uma matriz que não apresentasse a substância de interesse (OTA). Os cafés brancos foram devidamente fortificados com concentrações de interesse para preparo da curva de calibração.

A curva de calibração na matriz foi preparada pesando-se gravimetricamente 25,0 g da matriz café, verde e torrado em garrafa âmbar de 500 mL, conforme método estabelecido. Cada ponto da curva foi devidamente fortificado nas respectivas faixas de trabalho para cada método, descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Massa de solução padrão de ocratoxina A (g) para elaboração das curvas de calibração em matriz para café verde e café torrado.

Massa de Solução Padrão de OTA (g)		Concentração Final (µg/kg)
Curva de Calibração		
Café verde	Café torrado	
0,75593	0,75593	3,0 µg/kg
2,01581	X	8,0 µg/kg
3,27570	X	13,0 µg/kg
4,53558	X	18,0 µg/kg
5,79546	X	23,0 µg/kg
X	1,00791	4,0 µg/kg
X	1,25988	5,0 µg/kg
X	1,51186	6,0 µg/kg
X	1,76384	7,0 µg/kg

Homogeneizou-se a garrafa tampada, vertendo-a tampada de cima para baixo por 10 segundos. Deixou-se em repouso durante 12 h.

Extração de OTA no café verde e no café torrado

Para preparação das amostras o procedimento de extração foi adaptado e otimizado a partir de Pittet *et al.* (1996). Resumidamente, em uma balança analítica calibrada, pesou-se 25,0 g de café em uma garrafa de vidro Schott âmbar de 500 mL e fortificou-se com solução padrão de trabalho, permaneceu a temperatura ambiente por período de 12 h. Decorrido este tempo, as amostras de café foram transferidas para extrator tipo *blender* e extraídas com 190,0 g da mistura de metanol e bicarbonato de sódio 3,00 % (1:1) batendo por 5 minutos em velocidade baixa. O extrato foi filtrado, sob vácuo, utilizando três filtros seqüenciados (papel qualitativo, membrana de fibra de vidro e de celulose (0,45 µm) através de um sistema de filtração de fase móvel. Pesou-se 4,60 g do extrato em balão volumétrico de 100 mL e completou-se com solução tampão fosfato salino até o menisco e homogeneizou-se vertendo o balão tampado de baixo para cima.

Clean up (Coluna de Imunoafinidade- IA)

Para a etapa de limpeza (*clean up*), foi conectado a coluna de imunoafinidade (IA), em temperatura ambiente (20 °C), no *manifold* de vidro, sob vácuo. Retirou-se a tampa preta da IA Ochratest WB e conectou-se a seringa de polipropileno de 60,0 mL na IA. Desta forma a disposição final ficou de cima para baixo, a seringa de polipropileno de 60,0 mL (primeira), logo abaixo a IA, o *manifold* por último. Transvazou-se através da coluna de polipropileno todo o extrato diluído em tampão fosfato salino (conteúdo do balão volumétrico de 100 mL), ajustando o fluxo de 2,0 - 3,0 mL/min, lentamente, sem deixar secar a coluna de IA. Em seguida, o balão volumétrico de 100,0 mL foi rinsado com 10,0 mL de água Tipo 1 e eluiu este conteúdo pela IA. Secou-se a coluna aplicando vácuo durante 30 segundos. Foi colocada dentro do *manifold* uma estante com tubos de ensaio para a realização da coleta do extrato. A OTA foi eluída com 4,0 mL de metanol em tubo de ensaio de 10,0 mL, procedendo da seguinte forma: inicialmente colocou-se 2,0 mL de metanol pela IA, deixou eluir uma gota e aguardou-se 3 minutos. Após esse tempo o êmbolo da seringa foi puxado permitindo desta forma que o solvente permeasse várias vezes o adsorvente liberando o analito de interesse, este processo denomina-se *flush up*. Passou-se os 2,0 mL restantes de metanol. O eluído foi evaporado à secura sob nitrogênio (N₂) à 37 °C em banho-maria. Foi reconstituído com 1,0 g de fase móvel e homogeneizado em vórtex por 30 segundos. O volume de injeção no CLAE-EM/EM foi de 50 µL.

A quantificação foi realizada por padronização externa.

O Anexo A apresenta um fluxograma resumido da extração utilizada para a análise de OTA no café verde e torrado.

3.7 Validação do Método

O primeiro passo para a obtenção de resultados analíticos confiáveis é a validação do método analítico escolhido. A validação de um método estabelece, através de estudos sistemáticos de laboratório, que o método é adequado à finalidade, isto é, suas características de desempenho são capazes de produzir resultados que correspondam as necessidades de um determinado procedimento analítico (VALENTE SOARES, 2001).

A validação de um método é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos, conforme exigências previstas (ABNT NBR ISO/IEC 17025/2005).

Os métodos desenvolvidos para determinação de ocratoxina A em café verde e torrado seguiram as orientações sobre Validação do Método analítico de documentação do Inmetro (DOC CGCRE-008/2010) e a Diretiva da Comunidade Européia (EC 657/2002). Os parâmetros foram avaliados também através dos critérios estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, 2007.

Os parâmetros de validação avaliados foram: Seletividade, Linearidade, Limite de Detecção e de Quantificação e Exatidão.

Primeiramente, os resultados foram submetidos a verificação de valores aberrantes (*outliers*) através do teste de Grubbs utilizando a equação descrita a seguir.

$$G_{\text{calculado}} = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \quad (5)$$

x_i = valor suspeito de ser aberrante;

\bar{x} = média aritmética de todos os valores obtidos;

s = desvio-padrão.

Se o valor de $G_{\text{calculado}} > G_{\text{tabelado}}$, diz-se que o valor suspeito é aberrante e o mesmo pode ser descartado.

3.7.1 Seletividade

A seletividade e especificidade de um método analítico estão relacionadas com a capacidade de detecção do analito frente a outras possíveis substâncias presentes naquela matriz.

A seletividade de um método avalia o quanto o método é indiferente a presença na amostra de espécie que possa interferir na determinação do analito. A matriz pode conter componentes que interfiram no desempenho da medição pelo detector selecionado, aumentando ou reduzindo o sinal.

Avalia o método é capaz de distinguir a resposta do analito a ser medido de outros componentes da amostra (confirmação da identidade), que pode variar de acordo com a classe de compostos ou matriz.

A especificidade está relacionada a métodos que produzem resposta para apenas um analito em um determinado tempo de retenção.

Efeito de Matriz

Para verificação do efeito de matriz, que pode prejudicar a quantificação do analito alvo em matrizes complexas, prepararam-se duas curvas de calibração com 5 (cinco) níveis de concentração cada, espaçadas igualmente, uma em matriz e outra em fase móvel (solução), ambas fortificadas na faixa de trabalho de cada método proposto, conforme descrito anteriormente. Este procedimento foi realizado para as matrizes de café verde e torrado e as injeções foram realizadas em triplicata.

Construíram-se as curvas obtendo a equação da reta por regressão linear sem forçar sua passagem pela origem, usando o método dos mínimos quadrados.

Pela existência de matriz isenta de analito (ocratoxina A) a avaliação do efeito matriz, foi realizada através do teste F e teste t, considerando o intervalo de confiança de 95,0 %.

Confirmação da Identidade

A presença de picos interferentes na identificação e quantificação de ocratoxina A foi verificada analisando amostras de branco de café verde e torrado, bem como amostras contaminadas com o analito a ser medido nestas matrizes, respectivamente (Rogastsky e Stein, 2005). Comparou-se o tempo de retenção.

3.7.2 Linearidade

Avalia a habilidade do método em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em uma determinada faixa de trabalho.

Os pontos da curva de calibração em matriz, para café verde e torrado, foram preparados e injetados em triplicata e com os valores obtidos das áreas construiu-se a curva de calibração. A linearidade foi obtida através do coeficiente de correlação linear (r) para toda a faixa de trabalho da curva de calibração.

O coeficiente de determinação (r^2) é normalmente utilizado para fornecer a idéia percentual da correlação dos pontos com a reta. Quanto mais próximo de 1, melhor a expressão do modelo matemático expresso pela equação da reta.

A adequação da linearidade foi verificada por meio do cálculo dos resíduos. Construiu-se o gráfico de resíduos e avaliou-se a dispersão dos resultados, que devem ser aleatórios e sem tendências entre os valores medidos e os valores calculados, a partir da equação de regressão. Realizou-se o teste de *Cochran* para verificar se a distribuição é homocedástica ou heterocedástica. Este teste compara o C_{tabelado} com o $C_{\text{calculado}}$. A equação do $C_{\text{calculado}}$ apresenta-se descrita a seguir.

$$C_{\text{calculado}} = \frac{s^2 \max}{\sum_i s_i^2} \quad (6)$$

S^2 (max.) = maior valor de variância;

$\sum_i s_i^2$ = somatório das variâncias.

Os resultados obtidos foram avaliados da seguinte forma, se o valor de $C_{\text{calculado}}$ for menor que o de C_{tabelado} , diz-se que as variâncias são estatisticamente equivalentes (condição de homocedasticidade). Neste caso, a curva de calibração pode ser determinada através da regressão linear. Caso seja heterocedástico, variâncias diferentes, utilizar os métodos dos mínimos quadrados ponderados para regressão.

O valor de C_{tabelado} para 5 (cinco) concentrações e 3 (três) replicatas com um intervalo de confiança de 95 % é 0,6838.

A confirmação da ocratoxina A foi realizada através da diretiva da União Européia (EC, 2002), que preconiza um número mínimo de quatro pontos de identificação para a técnica de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas em linha.

A faixa de trabalho é a faixa de concentração do analito de interesse, que compreende a faixa de aplicação para a qual o ensaio foi utilizado. A concentração estimada

do analito deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho e o limite inferior deve ser igual ou maior que o limite de quantificação do método.

Não há limites estabelecidos pela legislação brasileira para Ocratoxina A, no café verde e torrado. Para o café verde, adotou-se a faixa de 3,0 - 23,0 µg/kg. Os pontos da curva de calibração (eqüidistantes) foram: 3,0; 8,0; 13,0; 18,0 e 23,0 µg/kg. Para o café torrado, os pontos da curva de calibração (eqüidistantes) foram: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 µg/kg (nível 1, 2, 3, 4 e 5). Estes limites foram estabelecidos conforme descrito no item intitulado toxicidade e limites estabelecidos.

3.7.3 Sensibilidade

É um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, sendo expressa pela inclinação da reta de regressão de calibração (coeficiente angular), conforme equação a seguir:

$$S = \frac{dx}{dc} \quad (7)$$

S = sensibilidade;

dx = variação da resposta;

dc = variação da concentração.

3.7.4 Limite de quantificação (LQ)/ Limite de detecção (LD)

O parâmetro de limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Enquanto que o limite de detecção é a menor concentração de analito presente na amostra que pode ser detectada, mas não quantificada nas condições de ensaio.

O LQ foi determinado através da análise de cafés fortificados partindo do menor ponto de concentração para a respectiva faixa de trabalho de cada método, café verde e café torrado. A partir de uma matriz fortificada realizou-se sucessivas extrações com concentrações decrescentes até obter um extrato com relação sinal ruído igual a 10 (dez), que foi considerada como LQ. Para confirmação do valor, prepararam-se 3 (três) amostras de café fortificado com OTA na concentração do LQ e calculou-se a relação sinal ruído.

O LD foi calculado por meio do LQ de acordo com a fórmula a seguir:

$$LD = \frac{LQ}{3,3} \quad (8)$$

3.7.5 Exatidão

A exatidão foi expressa em termo de veracidade e precisão.

A veracidade é o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e um valor de referência. Quando não há Material de Referência Certificado (MRC) disponível, aceita-se que a veracidade das medições seja realizada através da

recuperação utilizando adição de quantidades conhecidas da substância a analisar em uma matriz branco (EC-657/2002).

Prepararam-se 3 (três) níveis de concentrações (controles): baixo (entre o primeiro e segundo ponto da curva), médio (no meio da curva) e alto (entre o penúltimo e último ponto da curva) nas matrizes café verde e torrado. Para o café verde, as concentrações testadas foram 5,0; 13,0; 20,0 µg/kg e para o café torrado foram 3,5; 5,0 e 6,5 µg/kg. Cada uma das soluções nessas concentrações foi injetada 5 vezes.

A concentração encontrada foi comparada com a concentração gravimétrica teórica e a recuperação estabelecida conforme a equação descrita abaixo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left[\frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \right] \times 100 \quad (9)$$

C_1 = concentração experimental obtida na matriz fortificada

C_2 = concentração experimental obtida na matriz não fortificada

C_3 = concentração teórica adicionada à matriz.

Para matrizes isentas do analito a ser determinado, são denominadas amostras branco de analito, no qual C_2 é igual a zero.

Os limites comumente aceitáveis para o parâmetro de recuperação no nível de contaminação de 1-10 µg/kg e ao redor de 10 µg/kg são na faixa de 70-110% (CODEX, 2007) e de 70-125 % (DIAZ, 2004).

Calculou-se a média dos resultados (\bar{x}), o desvio padrão (s) e o desvio padrão relativo (DPR) para cada nível de concentração, de acordo com as seguintes equações.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (10)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (11)$$

$$DPR\% = \frac{100 \times s}{\bar{x}} \quad (12)$$

A precisão foi avaliada em termos de repetitividade e precisão intermediária através do Desvio Padrão Relativo (DPR), levando em consideração o desvio padrão (s) e o valor médio dos resultados (\bar{x}).

A Repetitividade (DPR_r %) avalia o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição (mesmo analista, mesmo dia). A precisão intermediária (DPR_R %) é realizada em diferentes condições (diferentes analistas). Foram preparados os 3 (três) níveis de concentração, conforme estabelecido no item de recuperação. Cada nível foi injetado cinco vezes.

Os critérios estabelecidos pela Comissão do *Codex alimentarius* (EC, 2007) para repetitividade e precisão intermediária, são DPR_r menor ou igual a 20 %; e DPR_R menor ou igual a 30 %, nas três concentrações fortificadas (ponto baixo, médio e alto); condições

necessárias para uma boa repetitividade e precisão intermediária do método, respectivamente.

A igualdade estatística entre os dois analistas pode ser avaliada através do teste F e teste t.

3.7.6 Incerteza de Medição

Para estimativa da incerteza de medição na determinação de OTA no café verde e no café torrado por CLAE-EM/EM foi utilizado o método clássico, que envolveu as seguintes etapas: definição do mensurando, identificação das fontes de incerteza (diagrama de *Ishikawa*), quantificação dos componentes de incerteza, cálculo da incerteza padrão combinada e expandida.

3.7.6.1. Definição do Mensurando

A equação que define o mensurando para uma análise cromatográfica, foi expressa através da combinação entre a equação da reta da curva de calibração (cc), $y = (a \times x) + b$, relação existente entre a variável dependente (y), área do analito (A_{OTA}); e a variável independente (x), massa de OTA na amostra; considerando os coeficientes angular (a) e linear (b) (MÁRCO *et al*, 2007). O fator de recuperação (F_{rec}), a massa de solvente de extração (m_{MeOH}), a massa de reconstituído (m_R), a massa real de café (m_c), a massa de alíquota extraída (m_a) também foram considerados para a quantificação da concentração de OTA no café verde e café torrado; conforme equação descrita a seguir.

$$[OTA] = F_{rec} \times \frac{(A_{OTA} - b)}{a} \times \frac{(m_{MeOH} \times m_R)}{(m_c \times m_a)} \quad (13)$$

A partir da equação que define o mensurando foi possível identificar as fontes de incerteza.

3.7.6.2. Identificação das fontes de incerteza

Para a quantificação de ocratoxina A no café verde e no café torrado as contribuições das fontes de incerteza estão descritas no diagrama de causa e efeito (diagrama de *Ishikawa*), conforme a Figura 5. Este diagrama contém todas as grandezas de entrada advindas da equação do mensurando somadas aquelas que também influenciam na incerteza deste processo, mas que são provenientes de fontes externas como o preparo da solução padrão de ocratoxina A (P_{OTA}) e a diluição desta solução (C_f).

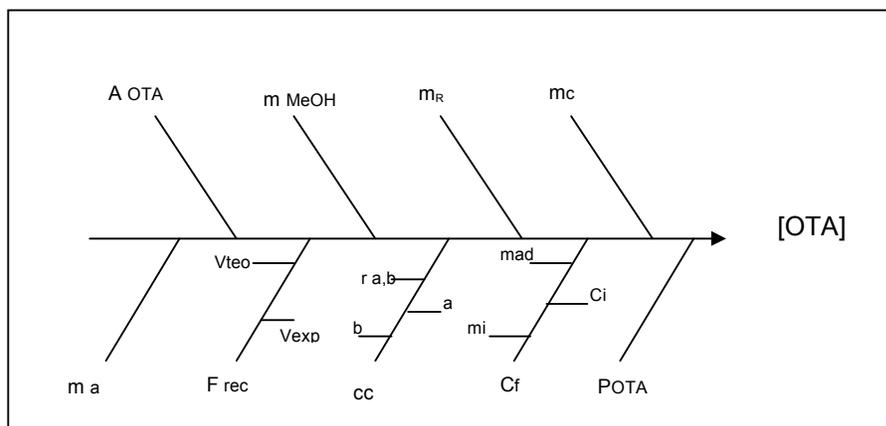


Figura 5. Diagrama de causa e efeito (Diagrama de *Ishikawa*) da análise de ocratoxina A no café verde e café torrado.

3.7.6.3. Quantificação dos componentes de incerteza

A quantificação dos componentes de incerteza foi realizada utilizando o método clássico, que emprega os cálculos matemáticos de derivada (coeficiente de sensibilidade) a fim de uniformizar as unidades das grandezas de entrada em relação à unidade do mensurando. O mensurando é derivado em relação a cada grandeza de entrada (fonte de incerteza) identificada como fonte de incerteza na Figura 5. Após esta etapa, foi multiplicado pela incerteza imediata que deverá ser avaliada e dependerá do tipo de incerteza que se está medindo. Se estas incertezas foram obtidas através de procedimentos experimentais, calcula-se pela razão do desvio padrão por raiz de n , onde n é o número de medições atrelada a um experimento (avaliação Tipo A). Caso a incerteza esteja relacionada a um valor de certificado, como incerteza de uma balança no qual os dados são fornecidos por um certificado de calibração, a incerteza imediata será a incerteza do certificado dividida pelo valor de fator de abrangência (k), avaliação Tipo B.

As equações relacionadas as incertezas imediatas (padrão) estão descritas a seguir:

$$u(\text{Tipo A}) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad u(\text{Tipo B}) = \frac{U_{\text{certificado}}}{k} \quad (14)$$

s = desvio padrão das medidas realizadas sob condições de repetitividade;

n = número de repetições;

$U_{\text{certificado}}$ = incerteza expandida fornecida pelo certificado de calibração;

k = fator de abrangência fornecido no certificado de calibração.

Com a aplicação do método clássico, que é o preconizado pelo Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (ABNT, 2003), as unidades das incertezas de cada uma das grandezas de entrada passam a ser expressas em termos de fração mássica, que é a unidade do mensurando.

As derivadas da equação do mensurando (OTA) em função de cada grandeza de entrada como área do analito (A_{OTA}); a massa de solvente de extração (m_{MeOH}), a massa de

reconstituído (m_R), a massa real de café (m_C), a massa de alíquota extraída (m_A) e fator de recuperação (F_{rec}) apresentadas a seguir.

3.7.6.3.1. Incerteza da Área do analito (A_{OTA})

Derivando a equação do mensurando [OTA] conforme descrito no item 3.7.7.1, em função da área obtida experimentalmente de OTA, tem-se a equação:

$$\frac{\partial [OTA]}{\partial A_{OTA}} = F_{rec} \times \frac{1}{a} \times \frac{(m_{MEOH} \times m_R)}{(m_C \times m_A)} \quad (15)$$

O resultado obtido desta equação deverá ser multiplicado pela incerteza imediata (padrão) correspondente de acordo com a classificação do tipo desta fonte (A ou B), a fim de se obter a incerteza da área do analito.

3.7.6.3.2. Incerteza do Solvente de extração (m_{MEOH})

Derivando a equação do mensurando [OTA] conforme descrito no item 3.7.7.1, em função do solvente de extração (m_{MEOH}), tem-se a equação:

$$\frac{\partial [OTA]}{\partial m_{MEOH}} = F_{rec} \times \frac{(A_{OTA} - b)}{a} \times \frac{m_R}{(m_C \times m_A)} \quad (16)$$

O resultado obtido desta equação deverá ser multiplicado pela incerteza imediata (padrão) correspondente de acordo com a classificação do tipo desta fonte (A ou B), a fim de se obter a incerteza do solvente de extração.

3.7.6.3.3. Incerteza da Massa reconstituída (m_R)

Derivando a equação do mensurando [OTA] conforme descrito no item 3.7.7.1, em função da massa reconstituída (m_R), tem-se a equação:

$$\frac{\partial [OTA]}{\partial m_R} = F_{rec} \times \frac{(A_{OTA} - b)}{a} \times \frac{m_{MEOH}}{(m_C \times m_A)} \quad (17)$$

O resultado obtido desta equação deverá ser multiplicado pela incerteza imediata (padrão) correspondente de acordo com a classificação do tipo desta fonte (A ou B), a fim de se obter a incerteza da massa reconstituída.

3.7.6.3.4. Incerteza da massa de café (m_c)

Derivando a equação do mensurando [OTA] conforme descrito no item 3.7.7.1, em função da massa de café (m_c), tem-se a equação:

$$\frac{\partial[OTA]}{\partial m_c} = -F_{rec} \times \frac{(A_{OTA} - b)}{a} \times \frac{(m_{MeOH} \times m_R)}{(m_c^2 \times m_A)} \quad (18)$$

O resultado obtido desta equação deverá ser multiplicado pela incerteza imediata (padrão) correspondente de acordo com a classificação do tipo desta fonte (A ou B), a fim de se obter a incerteza da massa de café.

3.7.6.3.5. Incerteza da massa de alíquota para extrair (m_a)

Derivando a equação do mensurando [OTA] conforme descrito no item 3.7.7.1, em função da massa de alíquota para extrair (m_a), tem-se a equação:

$$\frac{\partial[OTA]}{\partial m_A} = -F_{rec} \times \frac{(A_{OTA} - b)}{a} \times \frac{(m_{MeOH} \times m_R)}{(m_c \times m_A^2)} \quad (19)$$

O resultado obtido desta equação deverá ser multiplicado pela incerteza imediata (padrão) correspondente de acordo com a classificação do tipo (A ou B), a fim de se obter a incerteza da massa de alíquota para extrair.

3.7.6.3.6. Incerteza do Fator de recuperação (F_{rec})

Derivando a equação do mensurando [OTA], conforme descrito no item 3.7.7.1, em função do fator de recuperação, tem-se a seguinte equação:

$$\frac{\partial[OTA]}{\partial F_{rec}} = \frac{(A_{OTA} - b)}{a} \times \frac{(m_{MeOH} \times m_R)}{(m_c \times m_A)} \quad (20)$$

O resultado obtido desta equação deverá ser multiplicado pela incerteza imediata (padrão) correspondente. Apesar do fator de recuperação ser considerado uma incerteza do tipo A, a incerteza imediata relacionada esta fonte foi obtida de modo diferenciado. Como a recuperação de um extrato é avaliada através da razão entre o valor experimental (V_{exp}) e o valor teórico (V_{teo}), fontes de incerteza identificadas. A equação da recuperação foi considerada também nesta etapa:

$$recuperação = \frac{V_{exp}}{V_{teo}} \quad (21)$$

Derivando a equação referente a recuperação em função do valor experimental (V_{exp}) e o valor teórico (V_{teo}) tem-se as seguintes equações:

$$\frac{\partial Rec}{\partial V_{exp}} = \frac{1}{V_{teo}} \quad (22)$$

$$\frac{\partial Rec}{\partial V_{teo}} = -\frac{V_{exp}}{V_{teo}^2} \quad (23)$$

A incerteza combinada da recuperação será a raiz da soma quadrática referente aos termos relacionados a equação do mensurando (recuperação) para esta fonte que atribui o valor experimental (V_{exp}) e o valor teórico (V_{teo}), conforme equação a seguir.

$$u_c Rec = \sqrt{u_c^2 V_{exp} + u_c^2 V_{teo}} \quad (24)$$

Cada termo desta equação atribui o seu respectivo coeficiente de sensibilidade (derivada parcial), multiplicando pela incerteza imediata de cada uma das variáveis em questão, considerando a fonte valor experimental (V_{exp}) como tipo A e a fonte de valor teórico (V_{teo}) como tipo B. Este valor de $u_c Rec$ encontrado foi considerado como a incerteza imediata para a fonte de recuperação (u_{Frec}).

Desta forma, a derivada obtida através da equação do mensurando [OTA], em função do fator de recuperação, foi multiplicada por esta incerteza imediata para a fonte de recuperação (u_{Frec}) a fim de se obter a incerteza da fonte fator de recuperação (F_{rec}).

3.7.6.3.7. Incerteza da Curva de calibração (cc)

Apesar de ser uma grandeza que advém da equação, a incerteza da curva de calibração não é obtida na unidade das outras incertezas que vêm da equação que define o mensurando. Desta forma, tem-se que torná-la relativa (ABNT, 2003), dividindo pela unidade da abscissa.

Se a equação da reta para uma curva de calibração é expressa por:

$$y = (a \times x) + b \quad (25)$$

Evidenciando x , tem-se a equação que define a curva de calibração:

$$x = \frac{y - b}{a} \quad (26)$$

Desta forma, derivando x em função de a , tem-se a equação de C_a :

$$\frac{dx}{da} = -\left(\frac{y - b}{a^2}\right) = C_a \quad (27)$$

Derivando x em função de b , tem-se a equação de C_b :

$$\frac{dx}{db} = -\left(\frac{1}{a}\right) = C_b \quad (28)$$

C_a e C_b são os coeficientes de sensibilidade.

A incerteza combinada da curva de calibração não relativa, u'_{cc} , é dada pela seguinte equação:

$$u'_{cc} = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 \times u_{xi}^2 + 2 \times \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N c_i \times c_j \times u_{xi} \times u_{xj} \times r_{xi,xj}} \quad (29)$$

Considerando-se uma regressão linear e explicitando os valores tem-se:

$$u_{cc} = \sqrt{C_a^2 \times u_a^2 + C_b^2 \times u_b^2 + 2 \times C_a \times C_b \times u_a \times u_b \times r_{ab}} \quad (30)$$

Sendo os valores de incerteza do coeficiente angular (u_a), incerteza do coeficiente linear (u_b) e coeficiente de correlação entre a e b ($r_{a,b}$) definidos pelas seguintes equações:

$$u_a = \sqrt{\frac{n \times (\sum \text{resíduo}^2) / (n-2)}{(n \times \sum x^2) - (\sum x)^2}} \quad (31)$$

$$u_b = \sqrt{\frac{((\sum \text{resíduo}^2) / (n-2)) \times \sum x^2}{(n \times \sum x^2) - (\sum x)^2}} \quad (32)$$

$$r_{a,b} = -\frac{\sum x}{\sqrt{n \times \sum x^2}} \quad (33)$$

$x = m_{\text{analito}}$
 $\text{resíduo}^2 = (x - x_{\text{calc}})^2$
 $n = \text{pontos} \times \text{replicatas}$

Para obtenção da incerteza relativa (u_{RCC}) deve-se dividir a incerteza combinada da curva de calibração (u_{cc}) pelos valores experimentalmente obtidos (concentração do mensurando), aproximadamente de 13,0 ng/g e 5,0 ng/g para café verde e café torrado, respectivamente.

3.7.6.3.8. Incerteza do preparo de padrão da solução de ocratoxina A

Para a estimativa da incerteza da solução padrão de ocratoxina A, além dos documentos já mencionados, utilizou-se o procedimento descrito por SARTORI *et al.*, 2009.

A incerteza padrão combinada da concentração das soluções padrão de Ocratoxina A deve ser determinada combinando-se as incertezas relacionadas a equação que define o mensurando, que é o cálculo da concentração de ocratoxina A, considerando as grandezas da equação como a absorvância média das leituras das soluções padrão de ocratoxina A medidas em triplicata; a Massa Molecular dessa substância, o coeficiente de absortividade molar e o fator de correção (FC) do espectrofotômetro.

$$C_{\text{ocratoxina}} = \frac{\bar{A} \times 1000 \times MM \times FC}{\varepsilon} \quad (34)$$

\bar{A} = Absorvância média;
 MM = Massa Molecular da Ocratoxina A = 403;
 ε = coeficiente de absortividade molar específico (tabelado) = 5440;
 FC = Fator de correção.

A partir desta equação que define o mensurando, concentração de ocratoxina A é possível identificar as fontes de incerteza, descritas no diagrama de causa e efeito (diagrama de *Ishikawa*), conforme a Figura 6. Este diagrama contém todas as grandezas de entrada advindas desta equação como absorvância média da leitura da ocratoxina A (\bar{A}) obtida através da leitura da solução de OTA pelo espectrofotômetro na região de UV, Massa Molecular da ocratoxina A (MM), coeficiente de absortividade molar específico (ε) e Fator de correção (FC).

