

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**NATAMICINA: ANÁLISE E CONTROLE EM SUCOS DE UVA E VINHOS
NACIONAIS E IMPORTADOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL**

Aline Torres Venturini

Porto Alegre - RS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**NATAMICINA: ANÁLISE E CONTROLE EM SUCOS DE UVA E VINHOS
NACIONAIS E IMPORTADOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL**

Aline Torres Venturini

**Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos como um
dos requisitos para obtenção do grau
de Mestre em Ciência e Tecnologia
de Alimentos.**

Orientador: Isa Beatriz Noll

Co-orientador: Vitor Manfroi

Porto Alegre - RS

CIP – Catalogação na Publicação

V469n Venturini, Aline Torres
Natamicina: análise e controle em sucos de uva e vinhos nacionais e importados comercializados no Brasil. / Aline Torres Venturini. - Porto Alegre, 2012.
57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

Orientadora: Prof^a. Dra. Isa Beatriz Noll.
Coorientador: Prof. Dr. Vitor Manfroi.

1. Natamicina. 2. Antifúngico. 3. Conservante. 4. Aditivo alimentício. 5. Vinho. 6. Suco de uva. I. Noll, Isa Beatriz (orient.) II. Manfroi, Vitor (coorient.) III. Título

CDU 664:576.8

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM C&T DE ALIMENTOS/PPGCTA

Autor: Aline Torres Venturini

Título da dissertação: Natamicina: Análise e Controle em Sucos de Uva e Vinhos Nacionais e Importados Comercializados no Brasil

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Isa Beatriz Noll

Co-orientador: Prof. Dr. Vitor Manfroi

Dissertação aprovada por:

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Membro da Comissão Julgadora

Prof^ª. Dr^ª. Neidi Garcia Penna

Membro da Comissão Julgadora

Dr^ª. Michele Hoeltz

Membro da Comissão Julgadora

Prof. Dr. José Maria Wiest

Coordenador do PPGCTA

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Diretor do ICTA/UFRGS

Porto Alegre, 06 de fevereiro de 2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Pai e Nossa Senhora pelas bênçãos a mim concedidas.

À toda minha família, em especial meus pais Sergio e Maria de Lourdes por todo o desprendimento, em prol a educação que sempre foi prioridade em nossa casa.

À professora e orientadora Isa Beatriz Noll pela oportunidade, pelo conhecimento e pela convivência nessa jornada.

Ao professor Vitor Manfroi pelo apoio e incentivo a este trabalho.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pelo trabalho digno e compensador.

À Coordenação, à Chefia Técnica e a todos os colegas do LANAGRO/RS. Em especial, ao pessoal do Laboratório de Análises de Bebidas e Vinagres e do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários, companheiros essenciais para a concretização deste trabalho.

Um agradecimento especial aos colegas Fabiano, Gabriel, Paulo e Rodrigo. Muito obrigada pelo auxílio e conhecimento a mim repassado, que bom poder conviver com pessoas da grandeza de vocês.

Aos meus amores, Cleiton e Henrique, pela compreensão e carinho.

ÍNDICE

OBJETIVOS	11
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1 PANORAMA DA PRODUÇÃO NACIONAL DE UVAS E VINHOS.....	12
1.2 CONSERVADORES EM SUCOS E VINHOS	14
1.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA NATAMICINA.....	16
1.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	19
1.5 DADOS TOXICOLÓGICOS DA NATAMICINA.....	22
1.6 O EMPREGO DA NATAMICINA EM ALIMENTOS	24
1.7 ANÁLISE DE NATAMICINA EM VINHOS.....	26
2. MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1 SOLUÇÃO PADRÃO DE NATAMICINA (PIMARICINA)	27
2.2 SOLUÇÃO PADRÃO DE ERITROMICINA.....	27
2.3 REAGENTES	27
2.4 EQUIPAMENTOS.....	28
2.4.1 CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD).....	28
2.4.2 CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADO A ESPECTRÔMETROS DE MASSA EM SÉRIE (CLAE-EM/EM).....	28
2.5 CONDIÇÕES CROMATOGRAFICAS DOS MÉTODOS QUANTITATIVO E QUALITATIVO	28
2.6 CONDIÇÕES DE IONIZAÇÃO E FRAGMENTAÇÃO DA NATAMICINA	29
2.7 ESTUDO DO EFEITO DE MATRIZ NOS MÉTODOS QUANTITATIVO E QUALITATIVO	30
2.8 LINEARIDADE, LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	32
2.9 ESTUDO DA PRECISÃO INTRA E INTERDIA	32
2.10 PRECISÃO DO MÉTODO QUALITATIVO PRÓXIMO AO LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO QUANTITATIVO	33
2.11 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DA NATAMICINA EM SOLVENTE E MATRIZ VINHO.....	33
2.12 AMOSTRAS REAIS.....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1 CONDIÇÕES CROMATOGRAFICAS DOS MÉTODOS QUANTITATIVO E QUALITATIVO	36
3.2 CONDIÇÕES DE IONIZAÇÃO E FRAGMENTAÇÃO DA NATAMICINA	37
3.3 ESTUDO DO EFEITO DE MATRIZ NOS MÉTODOS QUANTITATIVO E QUALITATIVO	38
3.4 LINEARIDADE, LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	41
3.5 ESTUDO DA PRECISÃO INTRA E INTERDIA	44
3.6 PRECISÃO DO MÉTODO QUALITATIVO PRÓXIMO AO LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO QUANTITATIVO	46
3.7 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DA NATAMICINA EM SOLVENTE E MATRIZ VINHO.....	47
3.8 AMOSTRAS REAIS.....	49
4. CONCLUSÕES.....	50
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	56

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 - Localização das regiões vitivinícolas produtoras de vinhos finos do Rio Grande do Sul (a), de Santa Catarina (b) e dos Estados de Pernambuco e Bahia (c).</i> -----	13
<i>Figura 2 - Estrutura química da natamicina.</i> -----	16
<i>Figura 3 - Estrutura química dos principais produtos de degradação da natamicina em pH ácido: micosamina (a) e aponatamicina (b).</i> -----	17
<i>Figura 4 - Anomalias dose-dependentes de cabeça de espermatozóides: (a) normal; (b) em forma de banana (200 mg/kg, 12 h); (c) sem gancho (800 mg/kg, 12 h); (d) amorfa (400 mg/kg, 24 h); (e) dobra na junção cefalocaudal (400 mg/kg, 6 h) (x1000).</i> -----	23
<i>Figura 5 - Esquema da proporção dos solvente A e B na composição do gradiente da fase móvel do método CLAE-EM/EM.</i> -----	29
<i>Figura 6 - Tipo de amostras analisadas no método quantitativo</i> -----	34
<i>Figura 7 - Distribuição dos países de origem dos vinhos analisados (118 amostras).</i> -----	35
<i>Figura 8 - Separação cromatográfica de natamicina (0,3 mg L⁻¹) adicionada em vinho tinto (t_R 24 min); fluxo isocrático de solução de ácido acético 0,3% e solução de ácido acético 0,3% em metanol (47:53, v/v); coluna C18 (250 mm x 4,6mm; 5µm); volume de injeção de 10 µL e temperatura do forno de coluna de 30°C.</i> -----	36
<i>Figura 9 - Fragmentação da natamicina (Q1-MS) pela fonte ESI no modo negativo (A) e positivo (B)</i> -----	37
<i>Figura 10 - Íons produtos da fragmentação da natamicina (Q2-MS) pela fonte ESI no modo positivo</i> -----	38
<i>Figura 11 - Curva padrão de natamicina em solvente metanol (em azul) e curva padrão de natamicina em matriz vinho (em rosa); faixa de concentração de 0,2 a 5,0 mg L⁻¹</i> -----	40
<i>Figura 12 - Curva padrão de natamicina em solvente metanol (A) e curvas padrão de natamicina nas matrizes vinho branco seco (B), vinho branco suave (C), vinho tinto seco (D), vinho tinto suave (E), suco de uva (F); faixa de concentração de 0 a 0,2 mg L⁻¹</i> -----	41
<i>Figura 13 - Curva padrão de natamicina em solvente metanol (A) e curvas padrão de natamicina nas matrizes vinho branco seco (B), vinho branco suave (C), vinho tinto seco (D), vinho tinto suave (E), suco de uva (F), após correção pelo sinal do padrão de qualidade de eritromicina; faixa de concentração de 0 a 0,2 mg L⁻¹.</i> -----	41
<i>Figura 14 - Curva padrão de natamicina em vinhos: R² calculado versus R² previsto</i> -----	42
<i>Figura 15 - Curva padrão de natamicina em vinhos: distribuição dos resíduos positivos e negativos</i> -----	43
<i>Figura 16 - Perfil de degradação da natamicina em solvente metanol (primeira coluna) e em matriz vinho (segunda coluna) quando armazenadas sob luminosidade e à temperatura ambiente; intervalo de tempo das análises: 0-7-15-30 e 60 dias.</i> -----	47
<i>Figura 17 - Perfil de degradação da natamicina em solvente metanol (primeira coluna) e em matriz vinho (segunda coluna) quando armazenadas nas condições ideais - protegida da luz e sob refrigeração; intervalo de tempo das análises: 0-7-15-30 e 60 dias.</i> -----	47
<i>Figura 18 - Perfil de degradação da de natamicina em metanol e na matriz vinho (5 mg L⁻¹) em duas condições de armazenamento: escuro e refrigerado (ESC/GEL) e luz e temperatura ambiente (LUZ/AMB)</i> --	48

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Variação (%) relativa à cultura da uva entre as safras 2010-2011.</i>	12
<i>Tabela 2 - Produção de vinhos, sucos e derivados (em litros) no Rio Grande do Sul - safras 2009/2010.</i>	13
<i>Tabela 3- Conservadores permitidos para bebidas segundo a Legislação Brasileira.</i>	14
<i>Tabela 4 - Fungos sensíveis a natamicina em duas faixas de Concentração Inibitória Mínima (MIC).</i>	20
<i>Tabela 5 - Concentrações sugeridas de natamicina em alimentos e os respectivos métodos de aplicação.</i>	24
<i>Tabela 6 – Parâmetros de ionização e espectrométricos da natamicina e da eritromicina.</i>	30
<i>Tabela 7 - Preparação da curva padrão da natamicina em solvente metanol para análise por CLAE-DAD.</i>	31
<i>Tabela 8 - Preparação da curva padrão em diferentes matrizes para análise por CLAE-DAD.</i>	31
<i>Tabela 9 – Preparo da curva padrão de natamicina em diferentes matrizes para análise por CLAE-EM/EM.</i>	31
<i>Tabela 10 - Preparo das curvas padrão em matriz vinho.</i>	32
<i>Tabela 11 - Amostras de vinhos, sucos de uva e derivados analisadas por CLAE-DAD.</i>	34
<i>Tabela 12 - Variância média de seis repetições para cada ponto da curva padrão de natamicina em solvente.</i>	39
<i>Tabela 13 - Variância média de seis repetições para cada ponto da curva padrão de natamicina em matrizes.</i>	39
<i>Tabela 14 - Regressão linear da análise das curvas padrão de natamicina em matriz vinho, faixa de trabalho de 0,1 a 5,0 mg L (n= 8; 4 repetições).</i>	42
<i>Tabela 15 – Limites de detecção e quantificação de natamicina em vinhos obtidos por diferentes métodos.</i>	44
<i>Tabela 16 – Estudo de precisão intradia (primeiro dia): análise de três amostras de vinho adicionadas de natamicina nas concentrações de 0,1 – 0,2 e 0,3 mg L⁻¹ (6 repetições).</i>	45
<i>Tabela 17 - Estudo de precisão intradia (segundo dia): análise de três amostras de vinho adicionadas de natamicina nas concentrações de 0,1 - 0,2 e 0,3 mg L⁻¹ (6 repetições).</i>	45
<i>Tabela 18 – Estudo de precisão intradia (terceiro dia): análise de três amostras de vinho adicionadas de natamicina nas concentrações de 0,1 - 0,2 e 0,3 mg L⁻¹ (6 repetições).</i>	45
<i>Tabela 19 - Estudo da precisão intra e interdia do método de determinação de natamicina em vinhos por CLAE-DAD, 3 concentrações (0,1 – 0,2 – 0,3 mg L⁻¹) em três diferentes dias de análise.</i>	46
<i>Tabela 20 - Estudo de precisão do método CLAE-EM/EM: 22 amostras de vinhos adicionados de natamicina na concentração de 0,05 mg L⁻¹.</i>	46
<i>Tabela 21 - Resposta das amostras analisadas pelo método CLAE-EM/EM.</i>	49

RESUMO

A natamicina é um antifúngico produzido por *Streptomyces natalensis*, cujo emprego como aditivo alimentar está principalmente relacionado ao tratamento de superfície de queijos e embutidos. Foi avaliada a presença deste composto em 138 amostras (16 sucos de uva, 118 vinhos e quatro derivados) pelo método quantitativo de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com Detector de Arranjo de Diodos (DAD). A resposta da natamicina não foi influenciada pelo efeito das matrizes avaliadas e o método apresentou linearidade na faixa de trabalho de 0,1 a 5,0 mg L⁻¹. Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 0,04 e 0,13 mg L⁻¹. Foi verificada a ausência de natamicina em todas as amostras analisadas por CLAE-DAD. No desenvolvimento do método de confirmação (qualitativo) por CLAE acoplado à Espectroscopia de Massas (EM/EM) foram considerados os parâmetros de ionização e fragmentação da natamicina de forma a se obter a máxima sensibilidade; os íons de m/z 503,5 e 485,3 foram selecionados para avaliar a presença dessa substância em dez amostras (sete vinhos suaves e três sucos de uva), encontrando três provavelmente positivas (valores abaixo do limite de detecção do método CLAE-DAD). Na melhor condição de armazenamento testada, amostra protegida da luz e sob refrigeração, a concentração inicial (4,96 mg L⁻¹) de natamicina na matriz vinho diminuiu em 28% (3,55 mg L⁻¹), em 60 dias.

ABSTRACT

Natamycin is an antifungal agent produced by *Streptomyces natalensis*, its use as a food additive is mainly related to the surface treatment of cheeses and sausages. The presence of natamycin was evaluated in 138 samples (16 grape juices, 118 wines and four grape and wine derivatives), by the quantitative method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Diode Array Detector (DAD). The response of natamycin was not influenced by the effect of the evaluated matrices and the method was linear in the range of work from 0.1 to 5.0 mg L⁻¹. The detection and quantification limits were, respectively, 0.04 and 0.13 mg L⁻¹. The absence of natamycin was verified in all samples analyzed by HPLC-DAD. In the confirmation method (qualitative) by HPLC coupled with mass spectrometry (MS/MS) natamycin ionization and fragmentation parameters were considered in order to obtain maximum sensitivity; m/z 503.5 and 485.3 ions were selected to evaluate the presence of this substance on ten samples (seven sweet wines and three grape juice), three of them probably positive (values below the limit of detection by HPLC-DAD). In the best storage conditions tested, sample protected from light and under refrigeration, the initial natamycin concentration (4,96 mg L⁻¹) in the wine decreased 28% (3,55 mg L⁻¹) in 60 days.

INTRODUÇÃO

A deterioração dos alimentos deve-se a uma vasta gama de reações, incluindo fenômenos físico-químicos, reações enzimáticas e microbiológicas. O uso de conservantes em alimentos é requerido para prevenir ou retardar o crescimento microbiano evitando alterações indesejáveis dos mesmos. A tendência atual frente às necessidades dos consumidores é a utilização de procedimentos para entregar alimentos minimamente processados, livres de aditivos, nutricionalmente saudáveis, e ainda com alta garantia de qualidade e da segurança microbiológica. Com isso, há um consenso entre os órgãos responsáveis pela regulamentação do uso de aditivos mais seguros e com informação de técnicas específicas e sensíveis de detecção.

Os conservantes tradicionais usados em alimentos são ácidos orgânicos fracos, e seus sais de sódio, potássio ou cálcio (sorbato, benzoato, propionato) e, ainda compostos inorgânicos como sulfito e nitrito. Atualmente, métodos de preservação incluem a adição aos alimentos de enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas e outros antimicrobianos de ocorrência natural.

A biopreservação é uma técnica utilizada para prevenir o crescimento microbiano por meio do emprego de microbiota protetora e/ou seus peptídeos antimicrobianos, as bacteriocinas. As bacteriocinas podem ser usadas propositadamente em combinação com outros métodos de conservação a fim de aumentar a inativação microbiana.

