

Contaminação fúngica das uvas e ocratoxina A em vinhos

Mendonça C., Abrunhosa L., Serra R. e Venâncio A.

Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar
4710-057 Braga, Portugal

e-mail: avenan@deb.uminho.pt

Introdução

Os fungos constituem um grande grupo de seres vivos ubíquos na Natureza. Estes microrganismos são em geral capazes de produzir uma grande variedade de metabolitos secundários, metabolitos estes que são considerados produtos naturais e, alguns, mesmo vitais para o fungo produtor (*e.g.*, como seja a produção de melaninas que protegem contra a irradiação solar ou outros agentes agressores). Apesar dos fungos filamentosos serem produtores de metabolitos secundários, apenas um número restrito de espécies produz metabolitos com propriedades tóxicas, a que se dá vulgarmente o nome de micotoxinas.

O papel das micotoxinas nos agroecossistemas ainda não é bem conhecido, apesar de existirem várias teorias sobre as suas funções. Sabe-se que em ambientes onde várias espécies competem entre si pelo substrato, as micotoxinas podem ser determinantes para estabelecer a micoflora, e apresentar uma vantagem competitiva para o fungo que as produz. Por outro lado, algumas micotoxinas têm actividade insecticida, e pensa-se que são um modo de defesa dos fungos contra a predação por insectos (Bhatnagar *et al.*, 1992).

A ocratoxina A (OTA) é uma das micotoxinas produzida em alimentos por fungos filamentosos (figura 1), trata-se de uma 7-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocumarina (ocratoxina α), ligada pelo seu grupo 7-carboxil à L- β -fenilalanina através de uma ligação peptídica (van der Merwe *et al.*, 1965). Em condições ecológicas e nutritivas adequadas, esta micotoxina pode ser sintetizada e acumulada em produtos alimentares, como cereais, frutos secos, café, cacau, uvas, e, conseqüentemente, surgir em alimentos processados, como cereais de pequeno almoço, vinho, cerveja ou sumos de fruta. Esta micotoxina tem

sido detectada no plasma sanguíneo humano, em vários países, confirmando a exposição das populações a este contaminante (Miraglia & Brera, 2002).

A doença mais conhecida associada à OTA é a nefropatia dos suínos. Esta tem sido regularmente descrita desde que foi descoberta por volta de 1950, sendo mesmo considerada endêmica em diversos países da Europa do norte e central. Da mesma forma, é sugerido o seu envolvimento em nefropatias humanas, como a nefropatia endêmica dos Balcãs, que se caracteriza por uma atrofia atípica dos rins com múltiplos sintomas associados, e também com a nefritis crônica intersticial no norte de África. A sua nefrotoxicidade advém alegadamente do facto de a OTA induzir a peroxidação de lípidos. Em 1993, a Agência Internacional para a Pesquisa do Cancro (IARC) classificou a OTA como um possível carcinogénico humano, baseando-se em evidências suficientes provenientes de ensaios em animais e por falta de evidência em humanos. A OTA possui ainda efeitos citotóxicos, imunotóxicos, genotóxicos, neurotóxicos e hematóxicos (Wijnands & van Leusden, 2000). As propriedades imunotóxicas da OTA têm recebido recentemente uma atenção crescente por parte dos investigadores. Verificou-se que, mesmo concentrações baixas de OTA, na ordem de nanograma por mililitro, têm efeitos tóxicos para o sistema imunológico. Visto que o sistema imunológico está envolvido na defesa do organismo contra a invasão microbiana e propagação de células tumurosas, esta toxicidade não pode ser negligenciada (Petzinger & Weidenbach, 2002).

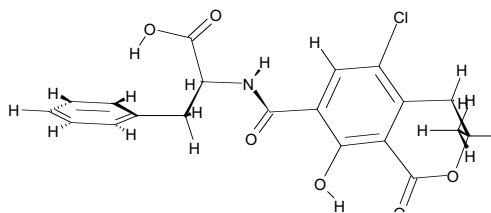


Figura 1. Estrutura molecular da ocratoxina A

A presença de micotoxinas em alimentos pode e deve ser minimizada. Idealmente, a solução passa pela prevenção da síntese no produto agrícola mas, ocorrendo esta, pode o processamento ser alterado de forma a remover ou inactivar a micotoxina do alimento, antes de este entrar na cadeia alimentar.

A descontaminação de produtos alimentares que contêm micotoxinas pode ser efectuada recorrendo a processos físicos, químicos ou biológicos, tendo sido implementada com bastante sucesso nalguns casos. Em vinhos, alguns investigadores procuraram testar diversos adsorventes (conhecidos no mundo enológico por colas) com o objectivo de remover a OTA (Dumeau & Trioné, 2000; Castellari *et al.*, 2001; Blateyron *et al.*, 2001; Rousseau & Blateyron, 2002). No entanto, o sucesso de tais tentativas é moderado, não tendo sido possível remover quantidades apreciáveis de micotoxina sem alterar do ponto de vista sensorial a qualidade do vinho.