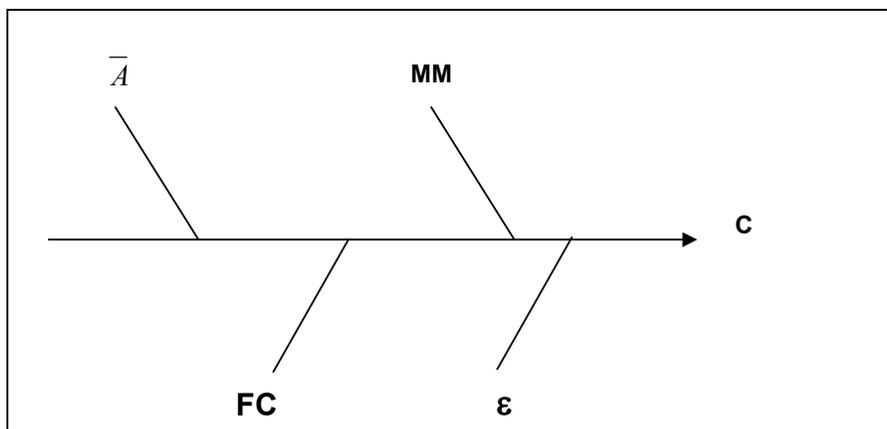


Figura 6. Diagrama de causa e efeito (Diagrama de *Ishikawa*) referente a concentração da solução padrão de ocratoxina A.

A quantificação de cada componente de incerteza foi realizada utilizando o método clássico, empregando os cálculos matemáticos de derivada (coeficiente de sensibilidade) a fim de uniformizar as unidades das grandezas de entrada em relação à unidade do mensurando. O mensurando foi derivado em relação a cada grandeza de entrada (fonte de incerteza), conforme descrito a seguir.

a) Repetitividade da absorvância

A equação relacionada a incerteza da repetitividade da absorvância corresponde a multiplicação do termo relacionado a derivada do mensurando que corresponde a concentração da solução padrão de ocratoxina, em função da absorvância; pelo segundo termo, a incerteza imediata (desvio padrão sobre raiz de n), devido a classificação tipo A.

$$u_c(\bar{A}) = \frac{1000 \times MM \times FC}{\varepsilon} \times \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (35)$$

s = desvio padrão das absorvâncias

n = número de leituras realizadas

A partir da equação que define o mensurando, repetitividade da absorvância, é possível identificar as fontes de incerteza, descritas no diagrama de causa e efeito (diagrama de *Ishikawa*), conforme a Figura 7. Este diagrama contém todas as grandezas de entrada advindas desta equação como Massa Molecular da ocratoxina A (MM), coeficiente de absorvidade molar específico (ε) e Fator de correção (FC).

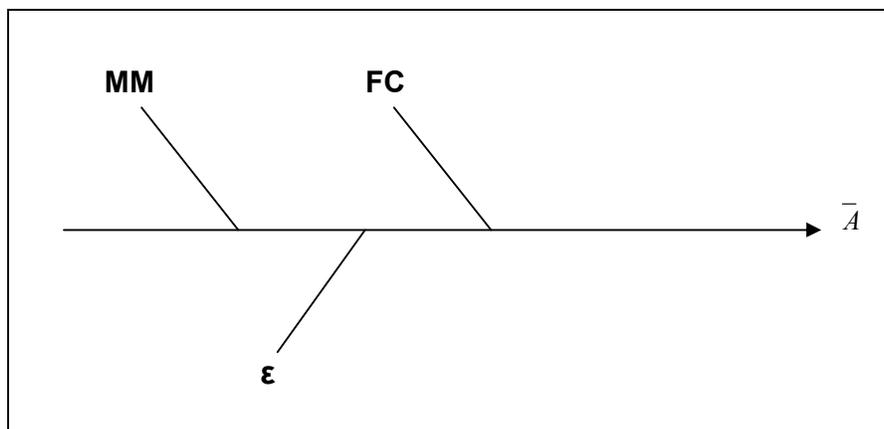


Figura 7. Diagrama de causa e efeito (Diagrama de *Ishikawa*) referente a repetitividade de absorvância da solução padrão de ocratoxina A.

b) Coeficiente de absorvidade molar

A incerteza avaliada para o coeficiente de absorvidade molar, $u(\epsilon)$ deve ser preferencialmente obtida através de estudos colaborativos coordenados pela AOAC. No entanto, verificou-se que não havia estudos colaborativos para este cálculo segundo a AOAC (TRUCKNESS, 2005).

Na tentativa de se realizar uma estimativa desse valor de incerteza, realizou-se uma pesquisa abrangente em relação aos ϵ existentes para as micotoxinas. Foram encontrados somente dados para a aflatoxina no qual existe um estudo colaborativo para as aflatoxinas B1, B2, G1, G2 onde cada uma possui quatro (4) valores de ϵ relacionados a solventes diferentes (metanol, acetonitrila, benzeno e acetonitrila, tolueno e acetonitrila) (NEISHEIM *et al.*, 1999). Para aflatoxina M1 existem dois (2) valores de ϵ , um para benzeno e acetonitrila, e outro, para acetonitrila. Para aflatoxina tipo M2 só há um resultado referente ao solvente acetonitrila. Para as demais micotoxinas (fumonisina, patulina, ocratoxina, esterigmattoxina e zearalenona) só existe um valor de ϵ para cada. Desta forma, não há possibilidade de se calcular o desvio padrão.

Concluiu-se que considerar a incerteza do coeficiente de absorvidade molar para ocratoxina A como o valor encontrado na literatura para aflatoxina seria incorreto, já que os solventes utilizados para ambas as micotoxinas não são correspondentes. Desta forma, esta fonte de incerteza não foi considerada.

Para solucionar este problema, o ideal seria a promoção de estudos colaborativos para determinação do coeficiente de absorvidade molar para OTA, a fim de se determinar a sua incerteza que irá contribuir na incerteza final do preparo de padrão da solução de ocratoxina A.

c) Fator de Correção (FC)

A incerteza padrão de medição de FC (u_{FC}) foi determinada através da combinação dos componentes da incerteza que definem o mensurando, conforme a equação a seguir:

$$FC = \frac{3 \times \varepsilon_{nominal}}{(\varepsilon_1 + \varepsilon_2 + \varepsilon_3)} \quad (36)$$

ε_1 = coeficiente de absorvidade molar da solução de dicromato de potássio (0,25 mM);
 ε_2 = coeficiente de absorvidade molar da solução de dicromato de potássio (0,125 mM);
 ε_3 = coeficiente de absorvidade molar da solução de dicromato de potássio (0,0625 mM);
 $\varepsilon_{nominal}$ = coeficiente de absorvidade molar para o dicromato de potássio tabelado (AOAC).

Considerou-se as incertezas dos coeficientes de absorvidade molar obtido para cada solução de dicromato de potássio (ε_{medido}), determinadas através do método clássico, derivando as equações que definem os coeficientes (ε_1 , ε_2 e ε_3), obtidos para as soluções de dicromato de potássio, conforme descrito a seguir.

Determinação da incerteza de ε_1

O coeficiente de absorvidade molar (ε_1) determinado para a Solução (1) de dicromato de potássio (0,25 M) foi obtido através da seguinte equação:

$$\varepsilon_1 = \frac{\bar{A}_1 \times 1000 \times mmol \times V_{b(1)}}{m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times p} \quad (37)$$

\bar{A}_1 = média das absorvâncias medidas para a Solução 1;

$m_{K_2Cr_2O_7(1)}$ = massa de dicromato de potássio pesada;

$V_{b(1)}$ = volume do balão com 1000 mL de capacidade;

p = pureza do dicromato de potássio.

A incerteza de cada contribuição em separado, como a incerteza da repetitividade obtida através da leitura das absorvâncias, da massa de dicromato de potássio, do volume de balão volumétrico e da pureza referente ao dicromato de potássio foi devidamente multiplicada por cada incerteza padrão avaliada para cada variável, obtendo as equações a seguir.

$$\text{Repetitividade das absorvâncias: } u_c(\bar{A}_1) = \frac{1000 \times mmol \times V_{b(1)}}{p \times m_{K_2Cr_2O_7(1)}} \times \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (38)$$

$$\text{Massa de dicromato pesada: } u_c(m_{K_2Cr_2O_7(1)}) = \frac{1000 \times mmol \times \bar{A}_1 \times V_{b(1)}}{p \times m_{K_2Cr_2O_7(1)}^2} \times \frac{U_{certificado}}{k} \quad (39)$$

$$\text{Volume do balão (Vb₁): } u_c(V_{b(1)}) = \frac{1000 \times \bar{A}_1 \times mmol}{p \times m_{K_2Cr_2O_7(1)}} \times \frac{U_{certificado}}{k} \quad (40)$$

$$\text{Pureza do padrão de dicromato: } u_c(p) = -\frac{1000 \times \text{mmol} \times \bar{A}_1 \times V_{b(1)}}{p^2 \times m_{K_2Cr_2O_7(1)}} \times \frac{U_{\text{certificado}}}{k} \quad (41)$$

A incerteza padrão combinada é a raiz quadrada positiva do somatório dos produtos das derivadas parciais (coeficientes de sensibilidade) com a incerteza padrão avaliada. Desta forma, a Incerteza padrão combinada para ε_1 foi a soma quadrática de todas as devidas contribuições conforme equação a seguir.

$$u_c(\varepsilon_1) = \sqrt{u_c(\bar{A}_1)^2 + u_c(m_{K_2Cr_2O_7})^2 + u_c(p)^2 + u_c(V_{b(1)})^2} \quad (42)$$

Determinação da incerteza de ε_2

O coeficiente de absorvância molar (ε_2) determinado para a Solução (2) de dicromato de potássio foi obtido através da equação a seguir.

$$\varepsilon_2 = \frac{\bar{A}_2 \times 1000 \times \text{mmol} \times V_{b(1)} \times V_{b(2)}}{V_{p1} \times m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times p} \quad (43)$$

\bar{A}_2 = média das absorvâncias medidas para a Solução 2

$m_{K_2Cr_2O_7(1)}$ = massa de dicromato de potássio pesada

$V_{b(1)}$ = volume do balão com 1000 mL de capacidade utilizado no preparo da Solução 1

$V_{b(2)}$ = volume do balão com 50 mL de capacidade utilizado para preparar a Solução 2

$V_{p(1)}$ = volume da pipeta com 25 mL de capacidade utilizada para transferir a alíquota da Solução 1

P = pureza do dicromato de potássio

$$\text{Repetitividade das absorvâncias: } u_{\bar{A}_2} = \frac{1000 \times \text{mmol} \times V_{b(1)} \times V_{b(2)}}{V_{p1} \times m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times p} \times \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (44)$$

$$\text{Pureza do padrão de dicromato: } u_p = -\frac{1000 \times \text{mmol} \times \bar{A}_2 \times V_{b(1)} \times V_{b(2)}}{p^2 \times m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times V_{p(1)}} \times \frac{U_{\text{certificado}}}{k} \quad (45)$$

$$\text{Volume do balão 1 (Vb}_1\text{): } u_{V_{b(1)}} = \frac{\bar{A}_2 \times 1000 \times \text{mmol} \times V_{b(2)}}{V_{p1} \times m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times p} \times \frac{U_{\text{certificado}}}{k} \quad (46)$$

$$\text{Volume do balão 2 (Vb}_2\text{): } u_{V_{b(2)}} = \frac{\bar{A}_2 \times 1000 \times \text{mmol} \times V_{b(1)}}{V_{p1} \times m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times p} \times \frac{U_{\text{certificado}}}{k} \quad (47)$$

$$\text{Volume da pipeta 1 (V}_{p1}\text{): } u_{V_{p1}} = -\frac{1000 \times \text{mmol} \times \bar{A}_2 \times V_{b(1)} \times V_{b(2)}}{p \times m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times V_{p(1)}^2} \times \frac{U_{\text{certificado}}}{k} \quad (48)$$

$$\text{Massa de dicromato pesada: } u(m_{K_2Cr_2O_7(1)}) = -\frac{\bar{A}_2 \times 1000 \times \text{mmol} \times V_{b(1)} \times V_{b(2)}}{p \times V_{p1} \times m_{K_2Cr_2O_7(1)}} \times \frac{U_{\text{certificado}}}{k} \quad (49)$$

Desta forma, devido a definição da incerteza padrão combinada ser a soma quadrática de todas as devidas contribuições para ε_2 tem-se a seguinte equação.

$$u_c(\varepsilon_2) = \sqrt{(u_{\bar{A}_2})^2 + (u_{m_{K_2Cr_2O_7(1)}})^2 + (u_{V_{p(1)}})^2 + (u_{V_{b(1)}})^2 + (u_{V_{b(2)}})^2 + (u_p)^2} \quad (50)$$

Determinação da incerteza de ε_3

O coeficiente de absorvidade molar (ε_3) determinado para a Solução (3) de dicromato de potássio foi obtida através da equação a seguir. A incerteza foi determinada combinando-se as derivadas parciais (coeficientes de sensibilidade) de cada grandeza de entrada.

$$\varepsilon_3 = \frac{\bar{A}_3 \times 1000 \times \text{mmol} \times V_{b(1)} \times V_{b(2)} \times V_{b(3)}}{V_{p1} \times V_{p2} \times m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times p} \quad (51)$$

\bar{A}_3 = média das absorvâncias medidas para a Solução 3;

$m_{K_2Cr_2O_7(1)}$ = massa de dicromato de potássio pesada;

$V_{b(1)}$ = volume do balão com 1000 mL de capacidade;

$V_{b(2)}$ = volume do balão com 50 mL de capacidade utilizado no preparo da solução 2;

$V_{b(3)}$ = volume do balão com 50 mL de capacidade utilizada no preparo da solução 3;

$V_{p(1)}$ = volume da pipeta com 25 ml de capacidade utilizada no preparo da solução 2;

$V_{p(2)}$ = volume da pipeta com 25 ml de capacidade utilizada no preparo da solução 3;

p = pureza do dicromato de potássio.

$$\text{Repetitividade das absorvâncias: } u_{A_3} = \frac{1000 \times \text{mmol} \times V_{b(1)} \times V_{b(2)} \times V_{b(3)}}{V_{p1} \times V_{p2} \times m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times p} \times \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (52)$$

$$\text{Pureza do padrão de dicromato: } u_p = -\frac{\bar{A}_3 \times 1000 \times \text{mmol} \times V_{b(1)} \times V_{b(2)} \times V_{b(3)}}{V_{p1} \times V_{p2} \times m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times p^2} \times \frac{U_{\text{certificado}}}{k} \quad (53)$$

$$\text{Volume do balão 1 (V}_{b1}\text{): } u(V_{b(1)}) = \frac{\bar{A}_3 \times 1000 \times \text{mmol} \times V_{b(2)} \times V_{b(3)}}{V_{p1} \times V_{p2} \times m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times p} \times \frac{U_{\text{certificado}}}{k} \quad (54)$$

$$\text{Volume do bal\~{a}o 2 (Vb}_2\text{): } uV_{b(2)} = \frac{\bar{A}_3 \times 1000 \times \text{mmol} \times V_{b(1)} \times V_{b(3)}}{V_{p1} \times V_{p2} \times m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times p} \times \frac{U_{\text{certificado}}}{k} \quad (55)$$

$$\text{Volume do bal\~{a}o 3 (Vb}_3\text{): } uV_{b(3)} = \frac{\bar{A}_3 \times 1000 \times \text{mmol} \times V_{b(1)} \times V_{b(2)}}{V_{p1} \times V_{p2} \times m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times p} \times \frac{U}{k} \quad (56)$$

$$\text{Volume da pipeta 1 (Vp}_1\text{): } uV_{p(1)} = -\frac{\bar{A}_3 \times 1000 \times \text{mmol} \times V_{b(1)} \times V_{b(2)} \times V_{b(3)}}{(V_{p1})^2 \times V_{p2} \times m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times p} \times \frac{U_{\text{certificado}}}{k} \quad (57)$$

$$\text{Volume da pipeta 2 (Vp}_2\text{): } uV_p = -\frac{\bar{A}_3 \times 1000 \times \text{mmol} \times V_{b(1)} \times V_{b(2)} \times V_{b(3)}}{V_{p1} \times (V_{p2})^2 \times m_{K_2Cr_2O_7(1)} \times p} \times \frac{U_{\text{certificado}}}{k} \quad (58)$$

$$\text{Massa de dicromato: } u(m_{K_2Cr_2O_7(1)}) = -\frac{\bar{A}_3 \times 1000 \times \text{mmol} \times V_{b(1)} \times V_{b(2)} \times V_{b(3)}}{V_{p1} \times V_{p2} \times (m_{K_2Cr_2O_7(1)})^2 \times p} \times \frac{U_{\text{certificado}}}{k} \quad (59)$$

Incerteza combinada para ε_3 : (60)

$$u(\varepsilon_3) = \sqrt{(u_{\bar{A}_3})^2 + (u_{m_{K_2Cr_2O_7(1)}})^2 + (u_{V_{p(1)}})^2 + (V_{p(2)})^2 + (u_{V_{b(1)}})^2 + (u_{V_{b(2)}})^2 + (u_{V_{b(3)}})^2 + (u_p)^2}$$

A incerteza combinada dos coeficientes de absorvidade molar medidos foi calculada atrav\~{e}s da m\~{e}dia da soma quadr\~{a}tica dos ε obtidos para as tr\~{e}s (3) equa\~{c}o\~{e}s das solu\~{c}o\~{e}s, combinando os resultados obtidos para determina\~{c}o\~{e} das incertezas de ε_1 , ε_2 e ε_3 conforme equa\~{c}o\~{e} a seguir.

$$u_c(\bar{\varepsilon}_{\text{medido}}) = \sqrt{\frac{u_c(\varepsilon_1)^2 + u_c(\varepsilon_2)^2 + u_c(\varepsilon_3)^2}{3}} \quad (61)$$

Posteriormente, o resultado da incerteza combinada foi dividido pelo valor m\~{e}dio medido a fim de relativizar e obter a incerteza adimensional conforme a equa\~{c}o\~{e} a seguir.

$$u_r(\bar{\varepsilon}_{\text{medido}}) = \sqrt{\left(\frac{u_c(\bar{\varepsilon}_{\text{medido}})}{\bar{\varepsilon}_{\text{medido}}}\right)^2} \quad (62)$$

A incerteza da absorvidade molar tabelada ($u_{\varepsilon_{\text{nominal}}}$) do dicromato de pot\~{a}sio obtida atrav\~{e}s da leitura de solu\~{c}o\~{e} de dicromato de pot\~{a}sio realizada por um espectrofot\~{o}metro foi considerada 0,3 % (RAND, 1969).

A incerteza de medição da fonte fator de correção, $u(FC)$, foi obtida através da combinação das incertezas relativas como demonstrado na equação a seguir.

$$u(FC) = \sqrt{(u_r(\varepsilon_{no\ min\ al}))^2 + (u_r(\varepsilon_{medido}))^2} \quad (63)$$

d) Massa Molecular

Considerando o número de átomos de todos os elementos dispostos na fórmula química do mensurando em questão, OTA ($C_{20}H_{18}ClNO_6$), pode-se estimar o cálculo de incerteza para a Massa Molecular de acordo com WIESER (2006), considerando uma distribuição retangular. A incerteza combinada do Massa Molecular da OTA será a raiz da soma quadrática da incerteza de cada elemento.

As fontes de incerteza foram identificadas como os átomos presentes da fórmula química da ocratoxina A, como o Carbono (C), Hidrogênio (H), Cloro (Cl), Nitrogênio (N) e Oxigênio (O). A Figura 8 apresenta o diagrama de causa e efeito (diagrama de *Ishikawa*).

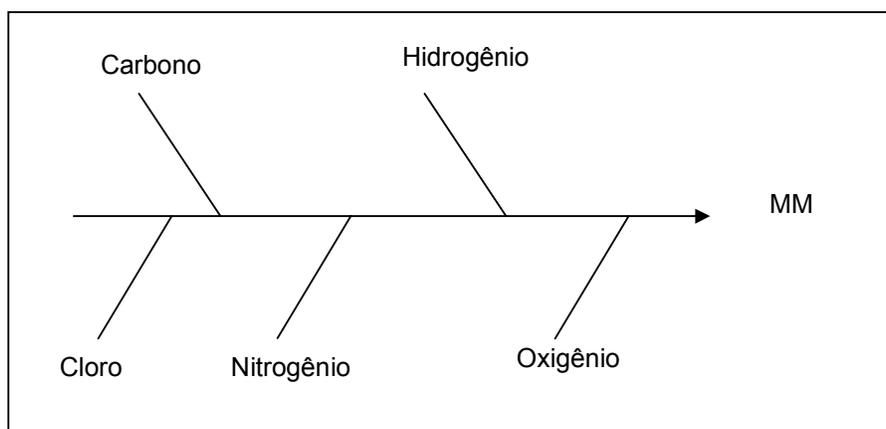


Figura 8. Diagrama de causa e efeito (Diagrama de *Ishikawa*) referente a massa molecular da ocratoxina A.

A incerteza padrão combinada da concentração da solução padrão da OTA foi calculada a partir da raiz da soma quadrática de cada termo: incerteza da repetitividade da absorção da ocratoxina (A), do fator de correção ($uc(FC)$) e da Massa Molecular ($uc(MM)$).

$$u_c(C_{Ocratoxina\ A}) = \sqrt{uc(A)^2 + uc(FC)^2 + uc(MM)^2} \quad (64)$$

Para a avaliação da incerteza de medição da solução padrão de ocratoxina A, outro método alternativo também pode ser utilizado. Este método é baseado no máximo de precisão e exatidão esperados na calibração do espectrofotômetro na região do Ultravioleta, utilizando soluções de dicromato de potássio, com a repetitividade da absorvância esperada por esta técnica, em termos de coeficiente de variação (CV %), sendo inferior a 3 % (0,03), de acordo com RAND (1969). Além disto, segundo a AOAC (2005), o fator de correção (FC) deve ter valor compreendido entre a faixa de 0,95 e 1,05; ou seja, $1,00 \pm 0,05$. A fim de

abranger um melhor resultado frente à estimativa desta incerteza, assumiu-se uma distribuição retangular ao invés de distribuição triangular.

Desta forma, a equação alternativa, que define a incerteza de medição da concentração da solução padrão de ocratoxina A é:

$$u_c(C_{\text{Ocratoxina A}}) = C_{\text{Ocratoxina A}} \sqrt{(0,03)^2 + \left(\frac{0,05}{\sqrt{3}}\right)^2} \quad (65)$$

A incerteza expandida será expressa multiplicando a incerteza padrão combinada pelo fator de abrangência ($k=2$) obtendo o nível de confiança de 95,0 %.

3.7.6.3.9. Incerteza da diluição da solução padrão de ocratoxina A

O processo de diluição ocorre através da obtenção de uma concentração final (c_f) em concentração inferior a concentração inicial (c_i), solução concentrada. Retira-se uma massa inicial (m_i) da solução concentrada e adiciona-se uma massa de solvente ($m_{\text{adicionada}}$) a fim de obter uma massa final, referente a solução diluída pretendida. Desta forma, a massa final (m_f) é a massa inicial (m_i) adicionada de uma massa ($m_{\text{adicionado}}$), dependendo da concentração final da solução almejada, conforme a equação:

$$m_i \times c_i = m_f \times c_f \quad (66)$$

$$m_f = m_i + m_{\text{adicionado}} \quad (67)$$

Substituindo a massa final na equação referente a diluição da solução padrão, tem-se:

$$m_i \times c_i = (m_i + m_{\text{adicionado}}) \times c_f \quad (68)$$

Evidenciando a concentração final (C_f), tem-se a seguinte equação que define o mensurando nesta etapa:

$$C_f = \frac{m_i \times c_i}{(m_i + m_{\text{adicionado}})} \quad (69)$$

As fontes de incerteza foram identificadas como a massa inicial (m_i), concentração inicial (c_i) e massa adicionada ($m_{\text{adicionado}}$). A Figura 9 apresenta o diagrama de causa e efeito (diagrama de *Ishikawa*) para esta etapa de diluição da solução padrão de Ocratoxina.

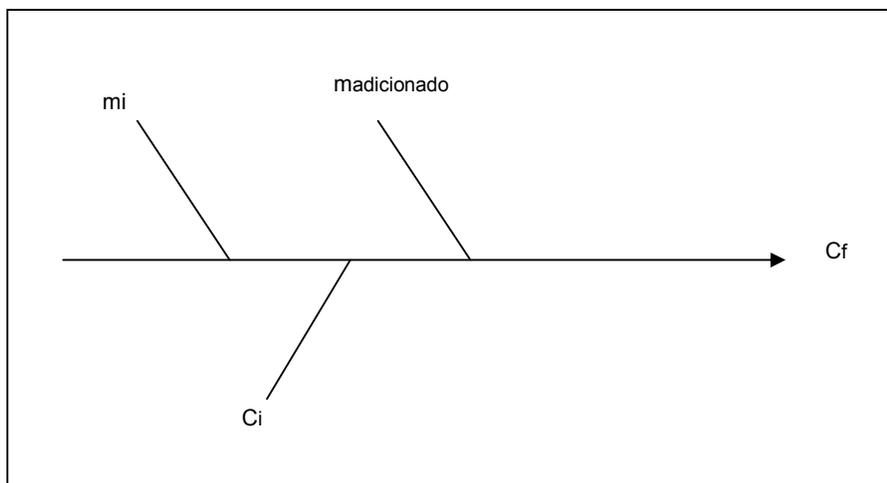


Figura 9. Diagrama de causa e efeito (Diagrama de *Ishikawa*) referente a diluição da solução padrão de ocratoxina A.

Derivando a equação referente a concentração final em função da massa inicial (m_i), em função da massa adicionada (m_{adic}) e em função da concentração inicial (c_i), tem-se as seguintes equações:

$$\frac{\partial C_f}{\partial m_{adic}} = -\frac{m_i \times c_i}{(m_i + m_{adic})^2} \quad (70)$$

$$\frac{\partial C_f}{\partial C_i} = \frac{m_i}{(m_i + m_{adic})} \quad (71)$$

$$\frac{\partial C_f}{\partial m_i} = \frac{m_{adic} \times c_i}{(m_i + m_{adic})^2} \quad (72)$$

As incertezas destas fontes são do tipo B estando relacionada às incertezas expandida dos certificados de calibração da balança e a um fator de abrangência (k) expresso no certificado de calibração da balança.

A incerteza combinada da diluição da solução padrão de trabalho será a raiz da soma quadrática referente aos termos da equação do mensurando de concentração final, que atribui concentração inicial, massa adicionada e massa inicial, conforme equação a seguir.

$$u_c c_f = \sqrt{u_c^2 c_i + u_c^2 m_{adic} + u_c^2 m_i} \quad (73)$$

Cada termo desta equação atribuiu o seu respectivo coeficiente de sensibilidade (derivada parcial), multiplicando pela incerteza da fonte de cada uma das variáveis em questão. Para a incerteza em função da concentração da solução inicial, atribuiu-se a incerteza do preparo da solução (u_{solmae}). As demais incertezas, como estiveram relacionadas com procedimentos de pesagem, considerou-se a U/k , conforme as equações a seguir:

$$u_{cf} = \sqrt{\left(\frac{m_i}{m_i + m_{adicionado}} \times u_{solmae}\right)^2 + \left(-\frac{m_i \times c_i}{(m_i + m_{adicionado})^2} \times \frac{U}{k}\right)^2 + \left(\frac{m_{adicionado} \times c_i}{(m_i + m_{adicionado})^2} \times \frac{U}{k}\right)^2} \quad (74)$$

3.7.6.4. Incerteza Padrão Combinada

Com as grandezas de entrada definidas no diagrama de causa e efeito, define-se a equação da incerteza padrão combinada (u_c) conforme a equação a seguir:

$$u_c[OTA] = [OTA] \sqrt{u(A_{OTA})^2 + u(m_{MeOH})^2 + u(m_R)^2 + u(m_c)^2 + u(m_a)^2 + u(F_{rec}) + u(cc)^2 + u(cf)^2 + u(P_{OTA})^2} \quad (75)$$

Esta equação considera as grandezas de entradas relacionadas a equação do mensurando, como o fator de recuperação (Frec), a massa de solvente de extração (mMeOH), a massa de reconstituído (m_R), a massa real de café (m_c), a massa de alíquota extraída (m_a); e as que não estão contempladas na equação de determinação do mensurando, que devem ser combinadas relativamente, transformando cada termo em adimensional, como é o caso da incerteza da curva de calibração, do preparo e diluição da solução padrão de OTA.

Com o cálculo da incerteza padrão combinada e do fator de abrangência, realiza-se a etapa final, que é a expressão da incerteza expandida.