O crescimento bacteriano em mosto e vinhos é controlado convencionalmente pela adição de dióxido de enxofre. Além deste, o ácido sórbico também é usado como conservante para vinhos. No caso de bebidas não alcoólicas pode-se ainda empregar o ácido benzóico como aditivo para a conservação.

A presença do conservante nos sucos e em vinhos tem como finalidade prevenir a ocorrência de alterações indesejáveis nestas bebidas. O aumento da vida de prateleira do produto representa uma economia significativa para a cadeia produtiva vitivinícola. Por outro lado, é necessário o controle pelos órgãos competentes para coibir o uso abusivo, acima da legislação vigente, dos conservantes citados ou a utilização de substâncias ilícitas.

A natamicina é um antifúngico do grupo macrolídeo polieno produzido através da fermentação aeróbica de *Streptomyces natalensis* e espécies relacionadas. O primeiro

isolado data de 1955, em uma amostra de solo da Província Natal, na África do Sul; o nome natamicina é em homenagem a essa região. O uso de natamicina como conservante para a prevenção de crescimento fúngico em alimentos é relatado a mais de 50 anos. Os principais produtos comerciais apresentam a formulação de natamicina associada à lactose, na proporção 1:1.

A natamicina em pequenas quantidades é muito eficaz contra fungos, mas não exerce nenhum ou muito pouco efeito sobre bactérias; essa propriedade a torna conveniente para o tratamento de alimentos que, após seu processamento, passam por um período de maturação. É empregada principalmente no tratamento de superfície de queijos e embutidos.

O uso de natamicina como aditivo alimentar em bebidas é permitido em alguns países como África do Sul (vinhos e sucos de frutas) e China (somente em sucos de frutas). Em contrapartida, sua presença como aditivo intencional em sucos e vinhos não é legalmente aceita no Brasil e demais países do Continente Americano e na Comunidade Européia, caracterizando fraude se encontrada nestas bebidas. Visto que foi recentemente detectada em vinhos exportados à Alemanha, fato este que gerou uma série de medidas de vigilância e alertou as autoridades para a necessidade do seu controle, justificando-se a importância da otimização de metodologias que atendam as novas demandas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a presença de natamicina em sucos de uva e vinhos nacionais e importados comercializados no Brasil.

Objetivos Específicos

Otimizar método de análise para a determinação de natamicina em vinhos e sucos de uva por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Otimizar método confirmatório para determinação de natamicina em vinhos e sucos de uva por CLAE acoplada à Espectroscopia de Massas (EM)

Estudar o perfil de degradação da natamicina em solvente e na matriz vinho.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Panorama da produção nacional de uvas e vinhos

A vitivinicultura brasileira teve seu início utilizando uvas americanas, as chamadas uvas comuns, variedades das espécies *Vitis labrusca* e *Vitis bourquina*, usadas para a elaboração de vinhos de mesa. A partir do final do século XIX, com a chegada dos imigrantes italianos, o cultivo da uva e a produção de vinhos tornaram-se atividades de importância sócio-econômica. E, em seguida, começaram a ser elaborados vinhos finos, com uvas de variedades de *Vitis vinifera*, também conhecidas como uvas finas (EMBRAPA, 2009). Atualmente, o Brasil configura no panorama mundial como 14º produtor de uvas (OIV, 2011) e 16º produtor de vinho (EMBRAPA, 2009). Informações sobre a produção, área plantada, área colhida e rendimento médio são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Variação (%) relativa à cultura da uva entre as safras 2010-2011.

	Período		Variação (%)
	Safra 2010	Safra 2011	
Produção (toneladas)	1.305.672	1.463.481	+12,09
Área plantada (hectare)	82.201	81.915	-0,35
Área colhida (hectare)	79.970	80.003	+0,04
Rendimento médio (Kg/hectare)	16.327	18.293	+12,04

Fonte: Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA) - IBGE

Em 2010, apenas 43,07% da uva produzida no Brasil foi destinada ao processamento para elaboração de vinhos, sucos de uva e derivados, sendo o restante destinado ao mercado de uva *in natura*. A análise das informações relativas à produção de vinhos e derivados no Rio Grande do Sul permite ter uma boa aproximação do desempenho da agroindústria vinícola do país, visto que o Estado é responsável por cerca de 90% da produção nacional desses produtos (EMBRAPA, 2011).

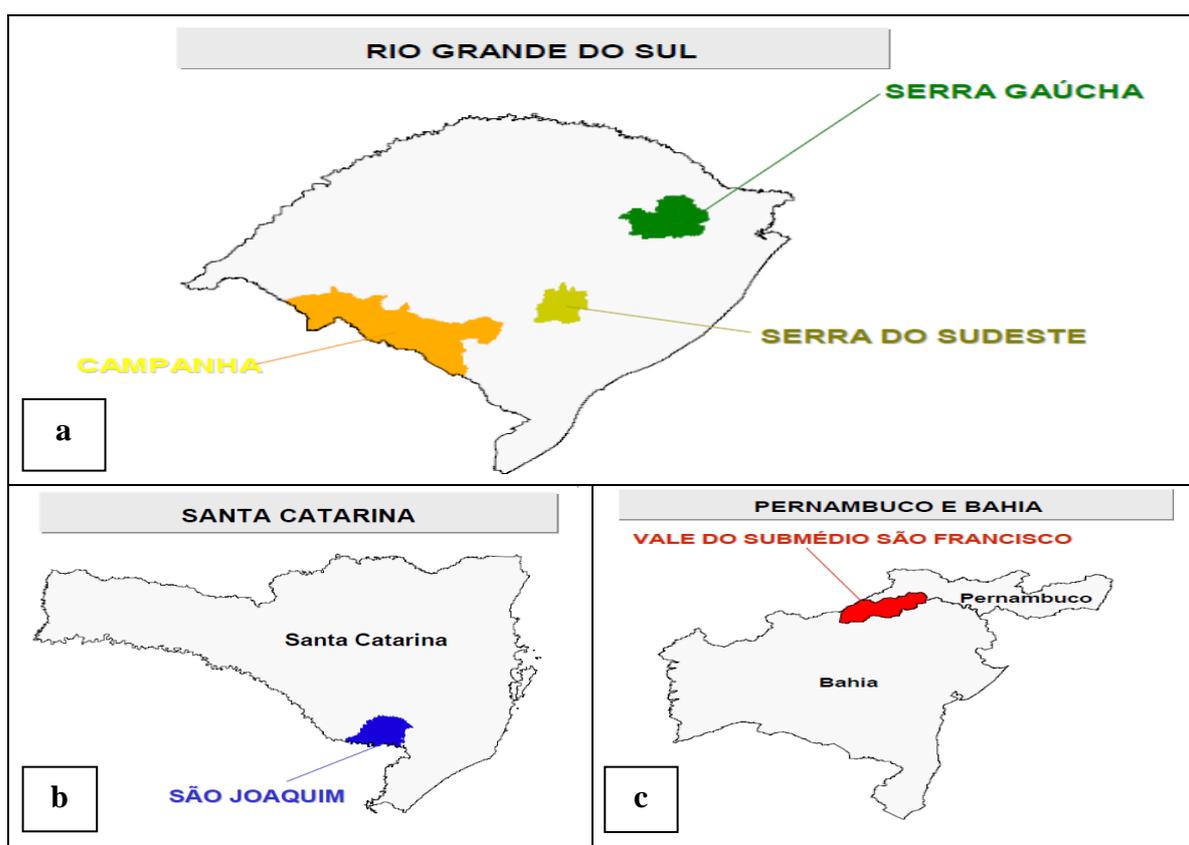
Nesse mesmo período ainda segundo a EMBRAPA (2011), fatores climáticos foram os responsáveis pela redução da produção de uvas e, conseqüentemente, a elaboração de vinhos, sucos e derivados do Rio Grande do Sul apresentaram redução de 4,49% (tabela 2).

Tabela 2 - Produção de vinhos, sucos e derivados (em litros) no Rio Grande do Sul - safras 2009/2010.

<i>PRODUÇÃO</i>	<i>2009</i>	<i>2010</i>
Vinho de mesa tinto	164.124.454	157.290.088
Vinho de mesa branco	39.211.278	35.408.083
Vinho de mesa rosado	2.063.474	2.569.809
Vinho fino tinto	18.209.043	11.401.406
Vinho fino branco	21.366.975	13.013.027
Vinho fino rosado	324.550	391.280
Suco de uva integral	16.034.003	26.887.259
Suco concentrado*	115.032.285	116.193.425
Outros derivados	57.462.530	51.210.756
TOTAL	433.828.592	414.365.132

*Transformados em litros de suco simples.
EMBRAPA, 2011

Além do Rio Grande do Sul com 3 regiões vitivinícolas: a tradicional região produtora da Serra Gaúcha e as regiões emergentes – Campanha e Serra do Sudeste (figura 1a), destacam-se também a região de São Joaquim, Santa Catarina (figura 1b) e a região do Vale do Submédio São Francisco, Estados de Pernambuco e da Bahia, no Nordeste do Brasil (figura 1c), na produção de vinhos finos (EMBRAPA, 2009).



Fonte: EMBRAPA, 2009

Figura 1 - Localização das regiões vitivinícolas produtoras de vinhos finos do Rio Grande do Sul (a), de Santa Catarina (b) e dos Estados de Pernambuco e Bahia (c).

1.2 Conservadores em sucos e vinhos

A Resolução nº 04, de 24 de novembro de 1988, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a revisão das tabelas referentes a aditivos intencionais permitidos no Brasil. O uso de ácido sórbico e dióxido de enxofre são admitidos para vinhos, 200 e 350 mg/L, respectivamente (BRASIL, 1988). Posteriormente (BRASIL, 2007), foram revisadas as concentrações destes conservantes, incluindo o ácido benzóico, permitidos em bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas (Tabela 3).

Tabela 3- Conservadores permitidos para bebidas segundo a Legislação Brasileira.

Conservadores	Bebidas	Limite máximo (g/100g – g/100mL)
Ácido benzóico e seus sais de sódio, cálcio e potássio	Aperitivos, cooler, sangrias, licores	0,05*
	Bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas	0,05**
Ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio	Saquê, vinhos, vinhos de frutas	0,02*
	Bebidas não alcoólicas gaseificadas	0,03**
	Amargos, aperitivos, filtrado doce, licores, sidras	0,05*
	Bebidas não alcoólicas não gaseificadas	0,08**
	Cooler; sangria	0,10*
Dióxido de enxofre: metabissulfito de sódio, de potássio, de cálcio; sulfito de sódio, de cálcio, de potássio; bissulfito de cálcio, de sódio, de potássio	Bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas	0,004 (como SO ₂) **
	Cervejas (somente ditonito)	0,006*
	Bebidas alcoólicas mistas, bebidas alcoólicas fermentadas, licores de frutas	0,01*
	Vinhos compostos	0,025*
	Cooler, filtrado doce, sangria, saquê, sidras, vinhos, vinhos de frutas	0,035*

* ANVISA (1988) - Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1988

** ANVISA (2007) - Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 5, de 15 de janeiro de 2007

Os principais conservantes usados em sucos e vinhos são ácidos orgânicos fracos e seus sais de sódio, potássio ou cálcio, portanto, são mais eficazes em pH baixo quando comparados a pH mais elevados. Esta característica deve-se as formas não-dissociadas dos ácidos, favorecidas em pH baixo, serem capazes de mais facilmente atravessar a membrana celular microbiana e acessar o citoplasma da célula, onde os ácidos tendem a dissociar-se fornecendo íons de hidrogênio, juntamente com o ânion particular (GOULD, 2000).

O crescimento bacteriano em mostos e vinhos é controlado convencionalmente pela adição de dióxido de enxofre (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). No entanto, a presença de sulfitos em bebidas alcoólicas pode causar reações alérgicas com sintomas que vão desde problemas gastrintestinais a choque anafilático (LIN e GEORGIU, 2005).

A indústria investe na pesquisa de novos aditivos para a conservação dos alimentos. Novos métodos de preservação incluem a adição aos alimentos de enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas e outros antimicrobianos de ocorrência natural. As bactérias lácticas empregadas na fermentação de alimentos são capazes de inibir ou reduzir a contaminação por microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, por meio da produção de vários agentes antimicrobianos. A acidificação é, provavelmente, o fator primário na preservação de produtos de fermentação láctica. Entretanto, outros compostos como diacetil, dióxido de carbono, peróxido, etanol e bacteriocinas podem exercer ação inibitória sobre diferentes grupos de microrganismos (HELANDER *et al.*, 1997).

A biopreservação é uma técnica utilizada para prevenir o crescimento microbiano por meio do emprego de microbiota protetora e/ou seus peptídeos antimicrobianos, as bacteriocinas. As bacteriocinas podem ser usadas propositadamente em combinação com outros métodos de conservação a fim de aumentar a inativação microbiana. (GÁLVEZ *et al.*, 2007). A natamicina é um antifúngico macrolídeo polieno produzida pela bactéria *Streptomyces natalensis* e espécies relacionadas.

Segundo o “Guia para a Indústria: perguntas frequentes sobre o GRAS” não é necessária a aprovação ou notificação do FDA sobre os resultados de uma investigação conduzida pela Indústria, desde que especialistas estejam de acordo sobre a segurança do produto (FDA, 2004). Mesmo assim, a grande maioria dos países segue a recomendação da União Européia que restringe o uso de natamicina ao tratamento de superfície de queijos e embutidos cárneos.

1.3 Propriedades físico-químicas da natamicina

A natamicina (CAS 7681-93-8) apresenta peso molecular de 665,725 g/mol e a fórmula empírica é $C_{33}H_{47}NO_{13}$. A natamicina, anteriormente mais conhecida como pimaricina, é um antifúngico do grupo macrolídeo polieno, produzido por *Streptomyces natalensis* e espécies relacionadas. A estrutura primária foi elucidada por Ceder em 1964 (Figura 2), consiste em um grande anel lactona de vinte e cinco átomos de Carbono e um anel piranose unidos por ligação glicosídica na posição do C_{15} (CEDER,1964). Brix (1981) descobriu que a tenecetina, isolada de uma cultura de *Streptomyces chattanoogensis* em 1959, se tratava de composto idêntico a natamicina . Os estudos conduzidos por Lancelin e Beau (1990), auxiliaram no melhor entendimento da relação estrutura-atividade da natamicina.

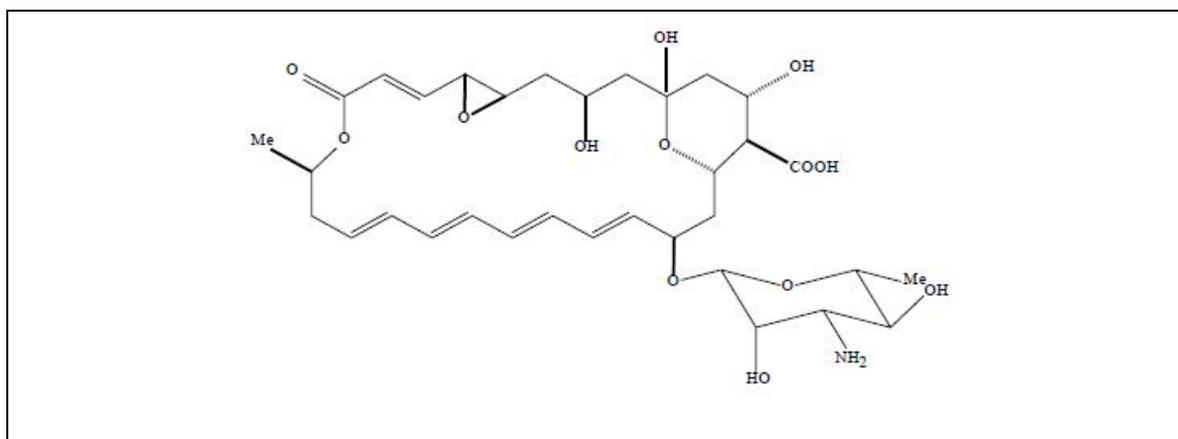


Figura 2 - Estrutura química da natamicina.

O anel lactona é composto de uma cadeia lipofílica de 4 ligações conjugadas e de uma porção hidrofílica com vários grupos hidroxilas, que formam uma estrutura cilíndrica de exterior apolar (EFSA, 2009). O tamanho do grupo cromóforo é responsável pelo espectro UV característico e contribui para a instabilidade a fatores como temperatura, luz e pH. A presença das ligações duplas conjugadas faz com que a absorção UV ocorra em comprimentos de onda (λ) mais longos; correspondentes a intensidade de cor. Compostos trienos são incolores ou de um amarelo muito pálido; tetraenos, pentenos e heptenos apresentam uma coloração que vai do amarelo-pálido; passando pelo amarelo até o laranja, respectivamente (HAMILTON-MILLER, 1973). A natamicina é um tetraeno e apresenta absorção máxima nos comprimentos de onda 291 nm, 303 nm e 318 nm.