A incerteza expandida desta análise foi expressa da seguinte forma:

$$U = u_c \times k \quad (76)$$

u_c = incerteza padrão combinada

k = fator de abrangência

Desta forma, a incerteza expandida da concentração de ocratoxina A no café verde e café torrado foi expressa de acordo com a equação:

(77)

$$U = [OTA] \times \left(\sqrt{u(A_{OTA})^2 + u(m_{MeOH})^2 + u(m_R)^2 + u(m_c)^2 + u(m_a)^2 + u(F_{rec}) + u(cc)^2 + u(cf)^2 + u(P_{OTA})^2} \right) \times k$$

O fator de abrangência (k) deve ser estabelecido em dependência do tipo de incerteza que predomina. Para a predominância de incertezas do tipo A, o k deve ser calculado, considerando-se o grau de liberdade efetivo $\nu_{efetivo}$ com contribuição de 95,0 % conforme a equação a seguir. No denominador desta equação, consideram-se apenas as grandezas de entrada tipo A e os seus respectivos graus de liberdade.

$$\nu_{eff} = \frac{(u_c)^4}{\sum \frac{GE(tipoA)^4}{gl}} \quad (78)$$

No entanto, para predominância das incertezas do tipo B, o k deve ser considerado igual a 2.

3.8 Estabilidade

A diretiva 2002/657/EC estabelece que a estabilidade do padrão em solução é importante, uma vez que a instabilidade da substância a ser analisada pode dar origem a desvios significativos no resultado de análise, sendo a monitorização das condições de armazenamento parte do sistema de acreditação do laboratório.

Para verificação da estabilidade de ocratoxina A em solução padrão foram preparadas soluções frescas em metanol grau pesticida, na concentração de 100,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Esta foi dividida em 30 alíquotas que foram armazenadas em vial âmbar sob diferentes condições de temperaturas: $-20\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,3$ (*freezer*), $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,3$ (geladeira) e $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,3$ (armário), respectivamente, permanecendo 10 alíquotas em cada temperatura.

As amostras de café verde e torrado foram fortificados na concentração de 13,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, extraídas e armazenadas a temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,3$ (*freezer*), $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,3$ (geladeira), permanecendo 10 amostras em cada temperatura.

As soluções padrão e os extratos das amostras de café verde e café torrado foram analisadas por 30 dias, sendo o tempo inicial (T_0) no dia em que foram preparadas e T_7 , T_{14} e T_{30} , sendo sete, quatorze e trinta dias após o preparo, respectivamente.

A estabilidade foi determinada quando o primeiro fenômeno de degradação ocorreu. O critério estabelecido foi quando o resultado obtido das determinações ao longo do tempo começou a apresentar variação superior a 10 % em relação a determinação realizada no tempo inicial do estudo (T_0).

Para as análises que utilizam a técnica CLAE-EMⁿ, há uma maior variação de resultados do dia-a-dia quando comparado com a técnica CLAE-UV. Desta forma, houve necessidade de preparo de uma solução controle em todos os dias de análise para que esta variação fosse minimizada e as áreas pudessem ser comparadas em relação às amostras estocadas (CROUBELS *et al.*, 2003).

3.9 Análise de Amostras de Café Torrado

Atualmente duas mil e quinhentas (2500) marcas de café estão registradas pela ABIC e disponíveis no comércio varejista brasileiro. No entanto, apenas 105 amostras são comercializadas no Estado do Rio de Janeiro, o que representa 4,2 % do total de amostras no território nacional.

Para comprovação da eficiência do método desenvolvido, 40 diferentes marcas de café torrado e moído obtidas no comércio do Rio de Janeiro foram analisadas, o que representa aproximadamente 38,0 % do total de amostras no Estado do Rio de Janeiro.

3.10 Teor de Umidade da Matriz de Café Verde e Café Torrado

Para determinação do teor de umidade foi realizada uma adaptação do método de perda por dessecação em estufa do Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO, 2008), pesando-se 2,0 g de café, em frasco de vidro previamente seco e tarado. Os frascos foram deixados em estufa à 105 °C por cinco horas. Este tempo foi pré-determinado por experimentos anteriores, que avaliaram que cinco horas seriam suficientes para atingir o peso constante. Em seguida, os frascos foram resfriados em dessecador e pesados.

A análise foi realizada em quintuplicata.

O percentual de umidade (% umidade) foi determinado através da diferença da massa final correspondente ao frasco e amostra seca diminuído da massa do frasco vazio, dividido pela massa de amostra pesada conforme equação a seguir:

$$\%umidade = 100 - \left[\frac{(M - m)}{Ma} \times 100 \right] \quad (79)$$

M = Massa final (massa frasco + massa de café após secagem);

m = Massa do frasco vazio;

Ma = Massa inicial de café pesada.

3.11 Pureza da Solução Padrão de Ocratoxina A

Os padrões de substâncias orgânicas comercialmente disponíveis normalmente são acompanhados de um certificado com um valor declarado da pureza da substância principal. No entanto, esses resultados podem ser considerados apenas como uma estimativa, que normalmente está baseada na razão de áreas obtidas por técnicas cromatográficas. O uso desses valores de pureza nos cálculos são necessários para determinação de um valor de propriedade de um MR, a fim de fornecer rastreabilidade metrológica a este valor. Portanto, torna-se necessária a adoção do procedimento de determinação da pureza dos padrões.

Na avaliação da pureza de uma substância orgânica, as fontes principais de impureza devem ser investigadas. Dentre as principais fontes estão os materiais de partida, produtos intermediários e subprodutos de síntese, produtos de degradação, solventes, água e compostos inorgânicos (WIBERG *et al.*, 2004).

Os métodos empregados para avaliação da pureza (BIPM, 2003), podem ser classificados como métodos diretos ou indiretos. Os primeiros quantificam diretamente o componente de interesse, através das técnicas como a CDV – Calorimetria diferencial de varredura (*Differential Full Scanning Calorimetry*, DSC), e a RMN – Ressonância Magnética Nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR). No método indireto, as frações mássicas individuais de cada impureza podem ser quantificadas, como: CG-DIC, CG-EM, CLAE-UV, CLAE-EM e Karl-Fischer.

A determinação da pureza dos padrões comerciais possui grande importância, pois é indispensável para assegurar a confiabilidade metrológica e prover rastreabilidade internacional às medições químicas realizadas.

Para confirmar o resultado da pureza de OTA descrita no certificado fornecido pelo fabricante (98,0%), a análise de pureza do padrão foi realizada utilizando o equipamento Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) e duas colunas cromatográficas com polaridades ligeiramente diferentes, Coluna de

octailsilica - Pursuit C₈ (150 mm x 2,0 mm i.d., 5 µm), e Coluna de octadesilsilano - Pursuit C₁₈ (150 mm x 2,0 mm i.d., 5 µm), ambas da empresa Varian (Walnut Creek, CA, E.U.A.).

A fase móvel utilizada no sistema CLAE-DAD consiste em uma mistura de água Tipo 1: acetonitrila: ácido fosfórico (60: 40: 1).

As soluções padrões de trabalho da ocratoxina A na fase móvel na concentração de 40 µg/mL foram analisadas em 9 (nove) replicatas, bem como as soluções puras de fase móvel. (isentas de ocratoxina A)

A pureza (p) foi calculada em função de três variáveis: área cromatográfica do pico do analito (X_1), área cromatográfica total (X_2), área cromatográfica dos picos do solvente (X_3) e coluna cromatográfica (C_i), que foram usadas na fórmula geral para determinação de pureza.

$$p_{c_i}(X_1, X_2, X_3) = 100 \frac{X_1}{(X_2 - X_3)} \quad (80)$$

A pureza foi calculada usando os valores médios encontrados para área cromatográfica do pico do analito com relação a área total das substâncias detectadas, subtraindo o valor médio da área cromatográfica dos picos do solvente, no qual estava dissolvido o analito de interesse, avaliando somente as impurezas do padrão.

O resultado final deve levar em consideração os valores obtidos através das colunas cromatográficas, se não houver diferença significativa entre elas, calculando-se a pureza média, conforme a equação a seguir:

$$p_F = \sum_i^n \frac{C_i}{n} \quad (81)$$

n = número de colunas.

No entanto, se os resultados de pureza para as colunas cromatográficas forem significativamente diferentes, a pureza final será o resultado obtido pela coluna que detectou maior número de impureza, sem considerar as áreas obtidas dos picos cromatográficos do solvente no qual o padrão está dissolvido (fase móvel).

3.12 Comparação dos resultados obtidos através das técnicas CLAE-FLD e CLAE-EM/EM

Como a determinação de ocratoxina A no café já estava estabelecida utilizando a técnica cromatografia líquida acoplada ao detector de fluorescência (CLAE-FLD), houve necessidade de comparar com o método proposto através da técnica CLAE-EM/EM.

Desta forma, foram preparadas duas curvas de calibração, uma em café verde e outra em café torrado, e seus respectivos pontos de recuperação, conforme estabelecido nos itens faixa de trabalho e recuperação de cada método proposto, para café verde e torrado, respectivamente.

Após isto foi realizado o teste F seguido do teste t para a comparação das variâncias médias entre os métodos, a fim de se verificar a compatibilidade com os resultados frente a um método já reconhecido e validado para este analito.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Soluções Padrão de Ocratoxina A e Ocratoxina B

As absorvâncias médias obtidas referente as três soluções de dicromato de potássio no comprimento de onda de absorção máxima de 350 nm foram de 0,8188; 0,4038 e 0,1985 para as concentrações de 0,25 mM, 0,125 mM e 0,625 mM, respectivamente.

Os espectros de UV obtidos para as soluções padrão estão no anexo B e C.

A partir dessas absorvâncias, obtidas pelo espectrofotômetro, e da concentração de cada solução de dicromato de potássio, calculou-se os valores da absorvidade molar (ϵ) de 3073,37; 3031,33 e 2980,28. Desta forma, o valor médio obtido para absorvidade molar foi de 3028,33, obtendo um fator de correção de 1,04. Este valor apresentou-se na faixa de 0,95 e 1,05; conforme estabelecido pela AOAC (TRUCKNESS, 2005).

Através do fator de correção obtido da solução de dicromato de potássio e das leituras de absorvâncias das soluções padrão de ocratoxina A e ocratoxina B, obteve-se o resultado de concentração final destes padrões.

A Tabela 6 apresenta os valores obtidos de absorvância em triplicata e os valores médios encontrados das soluções padrão de OTA e OTB.

Tabela 6. Média das absorvâncias para soluções padrão de OTA e OTB.

Analito	Valores obtidos	Absorvância Média
OTA	0,7462	0,7459
	0,7458	
	0,7458	
OTB	0,9459	0,9495
	0,9481	
	0,9546	

A média das medições de absorvância foi utilizada para o cálculo das concentrações das soluções padrão, que foram de 57,4256 $\mu\text{g/mL}$ e 59, 1879 $\mu\text{g/mL}$ para ocratoxina A e ocratoxina B, respectivamente.

4.2 Massa Específica para as Soluções Padrão de Ocratoxina A e Ocratoxina B

Foi realizada a verificação da massa específica das misturas de solventes tolueno: ácido acético e benzeno: ácido acético, em que se encontravam cada solução de ocratoxina A e ocratoxina B, a fim de se obter uma concentração m/m.

As massas específicas média obtidas através do densímetro digital para os padrões de OTA e OTB foram de 0,86974 e 0,88156, respectivamente são apresentadas nas Tabelas 7 e 8. Com estes valores encontrados pode-se converter a concentração das soluções padrão de m/v para m/m.

Tabela 7. Massa específica da mistura tolueno: ácido acético (99:1) para a solução padrão de ocratoxina A.

	Massa específica (g/mL)
tolueno: ácido acético	0,86974
tolueno: ácido acético	0,86974
tolueno: ácido acético	0,86973
Média	0,86974
Desvio Padrão	0,000058

Tabela 8. Massa específica da mistura benzeno: ácido acético (99:1) para solução padrão de ocratoxina B.

	Massa específica (g/mL)
benzeno: ácido acético	0,88156
benzeno: ácido acético	0,88156
benzeno: ácido acético	0,88156
Média	0,88156
Desvio Padrão	0,00000

As concentrações das soluções padrão foram recalculadas a partir do valor médio de massa específica encontrada em m/m obtendo 66,033 $\mu\text{g/g}$ e 67,136 $\mu\text{g/g}$ para OTA e OTB, respectivamente. Diluições sucessivas foram realizadas para as etapas de desenvolvimento e validação do método proposto.

Com a definição da fase móvel, água ácido trifluoroacético 0,05 %: metanol ácido trifluoroacético 0,05 % (20:80) foi realizada a análise da massa específica em densímetro digital. O resultado da massa específica foi necessário para os cálculos posteriores referentes à concentração real das soluções e dos extratos, utilizados no preparo do ponto da curva de calibração em solução e na contaminação de café, apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Massa específica da fase móvel água ácido trifluoroacético 0,05 %: metanol ácido trifluoroacético 0,05 % (20:80).

Replicatas	Massa específica (g/mL)
1	0,86013
2	0,86013
3	0,86013
Média	0,86013
Desvio Padrão	0,00000

4.3 Análise Cromatográfica para Determinação de Ocratoxina A no Café Verde e Café Torrado

4.3.1 CLAE-EM/EM

Para o desenvolvimento da metodologia de análise de ocratoxina A no café verde e torrado, primeiramente foram testadas cinco diferentes fases móveis utilizando a técnica de CLAE-EM/EM (Tabela 10).

Tabela 10. Fases móveis utilizadas na análise de ocratoxina A por CLAE-EM.

<i>Equipamento</i>	<i>Fase móvel</i>	<i>Referência</i>
CLAE-EM/EM	acetonitrila: metanol: água (1:1:1) ácido fórmico 0,1 %	LAU <i>et al.</i> , 2000
CLAE-EM/EM	água: metanol (20:80) ácido trifluoroacético 0,05 %	BECKER <i>et al.</i> , 1998., LINDENMEIER <i>et al.</i> , 2004.
CLAE-EM/EM	água: Acetonitrila (80:20) ácido fórmico 0,1 %	VENTURA <i>et al.</i> , 2003.
CLAE-EM/EM	ácido acético: metanol: acetonitrila (30:20: 50) ácido acético 0,5 %	ZOLLNER; MAYER-HELM, 2006.
CLAE-EM/EM	água: metanol (80:20) ácido fórmico 0,1 %	ZOLLNER; MAYER-HELM, 2006

A solução padrão estoque de OTA preparada foi devidamente diluída a fim de obter uma solução padrão de 20 µg/mL. Após isto, foi evaporada sob nitrogênio, reconstituída nas fases móveis testes (Tabela 11) e introduzidas através de bomba infusora diretamente no espectrômetro de massas para verificação das intensidades dos sinais produzidos pelo íon pseudo-molecular da OTA m/z 404.

Tabela 11. Intensidades dos sinais do Íon pseudo-molecular da ocratoxina A (m/z 404).

<i>Fase Móvel</i>	<i>Intensidade (mV)</i>
água ácido trifluoroacético 0,05 %: metanol ácido trifluoroacético 0,05 % (20:80)	569,31
água ácido fórmico 0,1 %: acetonitrila ácido fórmico 0,1 % (80:20)	166,18
água ácido fórmico 0,1 %: metanol ácido fórmico 0,1 % (80:20)	121,46
água pura: acetonitrila pura: metanol ácido fórmico 0,1 % (1:1:1)	273,02
ácido acético 0,5 %: metanol: acetonitrila (30:20:50)	200,00

Após testar as 5 (cinco) fases móveis descritas anteriormente, observou-se que à água: metanol 0,05 % ácido trifluoroacético, na proporção 20:80, v/v, foi a fase móvel que proporcionou a maior intensidade de sinal para a solução de ocratoxina A com 569,31 mV. Desta forma, esta fase móvel foi escolhida para as metodologias propostas. Todos os pontos da curva foram reconstituídos com esta fase móvel também.

A técnica de ionização por eletronebulização (IEN) foi utilizada para esta análise por ser considerada um método de ionização branda, produzindo íons pseudo-molecular, devido a pouca fragmentação. Estes resultados concordam com a detecção obtida através de detectores de fluorescência em matrizes complexas (LAU *et al.*, 2000).

Para muitas aplicações relacionada às análises por CLAE-EM/EM, os parâmetros experimentais devem ser otimizados variando um parâmetro por vez (MOBERG *et al.*, 2000). O procedimento de otimização destes parâmetros foi realizado introduzindo com auxílio de bomba infusora, soluções padrão na concentração de 20,0 µg/mL em separado para OTA e OTB, ambas evaporadas e reconstituídas na fase móvel selecionada para este método. Como resultado, as condições otimizadas obtidas foram as seguintes: temperatura e pressão do gás de secagem (340 °C, 21 psi), da câmara da interface (*housing*, 40 °C), do gás de nebulização (40 psi), posição e as voltagens da agulha de ionização (*needle*, 5000 V), do escudo (*shield*, 600 V), do capilar (50 V) e do detector (1600 V). A posição da agulha da interface IEN foi de 7 mm para Probe, 3 mm horizontal e 6 mm vertical.

Após a otimização dos parâmetros do EM para OTA, otimizou-se para o padrão interno a ser utilizado (OTB) os seguintes parâmetros: voltagens da agulha, do escudo e do capilar. No entanto, os parâmetros de ionização se mantiveram os mesmos para ambas as ocratoxinas (Figura 10).

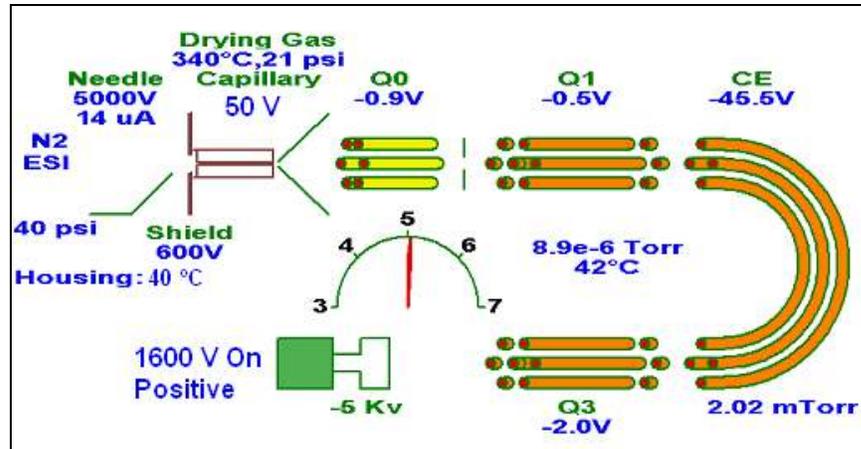


Figura 10. Parâmetros otimizados do EM para ocratoxina A e ocratoxina B.

Os gases nitrogênio e argônio foram utilizados como gases de nebulização e colisão, respectivamente, com pressões de 40 psi e 2,0 m Torr.

4.3.1.1 Varredura total de íons (*Full Scan*) e monitoramento seletivo de íons (MSI)

Após a otimização dos parâmetros do EM foi realizada a varredura total de íons na faixa de razão massa carga m/z 50 a 460 para ocratoxina A e ocratoxina B (Figura 11 e Figura 12). Para tal preparou-se uma solução de concentração 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em fase móvel de cada ocratoxina. Esta concentração elevada deve-se ao fato deste método ter pouca sensibilidade, uma vez que, monitora uma faixa extensa de íons por vez.

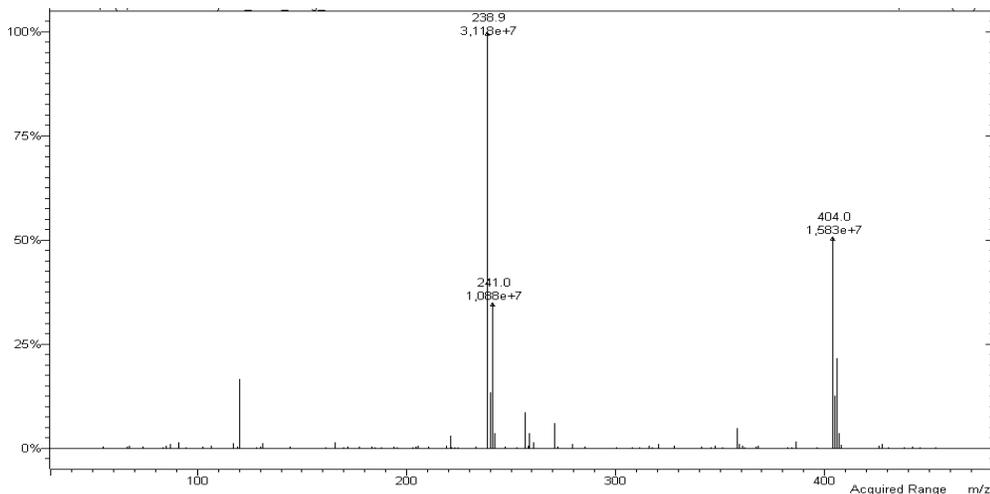


Figura 11. Varredura total de íons para ocratoxina A.

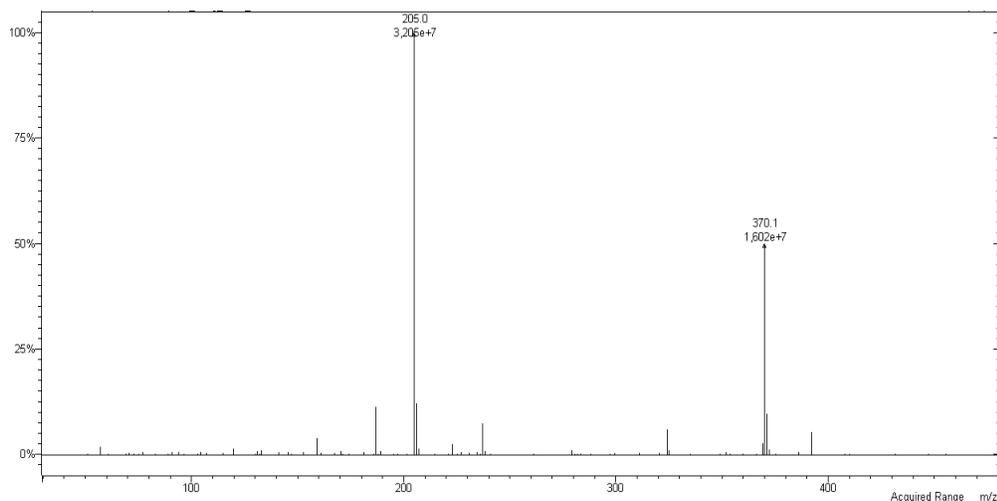


Figura 12. Varredura total de íons para ocratoxina B.

Os principais fragmentos encontrados da varredura total (*Full Scan*) foram m/z 239, 241 e 404 para Ocratoxina A (OTA) e m/z 205 e 370 para Ocratoxina B (OTB). Estes íons foram selecionados para realização do Monitoramento Seletivo de Íons (MSI), sendo os íons de m/z 239 e 205 foram os íons mais intensos para OTA e para OTB, íons, respectivamente. A partir do cromatograma obtido no modo *Full Scan* para OTA e OTB foram selecionados

os íons de maior intensidade para a realização do Monitoramento Seletivo de Íons (MSI), conforme descrito na Tabela 12.

Tabela 12. Íons monitorados no método MSI para OTA e OTB.

Analito	Íons (m/z)
OTA	239
	241
	404
OTB	205
	370

Inicialmente, foi testado o Monitoramento Seletivo de Íons (MSI) em concentrações superiores a faixa de trabalho estimada para café verde e café torrado e os resultados apresentados foram satisfatórios. No entanto, a medida que a concentração foi se aproximando da faixa de trabalho estabelecida para os métodos café verde e café torrado, a sensibilidade foi decrescendo e os íons monitorados não foram bem observados, apresentando cromatograma com muito ruído e tempo de retenção alterado. Desta forma, não foi possível identificar e quantificar o analito de interesse através de MSI, devido à pouca sensibilidade apresentada, conforme observado os cromatogramas das soluções padrão de ocratoxina A e ocratoxina B na concentração de 5,0 µg/kg (Figura 13).

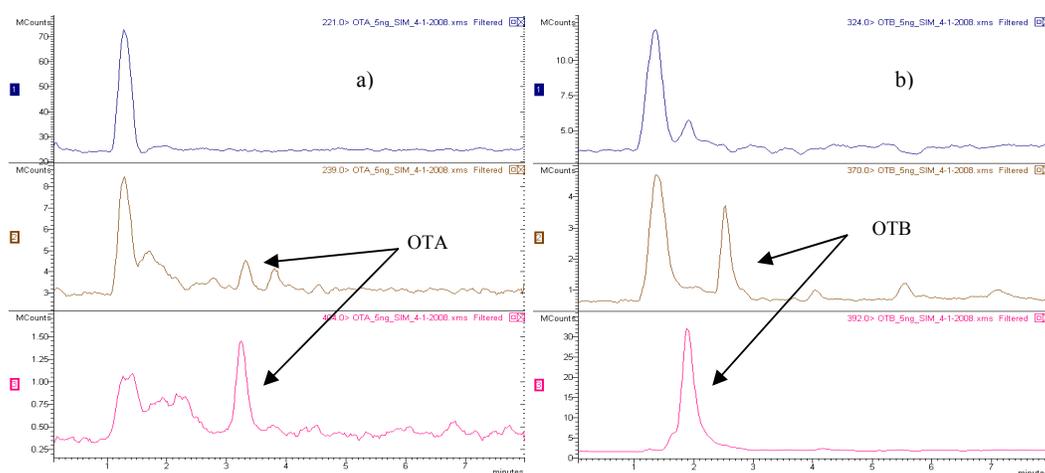


Figura 13. Cromatogramas da solução padrão de OTA (a) e OTB (b) na concentração de 5,0 µg/kg no Método MSI.

Devido aos resultados obtidos, o método MSI não foi utilizado para desenvolvimento da determinação de ocratoxina A no café verde e no café torrado.

4.3.1.2 Monitoramento Seletivo de Reação (MSR)

Após a otimização dos parâmetros de CLAE-EM/EM, através da introdução direta da solução padrão de ocratoxina A e ocratoxina B na concentração de 20 µg/g, foi realizada a curva de quebra dos analitos obtendo as energias de colisão para cada transição, íons precursor (pseudo-molecular), íons produtos, para cada ocratoxina, obtendo-se assim o método de Monitoramento Seletivo de Reação (MSR), no modo de eletronebulização positiva (IEN+).

Os íons precursores de cada uma das ocratoxinas foram selecionados no primeiro quadrupolo (Q1) ajustando-se o valor da corrente aplicada no capilar de entrada e posteriormente realizando a fragmentação do íon precursor utilizando argônio ultrapuro como gás de colisão no segundo quadrupolo (Q2), sendo as massas resultantes analisadas no terceiro quadrupolo (Q3).

Através das curvas de quebra, foram obtidas as energias de transição do íon precursor e produto, para cada ocratoxina, obtendo o monitoramento seletivo de reação (MSR), em modo positivo.

A Tabela 13 apresenta as energias de colisão (V) obtidas através das transições monitoradas nas curvas de quebra do método MSR para OTA e OTB, como demonstrado na Figura 14 e Figura 15.

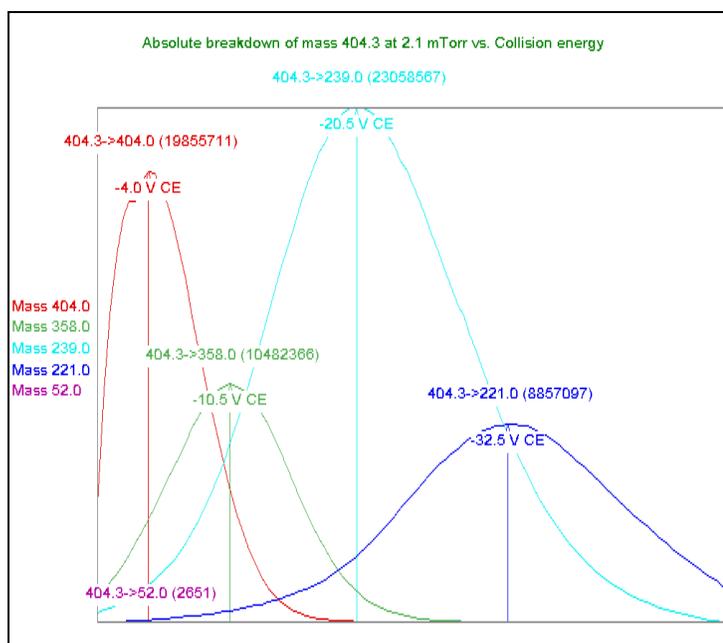


Figura 14. Curva de quebra da ocratoxina A.