Na forma de pó, o composto muito estável, não apresenta gosto e nem odor. É praticamente insolúvel em água (20-50 mg/L), em lipídeos e em óleos minerais; pouco solúvel em metanol e apresenta melhor solubilidade em ácido acético glacial, dimetilformamida e dimetilsulfóxido (EFSA, 2009). Na faixa de pH 4,5 a 9, a natamicina mostra-se com boa estabilidade, sendo o pH ótimo entre 6 e 7. Em valores de pH baixos, a degradação ocorre rapidamente, formando principalmente a micosamina (figura 3a) produzida pela hidrólise da ligação glicosídica. Além dessa, a degradação ácida pode gerar um composto anfótero, que mantém intacto o anel lactona, conhecido como aponatamicina (figura 3b). Na reação de degradação, cada dois moles de natamicina originam um mol de aponatamicina e um mol de micosamina. (BRIK, 1976).

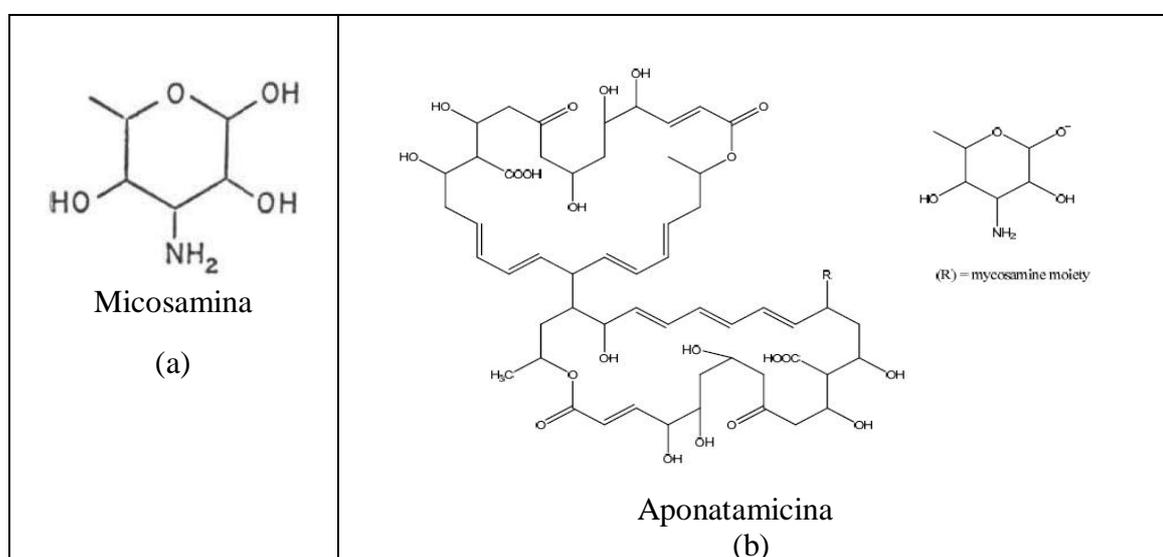


Figura 3 - Estrutura química dos principais produtos de degradação da natamicina em pH ácido: micosamina (a) e aponatamicina (b).

Em suspensão aquosa 5%, a natamicina perde completamente sua atividade biológica depois de armazenada no escuro por dois meses à temperatura ambiente, ou em duas semanas se a temperatura for de 40°C (BRIK, 1981).

Ao ser complexada com β -ciclodextrina e com γ -ciclodextrina mostrou-se mais estável comparada ao seu estado livre em soluções aquosas estocadas no escuro a 4°C. Na condição de armazenamento no escuro a 4°C, 92,2% da substância permaneceu na forma ativa, mesmo após um período de 14 dias. Essa recuperação sobe para 96%, quando associada aos dois tipos de ciclodextrinas citados. Entretanto, a natamicina presente em soluções aquosas mesmo quando associadas à ciclodextrinas é completamente degradada após 24h de exposição luminosa a 4°C. (KOONTZ *et al.*, 2003).

Flak e Schaber (1988) estudaram a degradação de um acréscimo de 7 mg L^{-1} de natamicina em vinhos armazenados à temperatura de adega (11°C), com e sem exposição à luz. A natamicina provou ser relativamente estável, mesmo após mais de dois meses, quando protegidas da luz. Nas amostras expostas, no entanto, após cerca de cinco a seis semanas a natamicina degradou a uma concentração inferior ao limite de detecção do método.

Alberts *et al.* (2011) avaliaram a degradação da natamicina em matriz vinho tinto e vinho branco em três condições de temperatura. A degradação da substância foi mais rápida em vinhos brancos quando comparada com vinhos tintos, provavelmente devido ao menor pH da amostra de vinho branco utilizado para o estudo. O tempo de meia vida para a degradação da natamicina em vinhos tintos foi definido como 20 dias à temperatura de 20°C , seis dias à 30°C e de apenas dois dias à 40°C .

1.4 Atividade antimicrobiana

A natamicina tem atividade antimicrobiana contra leveduras e bolores, mas não sobre bactérias, protozoários e vírus. O composto se liga com esteróis da membrana celular do fungo promovendo a formação de canais iônicos que interferem na permeabilidade celular, o que pode levar a morte da célula. A sua ação antimicótica é explicada pela preferência desta substância pelo ergosterol, esterol presente especialmente na membrana celular de fungos e muito pouco encontrado na de bactérias (MYERS, 2006).

Van Leeuwen *et al.*(2009) compararam o mecanismo de ação da natamicina com os antimicóticos nistatina e filipina. Os autores concluíram que ela age por um mecanismo diferente daquele apresentado pelos demais. A ligação específica da natamicina com o ergosterol bloqueando o crescimento fúngico foi confirmada, porém não foram observadas alterações na permeabilidade da membrana plasmática do fungo como se acreditava anteriormente.

Esse antifúngico é eficaz em doses baixas, uma vez que a maioria dos fungos é susceptível a Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC, da sigla em inglês *Minimum Inhibitory Concentration*) de 0,1 a 10,0 mg L⁻¹. A Tabela 4 relata a sensibilidade de uma grande gama de fungos em função da inibição de crescimento por 14 dias a 25°C a partir da inoculação de 10³ UFC/mL

Tabela 4 - Fungos sensíveis a natamicina em duas faixas de Concentração Inibitória Mínima (MIC).

	MIC* (µg/mL)		MIC* (µg/mL)
<i>Aspergillus chevalieri</i> 4298	0,1 - 2,5	<i>Absidia</i> sp.	3,0 – 10,0
<i>A. clavatus</i>		<i>Acremomyium sclerotigenum</i>	
<i>A. nidulans</i>		<i>Alternaria</i> sp.	
<i>A. niger</i> CBS733.88		<i>Aspergillus flavus</i> CBS 3005	
<i>A. ochraceus</i> 4069		<i>A. flavus</i> BB 67	
<i>A. versicolor</i> 108959		<i>A. flavus</i> Madagascar	
<i>Botrytis cinérea</i>		<i>A. flavus</i> Port Lamy	
<i>B. nívea</i> 163642		<i>A. niger</i>	
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>		<i>A. oryzae</i>	
<i>Byssochlamys fulva</i> 040021		<i>A. versicolor</i>	
<i>Candida albicans</i>		<i>Candida guilliermondii</i>	
<i>C. krusei</i> H66		<i>C. kefyr</i> H2	
<i>C. pseudotropicalis</i> H3		<i>C. paralopsilosis</i> NCYC458	
<i>C. valida</i> H74		<i>C. utilis</i> H41	
<i>C. vini</i>		<i>Fusarium</i> sp.	
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		<i>Geotrichum candidum</i>	
<i>Debaryomyces hansenii</i> H42		<i>Kloeckera apiculata</i>	
<i>Dekkera bruxellensis</i> CBS2796		<i>Kluyveromyces lactis</i> H17	
<i>D.bruxellensis</i> CBS4459		<i>Mucor mucedo</i>	
<i>D. bruxellensis</i> CBS6055		<i>Penicillium digitatum</i>	
<i>Fusarium solani</i> S200		<i>P. expansum</i>	
<i>Gloeosporium album</i>		<i>P. notatum</i> 4640	
<i>Hanseniasporum uvarum</i> CBS5074		<i>P. nigricans</i>	
<i>Hanseniula polymorpha</i>		<i>P. roqueforti</i> var. <i>punctatum</i> 6018	
<i>Penicillium candidum</i> S66		<i>P. viridicatum</i> Westling	
<i>P. chrysogenum</i>		<i>Rhizopus oryzae</i> 4758	
<i>P. chrysogenum</i> S138		<i>Rhodotorula gracilis</i>	
<i>P. commune</i> ABC118		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>P. cyclopium</i> S124		<i>S. cerevisiae</i> var. <i>paradoxus</i> H103	
<i>P. nalgiovense</i> S125		<i>S. exiguus</i> Rees CBS1514	
<i>P. roqueforti</i> S44		<i>S. florentinus</i> H79	
<i>P. verrucolosum</i> var. <i>cyclopium</i>		<i>S. unisporus</i> H104	
<i>Sclerotinia fructicola</i>		<i>S. (Zygosaccharomyces) rouxii</i> 0562	
<i>Pichia membranaefaciens</i> H67		<i>S. sake</i> 0305	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS8161		<i>Scopulariopsis asperula</i>	
<i>Saccharomyces (Zygosaccharomyces) bailli</i>		<i>Torulopsis lactis-condensi</i>	
<i>S. bayanus</i>		<i>Torulasporea rosei</i>	
<i>S. bayanus</i> IO18-2007		<i>Zygosaccharomyces barkerii</i>	
<i>S. carlsbergensis</i> CRA6413			
<i>S. cerevisiae</i> ATCC9763			
<i>S. cerevisiae</i> CRA124			
<i>S. cerevisiae</i> H78			
<i>S. cerevisiae</i> 8021			
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>			
<i>S. exiguus</i>			
<i>S. ludwigii</i> 0339			
<i>Torulopsis candida</i>			

* Concentração Inibitória Mínima (definida como a inibição de crescimento por 14 dias a 25°C, quantidade inoculada de 10³ UFC/mL.

Fonte: DELVES-BROUGHTON *et al.*, 2005

A natamicina inibe a produção de micotoxinas, metabólitos secundários produzidos por alguns tipos de fungos que podem ser carcinogênicos e teratogênicos. Esse efeito parece ser mais pronunciado para a inibição da produção de micotoxina do que a inibição do próprio crescimento do fungo (DELVES-BROUGHTON *et al.*, 2005).

Ray e Bullerman (1982) obtiveram resultados expressivos de diminuição da produção de afatoxina B1 e ácido penicílico, 62,2 e 98,8%, respectivamente, com dose de ataque de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de natamicina. A mesma dose mostrou-se suficiente para eliminar a produção de ocratoxina A e patulina. Concentrações ainda menores (50-100 ng mL^{-1}) foram eficazes na inibição de produtores típicos de ocratoxina A, como *Aspergillus carbonarius*, e na diminuição da produção dessa micotoxina (MEDINA *et al.*, 2007).

O seu emprego foi estudado para substituir a cicloheximida como fungicida nas preparações de meio de cultura Agar. A recuperação das bactérias não foi afetada pela natamicina, entretanto a contaminação fúngica das amostras de solo testadas foi suprimida significativamente (PEDERSEN, 1992).

1.5 Dados toxicológicos da natamicina

Na avaliação da segurança da natamicina pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2001, foram reportados dois estudos sobre os efeitos adversos de doses orais em humanos. No primeiro, foram administradas doses orais diárias de 300-400 mg e observado náuseas, vômitos e diarreia, sem alterações nas células sanguíneas. No segundo estudo, um grupo de 10 pacientes, acometidos de micoses sistêmicas, receberam uma dose diária de 50-1000 mg por 13-180 dias. Os pacientes tratados com doses superiores a 600 mg apresentaram náuseas, vômito e diarreia.

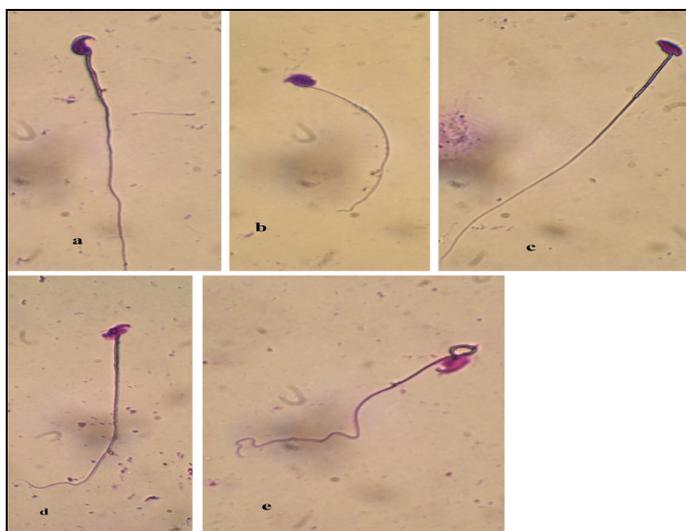
A Ingestão Diária Aceitável (IDA) foi determinada de 0-0,3 mg/Kg de peso corpóreo, ou seja, para um adulto de 60 Kg uma ingestão diária aceitável de até 18 mg de natamicina (JECFA, 1968; JECFA, 1976; JECFA, 2002; JECFA, 2007).

Posteriormente, considerando-se estimativas baseadas no GEMS/FOOD – Sistema de Monitoramento do Ambiente Global/Programa de Avaliação e Acompanhamento de Contaminação em Alimentos (WHO, 2006) e cálculos para crianças e consumidores de elevadas concentrações de natamicina, a IDA foi confirmada em 0-0,3 mg/Kg de peso corpóreo com a estimativa de que este valor dificilmente seja ultrapassado (JECFA, 2007).

Em 2009, Rencüzoğullari *et al.* estudaram os efeitos da natamicina sobre a frequência de aberrações cromossômicas, ocorrência de trocas de cromátides irmãs e formação de micronúcleos em linfócitos humanos. O tratamento com 28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de natamicina por 48 horas, acarretou em aumento da frequência de trocas de cromátides irmãs, metodologia citogenética bastante sensível em estudos genotóxicos. Além disso, todas as concentrações testadas (13, 18, 23 e 28 $\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram aumento da frequência de aberrações cromossômicas e de micronúcleos quando comparados ao controle.

Os principais produtos comerciais apresentam a formulação associada à lactose, na proporção 1:1. Os efeitos genotóxicos do Delvocid[®], nome comercial da natamicina, foram avaliados através de aberrações cromossômicas, pelo teste do micronúcleo em células da medula óssea e ensaio de anormalidade em cabeça de espermatozóides de camundongos. Delvocid foi injetado por via intraperitoneal em 200, 400 e 800 mg/kg, não induzindo aberrações cromossômicas, mas aumentando significativamente o número de micronúcleos eritrócitos policromáticos na medula óssea. Ou seja, o produto não se mostrou capaz de causar quebra do cromossomo (clastogênico), mas aneugênico - quando um agente causa perda de cromossomos inteiros - no ensaio do micronúcleo (RASGELE & KAYMAK, 2010).

Segundo os mesmos autores, Delvocid pode ser considerado como um agente tóxico devido à redução do índice mitótico e da razão PCE/NCE (eritrócitos policromáticos/normocromáticos). Além disso, a substância apresenta um potencial mutagênico de células germinativas, devido ao aumento dose-dependente na frequência de anomalias da cabeça do espermatozóide (figura 4). Por esta razão, é necessário ter cuidado ao usar este aditivo como conservantes em alimentos (RASGELE & KAYMAK, 2010).



Fonte: RASGELE e KAYMAK, 2010

Figura 4 - Anomalias dose-dependentes de cabeça de espermatozóides: (a) normal; (b) em forma de banana (200 mg/kg, 12 h); (c) sem gancho (800 mg/kg, 12 h); (d) amorfa (400 mg/kg, 24 h); (e) dobra na junção cefalocaudal (400 mg/kg, 6 h) (x1000).

1.6 O emprego da natamicina em alimentos

A atividade antifúngica seletiva da natamicina faz com que seja conveniente para a utilização em alimentos que são submetidos a um período de amadurecimento após seu processamento. A baixa solubilidade da natamicina em água e na maioria dos solventes orgânicos torna-a adequada para o tratamento de superfície dos alimentos. Seu uso tem sido recomendado para alguns alimentos sólidos, onde a casca ou a película envolvente não é ingerida, tal como em queijos e embutidos cárneos. (JECFA, 2002).