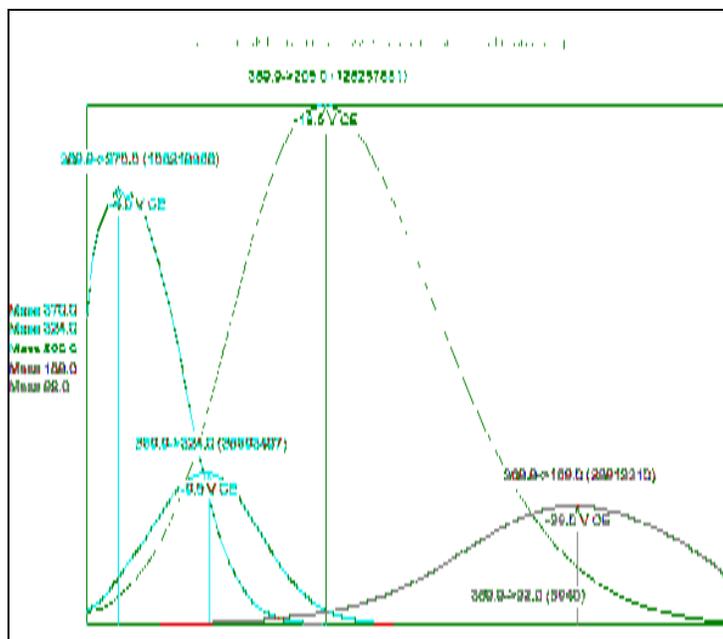


Figura 15. Curva de quebra da ocratoxina B.

Foram monitoradas duas transições de íon precursor > íon produto para OTA, de acordo com a diretiva da União Européia 2002/657/EC que preconiza quatro (4) pontos de identificação necessários para confirmação de substâncias orgânicas utilizando a técnica CLAE-EM/EM. As transições selecionadas de acordo com a maior intensidade e maior voltagem das suas energias de colisão foram: m/z 404>358 (-10,5 V) e m/z 404>239 (-20,5 V) e m/z 370>324 (-9,5 V) e m/z 370>205 (-18,5 V) para OTA e OTB, respectivamente. A transição de maior intensidade na energia de colisão foi utilizada para a quantificação, sendo m/z 239 e m/z 205 para OTA e OTB, respectivamente, correspondendo a perda da fenilalanina. O íon m/z 358 corresponde à perda de uma molécula de água e uma de monóxido de carbono (BECKER *et. al.*, 1998; LAU *et.al*, 2000).

Tabela 13. Energias de colisão (V) das transições monitoradas no método MSR para OTA e OTB.

	Íon precursor> Íon produto (m/z)	Energia de colisão (V)
OTA	404>239	- 20,5
	404>404	- 4,0
	404>358	- 10,5
OTB	370>205	- 18,5
	370>370	- 4,0
	370>324	- 9,5

Foram testadas duas colunas cromatográficas a *Pursuit C₁₈* (100 mm x 2,0 mm, 5 µm, *Varian*, Walnut Creek, CA, E.U.A.) e *Synergi Hydro C₁₈* (75 mm x 2,0 mm, 4 µm, *Phenomenex*, Torrance, C.A., E.U.A.), injetando solução padrão de OTA 5,0 ng/mL. Foi verificada a simetria do pico e a repetitividade do tempo de retenção. A coluna *Synergi Hydro C₁₈* com pré-coluna apresentou maior simetria no pico gerado, melhor resolução com repetitividade no tempo de retenção, sendo esta escolhida para desenvolvimento e validação do método proposto.

Após a escolha da coluna foram realizados testes com a solução padrão de 5,0 µg/kg variando o fluxo, 0,2 e 0,3 mL/min; percentual das fases móveis, 70:30 e 80:20 água ácido trifluoroacético 0,05 %: metanol ácido trifluoroacético 0,05 %; volumes de injeção de 10, 20, 30, 40 e 50 µL. Os melhores resultados encontrados em relação a maior intensidade, resolução do pico, pouco ruído produzido foram fluxo de 0,3 mL/min e percentual de 80:20 água ác. trifluoroacético 0,05 %: metanol ác. trifluoroacético 0,05 %, volume de injeção de 50 µL, com o modo de injeção *Full loop*, no qual todo *loop* do auto-injetor é preenchido com amostra.

Para melhorar a sensibilidade deste método foi testado o método MSR com segmento, onde a cada intervalo de tempo é possível monitorar íons diferentes. Assim o método de análise foi dividido em dois segmentos de tempo, um de 0 - 1,90 minutos, monitorando apenas as transições de OTB e outro de 1,91- 5,0 minutos para as transições de OTA. O tempo de retenção foi de 1,6 minutos e 2,0 minutos para OTB e OTA, respectivamente.

A Figura 16 apresenta a transição 370>205 e 404>239 de uma solução padrão na concentração de 5,0 ng /g contendo OTA e OTB no método de MSR com segmento.

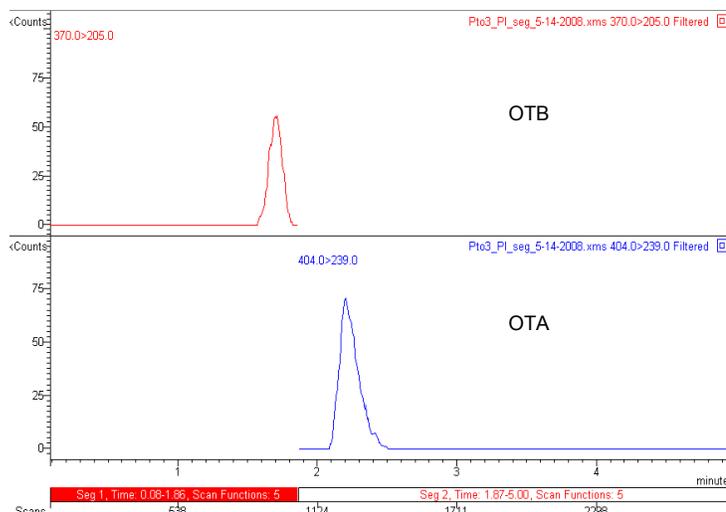


Figura 16. Solução padrão 5,0 µg/kg (OTA e OTB) no Método MSR com segmento.

Foi realizada a extração de uma amostra de café, fortificado na concentração de 5,0 µg/kg de ocratoxina A, sendo a ocratoxina B somente adicionada ao final do processo de extração na mesma concentração de 5,0 µg/kg, sendo o extrato injetado no método MSR com segmento (Figura 17).

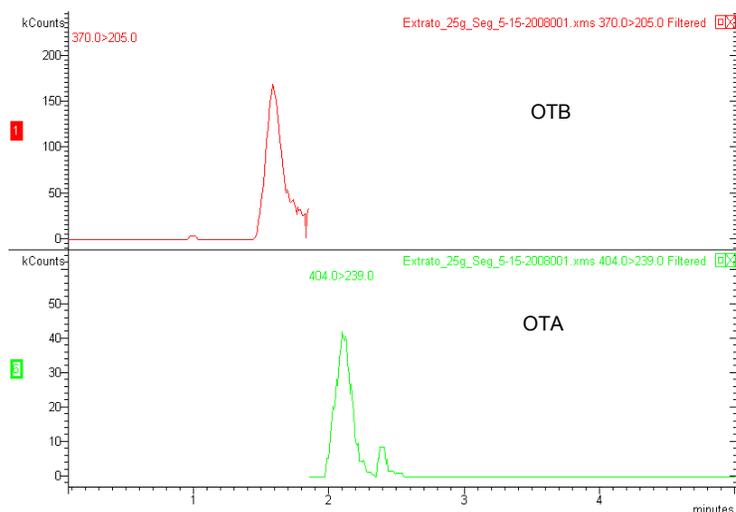


Figura 17. Extrato de café comercial fortificado com 5,0 µg/kg de OTA e OTB no método MSR com segmento.

Apesar do método de MSR com segmento aumentar a sensibilidade já que monitora menos íons por vez em determinado espaço de tempo, este método não foi considerado o mais adequado, pois quando testado para o extrato de café na faixa de trabalho estabelecida, o tempo de retenção dos picos variou, cortando os picos e inviabilizando a quantificação dos mesmos.

Desta forma, o método de MSR sem segmento foi utilizado durante a etapa de validação dos métodos para análise de café verde e de café torrado.

Durante os testes de extração realizados com café fortificado com solução padrão de OTA e OTB foi observado que a OTB estava sendo perdida, ou seja, não estava sendo detectada no CLAE-EM/EM (Figura 18).

Na Figura 15 encontra-se um cromatograma extrato de café fortificado com 3,0 µg/kg de solução padrão de OTA e 1,570 µg/kg de solução padrão de OTB utilizando o MSR sem segmento.

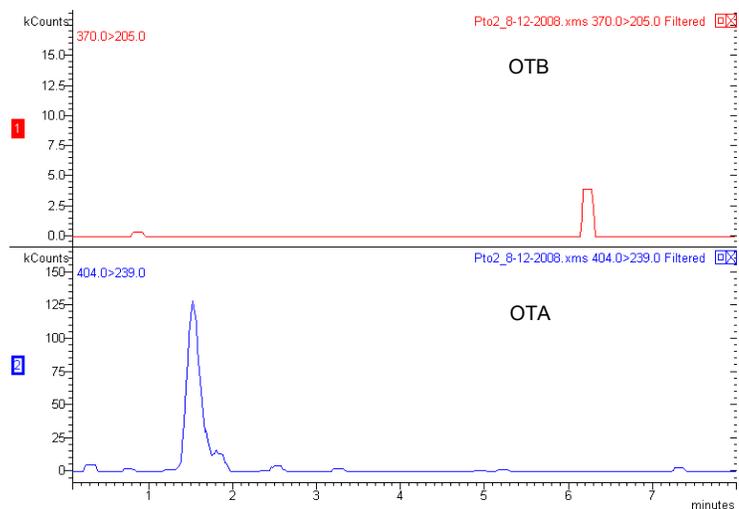


Figura 18. Extrato de café fortificado com OTA e OTB no método MSR sem segmento.

Foram realizados testes durante todas as etapas de extração, retirando-se pequenas alíquotas em diferentes etapas para verificar onde a OTB estaria se perdendo (após etapa de extração no *blender*, na etapa de filtração e na etapa de limpeza em coluna de IA). Não foi possível identificar a etapa onde ocorreu perda da OTB. Acredita-se que de alguma forma a coluna de imunoafinidade esteja retendo a OTB. Desta forma a quantificação possível foi através da padronização externa, devido à impossibilidade de quantificação por padronização interna (OTB).

As condições cromatográficas otimizadas e conseqüentemente utilizadas no método proposto para café verde e torrado foram: temperatura do forno da coluna cromatográfica 25 °C, fluxo da fase móvel de 0,3 mL/min, volume de injeção 50 µL, tempo total de análise de 8 minutos, eluição em modo isocrático com fase móvel água ác. trifluoroacético 0,05 %: metanol ác. trifluoroacético 0,05 % (20:80) e coluna cromatográfica *Synergi Hydro C₁₈* (75 mm x 2,0 mm x 4 µm, *Phenomenex*, Torrance, C.A., E.U.A.).

4.4 Validação do Método

Antes do processo de validação, em cada triplicata de resultado, foi verificada a existência de valores aberrantes, ponto a ponto, através do teste de Grubbs. Como todos os resultados de G calculado foram menores que o valor de G tabelado ($G_{tab} = 1,155$), o valor suspeito não foi considerado aberrante.

4.4.1 Faixa de trabalho

Adotou-se a faixa de trabalho de 3,0 - 23,0 µg/kg, com os pontos equidistantes 3,0; 8,0; 13,0; 18,0 e 23,0 µg/kg (níveis 1, 2, 3, 4 e 5), para o café verde e 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; e 7,0 µg/kg (níveis 1, 2, 3, 4 e 5) para o café torrado.

Esta faixa de trabalho foi escolhida contemplando os limites máximos para Ocratoxina A no meio da faixa de trabalho estabelecida para cada curva de calibração. Os limites máximos de tolerância para OTA variam de 5,0 a 20,0 µg/kg e 5,0 µg/kg, para café verde e torrado, respectivamente (CODEX, 2007; FAO, 2009; EC, 2005).

4.4.2 Seletividade

Para realização dos ensaios de seletividade, inicialmente foi realizada uma extração do café verde e do café torrado sem adição da ocratoxina A, para verificação da ausência do analito, branco de amostra. Posteriormente essas matrizes foram fortificadas na concentração de 3,0 µg/kg de Ocratoxina A e analisadas utilizando o método MSR.

Foi observada a ausência de picos interferentes no tempo de retenção da Ocratoxina A na matriz café verde e torrado nas transições monitoradas para esse método. Desta forma os cafés analisados foram utilizados durante o processo de validação, como branco de matriz.

Para a obtenção de cada ponto da curva de calibração, os cafés foram fortificados com massa de solução de Ocratoxina A para obtenção de concentração final desejada, conforme descrito anteriormente.

A Figura 19 apresenta o cromatograma de extrato de uma amostra de café verde branco e uma amostra de café verde fortificado na concentração de 3,0 µg/kg de ocratoxina A analisadas utilizando o método MSR.

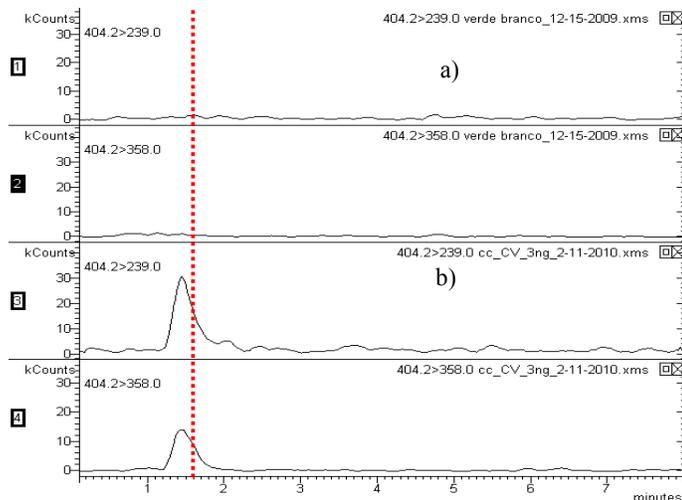


Figura 19. Cromatograma de extrato de café verde (a) branco e (b) fortificado com 3,0 µg/kg de ocratoxina A no Método MSR.

A Figura 20 apresenta o cromatograma do branco de café torrado, bem como o extrato de café torrado fortificado na concentração de 3,0 µg/kg de Ocratoxina A, analisados utilizando o método MSR.

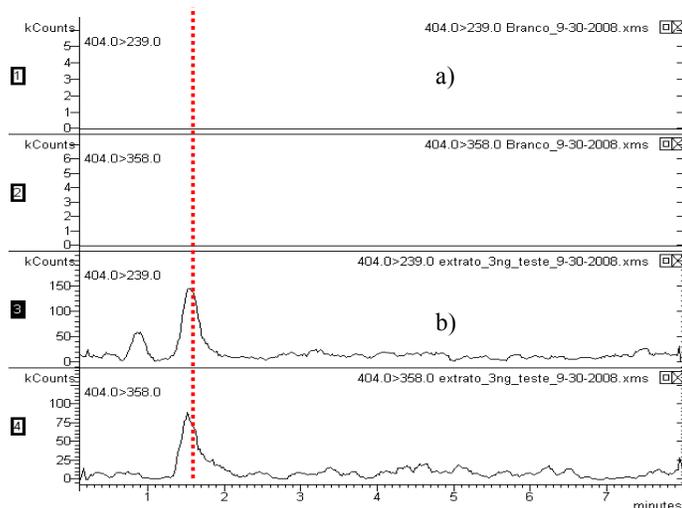


Figura 20. Cromatograma de extrato de café torrado (a) branco e (b) fortificado 3,0 µg/kg (b) no Método MSR.

Os métodos propostos foram considerados seletivos para esta análise já que monitorações selecionadas para o analito em questão.

Para confirmação da identidade da OTA e verificação da presença de interferentes da matriz café na OTA, foi realizada injeção de solução padrão de OTA em fase móvel e de um extrato de café, ambos na concentração de 3,0 µg/kg de OTA. Não foram observadas variações entre os tempos de retenção dos pontos de identificação da OTA (transições íon precursor > íon produto), no método de Monitoramento Seletivo de Reação (MSR).

Com estes resultados foram preparadas duas curvas de calibração para cada método proposto, café verde e café torrado, sendo uma em fase móvel (solução) e outra em matriz, na faixa de trabalho estipulada para cada método, de modo a avaliar a existência ou não de efeito matriz.

Na Tabela 14 encontram-se os parâmetros de regressão das curvas como coeficientes angulares e lineares para os métodos do café verde e café torrado.

Tabela 14. Parâmetros de regressão das curvas de calibração em solução e em matriz do café verde e café torrado.

<i>Curva de calibração</i>				
<i>Coefficientes</i>	<i>Café Verde (C. V)</i>		<i>Café Torrado (C. T)</i>	
	<i>Solução</i>	<i>Matriz</i>	<i>Solução</i>	<i>Matriz</i>
<i>Angular (b)</i>	160247,75	69817,90	1167577,23	239065,85
<i>Linear (a)</i>	-50487,21	27272,15	763032,98	626970,47

Nas Figuras 21 e 22, pode-se observar que as curvas de calibração em fase móvel (solução) e em matriz para café verde e café torrado, apresentaram inclinações da reta diferentes (coeficientes angulares), indicando presença de efeito de matriz na resposta linear de cada método.

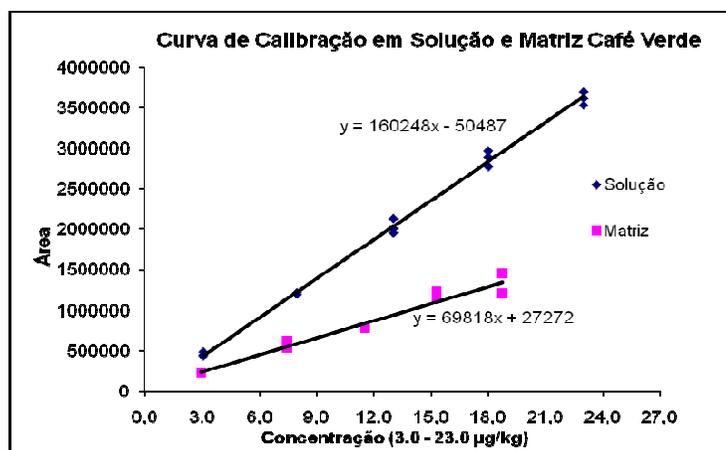


Figura 21. Curva de calibração em fase móvel (solução) e matriz na faixa de trabalho de 3,0 a 23,0 µg/kg no café verde.

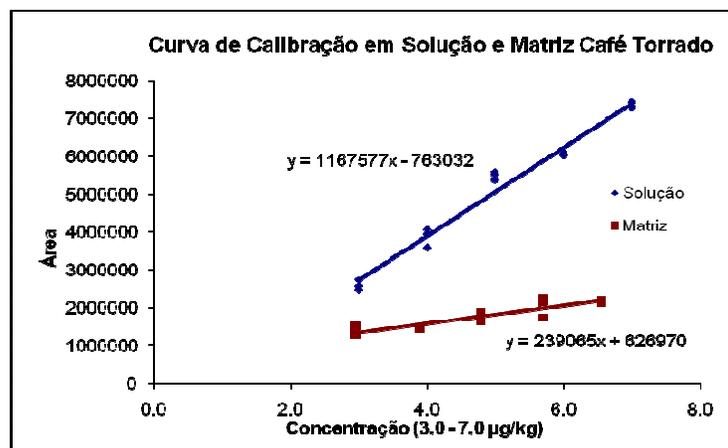


Figura 22. Curva de calibração em fase móvel (solução) e matriz na faixa de trabalho de 3,0 a 7,0 µg/kg no café torrado.

Para confirmação do efeito matriz foi realizado também o teste F para comparação das variâncias das curvas, os resultados encontrados foram que o $F_{\text{calculado}}$ tanto para o método café verde (7,7857) quanto para o café torrado (25,2342), apresentaram valores maiores que o F_{tabelado} (1,9837). Desta forma, as variâncias foram consideradas estatisticamente diferentes, indicando que a matriz tem efeito importante sobre a exatidão dos métodos na faixa de concentração estabelecida.

Após isto foi realizado o teste t, considerando a hipótese de médias estatisticamente diferentes. O valor t_{tabelado} foi obtido através da distribuição de t de Student com n-2 graus de liberdade e confiança de 95,0 %. Os resultados obtidos foram que o $t_{\text{calculado}}$, tanto para o café verde (5,0214) quanto para o café torrado (10,1997), apresentaram valores superiores ao t_{tabelado} (2,0422). Desta forma, as médias foram consideradas estatisticamente diferentes, confirmando que a matriz possui efeito significativo sobre o resultado do ensaio. O teste t Student comprovou estatisticamente a existência de efeito matriz. Este efeito já tinha sido observado visualmente através da diferença entre os coeficientes angulares da equação da reta sem matriz (em solução) e com matriz, tanto no café verde como no café torrado (Figura 18 e Figura 19). Estes resultados estão disponíveis nos anexos D e E, para café verde e torrado, respectivamente.

Desta forma, para os experimentos de validação subsequentes deste analito nestas matrizes, as curvas de calibração foram preparadas em matriz de café verde e torrado, respectivamente, para cada método.

Para minimizar o efeito matriz na linearidade de um método pode-se utilizar padrões marcados isotopicamente. O uso destas substâncias é eficaz para correção do desvio obtido, pois estes padrões possuem as características químicas e físicas semelhantes às substâncias de interesse, obtendo muitas vezes o mesmo tempo de retenção. No entanto, padrões marcados isotopicamente ainda têm sido pouco utilizados em países em desenvolvimento como o Brasil, devido às dificuldades relacionadas tanto na síntese destes como aos altos custos atrelados a importação dos mesmos. Neste trabalho não foi utilizado este tipo de padrão.

4.4.3 Linearidade

Os procedimentos analíticos foram considerados lineares em toda a faixa de trabalho da curva de calibração com os valores de 0,98188 e 0,91754, em matriz café verde e café torrado, respectivamente.

Para avaliação da homocedasticidade dos resultados foi realizado o teste de *Cochran*, onde foram comparados os valores de $C_{\text{calculado}}$ com C_{tabelado} . Observou-se que o $C_{\text{calculado}}$ (0,54280) e $C_{\text{calculado}}$ (0,58818) foram menores que o valor de C_{tabelado} (0,68380) para os cinco níveis de concentração em triplicata da curva de calibração preparada nas matrizes de café verde e café torrado, respectivamente, com nível de confiança de 95,0 %. Desta forma, a distribuição para os dois métodos, café verde e torrado, foi considerada homocedástica, indicando a variação de pontos homogênea (variância semelhante) durante toda a faixa de trabalho.

Os resíduos da curva de calibração em café verde e torrado apresentaram valores distribuídos de forma aleatória em torno do zero, durante toda a faixa de trabalho, indicando que o sistema é livre de tendências, que o modelo matemático para obtenção da equação da reta é adequado, confirmando também a linearidade dos métodos (Figura 23 e Figura 24).

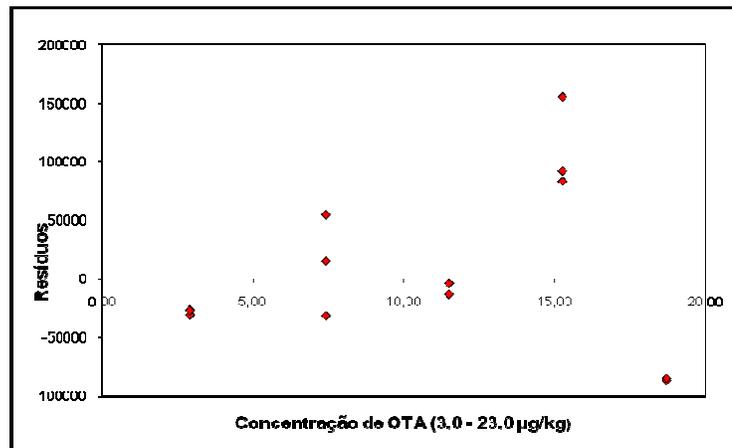


Figura 23. Distribuição dos resíduos na faixa de trabalho de 3,0 a 23,0 µg/kg para café verde.

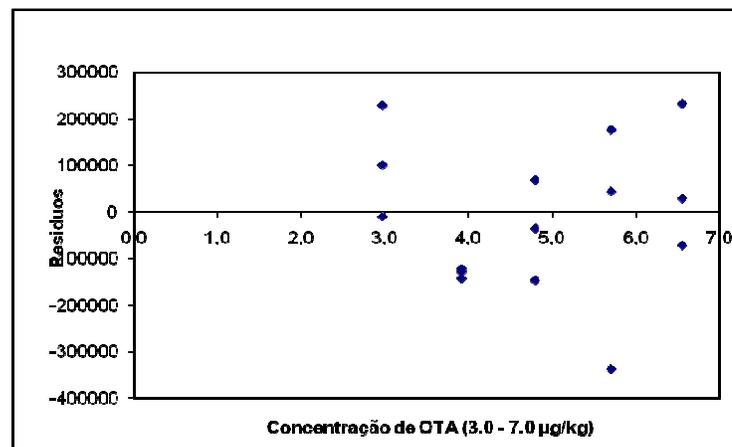


Figura 24. Distribuição dos resíduos na faixa de trabalho de 3,0 a 7,0 µg/kg para café torrado.

4.4.4 Sensibilidade

A sensibilidade é expressa pela inclinação da reta de regressão de calibração (coeficiente angular) que foi de 69817,90 e de 239065,85 para café verde e para o café torrado respectivamente.

Este resultado indica a mudança que se tem na resposta de um equipamento, área obtida, referente a variação na concentração. O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em uma maior variação da resposta. Este parâmetro de sensibilidade é muito utilizado para determinação de uma mesma substância em equipamentos diferentes. A maior inclinação da reta, ou seja, o maior coeficiente angular corresponde a uma maior sensibilidade.

4.4.5 Limite de quantificação (LQ)/Limite de detecção (LD)

Os limites de quantificação para os métodos propostos foram de 1,2 $\mu\text{g/kg}$ e 3,0 $\mu\text{g/kg}$ e os limites de detecção foram 0,36 $\mu\text{g/kg}$ e 1,0 $\mu\text{g/kg}$, para café verde e para café torrado, respectivamente.

Para café verde, o LQ encontrado foi abaixo do primeiro ponto da curva de calibração deste método. Estes valores quando comparados aos dados disponíveis na literatura referente à detecção por Fluorescência, estão acima do valor descrito por DIAZ *et al.* (2004) (0,3 $\mu\text{g/kg}$) e VENTURA *et al.* (2003) (0,5 $\mu\text{g/kg}$). No entanto, tais dados apresentaram valores abaixo de VATINNO *et al.* (2008) (2,0 $\mu\text{g/kg}$). Para o LD, o valor encontrado no método proposto foi abaixo do reportado por LEONI *et al.* (2001) (0,7 $\mu\text{g/kg}$) e por FURLANI *et al.* (1998) (0,7 $\mu\text{g/kg}$); e superior ao determinado por VENTURA *et al.* (2003) (0,1 $\mu\text{g/kg}$) e PITTET *et al.* (1996) (0,2 $\mu\text{g/kg}$) utilizando a técnica de CLAE-FLD.

Para café torrado, os resultados obtidos foram mais elevados quando comparados com outros métodos na literatura, que utilizam detector de fluorescência (VENTURA *et al.*, 2003). Entretanto, problemas atribuídos a coeluição de possíveis compostos interferentes usando detector de fluorescência foram superados através da elucidação estrutural obtida pelo espectrômetro de massas. Além disto, a técnica CLAE-EM/EM contribui para a confirmação da presença de OTA, evitando os falsos positivo que podem ocorrer pelo CLAE-FLD.

4.4.6 Exatidão

Os valores de recuperação média (%), Repetitividade (DPR_r %) e Precisão Intermediária (DPR_R %) para amostras de café verde e café torrado fortificadas nos seus respectivos pontos baixo, médio e alto estão apresentados nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15. Valores de recuperação, repetitividade (DPR_r) e precisão intermediária (DPR_R) para amostras de café verde utilizando CLAE-EM/EM.

Concentração ($\mu\text{g/kg}$)	Recuperação (%)	DPR_r (%)	DPR_R (%)
5,0	90,45	9,94	14,34
13,0	108,81	6,27	2,75
20,0	99,45	5,39	2,20

Tabela 16. Valores de recuperação, repetitividade (DPR_r) e precisão intermediária (DPR_R) para amostras de café torrado utilizando CLAE-EM/EM.

Concentração (µg/kg)	Recuperação (%)	DPR _r (%)	DPR _R (%)
3,5	108,85	13,73	17,84
5,0	90,74	9,55	12,57
6,5	89,02	2,43	16,54

Para o café verde os valores das recuperações médias, DPR_r e DPR_R variaram na faixa de 90,45 - 108,81 %, de 5,39 - 9,94 % e 2,20 - 14,34 %, respectivamente, nos três níveis de contaminação (baixo, médio e alto). Todos os resultados obtidos de DPR_r e DPR_R para esta matriz encontram-se dentro dos limites comumente aceitáveis nas três concentrações fortificadas; indicando que o método possui precisão adequada, apresentando boa repetitividade e precisão intermediária, conforme estabelecido pela Comissão do *Codex Alimentarius* (CODEX, 2007),

Os resultados de recuperação quando comparados a métodos que utilizaram o detector de fluorescência, foram melhores que os resultados relatados por SUGITA-KONISHI *et al.*, (2006) (59,0 %), DIAZ *et al.* (2004) (68,7 a 84,5 %), GILBERT; ANKLAM (2002) (60,0 a 86,0 %) e VENTURA *et al.* (2003) (82,4 %) e similares aos obtidos por PITTET *et al.* (1999) (80,0 a 108,0%) e VARGAS *et al.* (2005) (92,8 %).

Os valores de DPR_r % foram menores que os valores reportados por DIAZ *et al.* (2004) (14,3 a 15,5 %), GILBERT; ANKLAM (2002) (21,0 a 32,0 %) e VARGAS *et al.* (2005) (7,42 a 20,94 %) e maiores que os valores reportados por VENTURA *et al.* (2003) (4,0 %).

Os valores de DPR_R % apresentaram-se menores que os valores reportados por VARGAS *et al.* (2005) (16,34 a 29,17 %), SUGITA-KONISHI *et al.* (2006) (24,6 %) e GILBERT; ANKLAM (2002) (16,0 a 25,0 %) sendo similares ao valor reportado por VENTURA *et al.* (2003) (4,9 %).

Em relação a matriz café torrado, os valores das recuperações médias, DPR_r e DPR_R variaram na faixa de 89,02 - 108,85 %, 2,43 - 13,73 % e 12,57 - 17,84 %, respectivamente nos três níveis de contaminação (baixo, médio e alto). Os resultados obtidos para o parâmetro exatidão encontram-se dentro dos critérios estabelecidos nas três concentrações fortificadas indicando que o método possui precisão adequada, apresentando boa repetitividade e precisão intermediária do método, conforme estabelecido pela Comissão do *Codex Alimentarius* (CODEX, 2007),

Os resultados referentes a recuperação foram similares aos obtidos utilizando detectores de fluorescência, método correntemente em uso na literatura como ENTERWISE *et al.* (2001) (65,0 - 97,0 %) e PITTET *et al.* (1996) (89,0 - 100,0 %). No entanto, o método apresentou maior recuperação que encontrado por AHMED *et al.* (2007) (73,0 - 86,0 %), por VENTURA *et al.* (2003) (82,4%), SIBANDA *et al.* (2002), (72,0 - 84,0 %) e GILBERT; ANKLAM (2002) (85,0%).

Os valores obtidos de DPR_r e DPR_R do presente método foram melhores quando comparados a GILBERT; ANKLAM (2002) (21,0 - 32,0 %; 16,0 - 25,0 %) e ENTERWILSE *et al.*, (2001) (2,0 - 22,0 %; 14,0 - 26,0 %).

De acordo com os cálculos obtidos através dos testes t e teste F baseado nos valores das análises realizadas entre dois analistas, o $F_{\text{calculado}}$ (1,33175) e (6,98644) foram menores que o valor de F_{tabelado} (19,000) para café verde e para café torrado, respectivamente. Estes resultados comprovam que não houve diferença estatística entre as variâncias para os dois analistas. Assim foi determinado o teste t, considerando a hipótese de médias estatisticamente equivalentes. Os resultados obtidos foram inferiores para o $t_{\text{calculado}}$, tanto para o café verde (0,0214) quanto para o café torrado (0,91407), quando comparado ao t_{tabelado} (2,7764), confirmando que a troca de analista não possui efeito significativo sobre os resultados dos ensaios, pois as médias dos resultados obtidos foram consideradas estatisticamente equivalentes. Como não houve variação dos resultados obtidos em relação à troca entre as analistas, todas as análises foram realizadas por estes analistas para determinação de Ocratoxina A no café verde e no café torrado, utilizando o método de extração proposto e a técnica de CLAE-EM/EM promoverão a obtenção de resultados concordantes. Os resultados dos testes estatísticos aplicados estão disponíveis nos anexos F e G, para café verde e para café torrado, respectivamente.

Todos os resultados relacionados aos parâmetros de validação avaliados foram satisfatórios para os métodos propostos para análise de ocratoxina A em café verde e café torrado.

Por não haver na literatura dados de validação referentes a determinação de Ocratoxina A no café utilizando a técnica CLAE-EM/EM, toda a discussão foi realizada comparando dados obtidos através do detector de fluorescência.

Os métodos desenvolvidos e validados utilizaram técnica de elevada sensibilidade, permitindo a detecção, confirmação e a quantificação de Ocratoxina A no café verde e no café torrado, podendo auxiliar futuramente na superação das barreiras técnicas para exportação do café brasileiro.

4.4.7. Incerteza de Medição

Para calcular a incerteza do mensurando baseou-se na concentração do ponto central da curva de calibração de cada método, 13,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para café verde e 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para café torrado.

Os dados utilizados como massa real de café (g), massa de alíquota (g), massa de solvente para extração (g), massa de reconstituído (g), áreas obtidas e média da injeção, das amostras de café verde e de café torrado, estão descritas na Tabela 17.

Tabela 17. Massa de café (g), massa de alíquota (g), massa de solvente para extração (g), massa de reconstituído (g), áreas obtidas e média da injeção, para amostra de café verde e café torrado.

<i>Massa (g)</i>	<i>café verde</i>	<i>café torrado</i>
Café (mc)	25,006	25,082
Aliquota para extrair (ma)	4,81925	4,76364
Solvente de Extração (mMeOH)	190,104	190,039
Reconstituído (mr)	1,00158	1,00506
Area de injeção - Replicata 1	993012	1518000
Replicata 2	885487	1577000
Replicata 3	876877	1588000
Replicata 4	947727	1758000
Replicata 5	925776	1763000
Média das Áreas de injeção	925776	1640800

A Tabela 18 apresenta a classificação quanto ao tipo das fontes de incerteza área do analito (A_{OTA}); solvente de extração (m_{MeOH}), massa reconstituída (m_R), massa de café (m_c), massa de alíquota para extrair (m_a), fator de recuperação (F_{rec}), curva de calibração (cc) e diluição da solução padrão de ocratoxina (c_f), consideradas para a quantificação da concentração de OTA no café verde e café torrado.

Tabela 18. Fontes e tipos de incerteza definidos para a estimativa do cálculo de incerteza para café verde e café torrado.

Fonte	Tipo
uA_{ota}	A
um_{MeOH}	B
um_R	B
um_c	B
um_a	B
uF_{rec}	A
ucc	A
uC_f	B

Após a definição da equação do mensurando, a identificação dos componentes de incerteza, a classificação de cada tipo de incerteza (tipo A ou B), foi realizada a quantificação de cada componente.

Com a aplicação do método clássico, os resultados obtidos para as derivadas da equação do mensurando (OTA) em função de cada grandeza de entrada como área do analito (A_{OTA}); massa de solvente de extração (m_{MeOH}), massa de reconstituído (m_R), massa real de café (m_c), massa de alíquota extraída (m_a) e fator de recuperação (F_{rec}), para café verde e café torrado estão disponíveis na Tabela 19.

Tabela 19. Resultados das derivadas da equação do mensurando (OTA) em função das grandezas de entrada para café verde e café torrado.

Derivadas	Resultados	
	Café verde	Café torrado
$\frac{\partial[OTA]}{\partial A_{OTA}} =$	1,31542E-05	3,93234E-06
$\frac{\partial[OTA]}{\partial m_{MeOH}} =$	0,060497669	0,024375083
$\frac{\partial[OTA]}{\partial m_R} =$	11,48270622	4,608895298
$\frac{\partial[OTA]}{\partial m_c} =$	-0,459923574	-0,184682892
$\frac{\partial[OTA]}{\partial m_A} =$	-2,38643957	-0,972410807
$\frac{\partial[OTA]}{\partial F_{rec}} =$	12,51450818	4,105689634

Os resultados obtidos destas derivadas em função de cada grandeza de entrada foram multiplicadas pela sua incerteza imediata a fim de obter a incerteza de cada fonte relacionada a equação do mensurando (OTA) conforme descrito a seguir.

4.4.7.1 Incerteza da área do analito ($u_{A_{analito}}$)

Foi considerado para a incerteza área do analito ($u_{A_{analito}}$) as seguintes fontes: fator de recuperação (F_{rec}), massa solvente de extração (m_{MeOH}), massa reconstituída (m_R), massa de café (m_c), massa de alíquota para extrair (m_a) e o coeficiente angular (a), todas estas relacionadas a derivada obtida da equação do mensurando (OTA), no qual o resultado foi de 1,31542E-05 e 3,93234E-06 para café verde e café torrado conforme descrito na Tabela 19.

Para o cálculo da incerteza imediata da fonte área do analito (A_{OTA}), classificada como tipo A, considerou-se as áreas obtidas das injeções dos extratos de amostra, a média (\bar{x}), o desvio padrão (s) e o número de replicatas (n) para café verde e café torrado, conforme descrito na Tabela 20.

Tabela 20. Áreas, média (\bar{x}), desvio padrão (s), replicatas (n) e u_{AOTA} para café verde e café torrado.

	<i>Café verde</i>	<i>Café torrado</i>
	Área	
	993012	1518000
	885487	1577000
	876877	1588000
	947727	1758000
	925776	1763000
\bar{x}	925775	1640800
s	47478	112479
n	5	5
$u_{AOTA} = \frac{s}{\sqrt{n}}$	21233	50302

Desta forma, a incerteza da fonte área do analito foram calculadas multiplicando o valor da derivada (Tabela 19) com a incerteza imediata (Tabela 20). Os valores encontrados referentes às incertezas combinadas da fonte área de ocratoxina A (u_{AOTA}) foram de 0,279304107 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 0,197806532 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para café verde e café torrado, respectivamente. Estes valores obtidos de incerteza foram divididos pelos valores de concentração do ponto central das curvas de calibração 11,50084890 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 4,63221631 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para café verde e café torrado, respectivamente. As incertezas relativas da fonte área de ocratoxina (u_{rAOTA}) foram de 0,024285521 e 0,042702352 para café verde e café torrado, respectivamente.

A incerteza da área do analito está atrelada a incerteza da repetitividade do equipamento uma vez que para a estimativa da incerteza imediata considerou-se o desvio padrão das replicatas de análise.

4.4.7.2 Incerteza do Solvente de extração (m_{MEOH})

Para a incerteza solvente de extração (m_{MEOH}) foram consideradas as seguintes fontes: fator de recuperação (F_{rec}), área de OTA (A_{OTA}), coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), massa reconstituída (m_{R}), massa de café (m_{c}), massa de alíquota para extrair (m_{a}), todas estas relacionadas a derivada obtida da equação do mensurando (OTA), no qual o resultado foi de 0,060497669 e 0,024375083 para café verde e café torrado conforme descrito na Tabela 19.

Para o cálculo da incerteza imediata da fonte solvente de extração (m_{MEOH}), classificada como tipo B, considerou-se a incerteza expandida (U) e o fator de abrangência (k) obtidos através dos resultados de calibração apresentados nos certificados das balanças utilizadas. O fator de abrangência ($k=2$) corresponde a probabilidade de abrangência de aproximadamente 95 %. Cada carga (massa) possui um U e um k respectivo. Desta forma, a Tabela 21 apresenta os modelos de balança utilizadas nas pesagens (PT-001 e PT-006), os valores de carga, U, k, e o valor de u calculado através da razão de U/k .

Tabela 21. Carga, incerteza expandida (U), fator de abrangência (k) e incerteza imediata (u) obtidas através da balança PT-001 e PT-006.

<i>Balança</i>	<i>Carga (g)</i>	<i>U</i>	<i>k</i>	<i>u</i>
PT-001	25,0 -100	0,001	2	0,00050
PT-006	5,0	0,00009	2	0,000045
PT-006	1,0	0,00004	2	0,000020

O valor obtido para a incerteza imediata da fonte solvente de extração (m_{MEOH}) foi de 0,0005 para o café verde e para o café torrado.

Desta forma, a incerteza da fonte solvente de extração (m_{MEOH}) foram calculadas multiplicando o valor da derivada (Tabela 19) com a incerteza imediata (Tabela 21). Os valores encontrados referentes às incertezas combinadas da fonte solvente de extração ($uc_{m_{\text{MEOH}}}$) foram de 0,00003025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 0,00001219 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para café verde e café torrado, respectivamente. Estes valores obtidos de incerteza foram divididos pelos valores de concentração do ponto central das curvas de calibração 11,50084890 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 4,63221631 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para café verde e café torrado, respectivamente. Os resultados obtidos das incertezas relativas referente a fonte solvente de extração (urm_{MEOH}) foram de 0,00000263 e 0,00000263 para café verde e café torrado, respectivamente.

4.4.7.3. Incerteza da Massa reconstituída (m_R)

Para a incerteza da massa reconstituída (m_R) foram consideradas as seguintes fontes: fator de recuperação (F_{rec}), área de OTA (A_{OTA}), coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), massa solvente de extração (m_{MEOH}), massa de café (m_c) e massa de alíquota para extrair (m_a), todas estas relacionadas a derivada obtida da equação do mensurando (OTA), no qual o resultado foi de 11,48270622 e 4,608895298 para café verde e café torrado conforme descrito na Tabela 19.

Para o cálculo da incerteza imediata da fonte massa reconstituída (m_R), classificada como tipo B, considerou-se a incerteza expandida (U) e o fator de abrangência (k) de acordo com dados da Tabela 21. O valor obtido para a incerteza imediata da fonte massa reconstituída (m_R) foi de 0,00002 para o café verde e o café torrado.

Desta forma, a incerteza da fonte massa reconstituída (m_R) foram calculadas multiplicando o valor da derivada (Tabela 19) com a incerteza imediata (Tabela 21). Os valores encontrados referentes às incertezas combinadas da fonte massa reconstituída (uc_{m_R}) foram de 0,00022965 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 0,00009218 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para café verde e café torrado, respectivamente. Estes valores obtidos de incerteza foram divididos pelos valores de concentração do ponto central das curvas de calibração 11,50084890 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 4,63221631 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para café verde e torrado, respectivamente. Os resultados obtidos das incertezas relativas referente a fonte Massa reconstituída (ur_{m_R}) foram de 0,00001997 e 0,00001990 para café verde e café torrado, respectivamente.

4.4.7.4. Incerteza da massa de café (m_c)

Para a incerteza massa de café (m_c) foram consideradas as seguintes fontes: fator de recuperação (F_{rec}), área de OTA (A_{OTA}), coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), massa solvente de extração (m_{MEOH}), Massa reconstituída (m_R), massa de café (m_c) e massa de alíquota para extrair (m_a), todas estas relacionadas a derivada obtida da equação do mensurando (OTA), no qual o resultado foi de -0,459923574 e -0,184682892 para café verde e café torrado conforme descrito na Tabela 19.

Para o cálculo da incerteza imediata da fonte massa de café (m_c), classificada como tipo B, considerou-se a incerteza expandida (U) e o fator de abrangência (k) de acordo com dados da Tabela 21. O valor obtido para a incerteza imediata da fonte massa de café (m_c) foi de 0,0005 para ambos os cafés verde e café torrado.

Desta forma, a incerteza da fonte massa de café (m_c) foram calculadas multiplicando o valor da derivada (Tabela 19) com a incerteza imediata (Tabela 21). Os valores encontrados referentes às incertezas combinadas da fonte massa de café ($ucmc$) foram de -0,00022996 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e -0,00009234 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para café verde e café torrado, respectivamente. Estes valores obtidos de incerteza foram divididos pelos valores de concentração do ponto central das curvas de calibração 11,50084890 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 4,63221631 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para café verde e torrado, respectivamente. Os resultados obtidos das incertezas relativas referente a fonte massa de café ($urmc$) foram de 0,000019995 e 0,00001993 para café verde e café torrado, respectivamente.

4.4.7.5. Incerteza da massa de alíquota para extrair (m_a)

Para a incerteza massa de alíquota para extrair (m_a) foram consideradas as seguintes fontes: fator de recuperação (F_{rec}), área de OTA (A_{OTA}), coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), massa solvente de extração (m_{MEOH}), massa reconstituída (m_R), massa de café (m_c) e massa de alíquota para extrair (m_a), todas estas relacionadas a derivada obtida da equação do mensurando (OTA), no qual o resultado foi de -2,38643957 e -0,972410807 para café verde e café torrado conforme descrito na Tabela 19.

Para o cálculo da incerteza imediata da fonte massa de alíquota para extrair (m_a), classificada como tipo B, considerou-se a incerteza expandida (U) e o fator de abrangência (k) de acordo com dados da Tabela 21. O valor obtido para a incerteza imediata da fonte massa de alíquota para extrair (m_a) foi de 0,000045 para ambos os cafés verde e café torrado.

Desta forma, a incerteza da fonte massa de alíquota para extrair (m_a) foram calculadas multiplicando o valor da derivada (Tabela 19) com a incerteza imediata (Tabela 21). Os valores encontrados referentes às incertezas combinadas da fonte massa de alíquota para extrair ($ucma$) foram de -0,00010739 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e -0,00004376 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para café verde e café torrado, respectivamente. Estes valores obtidos de incerteza foram divididos pelos valores de concentração do ponto central das curvas de calibração 11,50084890 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 4,63221631 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para café verde e torrado, respectivamente. Os resultados obtidos das incertezas relativas referente a fonte massa de alíquota para extrair ($urma$) foram de 0,0000093376 e 0,0000094466 para café verde e café torrado, respectivamente.

4.4.7.6. Incerteza do Fator de recuperação (F_{rec})

Para a incerteza do Fator de recuperação (F_{rec}) foram consideradas as seguintes fontes: área de OTA (A_{OTA}), coeficiente angular (a), coeficiente linear (b), massa solvente de extração (m_{MEOH}), massa reconstituída (m_R), massa de café (m_c) e massa de alíquota para extrair (m_a). Desta forma, os resultados obtidos dos coeficientes de sensibilidade (derivadas da equação do mensurando (OTA) em função do fator de recuperação) foram de 12,51450818 e 4,105689634 para café verde e café torrado conforme Tabela 19.

Para o cálculo da incerteza imediata da fonte Fator de recuperação (uc_{rec}) considerou-se a soma quadrática da incerteza combinada do valor experimental (uc_{Vexp}) e da incerteza combinada do valor teórico (uc_{Vteo}). Cada termo da equação que define o mensurando (fator de recuperação) foi derivado em função do valor experimental (V_{exp}) e valor teórico

(Vteo) obtendo assim os devidos coeficientes de sensibilidade, conforme dados da Tabela 22.

Tabela 22. Resultados das derivadas da equação do mensurando (recuperação) em função das grandezas de entrada para café verde e café torrado.

Derivadas	Matriz	
	Café verde	Café torrado
$\frac{\partial Rec}{\partial V_{exp}} =$	0,086950108	0,210015155
$\frac{\partial Rec}{\partial V_{teo}} =$	-0,0946137	-0,18614352

Para o cálculo da incerteza imediata da fonte valor experimental (uV_{exp}), classificada como tipo A, considerou-se as concentrações obtidas das injeções dos extratos de amostra, a média (\bar{x}), o desvio padrão (s) e o número de replicatas (n) para café verde e café torrado, conforme descrito na Tabela 23.

Tabela 23. Concentração, média (\bar{x}), desvio padrão (s), replicatas (n) para café verde e café torrado.

	Café verde	Concentração	Café torrado
	\bar{x}	13,47690049	
s	11,93783027		3,991756811
n	11,81459014		4,031166381
$\frac{s}{\sqrt{n}}$	12,82870895		4,640223366
	12,51450746		4,658136807
	12,51450746		4,220332315
	0,679589		0,40298
	5		5
	0,303921		0,180218

Para o cálculo da incerteza imediata da fonte valor teórico (uV_{teo}), classificada como tipo B considerou-se o valor de 0,000020, dado obtido da Tabela 21, para café verde e café torrado.

Os resultados obtidos da multiplicação de cada derivada da fonte fator de recuperação (F_{rec}) (Tabela 22) e sua incerteza imediata (Tabela 21 e Tabela 23) promoveu a obtenção da incerteza combinada para valor experimental (ucV_{exp}) e valor teórico (ucV_{teo}) para o café verde e café torrado, respectivamente (Tabela 24).

Tabela 24. Resultados das incertezas combinadas para o valor experimental (ucV_{exp}) e o valor teórico (ucV_{teo}) para café verde e café torrado.

<i>Matriz</i>		
Incerteza combinada	Café verde	Café torrado
ucV_{exp}	$(0,086950108) \times (0,303921)$ =0,02642599	0,03784854
ucV_{teo}	$(-0,0946137) \times (0,000020)$ =0,0000019	-0,0000037

Para a obtenção da incerteza combinada da recuperação (uc_{Rec}) os resultados obtidos de incerteza combinada para valor experimental (ucV_{exp}) e valor teórico (ucV_{teo}) foram combinados, obtendo a incerteza combinada para a fonte de recuperação (uc_{Rec}) de 0,026425994 e 0,037848536 para café verde e café torrado, respectivamente. Estes valores foram considerados a incerteza imediata para a fonte de recuperação (u_{Frec}).

A Tabela 25 apresenta de modo resumido todos os dados obtidos para as fontes que estão contempladas na equação que define o mensurando (concentração de ocratoxina) para café verde e café torrado.

Tabela 25. Matriz, derivadas, incertezas imediata, combinada (uc) e relativa (ur) para as grandezas de entrada definidas para determinação de OTA no café verde e no café torrado.

<i>Fontes</i>	<i>Matriz</i>	<i>Derivadas</i>	<i>Incertezas Imediata</i>	<i>Incerteza Combinada (uc)</i> <i>µg/kg</i>	<i>Incerteza Relativa (ur)</i>
A_{OTA}	Café verde	1,31542E-05	21233,042	0,279304107	0,024285521
	Café torrado	3,93234E-06	50302,485	0,197806532	0,042702352
m_{MeOH}	Café verde	0,060497669	0,0005	0,00003025	0,00000263
	Café torrado	0,024375083	0,0005	0,00001219	0,00000263
m_R	Café verde	11,48270622	0,00002	0,00022965	0,00001997
	Café torrado	4,608895298	0,00002	0,00009218	0,00001990
m_c	Café verde	-0,459923574	0,0005	-0,00022996	0,00002000
	Café torrado	-0,184682892	0,0005	-0,00009234	0,00001993
m_a	Café verde	-2,38643957	0,000045	-0,00010739	0,00000934
	Café torrado	-0,972410807	0,000045	-0,00004376	0,00000945
Frec	Café verde	12,51450818	0,026426	0,33070832	0,02875512
	Café torrado	4,105689634	0,0378485	0,15539434	0,03354643

4.4.7.7. Incerteza da curva de calibração (u_{cc})

Os dados e cálculos auxiliares para a determinação da incerteza da curva de calibração do café verde e café torrado estão disponíveis no ANEXO J e ANEXO H.

Os resultados para os coeficientes angular (a) e linear (b), coeficiente de correlação entre a e b (r a,b), incerteza do coeficiente angular (u_a), incerteza do coeficiente linear (u_b), coeficientes de sensibilidade (C_a e C_b), estão descritos na Tabela 26 para café verde e café torrado, respectivamente.

Tabela 26. Coeficientes angular (a), linear (b), de correlação entre a e b (r a,b), incerteza do coeficiente angular (u_a), incerteza do coeficiente linear (u_b), coeficientes de sensibilidade (C_a e C_b) para café verde e café torrado.

	<i>Matrizes</i>	
	Café verde	Café Torrado
a, inclinação	110383,5183	458653,8398
b, intercepto	51467,09422	462820,7445
r a,b	-0,895146707	-0,967310922
u_a	5608,81364	55068,07278
u_b	42055,6852	166229,8777
C_a	-7,17557E-05	-5,59974E-06
C_b	-9,05932E-06	-2,18029E-06

Os valores encontrados referentes às incertezas combinadas da curva de calibração (u_{cc}) foram de 0,180601018 e 0,1011414 para café verde e café torrado, respectivamente. Estes valores obtidos de incerteza foram divididos pelos valores de concentração do ponto central das curvas de calibração 11,50084890 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 4,63221631 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para café verde e café torrado, respectivamente. Os resultados obtidos das incertezas relativas referente a fonte curva de calibração (u_{RCC}) foram de 0,01570328 e 0,02183434 para café verde e café torrado, respectivamente.

4.4.7.8 Incerteza do preparo da solução mãe padrão ($u_{C_{OTA}}$)

Para estimar o cálculo de incerteza para o preparo da solução mãe padrão de ocratoxina A, considerou-se como as fontes de incerteza para o Massa Molecular (u_{MM}), repetitividade da absorção da Ocratoxina A (u_A) e fator de correção (u_{FC}).

a) Incerteza do Massa Molecular (u_{MM})

Para o cálculo da incerteza do Massa Molecular (u_{MM}), levou-se em consideração a fórmula molecular da ocratoxina A ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}_6$), considerando a incerteza de cada elemento (C, H, Cl, N e O) bem como a incerteza referente ao número atômico de cada

elemento na fórmula da Ocratoxina A atribuindo a este uma distribuição retangular, conforme estabelecido por Wieser (2006).

A Tabela 27 apresenta as incertezas da massa atômica, obtida através de Tabela periódica; a incerteza por unidade de cada átomo é referente ao número de átomos de cada elemento na molécula de Ocratoxina A.

Tabela 27. Incerteza da massa atômica, unidade de átomo e número de átomos de cada elemento da fórmula molecular da ocratoxina A.

Elemento	Massa Atômica (u)	Incertezas		
		Massa Atômica	Unidade de átomo	Número de átomos
Carbono	12,0107 (8)	0,0008	0,00046188	0,0092376
Hidrogênio	1,00794 (7)	0,00007	4,04145E-05	0,0007274
Cloro	35,453 (2)	0,002	0,001154701	0,0011547
Nitrogênio	14,0067 (2)	0,0002	0,00011547	0,0001154
Oxigênio	15,9994 (3)	0,0003	0,000173205	0,0010392

u = incerteza referente a cada massa atômica obtida através de tabela periódica.

Inicialmente, procurou-se a incerteza de cada unidade de átomo em separado (C, H, Cl, N, O), obtida de cada massa atômica. Para o carbono, por exemplo, a incerteza foi de 0,0008. Este valor foi dividido por raiz de 3, assumindo uma distribuição retangular e multiplicados pelo número de átomos deste elemento na molécula estrutural, no caso do carbono, por vinte (20). Os valores encontrados de incerteza para a unidade de átomo e para o número de átomos referente ao elemento carbono na molécula ocratoxina A foram de 0,00046188 e 0,0092376, respectivamente (Tabela 27). Esses cálculos foram efetuados também para os elementos e, posteriormente, para o número de átomos de hidrogênio, cloro, nitrogênio e oxigênio correspondente para a fórmula da ocratoxina A, sendo dezoito (18) átomos de hidrogênio, um (1) átomo de cloro, um (1) átomo de nitrogênio e seis (6) átomos de oxigênio. Desta forma, a incerteza final de cada elemento considerando o número de átomos da fórmula da ocratoxina A foi de 0,0092376; 0,0007274; 0,0011547; 0,0001154 e 0,0010392, respectivamente.

A raiz da soma quadrática destes valores, originou na incerteza referente a massa molecular da ocratoxina A (u MM) no valor de 0,009396233.

b) Incerteza da repetitividade da absorção da Ocratoxina A (u_A)

Considerando os valores obtidos de absorvidade para a solução padrão de ocratoxina A na leitura em triplicata por espectrofotômetro na região do UV, a Massa Molecular de ocratoxina A, o coeficiente de absorvidade molar específico para esta substância bem como o fator de correção, pode-se obter o valor da incerteza de repetitividade da absorção de ocratoxina A que foi de 0,009986.

c) Incerteza do fator de correção (u_{FC})

A incerteza do fator de correção para as soluções de dicromato foi de 0,003448.

A Figura 25 apresenta as incertezas que contribuíram para o cálculo da concentração da Solução mãe padrão (u_{OTA}). Pode-se observar que a incerteza de maior contribuição no preparo da Solução Mãe de OTA foi a incerteza referente a fonte de absorvidade, seguida da incerteza de massa molecular e do fator de correção.

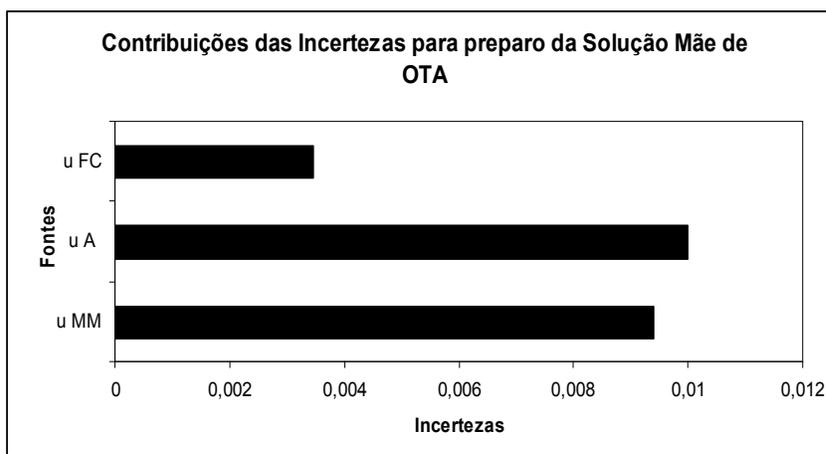


Figura 25. Contribuições de fontes de incerteza para preparo de solução padrão de ocratoxina A.