Há países que estendem seu uso para uma gama maior de alimentos e bebidas. Na China, alguns produtos de panificação e sucos de frutas podem ser adicionados de natamicina. Na África do Sul, o aditivo pode estar presente em sucos de frutas, vinhos, iogurtes, entre outros (DELVES-BROUGHTON et al., 2005). A tabela 5 apresenta a concentração de natamicina indicada para alguns alimentos, além do seu método de aplicação.

Tabela 5 - Concentrações sugeridas de natamicina em alimentos e os respectivos métodos de aplicação.

<i>Alimentos</i>	<i>Concentração de natamicina (ppm)</i>	<i>Método de aplicação</i>
Queijos duros e semi-duros	1250-2000	Tratamento de superfície por spray ou imersão
	500	Adição direta na emulsão de revestimento
Produtos cárneos: linguiça seca	1250-2000	Tratamento de superfície por spray ou imersão
Iogurtes	5-10	Adição direta na mistura do iogurte
Produtos de panificação	1250-2000	Tratamento de superfície por spray
Suco de frutas	2,5-10	Adição direta
Vinhos	30-40	Adição direta para cessar a fermentação
	3-10	Adicionada após o engarrafamento

Fonte: THOMAS e DELVES-BROUGHTON (2001)

Ao ser aplicada para o tratamento de superfície de queijos na forma de suspensão aquosa, a baixa solubilidade da natamicina em água pode dificultar a distribuição homogênea da substância na superfície do produto. O uso de ciclodextrinas como moléculas hospedeiras vem sendo utilizado para fármacos, apresentando-se como uma técnica muito útil para melhorar a solubilidade em soluções aquosas. Em 2003, Koontz e Marcy, mostraram que a formação de complexos natamicina:ciclodextrina resultou num aumento da solubilidade da substância em solução aquosa sem modificação da estrutura original ou da atividade antifúngica.

A Legislação Européia permite sua presença em diversas variedades de queijos e em carnes trituradas curadas e processadas, na concentração máxima de 40 e 20 mg/Kg respectivamente. Para ambos os alimentos estão previstos somente a aplicação superficial, sendo que a migração máxima da natamicina para o interior do alimento não deve ultrapassar 5 mm de espessura. Ainda é permitida no tratamento de cortes ou peças inteiras de carne (gado, aves e produtos de caça) curada e processada num nível máximo de 6 mg/Kg (WHO, 2009).

A Resolução nº 04/1988 da ANVISA aprova a natamicina somente para uso na crosta de queijos, sendo o limite máximo permitido de 2 mg/100cm² não havendo migração (BRASIL, 1988). A Resolução nº 28, de 23 de fevereiro de 2001, aprovou a extensão de uso da natamicina como conservador, para tratamento de superfícies de produtos cárneos embutidos no limite máximo de 1 mg/dm², com ausência em 5 mm de profundidade (BRASIL, 2001).

Na Alemanha, foi sugerida como aditivo em cervejas, vinhos e sucos de frutas, porém ao ser testado, foram evidenciadas alterações irreversíveis em cepas de leveduras e, portanto, seu uso não foi implementado na prática (TORRES, 1997). Na União Européia a utilização de natamicina em vinhos é proibida, assim como a comercialização de bebidas importadas que a contenham, mas esta consideração não é unânime nos países em desenvolvimento; enquanto na Argentina é vetado o seu uso, na África do Sul ela é permitida. Em outubro de 2009, a revista científica “Weinwirtschaft” citada por ZUR, *et al.* (2010) relatou sobre a presença de natamicina em vinhos argentinos e sul-africanos avaliados pelo governo da Alemanha, o que resultou na retirada de circulação destes vinhos do mercado alemão.

Considerando seu uso como aditivo alimentar em queijos, estudos baseados na extração com solvente orgânico seguida de análise por CLAE-DAD foram desenvolvidos (CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 2000; GUARINO *et al.*, 2011). Este método possibilitou a determinação simultânea de natamicina e dos ácidos sórbico e benzóico na matriz queijo (GUARINO *et al.*, 2011).

Na matriz vinho, esses trabalhos são mais recentes com foco no desenvolvimento de métodos capazes de detectar níveis traços deste composto (ZUR *et al.*, 2010; ALBERTS *et al.*, 2011; REPIZO *et al.*, 2012).

1.7 Análise de natamicina em vinhos

Em dois estudos realizados na Alemanha empregou-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência como ferramenta analítica.

O primeiro estudo utilizou HPLC/DAD, as seguintes condições foram propostas para a determinação de natamicina em vinhos: padrão pimarcina solubilizada no eluente (200 mM KH_2PO_4 e CH_3CN 72,5:27,5 v/v) numa concentração de 18mg/L e detecção simultânea em quatro canais de medidas (254, 290, 303 e 318 nm). Foram observados dois metabólitos com características espectrais similares a natamicina, sem identificação se era aponatamicina ou micosamina (FLAK e SCHABER, 1988).

No segundo estudo a tecnologia por meio do HPLC/MS/MS foi empregada e possibilitou, diante da instabilidade da natamicina em vinhos, a detecção de traços desta molécula e a identificação dos seus produtos de degradação. O eluente utilizado foi uma mistura entre solução aquosa e metanólica de acetato de amônio, sendo que a melhor separação foi obtida com um gradiente de eluição (fluxo de 0,25 mL/min) numa coluna C_{18} com dimensões de 2,1 mm de diâmetro, 150 mm de comprimento e com tamanho de partícula de 5 μm . A determinação foi linear numa faixa de 8-300 $\mu\text{g/L}$; os Limites de Detecção e de Quantificação foram, respectivamente, 2,5 e 8 $\mu\text{g/L}$ (ZUR *et al.*, 2010).

Recentemente, outros dois trabalhos foram divulgados sobre este tema, ambos incluindo um procedimento de extração em fase sólida (SPE) durante o preparo da amostra e a utilização o sistema de CLUE (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência). No primeiro trabalho em matrizes de vinho tinto e vinho branco, foram estabelecidos os limites de detecção de 0,68 e 1,13 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os limites de quantificação de 2,07 e 3,42 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Do mesmo modo, foram para essas matrizes (REPIZO *et al.*, 2012). O segundo trabalho, por sua vez, apresentou os valores de 0,3 e 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ como limites de detecção e quantificação, respectivamente (ALBERTS *et al.*, 2011).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Solução padrão de natamicina (pimaricina)

O padrão pimaricina de *Streptomyces chattanoogensis* (Sigma-Aldrich – Referência P9703-25MG, pureza mínima de 95%) foi dissolvido em metanol originando a solução-padrão estoque de concentração 100 mg L^{-1} (ppm), armazenada em frascos âmbar sob refrigeração.

A partir da solução-padrão estoque foram preparadas, a cada dia de uso, soluções de trabalho nas concentrações de 5,0 e 10 ppm para a preparação das curvas de calibração em solvente e em matriz, respectivamente. A faixa de trabalho foi de 0,1 - $5,0 \text{ mg L}^{-1}$.

2.2 Solução padrão de eritromicina

A eritromicina foi utilizada como padrão de controle de qualidade (QC) para a correção de eventuais variações no tempo de retenção da natamicina e avaliação do efeito de matriz.

O padrão de eritromicina (Sigma-Aldrich – Ref. 46256-250MG – Lote 8057X) foi dissolvido em metanol, de forma a ser obtido uma solução-padrão de 250 ppm. Dessa solução, foram preparadas novas diluições a fim de serem obtidas soluções de trabalho (1 ppm) e demais soluções-teste. Convencionou-se a adição de uma quantidade para a concentração final de eritromicina de $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (ppb) nas soluções e matrizes analisadas.

2.3 Reagentes

A água tipo I, $18 \text{ M}\Omega\text{cm}$ de resistividade (ASTM) foi produzida pelo sistema de ultra purificação de água Master System[®], marca Gehaka.

O metanol, grau HPLC, foi adquirido da J.T.Baker (USA).

Ácido acético (Sigma-Aldrich – Referência 33209-1L, pureza mínima de 99,8%) foi utilizado para acidificar a água tipo I e metanol, fase móvel A e B, respectivamente. Para a validação do método quantitativo a concentração de ácido acético foi de 0,3% em ambos, enquanto que uma fase móvel mais diluída (0,1%) foi utilizada na validação do método confirmatório.

2.4 Equipamentos

2.4.1 Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Foram utilizados dois sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Shimadzu (Kyoto, Japão). Tais sistemas apresentavam módulos de bombas binárias, degaseificadores, auto amostradores e detectores UV/Vis de arranjo de diodos (DAD), sendo operados pelo software LCSolutions, versão 1.23 SP1 (Shimadzu). Somente um dos sistemas possuía forno de coluna e foi utilizado durante o processo de desenvolvimento e validação do método, além das análises de amostras de vinhos e sucos. O outro sistema de cromatografia foi utilizado durante a avaliação da reprodutibilidade do método analítico desenvolvido.

A separação foi obtida utilizando uma coluna Zorbax SB C18 (dimensões 250 mm x 4,6mm; tamanho da partícula 5µm) precedida de pré-coluna Zorbax 300 SB C18.

2.4.2 Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a Espectrômetros de Massa em série (CLAE-EM/EM)

Cromatógrafo Líquido *Agilent* (Santa Clara, CA, USA), serie 1100, equipado com bomba quaternária, degaseificador e auto-amostrador; acoplado ao Espectômetro de Massas triplo quadrupolo API 5000 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) com uma interface de ionização por eletronebulização (em inglês, *electrospray* - ESI), no modo positivo.

A separação cromatográfica foi realizada com a utilização de uma coluna C18 (150 mm x 2,1 mm, tamanho de partícula de 5µm) precedida de coluna de guarda (4mm x 3mm) de mesmo material de empacotamento.

2.5 Condições cromatográficas dos métodos quantitativo e qualitativo

A natamicina foi analisada por CLAE-DAD utilizando fase móvel composta por (A) 0,3% de ácido acético em água (v/v) e (B) 0,3% de ácido acético em metanol (v/v), em modo isocrático A:B (47:53, v/v), injeção de 10 µL, e tempo de análise de 30 minutos. O fluxo da fase móvel foi de 0,5 mL min⁻¹. Os comprimentos de ondas (λ) selecionados para a natamicina foram 291, 303 e 318 nm.

Os mesmos eluentes foram utilizados para a análise por CLAE-EM/EM, porém numa menor concentração de ácido acético (0,1%) e com gradiente: concentração inicial de 25% de eluente B mantida até 2,5 minutos, elevada a 80% em 3 minutos e mantida até 8 minutos, retornando a concentração inicial nos próximos 0,5 minutos; o tempo total de corrida foi de 12 minutos (figura 5). O volume de injeção foi de 2 μ L a um fluxo de 0,250 mL/min.

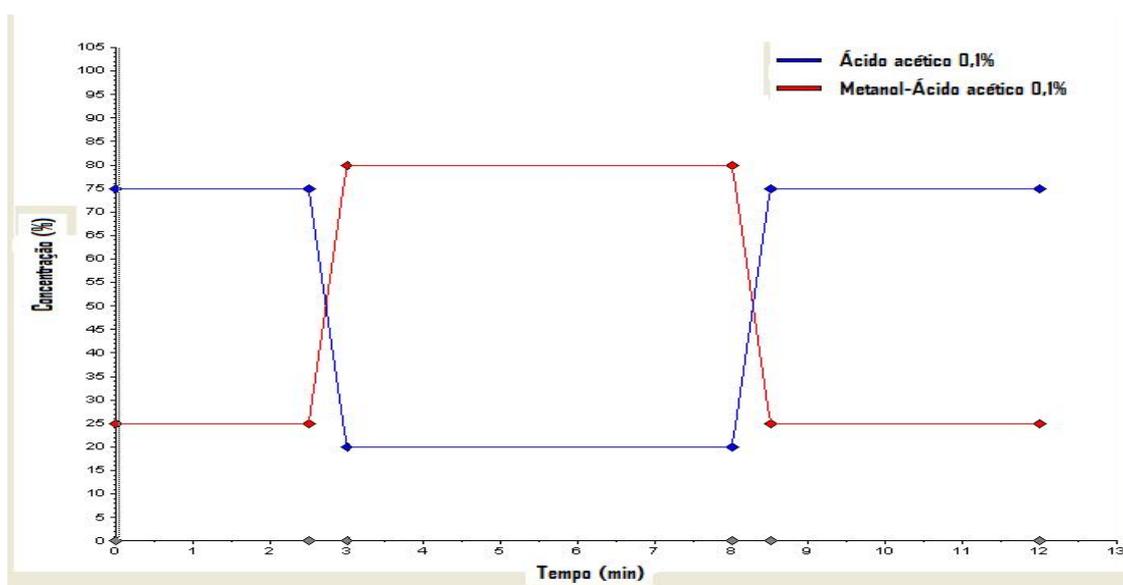


Figura 5 - Esquema da proporção dos solventes A e B na composição do gradiente da fase móvel do método CLAE-EM/EM.

As análises do método confirmatório por CLAE-EM/EM foram conduzidas no modo Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) para duas transições com um intervalo de tempo de 100 ms. Os parâmetros de ionização e espectrométricos foram otimizados automaticamente pelo software *Analyst* ver. 1.4.2 (*Applied Biosystems*). Gás nitrogênio foi utilizado para nebulização, desolvatação e fragmentação da natamicina.

2.6 Condições de ionização e fragmentação da natamicina

Uma fonte ESI, operada no modo positivo, foi responsável pela ionização da natamicina e seu direcionamento para o interior do espectrômetro por um filtro de íons (Q_0). Em seguida, os íons moleculares foram conduzidos pelo primeiro quadrupolo (Q_1) até a célula de colisão (Q_2), onde ocorreu a fragmentação destes íons. Por fim, os fragmentos resultantes foram selecionados pelo terceiro quadrupolo (Q_3) e conduzidos ao detector.

Os parâmetros da fragmentação (dependentes da natamicina) e da ionização (dependentes da fonte ESI) foram otimizados automaticamente pelo software *Analyst*. As principais condições espectrométricas obtidos pela otimização estão apresentados na tabela 6. Os parâmetros de ionização otimizadas foram: temperatura de ionização de 600 °C, voltagem de *spray* de 5500 V e pressão de nitrogênio aplicado na cortina de gás de 55 psi.

As condições de ionização e fragmentação adotadas para a eritromicina foram adaptadas do trabalho de Spisso *et al.* (2010).

Tabela 6 – Parâmetros de ionização e espectrométricos da natamicina e da eritromicina

	Íon	Íon Precursor (m/z)	Íons Produtos (m/z)	Tempo	DP	EP	CE	CXP
NAT	[M + H] ⁺	666,4	503,1 485,2	100 100	91 91	10 10	15 21	18 18
ERY	[M + H] ⁺	734,5	158	100	91	10	41	18

Legenda: Tempo – intervalo de tempo no Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM); DP – potencial de desaglomeração; EP – potencial de entrada; CE – energia de colisão; CXP – potencial de saída da célula de colisão.

2.7 Estudo do Efeito de Matriz nos métodos quantitativo e qualitativo

Foi realizado a partir da análise de amostras preparadas pela adição da solução-padrão de natamicina em solvente e em matrizes isentas da substância. Em seguida, foram construídas as curvas de calibração, correlacionando as áreas da natamicina com as respectivas concentrações em solvente e em matriz.

O efeito de matriz do método CLAE-DAD foi avaliado pela diferença estatística (Teste F) do sobreposicionamento das duas curvas de calibração. As curvas em solvente e em matriz foram preparadas na faixa de concentração de 0,2 a 5,0 ppm. Cada nível foi preparado em triplicata e injetado duas vezes no equipamento. A curva em solvente foi construída seguindo as informações relacionadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Preparação da curva padrão da natamicina em solvente metanol para análise por CLAE-DAD.

	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P3</i>	<i>P4</i>	<i>P5</i>	<i>P6</i>	<i>P7</i>
<i>Concentração (ppm)</i>	0,2	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
<i>Solução de trabalho 5ppm (µL)</i>	40	100	200	400	600	800	1000
<i>Metanol (µL)</i>	960	900	800	600	400	200	-

Foram selecionadas sete matrizes isentas de natamicina: vinho branco meio seco (VBM), vinho rosado meio seco (VRM), vinho tinto seco (VTS), vinho branco seco (VBS), espumante tinto doce (ETD), vinho tinto suave (VTU) e suco de uva (SUV), as quais foram fortificadas com a solução padrão estoque de natamicina (100 ppm) originando as soluções como consta na tabela 8. Para a construção da curva em matriz, cada ponto foi diluído dez vezes em metanol.

Tabela 8 - Preparação da curva padrão em diferentes matrizes para análise por CLAE-DAD.

	<i>M1</i> (<i>VBM</i>)	<i>M2</i> (<i>VRM</i>)	<i>M3</i> (<i>VTS</i>)	<i>M4</i> (<i>VBS</i>)	<i>M5</i> (<i>ETD</i>)	<i>M6</i> (<i>VTU</i>)	<i>M7</i> (<i>SUV</i>)
<i>Concentração (ppm)</i>	2	5	10	20	30	40	50
<i>Solução-padrão 100ppm (mL)</i>	2	5	10	20	30	40	50
<i>Matriz (mL)</i>	98	95	90	80	70	60	50

Legenda: VBM - vinho branco meio seco, VRM - vinho rosado meio seco, VTS - vinho tinto seco, VBS - vinho branco seco, ETD - espumante tinto doce, VTU - vinho tinto suave e SUV - suco de uva.

No estudo do efeito da matriz por CLAE-EM/EM, diferentes matrizes foram adicionadas de natamicina nas concentrações de 50 a 200 ppb, entre as quais, solvente, vinho tinto seco, vinho tinto suave, vinho branco seco, vinho branco suave e suco de uva. A tabela 9 esquematiza o preparo das matrizes analisadas. A solução em solvente diferencia-se pelo não acréscimo de 100 µL de matriz sendo este volume substituído pelo metanol. As soluções de trabalho utilizadas de natamicina e de eritromicina foram de 500 ppb e 1000 ppb, respectivamente.

Tabela 9 – Preparo da curva padrão de natamicina em diferentes matrizes para análise por CLAE-EM/EM.

Conc. (ppb)	0	0	50	100	150	200
Sol. trabalho de natamicina (µL)	-	-	100	200	300	400
Sol. trabalho de eritromicina (µL)	-	50	50	50	50	50
Matriz (µL)	100	100	100	100	100	100
Metanol (µL)	900	850	750	650	550	450
Total (µL)				1000		

2.8 Linearidade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Foram analisados os dados obtidos de curvas padrão em matriz vinho preparadas em três dias diferentes, conforme esquematizado na tabela 10.

Tabela 10 - Preparo das curvas padrão em matriz vinho

	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P3</i>	<i>P4</i>	<i>P5</i>	<i>P6</i>	<i>P7</i>	<i>P8</i>
<i>Concentração (ppm)</i>	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
<i>Solução de trabalho 10ppm (µL)</i>	10	20	50	100	200	300	400	500
<i>Matriz (µL)</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Metanol (µL)</i>	980	960	900	800	600	400	200	-

Procedeu-se a análise dos dados através da regressão linear das curvas e do perfil de resíduos. A partir das informações fornecidas pela estatística de regressão, calcularam-se os limites de detecção e quantificação do método:

$$LD = 3 * \text{Erro padrão} / \text{Coeficiente angular}$$

$$LQ = 10 * \text{Erro padrão} / \text{Coeficiente angular}$$

A elucidação da linearidade do método seguiu a norma ISO 11095 recomendada pela Organização Internacional do Vinho - OIV (OIV, 2011). O princípio dessa abordagem consiste na comparação do erro residual com o erro experimental usando o teste de Fischer.

2.9 Estudo da Precisão intra e interdia

Para o estudo de precisão intra e interdia, três níveis próximos ao limite de quantificação (0,1; 0,2 e 0,3 ppm) foram adicionados em matriz vinho e analisados com seis repetições em três dias distintos utilizando as mesmas curvas do teste da linearidade.

2.10 Precisão do método qualitativo próximo ao limite de detecção do método quantitativo

A precisão do método de CLAE-MS/MS foi avaliada pela verificação da repetibilidade, sendo conduzida pela análise de 22 amostras na concentração de 0,05 mg L⁻¹ de natamicina, próxima ao Limite de Detecção do método CLAE-DAD, garantindo assim, que as amostras detectadas no método quantitativo fossem estatisticamente passíveis de confirmação. A partir das soluções de trabalho de natamicina (0,5 mg L⁻¹) e eritromicina (1 mg L⁻¹), foram adicionados, respectivamente, 100 µL e 50 µL em 100 µL de cada matriz analisada e completado o volume (1000 µL) com metanol.

2.11 Estudo de degradação da natamicina em solvente e matriz vinho

O padrão pimaricina de *Streptomyces chattanoogensis* (Sigma-Aldrich – Ref. P9703-25MG, pureza mínima de 95%) foi dissolvido em metanol e acidificado com ácido fórmico 0,1% (Merck, pureza de 98-100%) originando a solução-padrão estoque de concentração 100 ppm, três alíquotas foram segregadas e cada uma armazenada em uma condição diferente: protegida da luminosidade e à temperatura ambiente (esc/amb); sob luminosidade e à temperatura ambiente (luz/amb) e protegida da luminosidade e sob refrigeração (esc/gel). Do mesmo modo, foram armazenadas três alíquotas de matriz vinho tinto adicionada de natamicina.

As análises foram realizadas no intervalo de tempo de 0-7-15-30-60 dias, diluindo-se as amostras ao nível de 5 mg.L⁻¹ nos dias de ensaio.

2.12 Amostras reais

Foram analisadas 138 amostras provenientes do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, sendo as amostras de vinhos obtidas principalmente no Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS e as amostras de sucos de uva do Laboratório de Referência Enológica – LAREN/RS. A figura 06 mostra o percentual do tipo de amostra analisada e a tabela 11 a classificação das mesmas.

As amostras foram filtradas por meio de membrana filtrante de polietersulfona (PES), de 0,45 µm de tamanho de poro e 33 mm de diâmetro, marca Millex® HP (Millipore) e diluídas dez vezes.

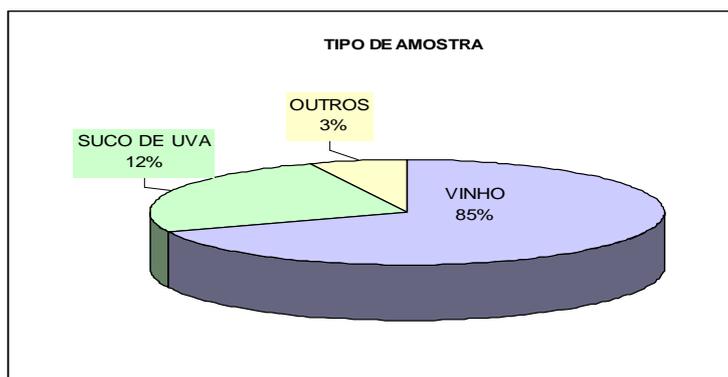


Figura 6 - Tipo de amostras analisadas no método quantitativo

Tabela 11 - Amostras de vinhos, sucos de uva e derivados analisadas por CLAE-DAD

Vinho fino tinto	seco	40
	meio seco	6
	suave	1
Vinho fino branco	seco	24
	meio seco	5
	suave	2
Vinho fino rosado	seco	3
	meio seco	1
	suave	1
Vinho espumante branco	brut	4
	doce	5
Vinho frisante tinto	seco	1
	doce	1
Vinho de mesa branco	seco	2
	suave	5
Vinho de mesa tinto	seco	2
	suave	15
Suco de uva		16
Coquetel de vinho		1
Cooler		1
Filtrado doce		2
TOTAL		138

A figura 07 apresenta os países de origem dos vinhos que corresponderam a 85% das amostras analisadas.

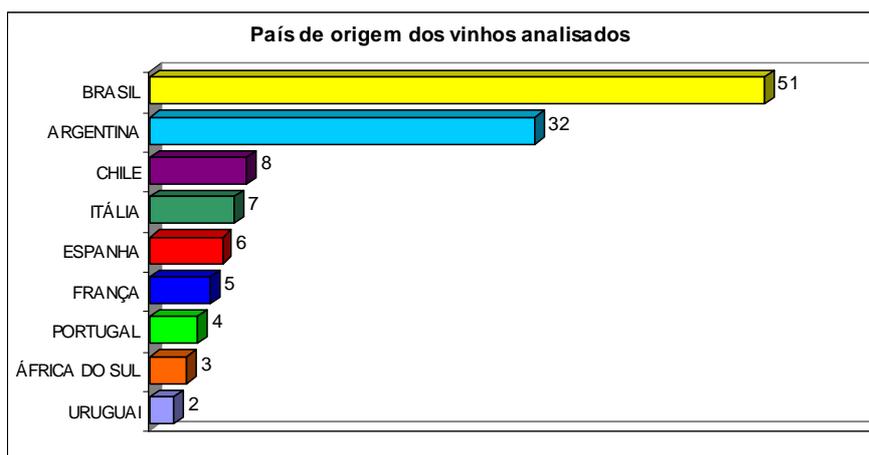


Figura 7 - Distribuição dos países de origem dos vinhos analisados (118 amostras).

Do total de amostras, 10 (sete de vinhos suaves e três de sucos de uva) foram também analisadas por CLAE-EM/EM. Além da filtração e diluição, adicionou-se o padrão de eritromicina para correção de eventuais perdas volumétricas na etapa de diluição e o efeito de matriz. Dessa forma, o padrão de eritromicina foi submetido às mesmas condições de supressão iônica e de ionização do analito, normalizando a resposta analítica da natamicina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Condições cromatográficas dos métodos quantitativo e qualitativo

A fase móvel A (solução de ácido acético 0,3%) e B (solução de ácido acético 0,3% em metanol) foi inicialmente testada em três diferentes proporções A:B 60:40, 50:50 e 40:60. Na primeira condição, não foi possível observar o sinal de natamicina em até 30 minutos. Na segunda e terceira condição, nos tempos de retenção (t_R) de aproximadamente 30 e 10 minutos, respectivamente, a natamicina foi visualizada. Proporções intermediárias foram então testadas, sendo que a condição A:B 47:53 permitiu a separação cromatográfica do composto dos demais componentes das matrizes em um t_R de aproximadamente 20 minutos, conforme cromatograma ilustrado na figura 8):

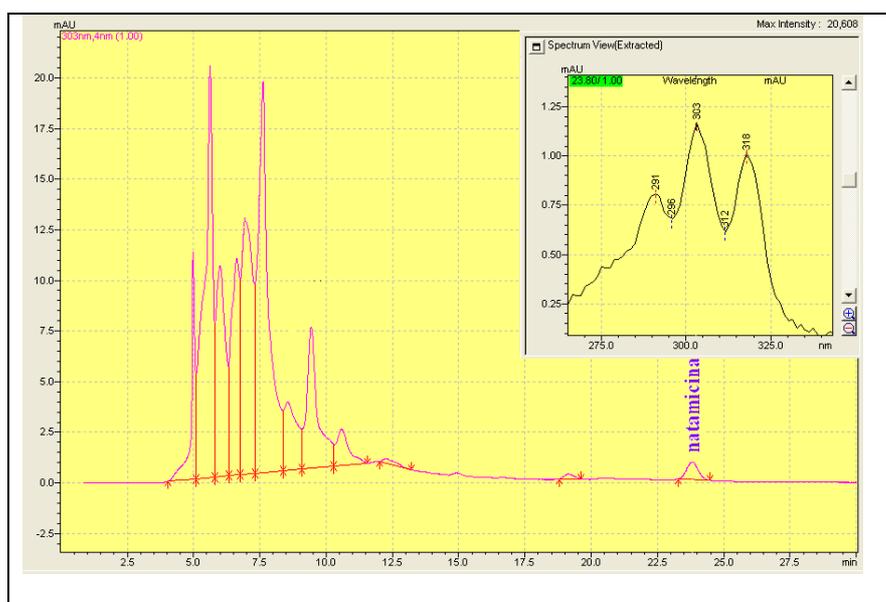


Figura 8 - Separação cromatográfica de natamicina ($0,3 \text{ mg L}^{-1}$) adicionada em vinho tinto (t_R 24 min); fluxo isocrático de solução de ácido acético 0,3% e solução de ácido acético 0,3% em metanol (47:53, v/v); coluna C18 (250 mm x 4,6mm; $5\mu\text{m}$); volume de injeção de $10 \mu\text{L}$ e temperatura do forno de coluna de 30°C .

A temperatura do forno de coluna foi ajustada em 30°C para melhorar a reprodutibilidade do tempo de retenção do analito durante a corrida cromatográfica. Contudo, o método foi reprodutível também quando avaliado no sistema de CLAE-DAD que não apresentava forno de coluna.

A análise de natamicina foi acompanhada pelos comprimentos de ondas característicos, sendo o λ máximo de 303 nm utilizado para a quantificação e os de 291nm e 318 nm utilizados para o monitoramento do perfil de absorção.

3.2 Condições de ionização e fragmentação da natamicina

Inicialmente, foi realizado um estudo de formação de íons negativos e positivos da natamicina, utilizando a fonte de ESI no modo negativo e positivo, respectivamente. Como resultado, não foi possível observar a presença de um íon analítico no modo negativo (Figura 9A). Por outro lado, no modo positivo, foi observada a formação de íon analítico com relação massa/carga (m/z) 666,4 (Figura 9B).

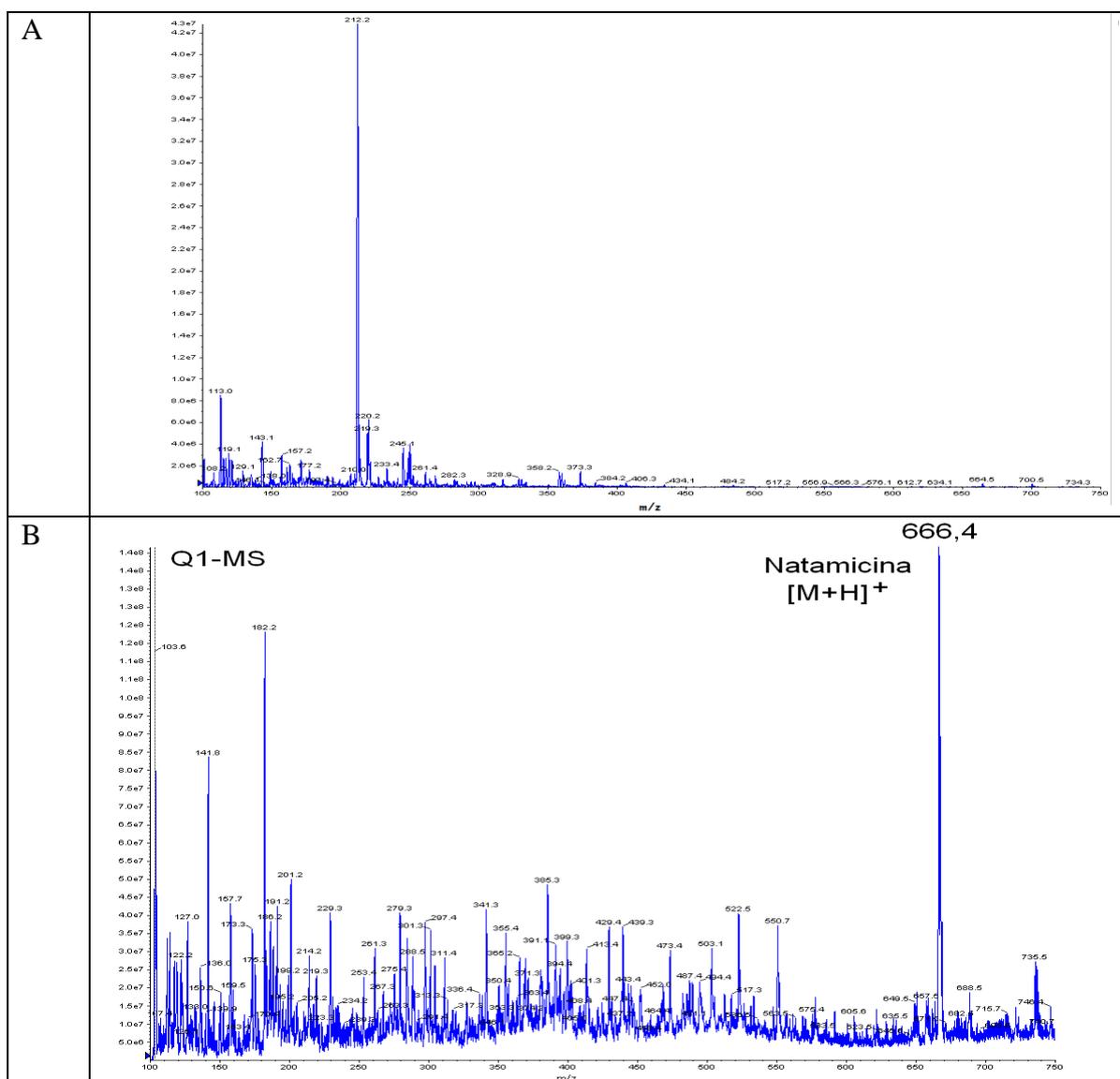


Figura 9 - Fragmentação da natamicina (Q1-MS) pela fonte ESI no modo negativo (A) e positivo (B)

A figura 10 apresenta dos principais produtos da fragmentação da natamicina (m/z 666,4). Para um método confirmatório por CLAE-EM/EM, são necessários somente dois íons produtos (EEC, 2002). A seleção desses íons foi realizada de forma a obter um método de máxima sensibilidade. Portanto, foram selecionados os íons de maior intensidade, a saber os de m/z 503,5 e 485,3.