Através da raiz da soma quadrática de cada uma destas contribuições (u_{FC} , u_A , u_{MM}) obteve-se a incerteza combinada do preparo da Solução Mãe de ocratoxina A no valor de 0,014139.

O valor encontrado para a estimativa da incerteza através do método alternativo no preparo da Solução Mãe de Ocratoxina A foi de 2,887479. Este valor elevado já era esperado, pois há uma super estimação do valor quando se considera distribuição retangular. Este valor não foi utilizado para cálculo da incerteza combinada da OTA.

4.4.7.9 Incerteza da diluição da solução mãe (u_{cf})

Para calcular a incerteza de u_{cf} , considerou-se a massa inicial (m_i), a massa final (m_f), a concentração inicial (c_i) e a concentração final (c_f), que se pretende obter.

Os dados obtidos de massa inicial (m_i), massa adicionada (m_{adc}), concentração inicial (C_i) e concentração final (C_f) para diluição da solução padrão de ocratoxina estão descritos na Tabela 28.

Tabela 28. Massa inicial (m_i), massa adicionada (m_{adc}), concentração inicial (C_i) e concentração final (C_f) para diluição da solução padrão de ocratoxina.

	Valor	Unidade
Massa Inicial (m_i)	0,15063	g
Massa de Adicionada (m_{adc})	100,102	g
$\Sigma m_{adc} + m_i$	100,25263	g
Concentração Inicial (C_i)	66,03345166	$\mu\text{g/g}$
Concentração Final (C_f)	0,09921554	$\mu\text{g/g}$

Com a aplicação do método clássico, os resultados obtidos para as derivadas da equação do mensurando (concentração final) em função de cada grandeza de entrada como massa inicial (m_i), concentração inicial (C_i) e massa adicionada (m_{adc}) para café verde e café torrado estão disponíveis na Tabela 29.

Tabela 29. Resultados das derivadas da equação do mensurando (concentração final) em função das grandezas de entrada para café verde e café torrado.

Derivadas	<i>Resultados</i>	
	Café verde	Café torrado
$\frac{\partial C_f}{\partial m_i} =$	0,657680862	0,657680862
$\frac{\partial C_f}{\partial m_{adc}} =$	-0,000989655	-0,000989655
$\frac{\partial C_f}{\partial C_i} =$	0,001502504	0,001502504

Os resultados obtidos destas derivadas em função de cada grandeza de entrada foram multiplicadas pela sua incerteza imediata a fim de obter a incerteza de cada fonte relacionada a equação do mensurando (OTA) conforme descrito a seguir.

Para o cálculo da incerteza imediata da fonte massa inicial (u_{m_i}) e massa adicionada ($u_{m_{adc}}$), classificadas como tipo B, considerou-se o valor de 0,0005 (Tabela 21), para café verde e café torrado.

Para o cálculo da incerteza imediata da fonte concentração inicial (u_{C_i}), classificada como tipo A, considerou-se a incerteza combinada do preparo da solução padrão no valor de 0,014139.

Os resultados obtidos da multiplicação de cada derivada da fonte concentração final (Cf) (Tabela 29) e sua incerteza imediata, promoveu a obtenção da incerteza combinada para massa inicial (ucmi), concentração inicial (ucci) e massa adicionada (ucmadic) para o café verde e torrado, respectivamente (Tabela 30).

Tabela 30. Resultados das incertezas combinadas para massa inicial (ucmi), concentração inicial (ucci) e massa adicionada (ucmadic) para o café verde e café torrado.

<i>Matriz</i>		
Incerteza combinada	Café verde	Café torrado
ucmi	(0,657680862 × 0,0005) = 0,00032884	0,00032884
ucci	(-0,000989655 × 0,0005) = -0,00000049	-0,00000049
ucmadic	(0,001502504 × 0,014139) = 0,00002266	0,00002266

Estes valores obtidos de incerteza combinada foram divididos pelo valor de concentração final da solução padrão 0,09921554 µg/g (Tabela 28).

Desta forma os resultados obtidos das incertezas relativas referente às fontes massa inicial (urmi), concentração inicial (urci) e massa adicionada (urmadic) 0,0033144; 0,00000499; 0,00022841 para o café verde e café torrado (Tabela 31).

Tabela 31. Resultados das incertezas relativas para massa inicial (urmi), concentração inicial (urci) e massa adicionada (urmadic) para o café verde e café torrado.

<i>Matriz</i>		
Incerteza combinada	Café verde	Café torrado
urmi	(0,00032884/0,09921554) = 0,0033144	0,0033144
urci	(-0,00000049/0,09921554) = -0,00000499	0,00000499
urmadic	(0,00002266/0,09921554) = 0,00022841	0,00022841

O valor obtido para a incerteza combinada da concentração final (uc_{Cf}) foi de 0,000329621 $\mu\text{g/g}$. Este valor foi dividido pela concentração final da solução padrão 0,09921554 $\mu\text{g/g}$ (Tabela 28) para obtenção da incerteza relativa (ur_{cf}) 0,00332227.

A Tabela 32 apresenta todas as contribuições individuais das grandezas relativas calculadas. Os valores obtidos para as incertezas relativa da concentração de OTA foram 0,0432917688 e 0,0603036765, para café verde e café torrado.

Tabela 32. Incertezas relativas das grandezas de entrada definidas para café verde e café torrado.

<i>Fonte</i>	<i>Café verde</i>	<i>Café Torrado</i>
ur Aota	0,0242855210	0,0427023522
ur mMeOH	0,0000026301	0,0000026310
ur mr	0,0000199684	0,0000198993
ur mc	0,0000199952	0,0000199346
ur ma	0,0000093376	0,0000094466
ur Frec	0,0287551229	0,0335464347
ur cc	0,0157032772	0,0218343432
ur cf	0,0033222691	0,0033222691
ur P OTA	0,0141386824	0,0141386824
ur [OTA]	0,0432917688	0,0603036765

A Figura 26 e a Figura 27 apresentam os gráficos que contemplam as contribuições de cada fonte de incerteza no cálculo da incerteza para as concentrações de 13,0 $\mu\text{g/kg}$ e 5,0 $\mu\text{g/kg}$ para café verde e torrado, respectivamente.

Pode-se observar que as incertezas que apresentaram maior contribuição foram o fator de recuperação (Frec), a área de OTA (A_{OTA}), a curva de calibração (cc), o preparo de solução de OTA (P_{OTA}) e a diluição da concentração de OTA (C_f) para café verde.

Para o café torrado pode-se observar que as incertezas que apresentaram maior contribuição foram área de OTA (A_{OTA}), fator de recuperação (Frec), curva de calibração (cc), a o preparo de solução de OTA (P_{OTA}) e a diluição da concentração de OTA (C_f).

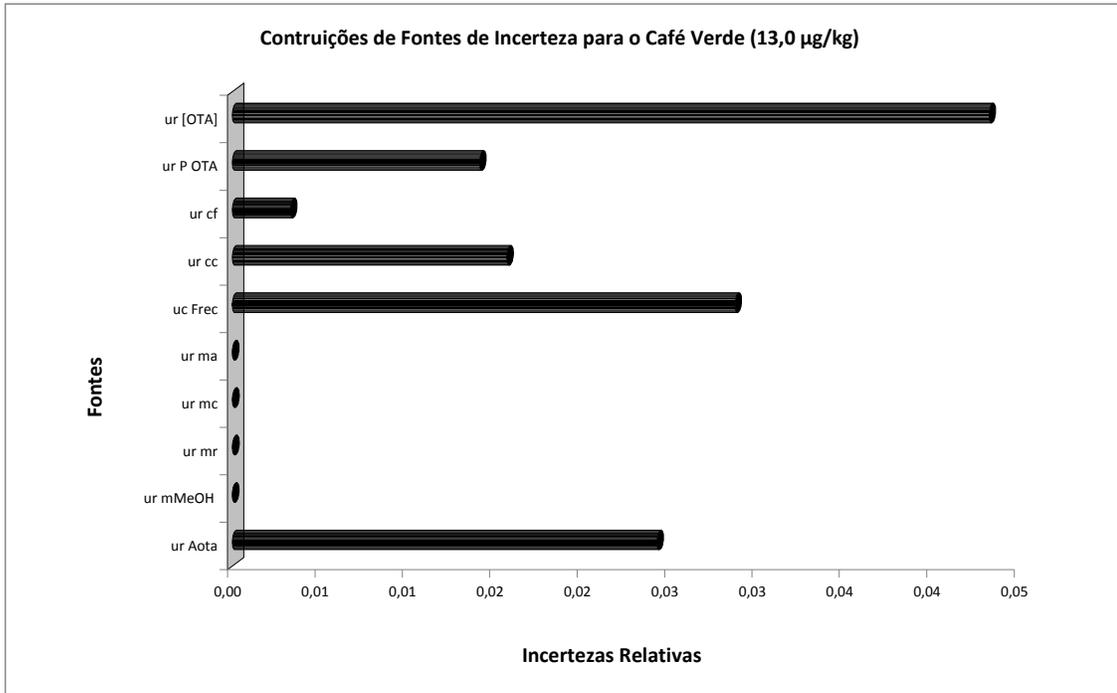


Figura 26. Contribuições de cada fonte de incerteza para o cálculo da incerteza no café verde (13,0 µg/kg).

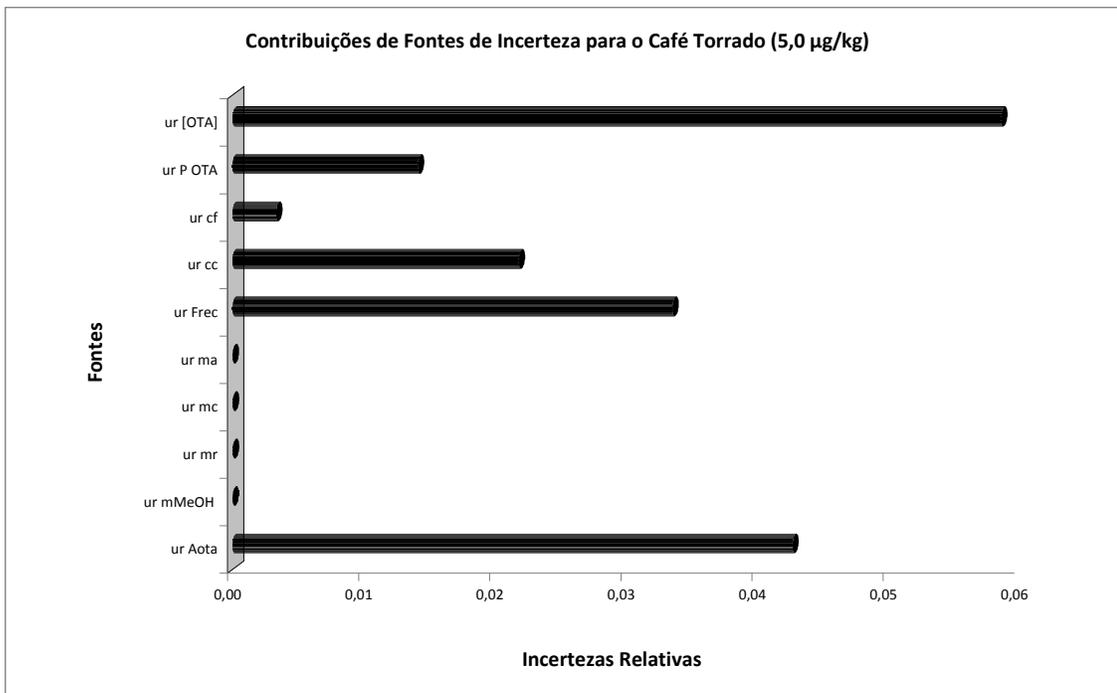


Figura 27. Contribuições de cada fonte de incerteza para o cálculo da incerteza no café torrado (5,0 µg/kg).

Dentre as incertezas das grandezas de entrada, aquela proveniente do modo gravimétrico, como massa de solvente de extração (m_{MeOH}), massa reconstituída (m_R), massa de café (m_c) e massa de alíquota para extrair (m_a) apresentaram os menores valores tanto para café verde quanto para café torrado. Este resultado deve-se ao fato da resolução da balança ser a única fonte de incerteza considerada.

Os valores elevados para a incerteza relacionada a fonte área do analito podem demonstrar possíveis problemas na repetitividade do equipamento.

4.4.7.10. Incerteza padrão combinada (u_c)

A incerteza padrão combinada para a determinação de ocratoxina A foi obtida através da raiz da soma quadrática de todas as incertezas relativas obtidas para cada grandeza de entrada conforme (Tabela 32), multiplicada pela fração mássica média de ocratoxina A obtida no ponto central para cada determinação, 11,50 $\mu\text{g/kg}$ e 4,63 $\mu\text{g/kg}$ no café verde e no café torrado, respectivamente.

Os valores obtidos para incerteza padrão combinada (u_c) foram de 0,49 $\mu\text{g/kg}$ e 0,27 $\mu\text{g/kg}$ para café verde e café torrado, respectivamente.

4.4.7.11 Incerteza expandida (U)

Para finalizar os resultados dos cálculos de incerteza, obteve-se a incerteza expandida (U), no qual multiplicou-se a u_c obtida para café verde e café torrado com seu k respectivo.

Como as contribuições das fontes de incerteza predominantes, que apresentaram maior valor, foram do tipo A, ou seja, obtidas experimentalmente tanto para café verde e como para o café torrado, houve necessidade de se calcular o fator de abrangência k a partir do cálculo do grau de liberdade efetivo (ν_{eff}) considerando o valor de cada fonte de incerteza relativa tipo A e o número de replicatas de análise, atribuindo uma contribuição de 95,0 % (Tabela 33).

Tabela 33. Valor de Grau de liberdade efetivo (ν_{eff}) e fator de abrangência (k) para café verde e café torrado, respectivamente.

	<i>café verde</i>	<i>café torrado</i>
ν_{eff}	12	11
k	2,23	2,25

As incertezas expandidas (U) foram de 1,11 e 0,63; que correspondem a contribuição percentual de 9,7 % e 13,6 % em relação ao valor medido para o fator de abrangência calculado de 2,23 e 2,25 para café verde e café torrado, respectivamente

Desta forma, como resultado final da análise tem-se, para fração mássica de ocratoxina A o resultado de $w = (11,50 \pm 1,11) \mu\text{g/kg}$ e $w = (4,63 \pm 0,63) \mu\text{g/kg}$ para a incerteza expandida para café verde e café torrado na concentração do ponto central da curva de calibração.

4.5 Estabilidade

A solução padrão da solução de OTA permaneceu estável por 30 dias nas temperaturas de geladeira e câmara fria, 4 °C e - 20 °C, respectivamente. No entanto, a temperatura ambiente (20 °C) a solução de OTA permaneceu estável apenas por 7 dias, apresentando após este tempo variação superior a 10 %.

A partir deste resultado, foi testada a estabilidade dos extratos de café verde e café torrado na temperatura de 4 °C e - 20 °C, e constatou-se a variação de 10 % das áreas obtidas no período superior a 15 dias para ambos os cafês.

4.6 Análise de Amostras de Café Torrado

O resultado mostrou que das 40 amostras de café torrado e moído analisadas, 13 amostras apresentaram níveis detectáveis entre 3,07221 a 9,61161 µg/kg de OTA, representando 32,5 % do total de amostras. Duas amostras apresentaram níveis abaixo de 5,0 µg/kg, limite permitido para presença de OTA no café torrado, representando 5,0 % do total. No entanto, 25 amostras, representando 62,5 %, não apresentaram OTA.

4.7 Teor de Umidade da Matriz de Café Verde e Café Torrado

Os resultados encontrados não foram considerados valores aberrantes, quando aplicado o teste de Grubbs, não sendo excluído nenhum resultado nos cálculos posteriores.

Os resultados encontrados para o teor de umidade do café verde e no café torrado, variaram de 5,34-5,49 % e 1,56-1,59 %, respectivamente, estando em concordância com os limites estabelecidos na literatura (CLARKE, 1985).

A Tabela 34 apresenta a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação para as replicatas obtidas através dos resultados obtidos para teor de umidade (%) pelo método de secagem em estufa a 105 °C para café verde e torrado.

Tabela 34. Média, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) do teor de umidade para amostra de café verde e café torrado.

<i>Replicatas</i>	Teor de Umidade (%)	
	<i>Verde</i>	<i>Torrado</i>
1	5,34751	1,57599
2	5,41973	1,59473
3	5,49363	1,56131
4	5,34847	1,58660
Média	5,40234	1,57966
Desvio Padrão	0,06030	0,01251
CV	1,11618	0,79170

4.8 Pureza da Solução Padrão de Ocratoxina A

O presente método foi considerado preciso por assumir que os analitos e as impurezas foram eluídos, detectados e tiveram a mesma resposta, ou seja, o mesmo coeficiente de absorção molar no UV (SCHUMACHER, 2007)

As condições cromatográficas foram adquiridas através do certificado de análise da LGC de acordo com JOSEPHS *et al* (2006) e adaptadas conforme descrito na Tabela 35.

Tabela 35. Condições cromatográficas do método para determinação de pureza.

<i>Fase móvel</i>	água: acetonitrila: ácido fosfórico (60:40:1)
<i>Bomba</i>	Isocrático
<i>Fluxo</i>	0,4 mL/min
<i>Volume de injeção</i>	10 µL
<i>Número de injeções</i>	9
<i>Tempo de análise</i>	20 min

Os parâmetros de integração foram otimizados para análise de OTA por CLAE-DAD para cada coluna cromatográfica, sendo monitorada a banda espectral na faixa de 190 a 350 nm para OTA, encontrando o comprimento de onda máximo de 215 nm e 216 nm para as colunas C₈ e C₁₈, respectivamente (Tabela 36).

Tabela 36. Parâmetros de integração CLAE-DAD utilizando as colunas cromatográficas *Pursuit* C₈ e C₁₈.

	<i>Coluna Cromatográfica</i>	
	<i>C₈</i>	<i>C₁₈</i>
Comprimento de onda	215 nm	216 nm
Largura	10	25
Inclinação	100	100
Desvio	5000	500
T.DBL	10	100
Min Área/Altura	100	100

As áreas dos picos obtidos na integração da OTA e da fase móvel foram inseridas em uma planilha do Microsoft Excel, onde foram calculadas as áreas totais dos analitos e dos interferentes. A partir dessas áreas foi calculado o valor da pureza e a incerteza padrão da solução padrão de OTA.

A Figura 28 apresenta os cromatogramas da solução padrão de OTA nas colunas *Pursuit* C₈ e C₁₈. A diferença de polaridade das colunas foi adequada para a separação cromatográfica dos componentes de impureza presentes em solução padrão do componente primário (OTA) usado para determinação da pureza. Os picos cromatográficos do analito em questão (OTA) apresentaram boa resolução cromatográfica para as duas colunas e picos minoritários de impureza também puderam ser detectados.

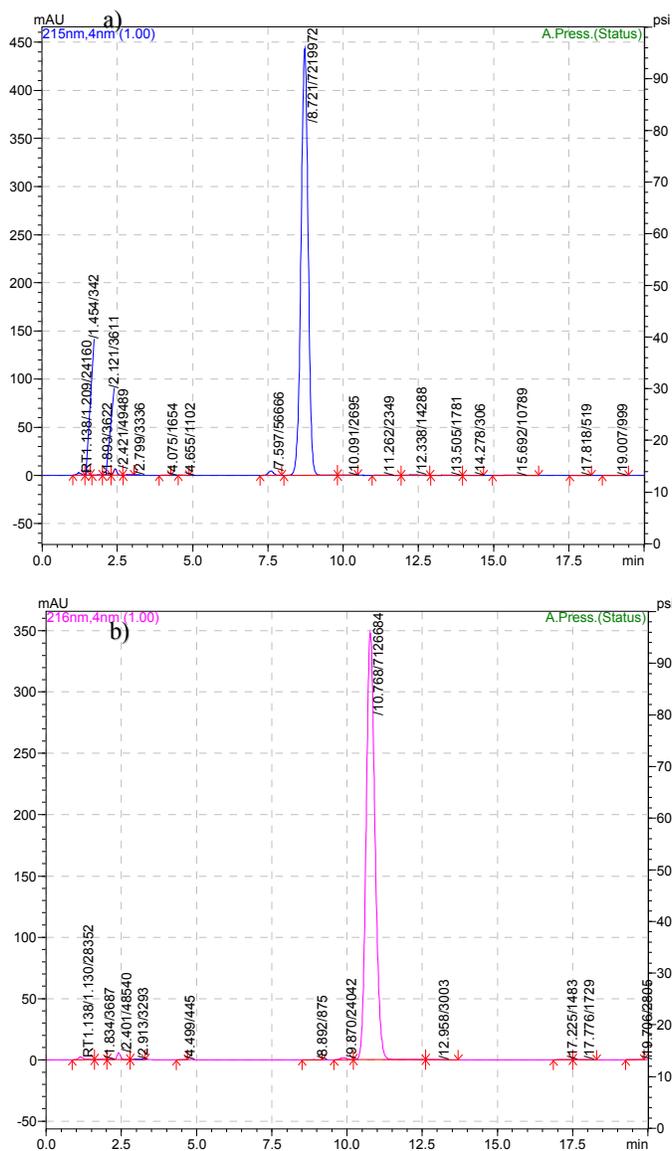


Figura 28. Cromatogramas da solução padrão de ocratoxina A nas colunas *Pursuit C₈* (a) e *Pursuit C₁₈* (b) na análise de determinação na pureza cromatográfica.

O resultado final deve levar em consideração os valores obtidos através das colunas cromatográficas, se não houver diferença significativa entre elas, calculando-se a pureza média. No entanto, como os resultados de pureza para as colunas cromatográficas foram significativamente diferentes com valores de 97,993 % e 98,819 % para C₈ e C₁₈, respectivamente. O resultado de pureza final foi obtido através da coluna que detectou maior número de impurezas, a C₈. Este resultado encontrado referente ao valor de pureza foi concordante com o mencionado pelo fabricante no valor de 98,0 %.

4.9 Comparação dos resultados obtidos através das técnicas CLAE-FLD e CLAE-EM/EM

Para a técnica de cromatografia líquida com detector de fluorescência (CLAE-FLD), os procedimentos analíticos foram considerados lineares em toda a faixa de trabalho da curva de calibração com valores 0,99483 e 0,97709 para matriz café verde e café torrado, respectivamente. Para avaliação da homocedasticidade dos resultados foi realizado o teste de *Cochran*, onde foram comparados os valores de $C_{\text{calculado}}$ com C_{tabelado} . Observou-se que o $C_{\text{calculado}}$ (0,5352) e $C_{\text{calculado}}$ (0,2460) foram menores que o valor de C_{tabelado} (0,68380) para os cinco níveis de concentração em triplicata da curva de calibração preparada nas matrizes de café verde e café torrado, respectivamente. Desta forma, a distribuição para os dois métodos, café verde e torrado, foi considerada homocedástica, indicando a variação de pontos homogênea durante toda a faixa de trabalho.

A Tabela 37 apresenta os resultados obtidos nos parâmetros linearidade, recuperação, desvio padrão relativo para repetitividade (DPR_r), desvio padrão relativo para reprodutibilidade (DPR_R) e o tempo de retenção (TR), utilizados para comparação entre as duas técnicas de CLAE-FLD e CLAE-EM/EM.

Tabela 37. Parâmetros de comparação entre a técnica CLAE-FLD e CLAE-EM/EM no café verde e café torrado.

		<i>CLAE - FLD</i>		<i>CLAE - EM/EM</i>	
		<i>Café Verde</i>	<i>Café Torrado</i>	<i>Café Verde</i>	<i>Café Torrado</i>
Linearidade	Coefficiente de determinação (r)	0,99483	0,97709	0,98188	0,91754
	Coefficiente angular	12592	6355,2	69817,9	239065,9
	Teste Cochran	0,5352	0,2460	0,5428	0,5882
Recuperação		77,82-115,67	79,54-99,51	90,45-108,81	89,02-108,85
DPR_r		0,30-3,19	0,49-12,82	5,39-9,94	2,43-13,73
DPR_R		-----	-----	2,20-14,34	12,57-17,84
TR (minutos)		7,543 e 7,614		1,40	

A sensibilidade do método CLAE-FLD expressa através da inclinação da reta que foi 12592 e 6355,2 para café verde e café torrado, respectivamente. Estes resultados apresentaram valores menores do que os comparados para as curvas de calibração do método CLAE-EM/EM, 69817,90 e de 239065,85 para café verde e café torrado, respectivamente. Como uma maior inclinação da reta, ou seja, um maior coeficiente angular corresponde a uma maior sensibilidade, pode-se concluir que o método CLAE-EM/EM se

mostrou mais sensível do que o CLAE-FLD para determinação de ocratoxina A, pois pequenas variações de concentração resultaram em uma maior variação da resposta.

Os cromatogramas obtidos para os extratos de café verde e torrado nas concentrações 13,0 µg/kg e 5,0 µg/kg através da técnica CLAE-FLD estão descritos na Figura 29 e Figura 30, respectivamente. A ocratoxina A eluiu nos tempos de retenção de 7,543 e 7,614 minutos no café verde e café torrado, respectivamente.

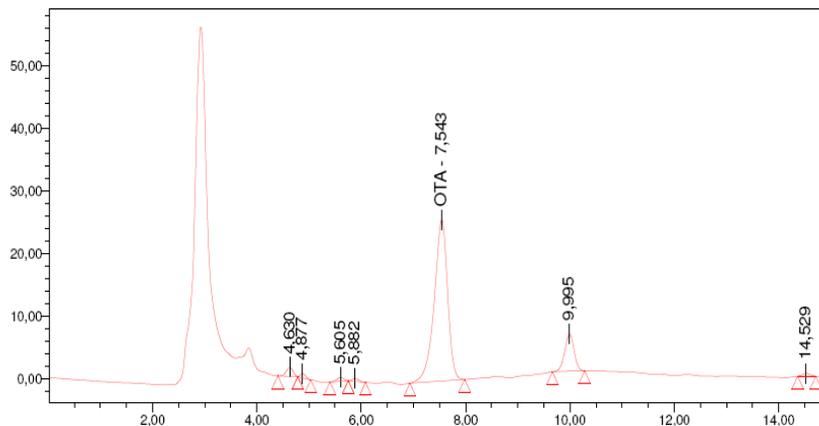


Figura 29. Cromatograma de extrato de café verde fortificado com ocratoxina A na concentração de 13,0 µg/kg através da técnica CLAE-FLD.

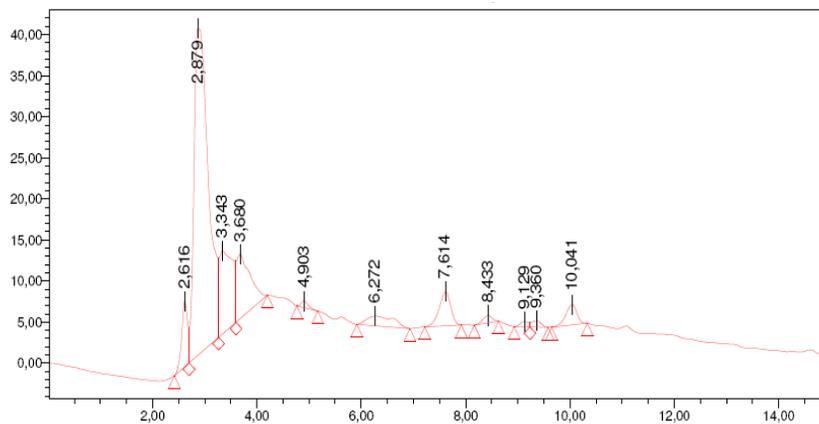


Figura 30. Cromatograma de extrato de café torrado fortificado com ocratoxina A na concentração de 5,0 µg/kg através da técnica CLAE-FLD.

Através destes cromatogramas, pode-se observar a presença de inúmeros picos, diferentes da ocratoxina A demonstrando a pouca seletividade dessa técnica para determinação de ocratoxina A no café verde e torrado. Desta forma, a quantificação dessa substância por essa técnica pode gerar resultados errôneos de falso positivo, uma vez que outras substâncias podem estar coeluinto no mesmo tempo de retenção da ocratoxina A.

Os cromatogramas obtidos para os extratos de café verde e torrado nas concentrações de 13,0 µg/kg e 5,0 µg/kg através da técnica de cromatografia líquida acoplada ao detector de espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) estão descritos nas Figura 31 e Figura 32, respectivamente. A ocratoxina A eluiu no tempo de retenção de 1,40 minutos para ambas as

matrizes, café verde e torrado. Desta forma, a técnica CLAE-EM/EM se mostrou mais rápida do que a CLAE-FLD e observou-se que os cromatogramas obtidos pela técnica de CLAE-EM/EM são seletivos e a possibilidade de interferência de outros picos no mesmo tempo de retenção não ocorre, devido ao monitoramento dos íons específicos, como a razão massa carga 239 para ocratoxina A.