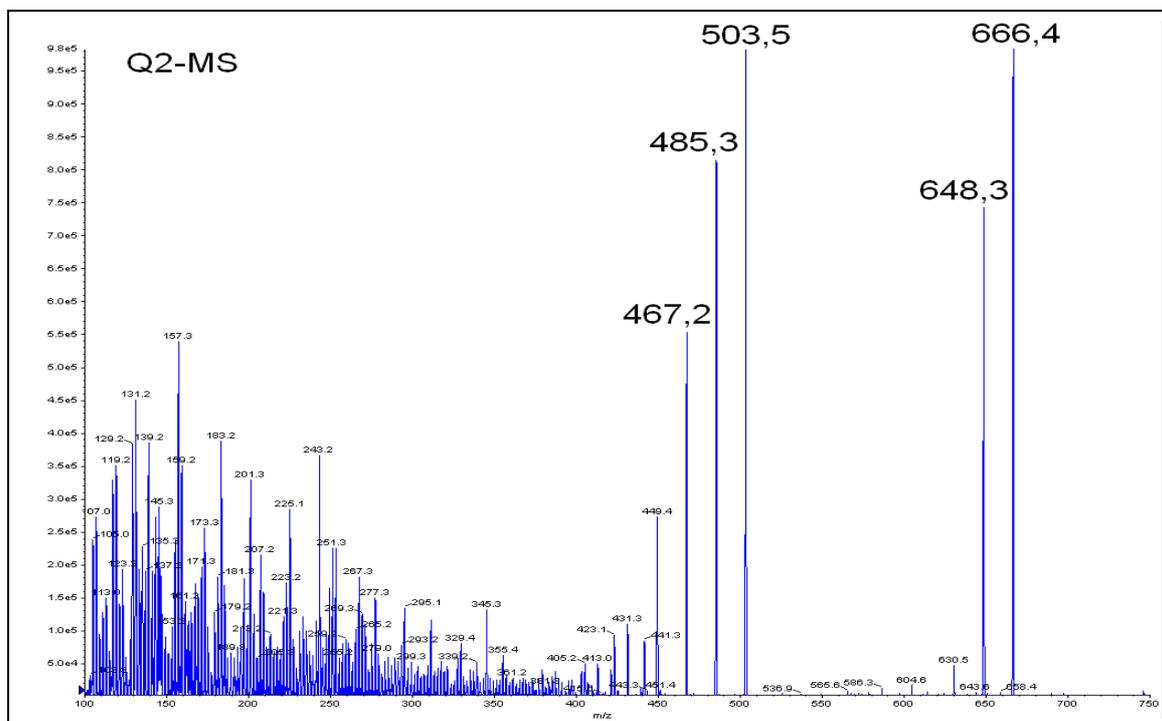


Figura 10 - Íons produtos da fragmentação da natamicina (Q2-MS) pela fonte ESI no modo positivo

A utilização da fonte de ESI no modo positivo e a seleção dos íons m/z 503,5 como quantificador e do m/z 485,3 como qualificador estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores que analisaram este composto em matriz vinho (Zur *et al.*, 2010; ALBERTS *et al.*, 2011 e REPIZO *et al.*, 2012).

3.3 Estudo do Efeito de Matriz nos métodos quantitativo e qualitativo

Os dados referentes às seis repetições efetuadas para cada ponto das curvas padrão em solvente e em matriz encontram-se nas tabelas 12 e 13, respectivamente. O estudo do efeito de matriz é importante para avaliar se a matriz interfere na detecção da substância de interesse (OIV, 2011). As informações sobre a intensidade desse efeito e a eficiência cromatográfica são parâmetros que devem ser avaliados para que o método alcance uma ótima sensibilidade (ROGATSKY e STEIN, 2005).

Tabela 12 - Variância média de seis repetições para cada ponto da curva padrão de natamicina em solvente.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Repetição 1	15919	43283	91816	188713	289495	385332	476663
Repetição 2	15742	44062	90866	186057	288680	382932	476417
Repetição 3	16236	43695	89860	187671	291154	382899	474377
Repetição 4	15757	43746	91375	187013	290332	385615	472496
Repetição 5	15736	43602	91312	191231	288603	377460	475706
Repetição 6	15016	43534	92746	188476	292219	374874	470554
Média	15734	43654	91329	188194	290081	381519	474369
Desvio-padrão (S)	401	257	961	1778	1434	4378	2421
Variância (S²)	160470	66271	923959	3161462	2055211	19169732	5861345
Média (S²)							4485493

Legenda: P1 – primeiro nível da curva em solvente na concentração de 0,2 mg L⁻¹; P2 – 0,5 mg L⁻¹; P3 – 1,0 mg L⁻¹; P4 – 2,0 mg L⁻¹; P5 – 3,0 mg L⁻¹; P6 – 4,0 mg L⁻¹; P7 – 5,0 mg L⁻¹.

Tabela 13 - Variância média de seis repetições para cada ponto da curva padrão de natamicina em matrizes.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Repetição 1	17843	45835	82037	181094	272352	369148	463142
Repetição 2	16887	44440	89133	180030	274441	373647	463878
Repetição 3	17978	42401	85163	186871	276182	378440	464719
Repetição 4	17867	43172	87381	189556	278668	374726	466362
Repetição 5	18165	44294	86683	191066	276251	377194	462303
Repetição 6	17785	44823	86822	191169	274700	374605	462472
Média	17754	44161	86203	186631	275432	374627	463813
Desvio-padrão (S)	446	1218	2409	4962	2131	3229	1540
Variância (S²)	198487	1482354	5804660	24621493	4541852	10423717	2370217
Média (S²)							7063254

Legenda: M1 – primeiro nível da curva em matriz na concentração de 0,2 mg L⁻¹; M2 – 0,5 mg L⁻¹; M3 – 1,0 mg L⁻¹; M4 – 2,0 mg L⁻¹; M5 – 3,0 mg L⁻¹; M6 – 4,0 mg L⁻¹; M7 – 5,0 mg L⁻¹.

O teste F foi aplicado para analisar as variâncias das curvas. Se $F_{\text{calculado}}$ for menor que F_{tabelado} , com diferentes matrizes, rejeita-se a hipótese de que há variância significativa entre as curvas testadas. O $F_{\text{calculado}}$, considerando a variância média dos valores das diferentes curvas, foi igual a 1,57 (razão entre a Variância maior sobre a Variância menor) e o F_{tabelado} para 6 repetições ($g_L = 5$) é 5,05. Nesse sentido, pode-se afirmar que não houve diferença significativa entre a variabilidade das análises. A figura 11 ilustra as curvas obtidas das médias das repetições realizadas, mostrando similaridade entre as curvas.

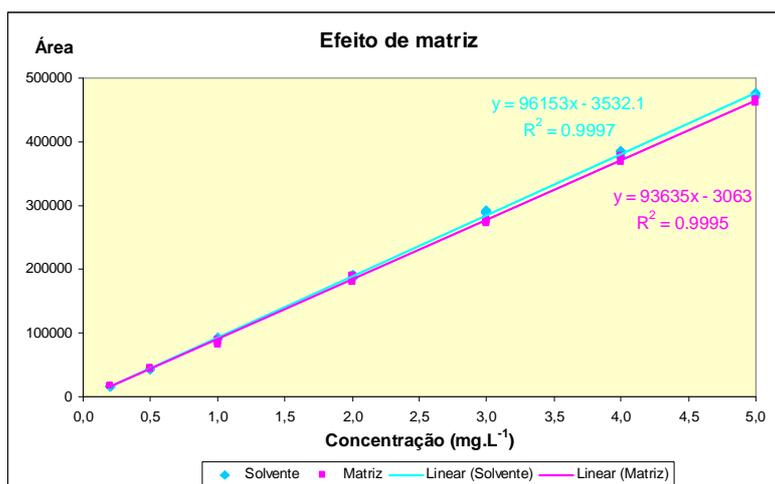


Figura 11 - Curva padrão de natamicina em solvente metanol (em azul) e curva padrão de natamicina em matriz vinho (em rosa); faixa de concentração de 0,2 a 5,0 mg L⁻¹

Em matriz soro de leite, também não houve efeito de matriz para a determinação de natamicina (CAPITÁN-VALLVEY et al., 2000). Alberts et al. (2011) utilizaram uma etapa anterior de extração em fase sólida aminopropil para remover os interferentes da matriz vinho pela eluição direta da natamicina.

A matriz pode causar um efeito de supressão da eficiência de ionização em análises por CLAE-EM/EM, principalmente quando é utilizada fonte do ESI, com consequente perda na sensibilidade do método. Portanto, a avaliação do efeito de matriz é uma informação importante sobre a qualidade da validação (ROGATSKY e STEIN, 2005). A extensão do efeito de matriz pode ser minimizada pela adição de um padrão interno ao solvente e às amostras, procedimento que também é passível de corrigir eventuais perdas volumétricas no processo de preparo das amostras.

Conforme apresentado na figura 12, as matrizes analisadas (suco de uva, vinho branco suave e seco, vinho tinto suave e seco) conferem efeito de matriz sobre o sinal analítico da natamicina, produzindo diferenças visuais na sensibilidade do método (diferentes coeficientes angulares e lineares). Esse efeito foi corrigido dividindo-se a resposta analítica da natamicina pela resposta da eritromicina como pode ser observado na figura 13. Dessa forma, ambos os coeficientes angulares e lineares foram normalizados, produzindo respostas semelhantes entre a natamicina em solvente e nas diferentes matrizes.

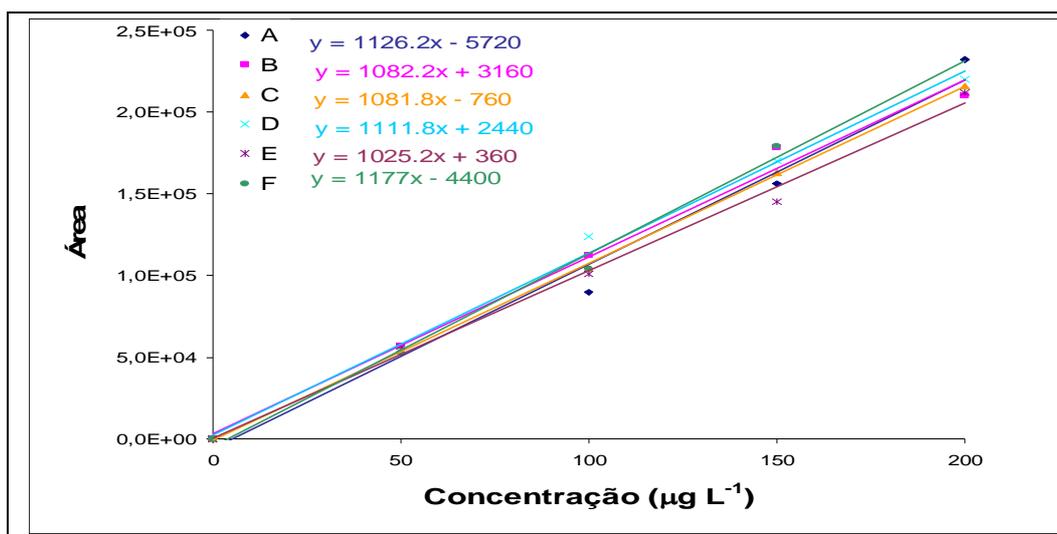


Figura 12 – Curva padrão de natamicina em solvente metanol (A) e curvas padrão de natamicina nas matrizes vinho branco seco (B), vinho branco suave (C), vinho tinto seco (D), vinho tinto suave (E), suco de uva (F); faixa de concentração de 0 a 0,2 mg L⁻¹

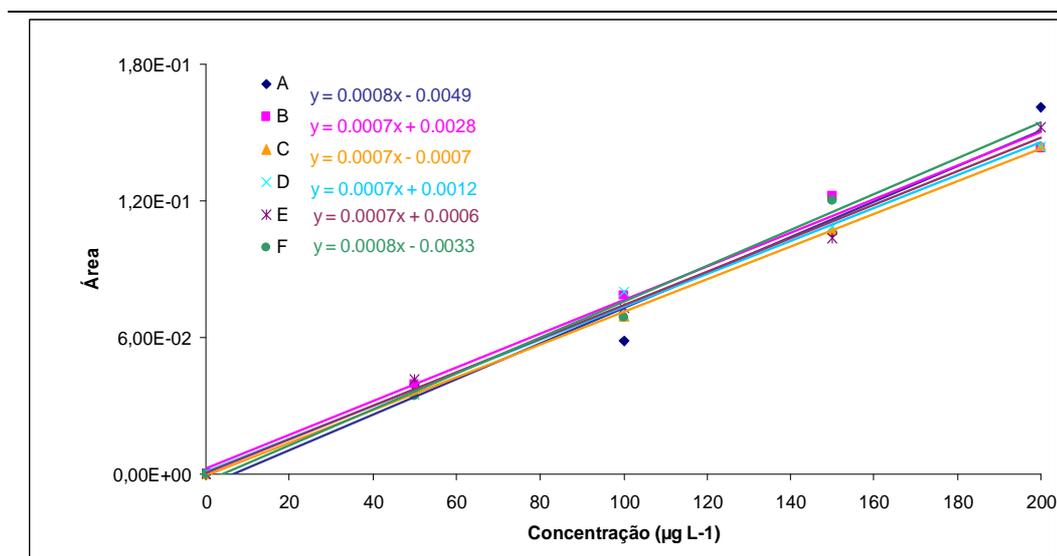


Figura 13 – Curva padrão de natamicina em solvente metanol (A) e curvas padrão de natamicina nas matrizes vinho branco seco (B), vinho branco suave (C), vinho tinto seco (D), vinho tinto suave (E), suco de uva (F), após correção pelo sinal do padrão de qualidade de eritromicina; faixa de concentração de 0 a 0,2 mg L⁻¹.

3.4 Linearidade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Na tabela 14 pode-se observar a estatística de regressão gerada a partir das análises efetuadas que forneceram um R-Quadrado (R²) de 0,9992.

Tabela 14 - Regressão linear da análise das curvas padrão de natamicina em matriz vinho, faixa de trabalho de 0,1 a 5,0 mg L (n= 8; 4 repetições)

Estatística de regressão					
	R múltiplo	0,999607692			
	R-Quadrado	0,999215538			
	R-quadrado ajustado	0,999189389			
	Erro padrão	4972,126891			
	Observações	32			

ANOVA	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	9,44698E+11	9,44698E+11	38212,78	3,78877E-48
Resíduo	30	741661374,7	24722045,82		
Total	31	9,4544E+11			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	Valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	-1501,32	1331,58	-1,13	0,2685	-4220,76	1218,13
Conc (mg L ⁻¹)	99004,07	506,46	195,48	3,79E-48	97969,73	100038,41

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A faixa dinâmica linear é válida se os valores residuais estão aleatoriamente distribuídos entre os valores positivos e negativos (OIV, 2011).

A figura 14 mostra a curva padrão a partir das análises efetuadas em matriz vinho em três dias distintos, mostrando que o R^2 calculado foi muito próximo ao esperado.

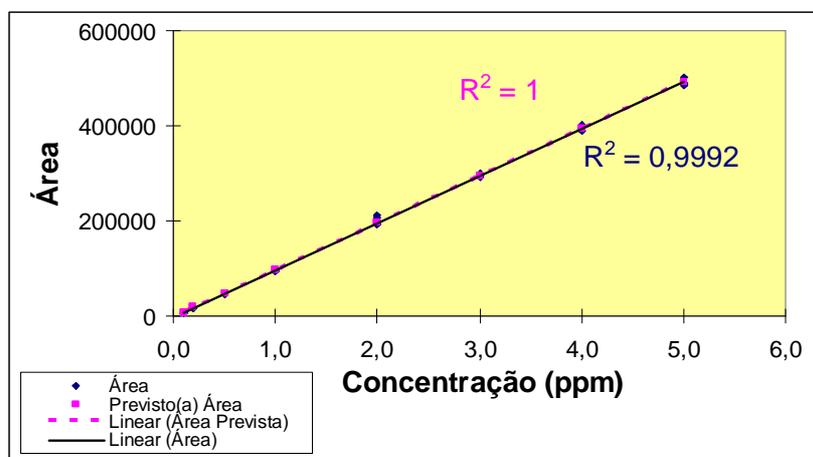


Figura 14 – Curva padrão de natamicina em vinhos: R^2 calculado versus R^2 previsto

Na faixa de trabalho de 0,1 a 5,0 mg L⁻¹ o método apresentou linearidade, o R-Quadrado (R²) foi superior a 0,99 (0,9992) e o perfil de resíduos foi satisfatório (figura 15).