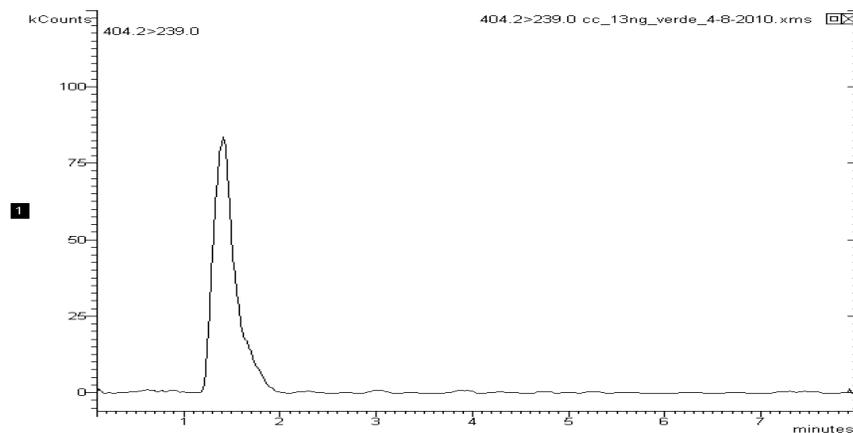


Figura 31. Cromatograma de extrato de café verde fortificado com ocratoxina A na concentração de 13,0 µg/kg através da técnica CLAE-EM/EM.

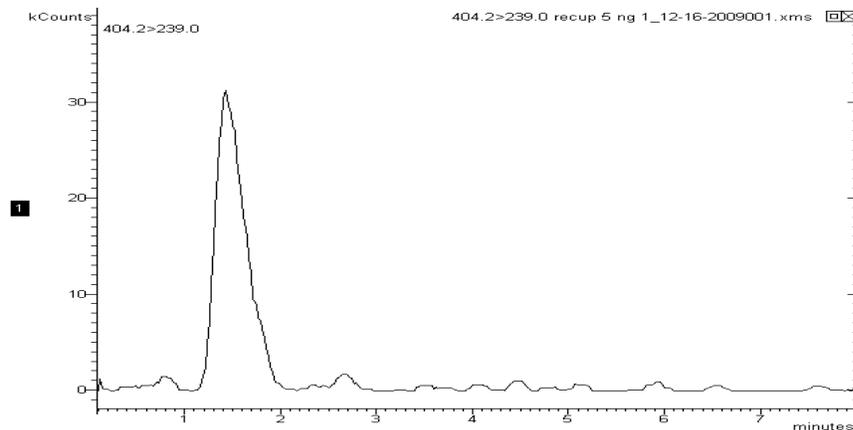


Figura 32. Cromatograma de extrato de café torrado fortificado com ocratoxina A na concentração de 5,0 µg/kg através da técnica CLAE-EM/EM.

Os valores de Recuperação média e Repetitividade (DPR_r) encontrados na determinação de ocratoxina A por CLAE-FLD para amostras de café verde e café torrado fortificadas nos pontos baixo, médio e alto, estão apresentados nas Tabela 38 e Tabela 39.

Tabela 38. Valores de recuperação e repetitividade (DPR_r) para amostras de café verde utilizando CLAE-FLD.

Concentração ($\mu\text{g/kg}$)	Recuperação (%)	DPR_r (%)
5,0	77,82	1,22
13,0	115,67	3,19
20,0	91,64	0,30

Para o café verde os valores das recuperações médias e DPR_r (%) variaram na faixa de 77,82 – 115,67 % e de 0,30 – 3,19 %, respectivamente nos três níveis de contaminação. Os resultados de recuperação nas concentrações baixa (5,0 $\mu\text{g/kg}$) e alta (20,0 $\mu\text{g/kg}$) encontram-se dentro dos limites comumente aceitáveis pela Comissão do *Codex Alimentarius* (70-110 %). No entanto, o ponto médio (13,0 $\mu\text{g/kg}$) apresentou valor superior a faixa estabelecida. Este resultado pode ter ocorrido devido a presença de interferente, que pode ter coeluído no mesmo tempo de retenção da ocratoxina A.

Os resultados de recuperação obtidos foram melhores que os relatados por SUGITA-KONISHI *et al.* (2006) (59,0%). Os valores de DPR_r % foram menores que os reportados por DIAZ *et al.* (2004) (14,3 a 15,5 %), GILBERT; ANKLAM (2002) (21,0 a 32,0 %), VARGAS *et al.* (2005) (7,42 a 20,94 %) e que os valores reportados por VENTURA *et al.* (2003) (4,0 %). Desta forma, os resultados apresentaram pouca variação e boa repetitividade nos resultados.

Tabela 39. Valores de recuperação e repetitividade (DPR_r) para amostras de café torrado utilizando CLAE-FLD.

Concentração ($\mu\text{g/kg}$)	Recuperação (%)	DPR_r (%)
3,5	99,51	12,24
5,0	79,54	12,82
6,5	80,09	0,49

Para café torrado os valores das recuperações médias e DPR_r (%) variaram na faixa de 79,54 – 99,51 % e de 0,49 – 12,82 %, respectivamente, nos três níveis de contaminação baixo (3,5 $\mu\text{g/kg}$), médio (5,0 $\mu\text{g/kg}$) e alto (6,5 $\mu\text{g/kg}$). Todos os resultados de recuperação dos pontos de concentração encontram-se dentro dos limites comumente aceitáveis pela Comissão do *Codex Alimentarius* (70-110 %) e foram similares aos obtidos na literatura como ENTERWISE *et al.* (2001) (65,0 - 97,0 %). Os valores obtidos de DPR_r do presente método foram melhores quando comparados a GILBERT; ANKLAM (2002) (21,0 - 32,0 %). Os desvios padrões relativos para café verde (DPR_r %) foram inferiores aos encontrados para café torrado para toda faixa estudada, isto provavelmente está relacionado a complexidade da matriz uma vez que com o processo de torrefação, muitos compostos são formados.

Para comparação entre os métodos propostos foi realizado também o teste F para comparação das variâncias das curvas. Os resultados encontrados foram que o $F_{\text{calculado}}$ tanto para o método café verde (1,01611) quanto para o café torrado (1,31712), apresentaram valores menores que o F_{tabelado} (19,000), as variâncias foram consideradas estatisticamente semelhantes. Foi realizado também o teste t considerando a hipótese de médias estatisticamente equivalentes, onde o $t_{\text{calculado}}$, tanto para o café verde (0,07066) quanto para o café torrado (1,11216) apresentaram valores inferiores ao t_{tabelado} (2,77644), indicando a

equivalência entre os resultados obtidos para ambas as técnicas, de CLAE-FLD e de CLAE-EM/EM. Estes resultados estão disponíveis nos anexos H e I, para café verde e café torrado, respectivamente.

4.10 Publicações

BANDEIRA, R. D. C. C., UEKANE, T. M., CUNHA, C. P., COSTA, D. A., la Cruz, M. H. C., GODOY, R. L. O., CUNHA, V. S., RODRIGUES, J. M. “DEVELOPMENT OF METHOD FOR OCHRATOXIN A ANALYSIS IN COFFEE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY/ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY“. **Simpósio de Metrologia, outubro de 2008, CENAM, Querétaro, México.**

BANDEIRA, R. D. C. C., UEKANE, T. M., CUNHA, C. P., COSTA, D. A., la Cruz, M. H. C., GODOY, R. L. O., BORGES, C.N., CUNHA, V. S., RODRIGUES, J. M. PURITY DETERMINATION OF OCHRATOXIN A (OTA) BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH DIODE ARRAY DETECTOR (HPLC-DAD). **Metrologia 2009, novembro de 2009, Salvador.**

BANDEIRA, R. D. C. C., UEKANE, T. M., CUNHA, C. P., COSTA, D. A., la Cruz, M. H. C., GODOY, R. L. O., CUNHA, V. S., RODRIGUES, J. M. “DEVELOPMENT OF METHOD FOR OCHRATOXIN A ANALYSIS IN COFFEE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY/ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY“. **Submetido à revista Ciência da Vida Rural, situação em avaliação, maio de 2010.**

BANDEIRA, R. D. C. C., UEKANE, T. M., CUNHA, C. P., COSTA, D. A., la Cruz, M. H. C., GODOY, R. L. O., CUNHA, V. S., RODRIGUES, J. M. “DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD FOR OCHRATOXIN A ANALYSIS IN ROASTED COFFEE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY/ELECTROSPRAY TANDEM MASS SPECTROMETRY“. **Submetido à revista Food Additives and Contaminants, situação em avaliação, julho de 2010.**

CUNHA, C.P., BANDEIRA, R.D.C.C., UEKANE, T.M., GEQUINTO, L.R.O., CUNHA, V.S., RODRIGUES, J.M. “COMPARAÇÃO DA ANÁLISE DO TEOR DE UMIDADE NO CAFÉ TORRADO E MOÍDO POR KARL FISCHER E MÉTODO DE SECAGEM EM ESTUFA“. **Submetido à revista Ciência da Vida Rural, situação em avaliação, maio de 2010.**

5 CONCLUSÕES

A técnica CLAE-IEN-EM/EM em combinação com MSR se mostrou sensível para determinação de OTA no café verde e no café torrado.

Os resultados obtidos da validação dos métodos propostos encontram-se dentro dos limites comumente aceitáveis na literatura

O $F_{\text{calculado}}$ para os métodos café verde (25,2152) e café torrado (104,0353) foram superiores ao F_{tabelado} (4,0426). O $t_{\text{calculado}}$ para o café verde (5,0214) e café torrado (10,1997) apresentaram valores maiores que o t_{tabelado} (2,0106). Estes resultados comprovaram o efeito matriz para café verde e café torrado.

Os métodos foram considerados lineares em toda a faixa de trabalho da curva de calibração com os coeficientes de determinação linear (r) de 0,98188 e 0,91754 para matriz café verde e café torrado, respectivamente.

O limite de quantificação e detecção para os métodos propostos foram de 1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 3,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para café verde e 0,36 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para café torrado.

Os valores das recuperações médias, DPR_r e DPR_R variaram na faixa de 90,45 - 108,81 %, 5,39 - 9,94 % e 2,20 - 14,34 % para café verde; e de 89,02 - 108,85 %, de 2,43 - 13,73 % e 12,57 - 17,84 %, para café torrado.

A técnica CLAE-EM/EM se mostrou adequada para determinação de ocratoxina A no café verde e café torrado por ser seletiva e mais rápida do que a técnica CLAE-FLD comumente utilizada para determinação desta substância nestas matrizes.

Os resultados de medição e as incertezas expandidas (U) para ocratoxina A foram as frações mássicas $W = (11,50 \pm 1,11) \mu\text{g}/\text{kg}$ e $W = (4,63 \pm 0,63) \mu\text{g}/\text{kg}$ para café verde e café torrado, respectivamente. Este trabalho é pioneiro na criação de métodos validados para determinação de ocratoxina A nas matrizes café verde e café torrado utilizando a técnica de CLAE-IEN-EM/EM e estimando a incerteza de medição.

Este trabalho de tese foi de grande valia para a metrologia química no Brasil, pois permitiu promover ensaios com confiabilidade metrológica, contribuindo para a melhoria da capacidade técnica na realização de análises de resíduos de ocratoxina A no café verde e café torrado.

Este trabalho é o primeiro passo para a futura produção e certificação de material de referência certificado (MRC) para OTA no café verde e café torrado no INMETRO, comercialmente inexistente no mundo.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Produzir, Caracterizar, Homogeneizar e Estudar a estabilidade para produção de Materiais de Referência Certificados (MRC) para OTA no café verde e café torrado, ainda comercialmente inexistentes no mundo.

Contribuir disponibilizando amostras para realização de Ensaio de Proficiência (EP) a fim de auxiliar laboratórios em análise de OTA no Brasil.

Desenvolver e validar metodologias utilizando padrões marcados isotopicamente (OTA C13), método primário de medição.

Contribuir para a melhoria do desempenho de laboratórios nacionais na realização de análises de resíduos de ocratoxina A em café verde e torrado, disponibilizando os métodos desenvolvidos.

Aplicar esta metodologia em outros alimentos, como cereais (trigo, aveia, cevada, milho) e produtos de cereais; bebidas (vinho, suco de uva, cerveja); frutas secas (passas); grãos (soja, cacau), chá, temperos e produtos de origem animal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ). **Estatísticas: Indicadores da Indústria de café do Brasil**. In: portal da Associação Brasileira da Indústria de café. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/exportação>>. Acesso: jun. 2010.

ABNT, INMETRO (Associação Brasileira de Normas Técnicas, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial); **Guia para a Expressão da Incerteza de Medição**, 3^a Ed., Rio de Janeiro, 2003.

ABNT, NBR ISO/IEC 17025:2005. (Associação Brasileira de Normas Técnicas, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial); **Requisitos Gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**, 2^a Ed., Rio de Janeiro, 2005.

AHMED, N.E., FARAG, M.M., SOLIMAN, K.M., ABDEL-SANED, A.K.M., NAGUIB, KH. M. Evaluation of Methods Used To Determine Ochratoxin A in Coffee Beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9576-9580, 2007.

ALMEIDA, A.P. J. ALABURDA, L. SHUNDO, V. RUVIERI, S.A. NAVAS, L.C.A. LAMARDO, M. SABINO. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 300-303, 2007.

ANVISA (AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA). **Legislação**. In: portal da Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/377_99.htm. Acesso: jun 2009.

AUGUSTO, C. R. **A influência da incerteza de medição da análise cromatográfica do gás natural no cálculo do poder calorífico superior do gás**, Rio de Janeiro, Brasil, 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, EQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, p. 53-65, 2007.

BAYMAN, P., BAKER, J.L. Ochratoxins: a global perspective. **Mycopathologia**. v.162, p.215, 2006.

BECKER, M. P. DEGELMANN, M. HERDERICH, P. SCHREIER, H.U., HUMPT, H. U. Column liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of ochratoxin. **Journal of Chromatography A**, v. 818, p. 260-264, 1998.

BLANC, M. et al. Behavior of Ochratoxin A during Green Coffee Roasting and Soluble Coffee Manufacture. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, n.2, p.673-675, 1998.

BRASIL, MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Metodologia analítica para determinação de ocratoxina A por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em café verde, milho e feijão**. Instrução Normativa, n.9, mar, 2000.

BRESH, M., URBANEK, M., HELL, K. Ochratoxin A in coffee, tea and beer. **Archiv für Lebensmittelhygiene**, v.51, p.89-94, 2000.

BRUTTEL, P.; SCHLINK, R. **Determinação de água por titulação Karl Fisher**. Metrohm Ltd, 2003, p. 2-70. Disponível em <http://www.titrators.us/applications/lit/mono.html>. Acesso: jun 2009.

BUHELLI, P., TANIWAKI, M. H. Review: Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin in coffee. **Food Additives Contaminants**, v. 19, p. 655-665, 2002.

BULLERMAN, L. B. In: Caballero, B.; Trigo, L. C.; Finglas, P. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2 nd Edition. London: Academic Press, v.6, 2003, 4080-4108 p.

CECAFÉ (CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL). **Dados de Exportações de Agosto/2009**. In: Portal do Conselho dos exportadores de café do Brasil. Disponível em: <http://www.cecafe.com.br/Menu/dados/exportacoes.pdf>. Acesso: set. 2009.

CHIARADIA, M.C., COLLINS, C.H., JARDIM, I. C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada a espectrometria de massa acoplada a espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n.3, p. 623-636, 2008.

CLARKE, R.J., MACRAE, R. **Coffee Chemistry**. London: Elsevier Applied Science Publishers; 1985, v.1, c., 42 p.

CLARKE, R.J. MACRAE, R. **Green coffee, Roast and Ground**. In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. CABALLERO, B., TRMGO, L.C., FINGLAS, P. (Ed), 2ª edição, Academic Press, 2003, v. 3, 1486, 1489 p.

CODEX, 2007, Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Contaminants in Food. Discussion paper on Ochratoxin A in coffee. 2006. First Session, April 16-20, 2007 (China:WHO).

COELHO, K.F. **Avaliação química e sensorial da qualidade do café de bebida estritamente mole após a inclusão de grãos defeituosos**, Lavras, Brasil, 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) – Universidade Federal de Lavras, p. 3-17, 2000.

CROUBELS, S., DE BAERE, S., DE BACKER, P. Practical approach for the stability testing of veterinary drugs in solutions and in biological matrices during storage. **Analytica Chimica Acta**, n. 483, p. 419-427, 2003.

CUNHA, R.D.C. **Identificação de compostos voláteis de café sadios e com defeito por cromatografia gasosa e análise multivariada**, Rio de Janeiro, Brasil, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) – Instituto de Química, IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, p. 1-12, 2005.

DE GRANDE, S.M. B., AQUINO NETO, F. R. A espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas EM-EM. **Química Nova**, v.13, n.3, p.191-199, 1990.

DE LA CRUZ, M.H.C., RODRIGUES, J.M., COUTO, P.R., CUNHA, V.S., BREMSER, W. Estimativa da Incerteza de medição em análise cromatográfica: abordagem sobre a quantificação de carbamato de etila na cachaça. **Química Nova**, v. 33, n.7, p.1-7, 2010.

DE MARIA, C.A.B., TRMGO, L.C., MOREIRA, R.F.A., WERNECK, C.C. Composition of green coffee fractions and their contribution to the volatile profile formed during roasting. **Food Chemistry**, v.50, p.141-145, 1994.

DE OLIVEIRA, E.C., DE AGUIAR, P.F. Validação da Metodologia da avaliação de incerteza em curvas de calibração melhor ajustada por polinômio de segundo grau. **Quim. Nova**, v.32, n.6, p.1655, 2009.

DIAS, J.L.M. **Medida, Normalização e Qualidade: aspectos da história da metrologia no Brasil**. Rio de Janeiro. Inmetro, c.1-6, 1998, 11-208 p.

DIAZ, G. J.; ARIZA, D.; PERILLA, N. S. Method validation for the determination of ochratoxin A in green and soluble coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography. **Mycotoxin Research**, v. 20, p.59, 2004.

EC. 2002. Commission Decision (EC) No. 657/2002 of 2 August 2002. Official Journal of the European Communities L221/8-36.

EC. 2005. Commission Regulation (EC) No. 123/2005 of 26 January 2005. Official Journal of the European Union L25: 3-5.

ENTERWILSE, A., WILLIAMS, A.C., MANN, P.J., RUSSELL, J. SLACK, P.T., GILBERT, J. Combined phenyl silane and immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of ochratoxin A in roasted coffee: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 2, p. 444-450, 2001.

EURACHEM, CITAC Working Group (The Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry, A focus for Analytical Chemistry in Europe). **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, 2nd Edition, 2000, 4-30p.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION). **International Conference on Mycotoxins; Report of Joint FAO/WHO/UNEP**. Tunis: WHO, 1999.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Manual on the application of the Haccp System in mycotoxin prevention and control**. In: portal Food and agriculture organization of the united nations. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/005/y1390e/y1390e00.htm>>. Acesso: set. 2009.

FAO/WHO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Reducing OTA in Coffee**. In: portal da Food and agriculture organization of the united nations. Disponível em <<http://www.coffee-ota.org/faq.asp>>. Acesso: set. 2009.

FARAH, A. **Distribuição nos grãos, importância na qualidade da bebida e biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos do café**, Rio de Janeiro, Brasil. 2004. Tese (Doutorado em Ciência de alimentos) - Instituto de Química, CT, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2004.

FROTA, M.N., OHAYON, P. **Padrões e Unidades de Medida – Referências Metroológicas da França e do Brasil**. Rio de Janeiro. Inmetro, 1999, 120 p.

FROTA, M.N., MULLER, T.H., SEMERIJAN, H.G. **Metrology in Chemistry: a new challenge for the Americas: proceedings of the First Interamerican Workshop on Metrology in Chemistry**. Rio de Janeiro. Inmetro, 1998, 1-244 p.

FUJII, S. ONO, E.Y.S., RIBEIRO, R.M.R., ASSUNÇÃO, F.G.A., TAKABAYASHI, C.R., OLIVEIRA, T.C.R.M., ITANO, E.N., UENO, Y., KAWAMURA, O., HIROOKA, E.Y. A comparison between enzyme immunoassay and HPLC for Ochratoxin A detection in green, roasted and instant coffee. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 349-359, 2007.

FUJII, S.; ONO, E. Y. S., HIROOKA, E.Y. Ocratoxina A em café: controle e metodologia analítica com ênfase a inovação no contexto de segurança alimentar. **Seminário de Ciências Agrárias**, v.23, n.2, p.273-292, 2002.

FURLANI, R.P.Z., SOARES, L.M.V., OLIVEIRA, P.L.C. Avaliação de métodos para determinação de Ocratoxina A em cafés verdes e torrados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, p. 87-98, 1998.

GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**, n. 21, n.6, p. 468, 2002.

GOLLUCKE, A. P. B., TANIWAKI, M. H.; TAVARES, D. Q. Survey on ochratoxin A in Brazilian green coffee destined for exports. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p.641-645, 2004.

GONZALEZ, E.A.S. **Estudo da viabilidade de implantação de pequenas unidades de torrefação de café**, Rio de Janeiro, Brasil, 2003. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Engenharia de Alimentos - Universidade Estácio de Sá, RJ, 2003.

HORWITZ, W. Uncertainty: a chemist's view. **J. AOAC Int.**, v.81, n.4, p.785-794, 1998.

HORWITZ, W., ALBERT, R. Quality Issues the concept of uncertainty as applied to chemical measurements. **Analyst**, v.122, p.615, 1997.

INDEX MERCK. 20 th Edition. New Jersey; Merck & CO. Inc; 1996, 1521-1529 p.

INMETRO. DOQ-CGCRE Nº 008, 2010. **Orientação sobre Validação do Métodos de Ensaio Químicos**, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Rio de Janeiro, n.3, 2010.

INMETRO. VIM, 2008. **Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados**, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, JCGM, 3ª Ed., Rio de Janeiro, 2008.

ISENGARD, H. D.; FÄRBER, J. M. Hidden parameters of infrared drying for determining low water contents in instant powders. **Talanta**, v. 50, n. 2, p. 239-246, 1999.

ISO GUIDE 35. **Reference Material – General and Statistical principles for certification.** International Organization for Standardization. Geneva, 3 rd edition, 2006.

JOSEPHS, R. D., KRŠKA, R., MACDONALD, S., WILSON, P., PETERSON, H. Preparation of calibrant as certified reference material for determination of the Fusarium Mycotoxin Zearalenone. **J. AOAC Int.**, v. 86, p. 50, 2006.

LAU, B. P. Y., SCOTT, D.A., KANHERE, L., KANHERE, S.R. Quantitative determination of ochratoxin A by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.35, p.23-32, 2000.

LEONI, L.A.B.; FURLANI, R.P.Z.; VALENTE SOARES, L.M.; OLIVEIRA, P.L.C. Ochratoxin A in brazilian green coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n.1, p.105, 2001.

LINDENMEIER, M., SCHIEBERLE, P., RYCHLIK, M. Quantification of Ochratoxin A in food by stable isotope dilution assay using high-performance liquid chromatography-tandem mass-spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, p. 57-66, 2004.

MANTLE, P.G. Risk assessment and the importance of ochratoxins. **Int Biodet & Biodeg**, v.50, p.143-146, 2002.

MARCÓ, A., COMPANYÓ, R., RUBIO, R., PUEYO, M., VILALTA, E.; **Microchim. Acta**, v.159, p. 387, 2007.

MARTIN, S.K. **Coffee and tea.** In: William HORWITZ; George W. LATIMER, Jr. (Ed.) Official methods of analysis of the AOAC International. Gaithersburg: AOAC International, 2005, p. 1-12.

MASOUD, W.; KALTOFT, C. H. The effects of yeasts involved in the fermentation of Coffea arabica in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by Aspergillus ochraceus. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.229 -234, 2006.

MELLO, A.A. **Estudo dos compostos voláteis formados por pirólise da fração de alto Massa Molecular isolada de café**, Rio de Janeiro, Brasil, 1998. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Química, IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 1998.

MICCO, C. *et al.* A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. **Food Addit. Contam.**, v. 6, p.333-339, 1989.

MOBERG, M., BYLUND, D. B., MARKIDES, K. Optimization strategy for liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry methods. **Analyst**, v. 125, p. 1970-1976, 2000.

MONACI, L.; PALMISANO, F. Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges. **Anal Bioanal Chem**, n.378, p.96-103, 2004.

MORELLO, L.G.; SARTORI, D.; MARTINEZ, A.L.O.; VIEIRA, M.L.; TANIWAKI, M.H., FUNGARO, M.H. Detection and quantification of Aspergillus westerdijkiae in coffee

beans based on selective amplification of beta-tubulin gene by using real-time PCR. **Inter Journal Food Micro**, n.119, p.270, 2007.

MORGANO, A. M.; FARIA, C. G.; FERRÃO, M. F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M. M. C.; Determinação de umidade em café cru usando espectroscopia NIR e regressão multivariada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 12-17, 2008.

NESHEIM, S. TRUCKSESS, M. W., PAGE, S. W. Molar absorptivities of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in acetonitrile, methanol and toluene-acetonitrile (9:1) (Modification of AOAC Official Method 971.22): Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.82, n.2, p. 251-257, 1999.

NIESSEN, W.M.A., TINKE, A.P. Liquid chromatography – mass spectrometry General principles and instrumentation. **Journal of Chromatography A**, v. 703, p. 35-57, 1995.

NIST. **An approach to the metrologically sound traceable assessment of the chemical purity of organic reference materials**, National Institute of Standards and Technology. United States, 53 p., 2004.

PATEL, S., HAZEL, C.M., WINTERTON, A. G. M., GLEADLE, A.E. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Additives Contaminants**, v.14, p.217-222, 1997.

PITTET, A.; TORNARE, D.; HMGGETT, A.; VIANI, R. Liquid chromatography determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3564-3569, 1996.

POHLAND, A.E., NESHEIM, S., FRIEDMAN, L. Ochratoxin A: a review. **Pure and Applied Chemistry**, v.64, n.7, p.1029-1049, 1992.

PRADO, G., OLIVEIRA, M.S., ABRANTES, F.M., SANTOS, L.G., VELOSO, T., BARROSO, R.E.S. Incidência de Ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.2, p.192-196, 2000.

RAND, R.N. Practical Spectrophotometric Standards. **Clinical Chemistry**, v. 15, n.9, p. 839-863, 1969.

RODRIGUA-AMAYA, D.B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Braz J of Microb**, 33, 1, 2002.

SARTORI, A. V; SANTOS, R. P; MORAES, M. H. P; de la CRUZ, M. H. C. **Estimativa da Incerteza de Medição Associada à determinação da concentração de soluções padrão de micotoxinas por espectrofotometria de UV**. Anais do XVI Encontro Nacional e II Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos, 2009, Belo Horizonte.

SCHUMACHER, P. GORENBEIN, A. RASKIN, I. KUSELMAN, Development of an obidoxime chloride reference material: a metrological approach to the determination of chromatographic purity. **Accred. Qual. Assur**, v.12, p.629-636, 2007.

- SFORZA, S., DALL'ASTA, C. E MARCHELLI, R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/ Mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v.25, n.1, p.54-76, 2006.
- SIBANDA, L., DE SAEGER, S., VAN PETEGHEM, C. Optimization of solid-phase clean-up prior to liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in roasted coffee. **Journal of Chromatography A**, v.959, p.327-330, 2002.
- STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D.R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 341,1995.
- TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 173-179, 2003.
- TOLEDO, J.L.B., BARBOSA, A.T., **Classificação e degustação de café**. Brasília: Ed Sebrae, Rio de Janeiro, ABIC, 1998, 27-34 p.
- TRUCKNESS, M.W. **Natural Toxins**. AOAC (Association of Official Analytical Chemists): Official Methods of Analysis of AOAC International, Gaithersburg, 18 th Edition. Maryland, v. 1, c. 49, 2005, 58-65 p.
- TRUGO, L.C. Efeito da Torrefação no Perfil Cromatográfico obtido por Filtração em Gel e Extratos de Café Arábica. **Archivos Latino Americanos de Nutricion**, v. XXXVI, n. 4; p. 745-753, 1986
- TRUGO, L.C., MACRAE, R. Application of high performance liquid chromatography to the analyses of some non-volatile coffee components. **Archivos Latino Americanos de Nutrition**, v. 39, n.1, p. 60-64,1989.
- VALENTE SOARES, L. M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 60, n.1, p. 79-84, 2001.
- VARGAS, E.A., SANTOS, E.A. E PITTET, A. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.88, n.3, p.773-779, 2005.
- VATINNO, R; ARESTA, A.; ZAMBONIN, C.G.; PALMISANO, F. Determination of Ochratoxin A in green coffee beans by solid-phase microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, n.1187, v.145, 2008.
- VEGA, F.E.; POSADA, F.; PETERSON, S.W.; GIANFAGNA, T., CHAVES, F. Penicillium species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. **Mycologia**, n.98, p.31, 2006.
- VENTURA, M.; VALLEJOS, C.; ANAYA, I.A.; BROTO-PUIG, F.; AGUT, M.; COMELLAS, L. Analysis of Ochratoxin A in Coffee by Solid-Phase Cleanup and Narrow-Bore Liquid Chromatography-Fluorescence Detector-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.7564-7567, 2003.