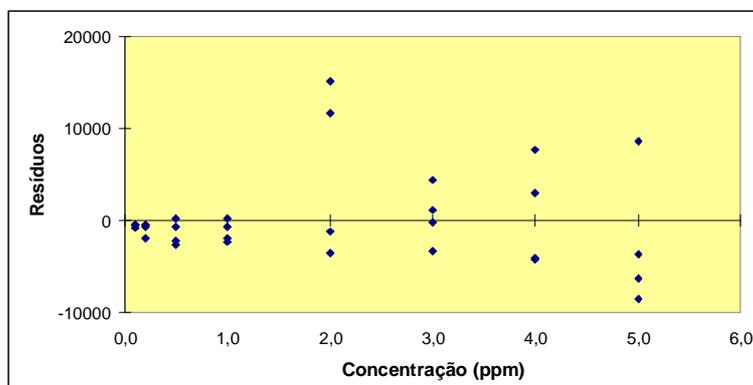


Figura 15 - Curva padrão de natamicina em vinhos: distribuição dos resíduos positivos e negativos

Na tabela 14 pode-se ainda obter os dados para a estimativa dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método. O LD foi determinado pelo cálculo de três vezes o erro padrão (1331,58) dividido pelo coeficiente angular (99004,07) que resultou no valor de 0,04 mg L⁻¹. O cálculo para determinação do LQ (dez vezes o erro padrão dividido pelo coeficiente angular) resultou no valor de 0,13 mg L⁻¹.

Alberts *et al.* (2011) determinando de natamicina em vinhos pelo método CLAE-DAD encontraram os limites de detecção e quantificação de 0,1 e 0,3 mg L⁻¹, respectivamente. Resultados similares foram encontrados em soro de leite na determinação desse antifúngico pelo mesmo método (CAPITÁN-VALLVEY *et al.*, 2000).

A sensibilidade do método CLAE-EM/EM é superior à do método quantitativo; as discrepâncias entre os limites de detecção e de quantificação são ainda maiores se compararmos estes métodos com os que utilizam a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência – CLUE. Os limites de detecção e quantificação, respectivamente, estimados para as análises de natamicina em vinhos pelo método de CLAE/EM-EM foram de 2,5 e 8 µg L⁻¹ (ZUR *et al.*, 2010). Quando a técnica de CLUE-EM/EM é empregada, os limites de detecção e quantificação são ainda menores: de 0,3 a 1,13 µg L⁻¹ para os valores de detecção e de 1 a 3,42 µg L⁻¹ para quantificação (ALBERTS *et al.*, 2011; REPIZO *et al.*, 2012). Estes dados estão resumidos na tabela 15.

Tabela 15 – Limites de detecção e quantificação de natamicina em vinhos obtidos por diferentes métodos.

AUTORES	MATRIZ	MÉTODO	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
ALBERTS <i>et al.</i> , 2011	vinho	CLAE-DAD	0,1	0,3
ZUR <i>et al.</i> , 2010	vinho	CLAE-EM/EM	0,0025	0,008
REPIZO <i>et al.</i> , 2012	vinho tinto	CLUE-EM/EM	0,0007	0,0021
REPIZO <i>et al.</i> , 2012	vinho branco	CLUE-EM/EM	0,001	0,0034
ALBERTS <i>et al.</i> , 2011	vinho	CLUE-EM/EM	0,0003	0,001

Durante as análises para a determinação da presença de natamicina nas bebidas estudadas evidenciou-se em vários cromatogramas um pico mais intenso no comprimento de onda de 291 nm quando comparado aos outros dois comprimentos selecionados (303 e 318 nm), considerando que a absorção máxima do ácido sórbico é em 260 nm e o perfil de absorção fornecido pelo DAD para aquele pico, pode-se suspeitar dessa substância. A natamicina e o ácido benzóico não são permitidos para vinhos; o ácido sórbico pode estar presente nessa matriz na concentração máxima de 200 mg L⁻¹.

3.5 Estudo da precisão intra e interdia

O grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições pré-estabelecidas é conhecido como a precisão do método. O valor da precisão pode ser interpretado por meio da repetitividade e da reprodutibilidade, sendo usualmente expresso pelo desvio-padrão ou pelo coeficiente de variação (CV%). Recomenda-se a seleção de pelo menos três diferentes níveis em torno da concentração de interesse com um mínimo de cinco determinações. A precisão é expressa em termos do coeficiente de variação, que não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação que se aceita até 20% (FDA, 2001; ANVISA, 2003).

As tabelas 16, 17 e 18 apresentam os valores intradia de concentração (mg L⁻¹) e de área dos três níveis (0,1-0,2-0,3 mg L⁻¹) monitorados do analito no primeiro, segundo e terceiro dia do estudo, respectivamente. A tabela 19 relaciona as médias das concentrações dos três dias para o cálculo da precisão interdia.

O coeficiente de variação (CV%), razão entre a média e o desvio-padrão, demonstra a precisão intra e interdia, uma vez que os coeficientes de variação encontram-se abaixo de 15%. O resultado da amostra 1.2.2 foi desconsiderado no cálculo do coeficiente de variação intradia.

Tabela 16 – Estudo de precisão intradia (primeiro dia): análise de três amostras de vinho adicionadas de natamicina nas concentrações de 0,1 – 0,2 e 0,3 mg L⁻¹ (6 repetições).

Amostra	Área	Conc (mgL ⁻¹)	Amostra	Área	Conc (mgL ⁻¹)	Amostra	Área	Conc (mgL ⁻¹)
1.1.1	6760	0,0916	1.2.1	14674	0,1721	1.3.1	23116	0,2579
1.1.2	7179	0,0959	1.2.2	21428	0,2407	1.3.2	23105	0,2578
1.1.3	7351	0,0976	1.2.3	13620	0,1614	1.3.3	22591	0,2526
1.1.4	6196	0,0859	1.2.4	14862	0,1740	1.3.4	21607	0,2426
1.1.5	6582	0,0898	1.2.5	13955	0,1648	1.3.5	22096	0,2475
1.1.6	6407	0,0880	1.2.6	13353	0,1586	1.3.6	22479	0,2514
Média	6746	0,0915		14092	0,1661		22499	0,2516
Desvio-padrão(S)	447	0,0045		655	0,0066		586	0,0060
CV(%)	6,62	4,97		4,65	4,01		2,60	2,37

Tabela 17 - Estudo de precisão intradia (segundo dia): análise de três amostras de vinho adicionadas de natamicina nas concentrações de 0,1 - 0,2 e 0,3 mg L⁻¹ (6 repetições).

Amostra	Área	Conc (mgL ⁻¹)	Amostra	Área	Conc (mgL ⁻¹)	Amostra	Área	Conc (mgL ⁻¹)
2.1.1	7085	0,10409	2.2.1	17009	0,19456	2.3.1	27597	0,29476
2.1.2	7005	0,10334	2.2.2	24316	0,26371	2.3.2	28010	0,29867
2.1.3	8276	0,11531	2.2.3	18201	0,20585	2.3.3	29301	0,31089
2.1.4	7169	0,10489	2.2.4	17961	0,20358	2.3.4	28450	0,30283
2.1.5	7972	0,11244	2.2.5	18708	0,21065	2.3.5	29618	0,31389
2.1.6	7984	0,11256	2.2.6	18267	0,20647	2.3.6	29623	0,31394
Média	7582	0,1088		19077	0,2141		28767	0,3058
Desvio-padrão(S)	556	0,0052		2628	0,0249		870	0,0082
CV(%)	7,33	4,81		13,78	11,61		3,02	2,69

Tabela 18 – Estudo de precisão intradia (terceiro dia): análise de três amostras de vinho adicionadas de natamicina nas concentrações de 0,1 - 0,2 e 0,3 mg L⁻¹ (6 repetições).

Amostra	Área	Conc (mgL ⁻¹)	Amostra	Área	Conc (mgL ⁻¹)	Amostra	Área	Conc (mgL ⁻¹)
3.1.1	7401	0,10979	3.2.1	16160	0,19849	3.3.1	27465	0,31219
3.1.2	8089	0,11668	3.2.2	16259	0,19948	3.3.2	28753	0,32511
3.1.3	8133	0,11711	3.2.3	18241	0,21936	3.3.3	27163	0,30916
3.1.4	7151	0,10728	3.2.4	17207	0,20775	3.3.4	27439	0,31194
3.1.5	7836	0,11414	3.2.5	17799	0,21369	3.3.5	28694	0,32451
3.1.6	8298	0,11877	3.2.6	16221	0,19786	3.3.6	27209	0,30962
Média	7818	0,1140		16981	0,2061		27787	0,3154
Desvio-padrão(S)	452	0,0045		903	0,0090		735	0,0074
CV(%)	5,78	3,97		5,32	4,37		2,65	2,34

Tabela 19 - Estudo da precisão intra e interdia do método de determinação de natamicina em vinhos por CLAE-DAD, 3 concentrações (0,1 – 0,2 – 0,3 mg L⁻¹) em três diferentes dias de análise.

Concentração Referência	Dia	Concentração Média (mg L ⁻¹)	CV(%) intradia	CV(%) interdia
0,1 mg L ⁻¹	Primeiro	0,0915	4,97	11,24
	Segundo	0,1088	4,81	
	Terceiro	0,1140	3,97	
0,2 mg L ⁻¹	Primeiro	0,1661	4,01	9,33
	Segundo	0,2141	11,61	
	Terceiro	0,2061	4,37	
0,3 mg L ⁻¹	Primeiro	0,2516	2,37	11,82
	Segundo	0,3058	2,69	
	Terceiro	0,3154	2,34	

3.6 Precisão do método qualitativo próximo ao limite de detecção do método quantitativo

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade, que representa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição. O coeficiente da variação obtido foi inferior a 15% (tabela 20)

Tabela 20 - Estudo de precisão do método CLAE-EM/EM: 22 amostras de vinhos adicionados de natamicina na concentração de 0,05 mg L⁻¹.

Amostra	Natamicina 648/583	Amostra	Natamicina 648/583
1	4,06E+04	12	4,55E+04
2	5,13E+04	13	4,56E+04
3	5,34E+04	14	3,86E+04
4	4,95E+04	15	4,28E+04
5	3,72E+04	16	4,23E+04
6	4,76E+04	17	4,19E+04
7	4,49E+04	18	3,59E+04
8	4,23E+04	19	4,60E+04
9	3,87E+04	20	4,28E+04
10	4,32E+04	21	4,38E+04
11	4,31E+04	22	3,97E+04
		Média	4,35E+04
		Desvio-padrão	4377
		Coeficiente de Variação - CV (%)	10,10

3.7 Estudo de degradação da natamicina em solvente e matriz vinho

A figura 16 apresenta o perfil de degradação da natamicina adicionada em solvente metanol e em matriz vinho, acondicionada sob luminosidade e à temperatura ambiente. Nos cromatogramas em solvente (esquerda) a degradação foi mais acentuada que em matriz (cromatogramas da direita).

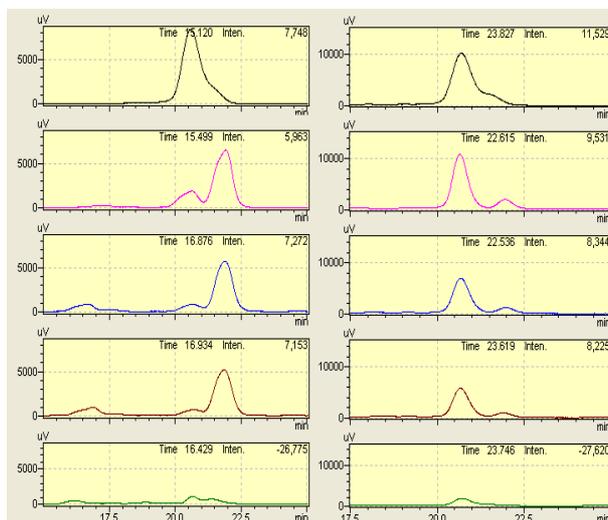


Figura 16 – Perfil de degradação da natamicina em solvente metanol (primeira coluna) e em matriz vinho (segunda coluna) quando armazenadas sob luminosidade e à temperatura ambiente; intervalo de tempo das análises: 0-7-15-30 e 60 dias.

Na condição ideal de armazenamento (protegido da luz e sob refrigeração), a degradação da natamicina na matriz vinho também foi menos acentuada do que em solvente (figura 17).

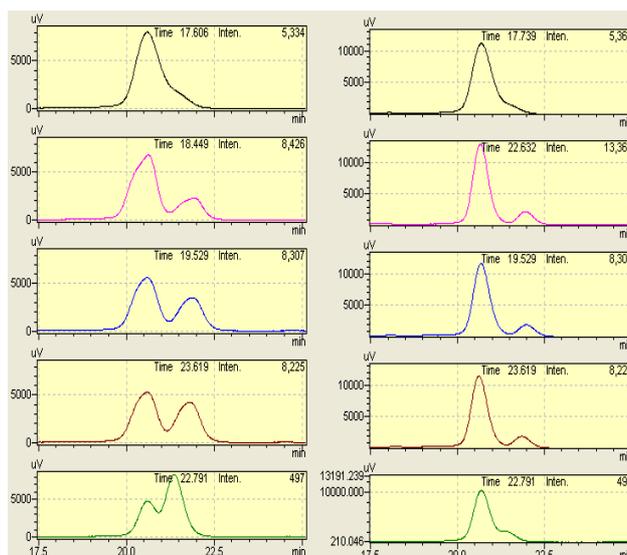


Figura 17 - Perfil de degradação da natamicina em solvente metanol (primeira coluna) e em matriz vinho (segunda coluna) quando armazenadas nas condições ideais - protegida da luz e sob refrigeração; intervalo de tempo das análises: 0-7-15-30 e 60 dias..

Na primeira condição de armazenamento, a degradação natamicina foi de 94% e 86% em solvente metanol e em matriz, respectivamente. Na segunda condição, a natamicina degradou 75% e 28%, respectivamente, quando adicionadas em solvente e na matriz vinho ao final dos 60 dias de estudo (figura 18).

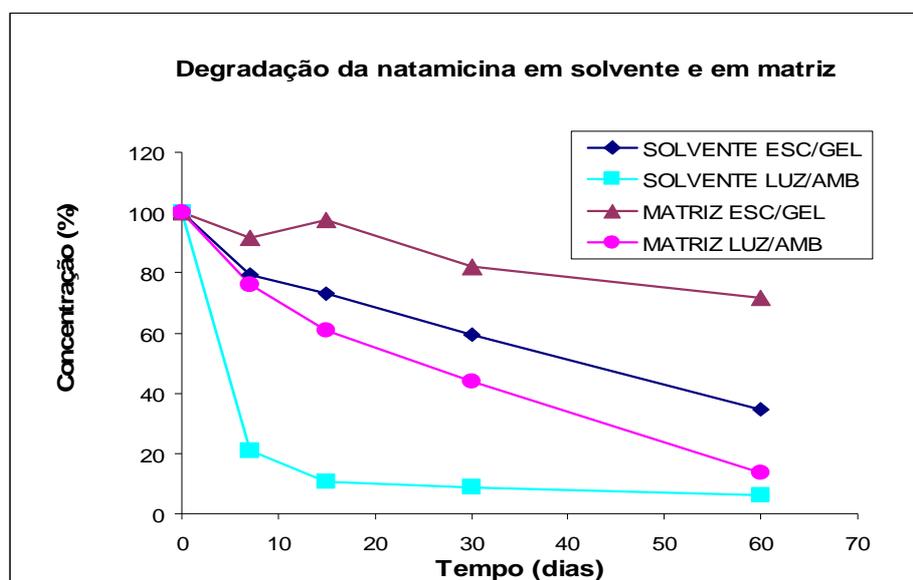


Figura 18 - Perfil de degradação da de natamicina em metanol e na matriz vinho (5 mg L^{-1}) em duas condições de armazenamento: escuro e refrigerado (ESC/GEL) e luz e temperatura ambiente (LUZ/AMB)

Em suspensão aquosa 5%, a natamicina perde completamente sua atividade biológica depois de armazenada no escuro por dois meses à temperatura ambiente (BRIK, 1981). Quando associada com ciclodextrinas e armazenada no escuro a 4°C , 96% da substância permaneceu na forma ativa em um período de 14 dias, sendo completamente degradada após 24h de exposição luminosa a 4°C (KOONTZ *et al.*, 2003).

A natamicina foi quantificada pelo método CLAE-DAD em matriz vinho tinto, vinho branco e vinho sintético (solução à 12% de etanol e $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de ácido tartárico em água). Na menor temperatura avaliada (20°C), o tempo de meia-vida da substância foi de 20 dias (ALBERTS *et al.*, 2011).

3.8 Amostras reais

Do total de amostras analisadas pelo método de CLAE-DAD não foi detectada a presença de natamicina em nenhuma das mesmas, considerando o limite de detecção de 0,04 mg L⁻¹.

Os sinais obtidos pelas amostras analisadas por CLAE-EM/EM estão apresentados na tabela 21. As concentrações de natamicina para a construção da curva foram: 12, 60, 120, 180 e 240 ppb, o R² foi igual a 0.9978. Uma amostra é provavelmente positiva (valor abaixo do limite de detecção do método CLAE-DAD).

Tabela 21 - Resposta das amostras analisadas pelo método CLAE-EM/EM

Amostras	Sinal
1	6,57E+04
2	0,00E+00
3	0,00E+00
4	0,00E+00
5	1,17E+04
6	0,00E+00
7	2,31E+04
8	0,00E+00
9	0,00E+00
10	0,00E+00

4. CONCLUSÕES

O método quantitativo CLAE-DAD foi seletivo, isento de interferência da matriz na resposta do analito, linear (R^2 igual a 0,9992), apresentou todos os valores de precisão intra e inter-dia abaixo de 15%. Os limites de detecção e quantificação do método foram, respectivamente, 0,04 e 0,13 mg L⁻¹.

Analisaram-se 138 amostras de vinhos e sucos de uva nacionais e importados comercializados no Brasil, os resultados foram integralmente inferiores ao limite de detecção do método.

Apesar do método CLAE-DAD ser seletivo, preciso e relativamente não oneroso, não é suficientemente sensível quando comparado aos métodos por CLAE acoplado a espectroscopia de massas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O antifúngico natamicina não é um constituinte natural das bebidas analisadas, vinhos e sucos de uvas. A presença de natamicina em vinhos argentinos e sul-africanos foi alertada pelo governo da Alemanha, mas ainda são escassos os trabalhos sobre o monitoramento dessa substância na matriz vinho, tão pouco em matriz suco. Os estudos da presença de natamicina em vinhos se restringem ao desenvolvimento de método analítico para sua determinação.

Portanto, o aperfeiçoamento desse método para possibilitar a análise simultânea dos conservantes citados nas matrizes analisadas, é uma grande oportunidade para tornar o processo analítico menos dispendioso.

O método por CLAE acoplado à espectroscopia de massas, validado como qualitativo-confirmatório para a presença de natamicina em vinhos e sucos de uva, pode ser complementado com o objetivo de validar também os procedimentos de análise quantitativa, visto que, evidenciou-se na prática e através dos relatos de trabalhos que utilizaram esta ferramenta analítica, ser mais sensível e, deste modo, diminuir os limite de detecção e quantificação do método.

6. Referências Bibliográficas

ALBERTS, P.; STANDER, M. A.; DE VILLIERS, A. Development of a Fast, Sensitive and Robust LC-MS/MS Method for the Analysis of Natamycin in Wine. S. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v.32, n.1, p.51-58, 2011

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

BRASIL (1988). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Aprova a revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, III, IV e VIII todas do Decreto 55871, de 26.03.1965. Disponível em: <<http://portal2.saude.gov.br/saudelegis>> Acesso em: 13 julho 2010

BRASIL (2001). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 28, de 23 de fevereiro de 2001. Aprova a extensão de uso da Natamicina (Pimaricina) (INS 235), como conservador, para tratamento de superfícies de produtos cárneos embutidos no limite máximo de 1mg/dm², ausente em 5mm de profundidade.

BRASIL (2007). ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 5, de 17 de janeiro de 2007. Aprova o regulamento técnico sobre “atribuição de aditivos e seus limites máximos para a categoria de alimentos 16.2: bebidas não alcoólicas, subcategoria 16.2.2: bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas”. Disponível em: <<http://portal2.saude.gov.br/saudelegis>> Acesso em 13 de julho de 2010

BRIK, Harry. Natamycin. **Analytical profiles of drug substances**, v.10, p.513-561, 1981.

BRIK, Harry. New High-Molecular Decomposition Products of Natamycin (Pimaricin) with Intact Lactone-Ring. **The Journal of Antibiotics**, v. XXIX, n. 6, p.632-637, 1976.

CAPITÁN-VALLVEY, L. F.; CHECA-MORENO, R.; NAVAS, N. Rapid Ultraviolet Spectrophotometric and Liquid Chromatographic Methods for the Determination of Natamycin in Lactoserum Matrix. **Journal of AOAC International**. v.83, n.4, p.802-808, 2000.

CEDER, Olof. Pimaricin – Complete Structure of the Antibiotic. **Acta Chemica Scandinavica**, v.18, n.1, p. 126-134, 1964.

DELVES-BROUGHTON, Joss; THOMAS, Linda V.; DOAN, Craig H. e DAVIDSON, P. Michael. Natamycin. In: DAVIDSON, P. Michael; SOFOS, John N. e BRANEN, A.L. (ORG). Antimicrobials in food. 3rd edition. **Food Science and Technology**; 143, Florida/US, 2005

EFSA (European Food Safety Authority). Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS); Scientific Opinion on the use of natamycin (E 235) as a food additive. **EFSA Journal** v.7 (12): 1412 [25 pp], 2009.

EMBRAPA. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos – Documento nº 48. Bento Gonçalves - RS, junho 2009. Disponível em: <<http://www.cnpv.embrapa.br/publica/documentos/doc048.pdf>>. Acesso em: 10 janeiro 2012.

EMBRAPA. Vitivinicultura Brasileira: panorama 2010. Bento Gonçalves - RS, novembro 2011. Disponível em: <<http://www.cnpv.embrapa.br/publica/comunicado/cot111.pdf>>. Acesso em: 10 janeiro 2012.

EUROPEAN ECONOMIC COMMUNITY. August/12/2002. Commission decision executes the disposed in Directiva 2002/657/CE from council related to analytical methods performance and to results interpretation. *Europ. Commun. Offic. J.*, v.657, p.L 221/8 - L 221/36, 2002.

FDA (Food and Drug Administration-US). Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Department of Health and Human Services. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. May 2001

FDA. Guidance for Industry: Frequently Asked Question About GRAS. U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), December 2004. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance>

[Documents/FoodIngredientsandPackaging/ucm061846.htm](http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance/Docs/OC/OC-UCM061846.htm)> Acesso em: 15 janeiro 2012

FLAK, W. and SCHABER, R. Die Bestimmung von Konservierungsmitteln in Weinen und anderen Getränken mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie. **Mitteilungen-Klosterneuburg,-Rebe-und-Wein,-Obstbau-und-Fruechteverwertung**; 38(24), 1988.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.51-70, 2007.

GOULD, Grahame W. Preservation: past, present and future. **British Medical Bulletin**, v.56, n.1, p.84-96, 2000.

GUARINO, C.; FUSELLI, F.; LA MANTIA, A.; LONGO, L. Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses. **Food Chemistry**, v.127, p.1294-1299, 2011

HAMILTON-MILLER, J. M. T. Chemistry and Biology of the Polyene Macrolide Antibiotics. **Bacteriological Reviews**, v.37, n.2, p.166-196. Junho, 1973.

HELANDER, I. M.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. M. Potencial of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. **Trends in Food Science and Technology**, v.8, 1997.

International Organisation of Vine and Wine (OIV). Annual statistics report on the world vitiviculture situation in 2010. 9th General Assembly of the OIV. In: 34th World Congress of Vine and Wine. Porto – Portugal, 2011

JECFA, 1968. Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some antibiotics. Twelfth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. FAO Nutrition Meetings Series, No. 45; WHO Technical Report Series, No. 430, Geneva, Switzerland, July 1-8, 1969.

JECFA, 1976. Evaluation of certain food additives. Twentieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, FAO Food and Nutrition Meetings Series, No. 1, WHO Technical Report Series, Rome, Italy, April 21-29, 1976.

JECFA, 2002. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additives Series, No. 48, p. 49-76, 2002.

JECFA, 2007. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JEFCA. WHO Food

Additives Series, No. 58, Annex 4 - *Toxicological recommendations and information on specifications*, 2007.

KOONTZ, J. L.; MARCY, J. E.; BARBEAU, W. E.; DUNCAN, S. E. Stability of Natamycin and Its Cyclodextrin Inclusion Complexes in Aqueous Solution. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, n.24, p.7111-7114, 2003.

KOONTZ, Jonh L. and MARCY, Joseph E. Formation of Natamycin:Cyclodextrin Inclusion Complexes and their Characterization. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, n.24, p.7106-7110, 2003.

LANCELIN, Jean-Marc; BEAU, Jean-Marie. Stereostructure of Pimaricin. **Journal of the American Chemical Society**, v.112, p. 4060-4061, 1990.

LIN, S. C. and GEORGIU, G. A biocatalyst for the removal of sulfite from alcoholic beverages. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n.1, p.123–127, 2005.

MEDINA, A.; JIMÉNEZ, M.; MATEO, R.; MAGAN, N. Efficacy of natamycin for control of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains under different environmental conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.2234-2239, 2007.

MYERS, R. S. Antifungal Agents. In *Immunizing and Antimicrobial Agents*, 2006. Disponível em: <http://courses.washington.edu/medch401/pdf_text/401_06_VI_Antifungal.pdf>. Acesso em 15 janeiro 2012.

OIV (International Organisation of Vine and Wine). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. Edition 2012, junho 2011.

PEDERSEN, Jens Christian. Natamycin as a Fungicide in Agar Media. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.3, p.1064-1066, 1992

RASGELE, P. e KAYMAK, F. Chromosome aberrations, micronucleus and sperm head abnormalities in mice treated with Delvocid, a food preservative. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.789–797, 2010.

RAY, L. L. and BULLERMAN, L. B. Preventing growth of potentially toxic moulds using antifungal agents. **Journal Food Protection**, 45:953, 1982

RENCÜZOĞULLARI, E.; AZIRAK, S.; CANIMOGLU, S.; PARLAK, S.; BUYUKLEYLA, M. Effects of natamycin on sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronucleus in human lymphocytes. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 1, p.47-52. January, 2009.

REPIZO, Leonardo Mariño; MARTINEZ, Luis Dante; OLSINA, Roberto A.; CERUTTI, Soledad; RABA, Julio. A novel and rapid method for determination of natamycin in wines based on ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry: validation according to the 2002/657/EC European decision. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 402(2), p. 965-73, Jan, 2012.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. *Handbook of Enology: The chemistry of wine stabilization and treatments*, 2nd ed. Wiley, New York: 2006.

ROGATSKY, Eduard and STEIN, Daniel. Evaluation of Matrix Effect and Chromatography Efficiency: New Parameters for Validation of Method Development. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v.16, p.1757–1759, 2005.

SPIZZO, Bernardete Ferraz; FERREIRA, Rosana Gomes; PEREIRA, Mararlene Ulberg; MONTEIRO, Mychelle Alves; CRUZ, Tatiana Ávila; COSTA, Rafaela Pinto da; LIMA, Adélia Mara Belém; NÓBREGA, Armi Wanderley da. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. **Analytica Chimica Acta**, v.682, p.82-92, 2010.

THOMAS, L.V. and DELVES-BROUGHTON, J. Applications of the natural food preservative natamycin. *Res. Adv. Food Sci.* 2:1, 2001.

TORRES, Elizabeth A. F. S. A Questão do Uso de Natamicina em Alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v.11, n.51, p.6, 1997.

VAN LEEUWEN, M. R.; GOLOVINA, E. A.; DIJKSTERHUIS, J. The polyene antimycotics nystatin and filipin disrupt the plasma membrane, whereas natamycin inhibits endocytosis in germinating conidia of *Penicillium discolor*. **Journal of Applied Microbiology**, 106 (2009) 1908–1918

WHO. GEMS/Food Consumption Cluster Diets. Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases, Geneva, World Health Organization, 2006.

WHO. GSFA/Codex Provisions for Natamycin (Pimaricin), 2009. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/details.html?id=208>> Acesso em: 15 janeiro 2012.

ZUR, K.; GUTSCHE, B.; HEINZ, M. & KAISER, W. Natamycin in Wein – Problematik – Analytik – Kontrolle. **Lebensmittelanalytik DLR Spezial**. p. 38-42, märz, 2010.

ANEXOS

Conc (ppm)	Área (yij)	yi	(yij-yi)^2
0,1	7871		1.560
0,1	7925		8.742
0,1	7623		43.472
0,1	7907	7832	5.700
0,2	17789		164.025
0,2	17789		164.025
0,2	17585		40.401
0,2	16373	17384	1.022.121
0,5	47253		360.600
0,5	48174		2.314.962
0,5	45787		749.090
0,5	45396	46653	1.578.792
1,0	95178		1.312.743
1,0	97749		2.031.338
1,0	95558		586.373
1,0	96810	96324	236.439
2,0	192898		82.469.102
2,0	208154		38.127.538
2,0	211564		91.867.433
2,0	195301	201979	44.599.023
3,0	296663		440.896
3,0	295300		488.601
3,0	299918		15.358.561
3,0	292115	295999	15.085.456
4,0	390204		23.775.376
4,0	390482		21.141.604
4,0	397434		5.541.316
4,0	402200	395080	50.694.400
5,0	484900		37.255.764
5,0	487150		14.851.389
5,0	502105		123.237.752
5,0	489860	491004	1.308.164

y(ij)=

Q exp=

n=	
p=	

Fc

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999607692
R-Quadrado	0,999215538
R-quadrado ajustado	0,999189389
Erro padrão	4972,126891
Observações	32

DL (mg.L⁻¹)= **0,04**QL (mg.L⁻¹)= **0,13**

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>= de significação</i>
Regressão	1	9,447E+11	9,44698E+11	38212,78	3,78877E-48
Resíduo	30	741661375	24722045,82		
Total	31	9,4544E+11			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	-1501,32	1331,58	-1,13	0,2685	-4220,76	1218,13
Conc (mg.L ⁻¹)	99004,07	506,46	195,48	3,79E-48	97969,73	100038,41

RESULTADOS DE RESIDUOS

<i>Observação</i>	<i>Previsto(a)</i>	<i>Área</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
1	8399,089282		-528,089282	-0,107965592
2	8399,089282		-474,089282	-0,096925523
3	8399,089282		-776,089282	-0,158668129
4	8399,089282		-492,089282	-0,100605546
5	18299,49619		-510,496187	-0,104368759
6	18299,49619		-510,496187	-0,104368759
7	18299,49619		-714,496187	-0,146075685
8	18299,49619		-1926,49619	-0,393863894
9	48000,7169		-747,716902	-0,152867518
10	48000,7169		173,283098	0,035426987
11	48000,7169		-2213,7169	-0,452584938
12	48000,7169		-2604,7169	-0,532523214
13	97502,75143		-2324,75143	-0,475285471
14	97502,75143		246,248573	0,050344466
15	97502,75143		-1944,75143	-0,397596099
16	97502,75143		-692,751427	-0,141630062
17	196506,8205		-3608,82048	-0,737807888
18	196506,8205		11647,1795	2,381215964
19	196506,8205		15057,1795	3,078375858
20	196506,8205		-1205,82048	-0,246524831
21	295510,8895		1152,11047	0,235544052
22	295510,8895		-210,889526	-0,04311546
23	295510,8895		4407,11047	0,901014859
24	295510,8895		-3395,88953	-0,694275068
25	394514,9586		-4310,95858	-0,881357015
26	394514,9586		-4032,95858	-0,824521106
27	394514,9586		2919,04142	0,596785516
28	394514,9586		7685,04142	1,571173801
29	493519,0276		-8619,02763	-1,762123279
30	493519,0276		-6369,02763	-1,302120417
31	493519,0276		8585,97237	1,755365275
32	493519,0276		-3659,02763	-0,748072525

Q res= 741661374,7