WIBERG, K.; ANDERSSON, M.; HAGMANA, A.; JACOBSSON, S. P. Peak purity determination with principal component analysis of high-performance liquid chromatography–diode array detection data. **Journal of Chromatography A.**, v. 1029, p. 13 -20, 2004.

WIESER, M.E. Atomic Weights of the elements 2005. (Iupac Technical Report). **Pure Appl. Chem.**, v.78, n. 11, p. 2051–2066, 2006.

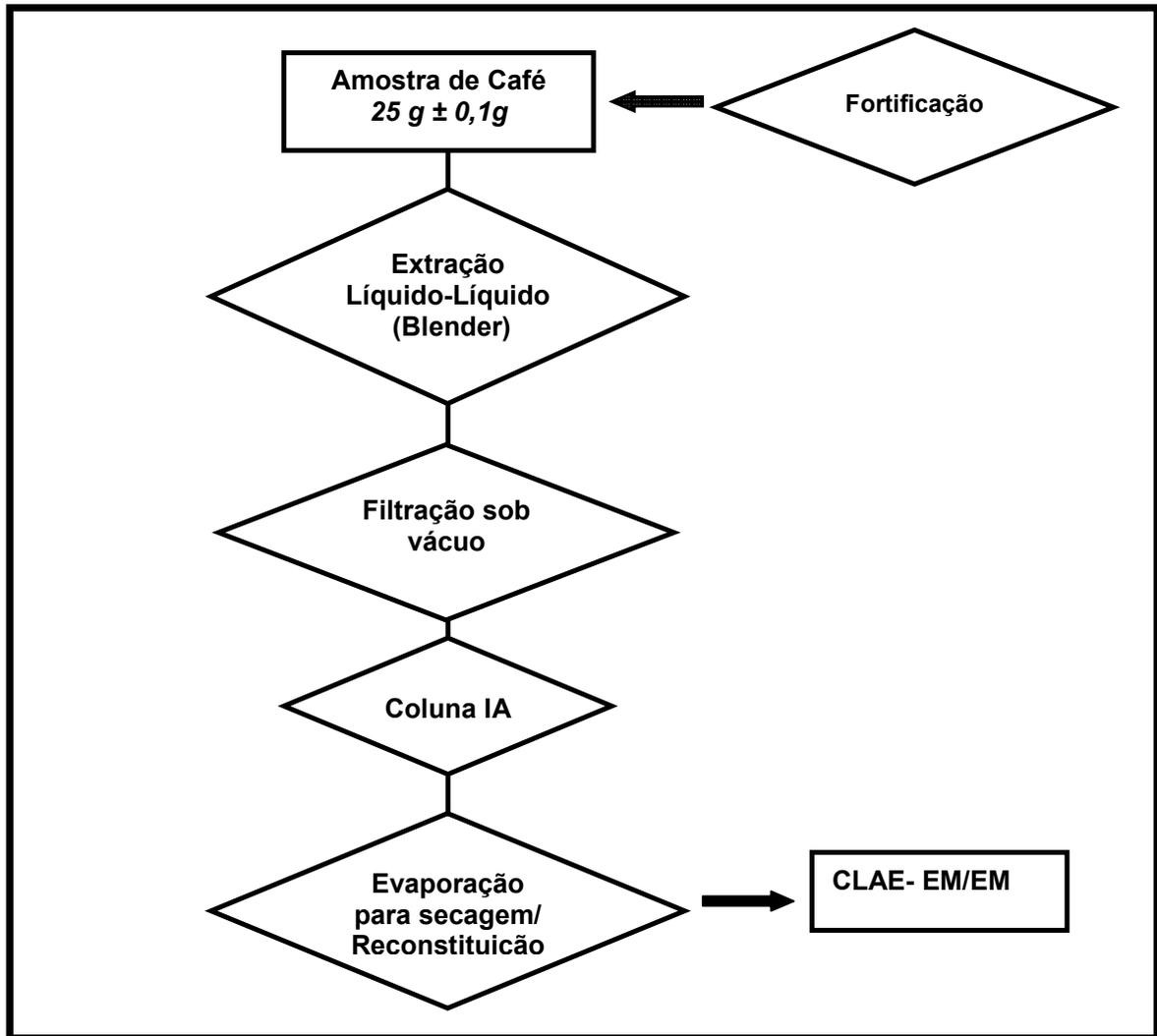
WILLIAMS, A. Measurement uncertainty in analytical chemistry. **Accred. Qual. Assur.** v.1, n.1, p. 14-17, 1996.

ZENEBON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 1^a edição digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, c.12, 2008, 489- 501 p.

ZOLLNER, P., MAYER-HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography - atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. **J of Chrom A**, n.1136, p.123, 2006.

8 ANEXOS

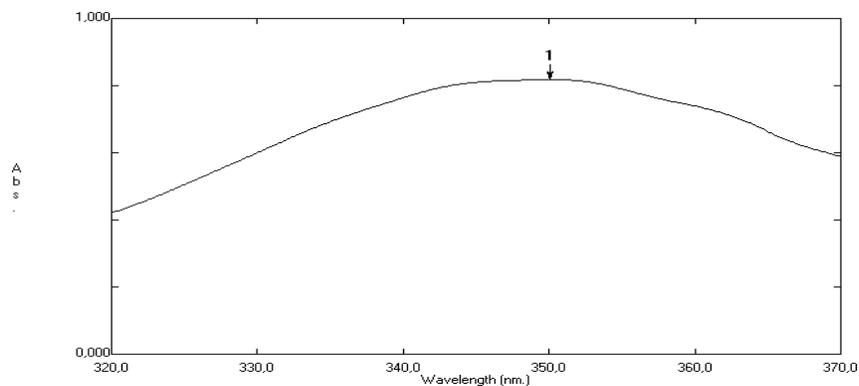
ANEXO A. FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DE OCRATOXINA A PARA O CAFÉ VERDE E TORRADO.



ANEXO B. ESPECTROS NA REGIÃO DO VISÍVEL (UV) PARA SOLUÇÃO DE DICROMATO DE POTASSIO NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,250 mM, 0,125 mM E 0,0625 mM, EM TRIPLICATA, RESPECTIVAMENTE.

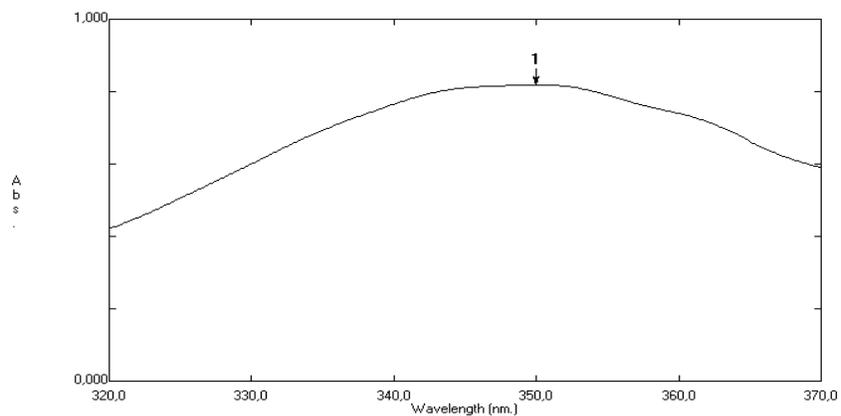
File Name: SOL 0,250 mM

No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	350,10	0,8185



File Name: SOL 0,250 mM_2

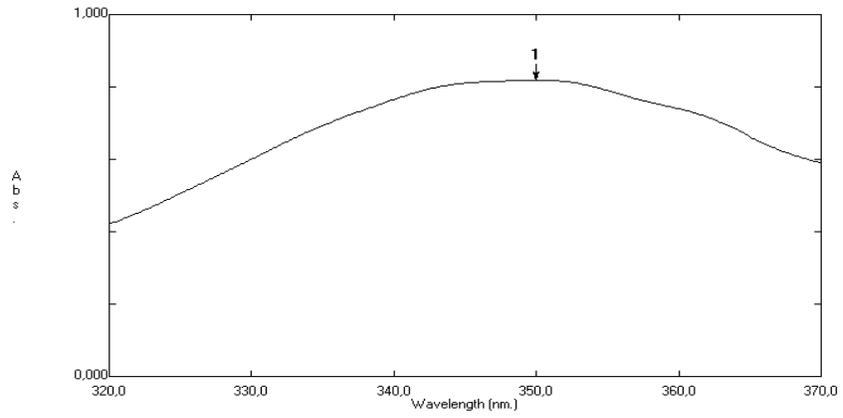
No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	350,00	0,8190



File Name: SOL 0,250 mM_3

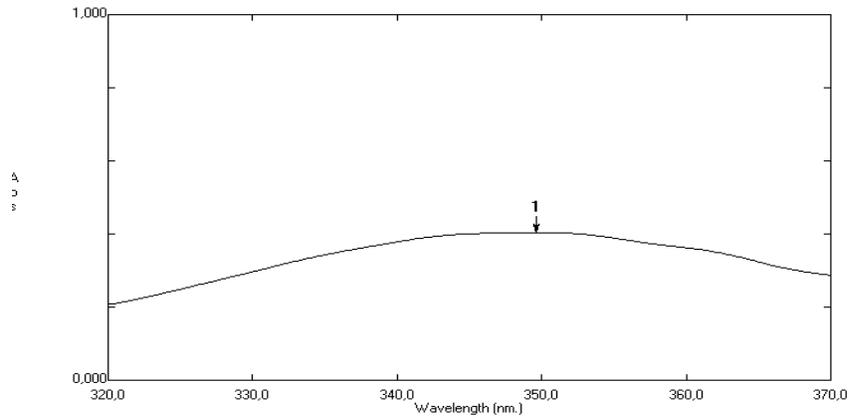
3ª Leitura:

No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	349,70	0,8190



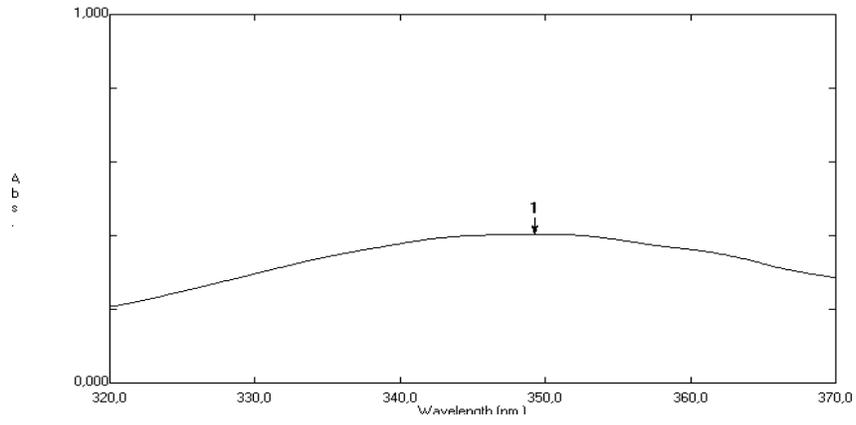
File Name: SOL 0, 125 mM

No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	349,60	0,4039



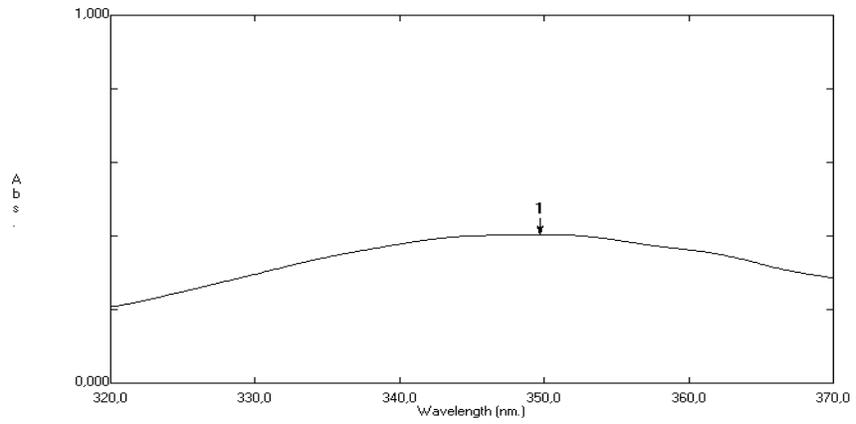
File Name: SOL 0, 125 mM_2

No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	349,30	0,4038



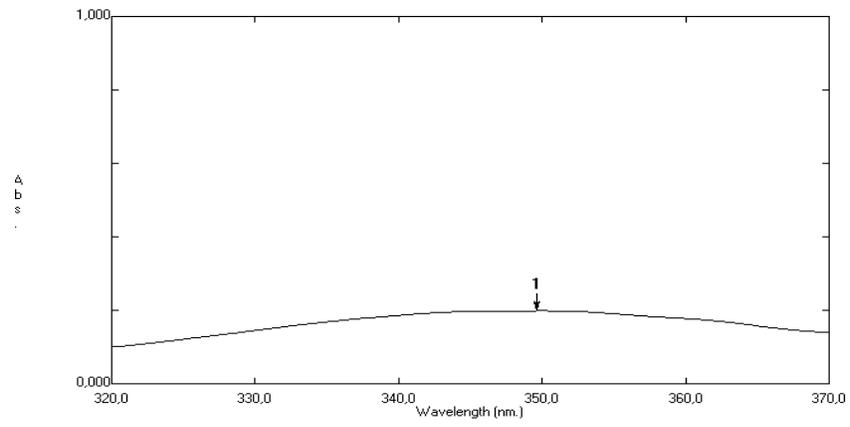
File Name: SOL 0, 125 mM_3

No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	349,70	0,4038



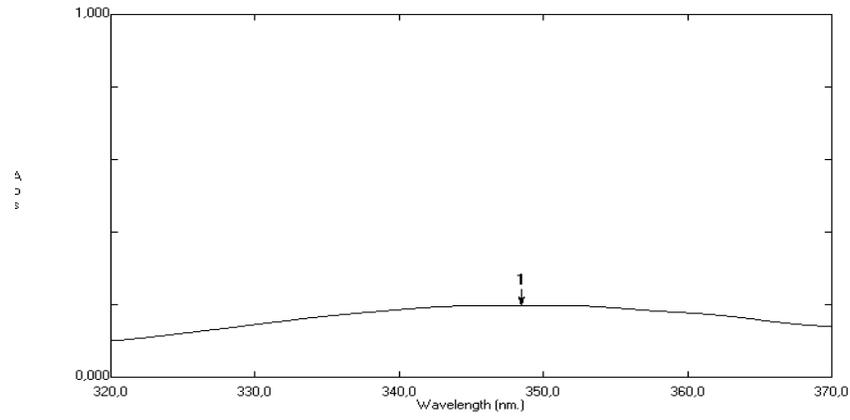
File Name: SOL 0, 0625 mM

No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	349,60	0,1986



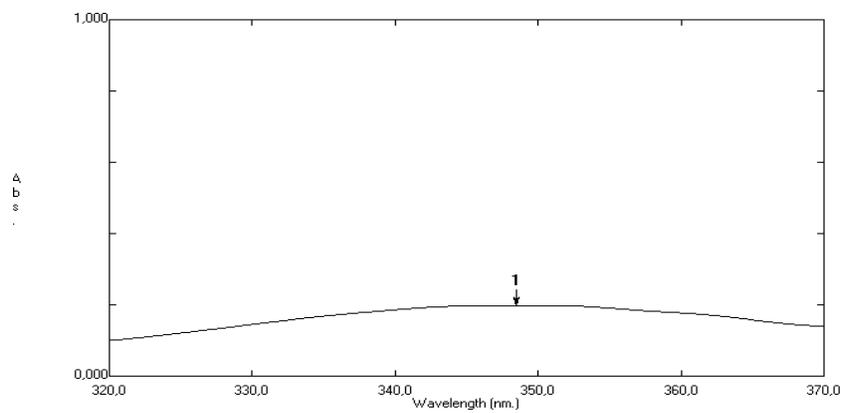
File Name: SOL 0, 0625 mM_2

No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	348,60	0,1985



File Name: SOL 0, 0625 mM_3

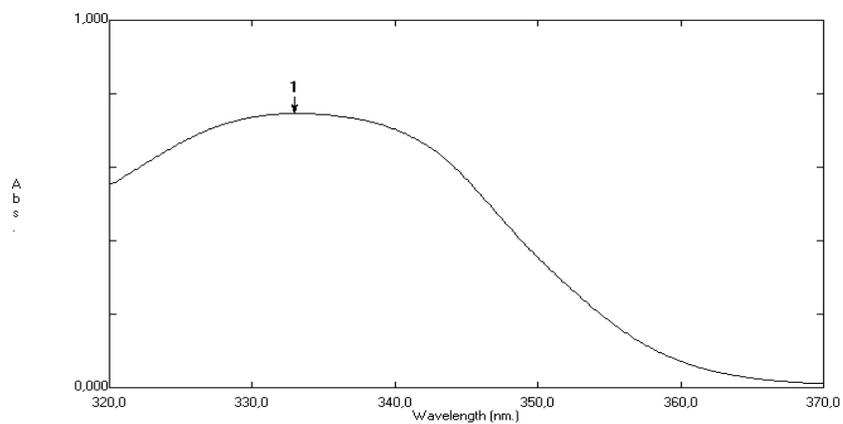
No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	348,50	0,1985



ANEXO C. ESPECTROS NA REGIÃO DO VISÍVEL (UV) PARA DETERMINAÇÃO DE SOLUÇÃO DE OCRATOXINA A.

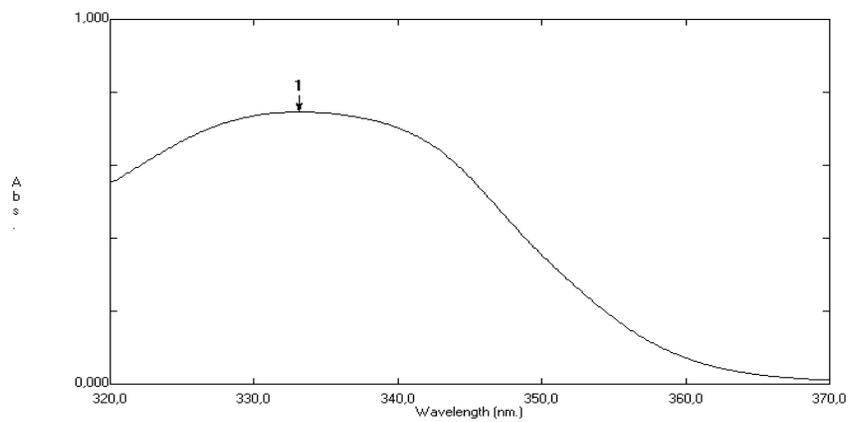
Sol 0209

No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	333,00	0,7462



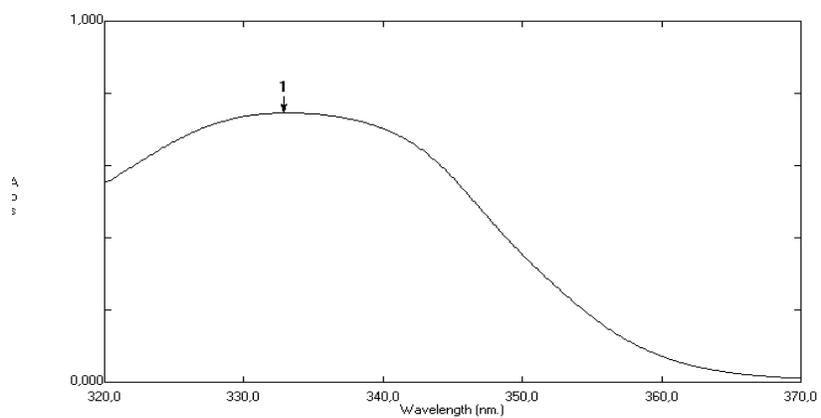
Sol 0209(2)

No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	333,10	0,7458



Sol0209(3)

No.	Wavelength (nm.)	Abs.
1	332,90	0,7458



ANEXO D. COMPROVAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ PARA A MATRIZ CAFÉ VERDE ATRAVÉS DO TESTE F E TESTE T STUDENT.

Teste-F: duas amostras para variâncias

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	2046941,08	815629,24
Variância	1,33209E+12	1,71094E+11
Observações	25	25
gl	24	24
F	7,785730282	
P(F<=f) uni-caudal	1,89416E-06	
F crítico uni-caudal	1,983759568	

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	2046941,08	815629,24
Variância	1,33209E+12	1,71094E+11
Observações	25	25
Hipótese da diferença de média	0	
gl	30	
Stat t	5,021477077	
P(T<=t) uni-caudal	1,09629E-05	
t crítico uni-caudal	1,697260851	
P(T<=t) bi-caudal	2,19259E-05	
t crítico bi-caudal	2,042272449	

ANEXO E. COMPROVAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ PARA A MATRIZ CAFÉ TORRADO ATRAVÉS DO TESTE F E TESTE T STUDENT.

Teste-F: duas amostras para variâncias

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	5077880	1702080
Variância	2,63411E+12	1,04386E+11
Observações	25	25
gl	24	24
F	25,23424291	
P(F<=f) uni-caudal	8,58323E-12	
F crítico uni-caudal	1,983759568	

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	5077880	1702080
Variância	2,63411E+12	1,04386E+11
Observações	25	25
Hipótese da diferença de média	0	
gl	26	
Stat t	10,19977201	
P(T<=t) uni-caudal	7,01042E-11	
t crítico uni-caudal	1,705617901	
P(T<=t) bi-caudal	1,40208E-10	
t crítico bi-caudal	2,055529418	

ANEXO F. COMPARAÇÃO ENTRE ANALISTAS NA ANÁLISE DE OCRATOXINA A NO CAFÉ VERDE POR CLAE-EM/EM

Teste-F: duas amostras para variâncias

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	11,01849676	11,13650445
Variância	52,04232453	39,07805387
Observações	3	3
gl	2	2
F	1,331753232	
P(F<=f) uni-caudal	0,428861848	
F crítico uni-caudal	19	

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	11,13650445	11,01849676
Variância	39,07805387	52,04232453
Observações	3	3
Variância agrupada	45,5601892	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	0,021412293	
P(T<=t) uni-caudal	0,491971157	
t crítico uni-caudal	2,131846782	
P(T<=t) bi-caudal	0,983942314	
t crítico bi-caudal	2,776445105	

ANEXO G. COMPARAÇÃO ENTRE ANALISTAS NA ANÁLISE DE OCRATOXINA A NO CAFÉ TORRADO POR CLAE-EM/EM

Teste-F: duas amostras para variâncias

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	4,65877005	4,276198551
Variância	0,45971609	0,065801118
Observações	3	3
gl	2	2
F	6,986448007	
P(F<=f) uni-caudal	0,125212109	
F crítico uni-caudal	19	

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	4,65877005	4,276198551
Variância	0,45971609	0,065801118
Observações	3	3
Variância agrupada	0,262758604	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	0,91407066	
P(T<=t) uni-caudal	0,206197026	
t crítico uni-caudal	2,131846782	
P(T<=t) bi-caudal	0,412394052	
t crítico bi-caudal	2,776445105	

ANEXO H. COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS CLAE-FLD E CLAE-EM/EM PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A NA MATRIZ CAFÉ VERDE.

Teste-F: duas amostras para variâncias

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	11,13650445	10,77723344
Variância	39,07805387	38,4582447
Observações	3	3
gl	2	2
F	1,016116419	
P(F<=f) uni-caudal	0,496003103	
F crítico uni-caudal	19	

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	11,13650445	10,77723344
Variância	39,07805387	38,4582447
Observações	3	3
Variância agrupada	38,76814929	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	0,070669215	
P(T<=t) uni-caudal	0,473526581	
t crítico uni-caudal	2,131846782	
P(T<=t) bi-caudal	0,947053162	
t crítico bi-caudal	2,776445105	

ANEXO I. COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS CLAE-FLD E CLAE-EM/EM PARA DETERMINAÇÃO DE OCRATOXINA A NA MATRIZ CAFÉ TORRADO.

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	3,996056	4,65877
Variância	0,605502	0,459716
Observações	3	3
gl	2	2
F	1,317121	
P(F<=f) uni-caudal	0,43157	
F crítico uni-caudal	19	

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	4,65877	3,996056
Variância	0,459716	0,605502
Observações	3	3
Variância agrupada	0,532609	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	1,112162	
P(T<=t) uni-caudal	0,164201	
t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,328403	
t crítico bi-caudal	2,776445	

ANEXO J. DADOS OBTIDOS PARA OS CINCO PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (EM TRIPLICATA) NO CAFÉ VERDE.

<i>Curva de calibração</i>	<i>X</i>	<i>y</i>	<i>Y calc</i>	<i>Δy</i>	<i>(Δy)²</i>	<i>x²</i>	<i>xi-xm</i>	<i>(xi-xm)²</i>
1-1	1,764463275	219139	246234,7584	27095,75835	734180121	3,113331	-4,94747	24,4775
1-2	1,764463275	215108	246234,7584	31126,75835	968875086	3,113331	-4,94747	24,4775
1-3	1,764463275	218619	246234,7584	27615,75835	762630109	3,113331	-4,94747	24,4775
2-1	4,626943508	530319	562205,3975	31886,39747	1016742344	21,40861	-2,08499	4,347201
2-2	4,626943508	616630	562205,3975	54424,60253	2962037360	21,40861	-2,08499	4,347201
2-3	4,626943508	576730	562205,3975	14524,60253	210964079	21,40861	-2,08499	4,347201
3-1	6,678228453	784284	788633,4466	4349,446645	18917686,1	44,59874	-0,03371	0,001136
3-2	6,678228453	784176	788633,4466	4457,446645	19868830,6	44,59874	-0,03371	0,001136
3-3	6,678228453	775311	788633,4466	13322,44665	177487585	44,59874	-0,03371	0,001136
4-1	9,22794747	1225000	1070080,402	154919,5976	2,4E+10	85,15501	2,51601	6,330305
4-2	9,22794747	1162000	1070080,402	91919,59762	8449212427	85,15501	2,51601	6,330305
4-3	9,22794747	1153000	1070080,402	82919,59762	6875659670	85,15501	2,51601	6,330305
5-1	11,26210616	1207000	1294617,995	87617,99515	7676913074	126,835	4,550168	20,70403
5-2	11,26210616	1209000	1294617,995	85617,99515	7330441094	126,835	4,550168	20,70403
5-3	11,26210616	1209000	1294617,995	85617,99515	7330441094	126,835	4,550168	20,70403

ANEXO H. DADOS OBTIDOS PARA OS CINCO PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (EM TRIPLICATA) NO CAFÉ TORRADO.

<i>Curva de calibração</i>	<i>X</i>	<i>y</i>	<i>Y calc</i>	<i>Δy</i>	<i>(Δy)²</i>	<i>x²</i>	<i>xi-xm</i>	<i>(xi-xm)²</i>
1-1	1,796429083	1391000	1286759,841	104240,1588	1,0866E+10	3,227157	-1,12352	1,262298
1-2	1,796429083	1280000	1286759,841	6759,841222	45695453,3	3,227157	-1,12352	1,262298
1-3	1,796429083	1518000	1286759,841	231240,1588	5,3472E+10	3,227157	-1,12352	1,262298
2-1	2,413068598	1433000	1569583,922	136583,9225	1,8655E+10	5,8229	-0,50688	0,256928
2-2	2,413068598	1446000	1569583,922	123583,9225	1,5273E+10	5,8229	-0,50688	0,256928
2-3	2,413068598	1453000	1569583,922	116583,9225	1,3592E+10	5,8229	-0,50688	0,256928
3-1	2,927569131	1667000	1805561,568	138561,5675	1,9199E+10	8,570661	0,00762	5,81E-05
3-2	2,927569131	1882000	1805561,568	76438,43247	5842833959	8,570661	0,00762	5,81E-05
3-3	2,927569131	1778000	1805561,568	27561,56753	759640005	8,570661	0,00762	5,81E-05
4-1	3,514563416	2129000	2074788,751	54211,24949	2938859571	12,35216	0,594614	0,353566
4-2	3,514563416	2261000	2074788,751	186211,2495	3,4675E+10	12,35216	0,594614	0,353566
4-3	3,514563416	1748000	2074788,751	326788,7505	1,0679E+11	12,35216	0,594614	0,353566
5-1	3,948115878	2314000	2273639,252	40360,74839	1628990010	15,58762	1,028167	1,057127
5-2	3,948115878	2517000	2273639,252	243360,7484	5,9224E+10	15,58762	1,028167	1,057127
5-3	3,948115878	2214000	2273639,252	59639,25161	3556840333	15,58762	1,028167	1,057127