A ocorrência de ocratoxina A em vinho

A descoberta de OTA em vinhos foi inicialmente publicada em 1995 pelos investigadores suíços Zimmerli & Dick (1995). Desde então, diversos estudos têm sido efectuados com o objectivo de determinar os níveis de OTA nos vinhos provenientes de várias regiões da Europa, assim como de outros continentes (cf. tabela 1).

Dando continuidade aos seus trabalhos, Zimmerli & Dick (1996) analisaram várias amostras de vinhos e sumo de uva provenientes do mercado suíço. A concentração de OTA encontrada nas 118 amostras de vinho de mesa analisadas encontrava-se na gama $< 0,003$ a $0,388 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$. Entre as amostras de vinhos, foram analisados seis vinhos do Porto, tendo sido detectados valores de $< 0,003$ a $0,017 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$. Este estudo foi fundamental pelo facto de mostrar, pela primeira vez, que a probabilidade de se encontrar a OTA em vinhos tintos é maior que nos vinhos brancos ou rosé. Este estudo refere, ainda, que os vinhos provenientes de regiões do sul da Europa e do norte de África apresentam igualmente um maior risco de contaminação. Estes investigadores apresentam duas hipóteses para explicar a maior incidência da micotoxina nestes vinhos. Por um lado, a influência das diferentes práticas usadas na viticultura (*e.g.*, uso de tratamentos fitossanitários) e na vinificação (armazenamento das uvas, tipo de maceração, tempo e temperatura de fermentação); e, por outro lado, o facto de as condições climáticas do sul favorecerem o crescimento de espécies de *Aspergillus* produtoras da OTA.

A influência do tipo de vinho e da origem geográfica na ocorrência de OTA foi o alvo do estudo realizado por Otteneder & Majerus (2000). Este

Tabela 1. Teores de OTA encontrados em vinhos de origem diversa, número de vinhos analisados, média e gama de valores de OTA encontrados (*continua*)

Origem	N.º de amostras	Média µg/l	Gama µg/l	Referência
Suíça (vinhos comerciali- zados na Suíça)	24 branco	0,011	< 0,003 – 0,178	Zimmerli & Dick (1996)
	15 rosé	0,025	< 0,003 – 0,123	
	79 tinto	0,039	< 0,003 – 0,388	
	15 doce	– ^a	< 0,003 – 0,451	
Várias regiões do mundo	41 branco	0,07 ^b	< 0,01 – 1,20	Majerus & Otteneder (1996)
	14 rosé	0,100 ^b	< 0,01 – 2,40	
	89 tinto	0,190 ^b	< 0,01 – 3,31	
França	4 branco	– ^a	< 0,01 – 0,02	Ospital <i>et al.</i> (1998)
	2 rosé	– ^a	< 0,01 – 0,11	
	21 tinto	– ^a	< 0,01 – 0,27	
Itália (vinhos comerciais e não comerciais)	7 branco ^d	0,045	< 0,01 – 0,06	Visconti <i>et al.</i> (1999)
	2 branco ^c	0,535	0,10 – 0,97	
	6 rosé ^d	0,804	< 0,01 – 1,15	
	2 rosé ^c	0,525	0,41 – 0,64	
	27 tinto ^d	1,269	< 0,01 – 7,63	
11 tinto ^c	1,185	0,46 – 4,72		
Espanha e outros países europeus	69 branco	0,020	< 0,003 – 0,267	Burdaspal & Legarda (1999)
	32 rosé	0,031	< 0,003 – 0,161	
	91 tinto	0,054	< 0,003 – 0,603	
Várias regiões do mundo	60 branco	0,108	< 0,01 – 1,36	Otteneder & Majerus (2000)
	55 rosé	0,119	< 0,01 – 2,38	
	305 tinto	0,201	< 0,01 – 3,31	

a – dado não disponível

b – valores correspondentes à mediana

c – vinhos não comerciais

d – vinhos comerciais

Tabela 1. Valores de OTA encontrados em vinhos de origem diversa, número de vinhos analisados, média e gama de valores de OTA encontrados (*continuação*)

Origem	N.º de amostras	Média µg/l	Gama µg/l	Referência
Portugal	30 Vinhos Verdes	–	< 0,02	Festas <i>et al.</i> (2000)
	31 Vinhos do Porto	–	< 0,02	
Itália	96 tinto	0,419	< 0,001 – 3,177	Pietri <i>et al.</i> (2001)
	15 doce	0,736	< 0,001 – 3,856	
Países próximos do mar Mediterrâneo	31 tinto	– ^a	< 0,002 – 3,400	Markaki <i>et al.</i> (2001)
Várias regiões do mundo	348 branco	– ^a	< 0,05	Soleas <i>et al.</i> (2001)
	14 branco	– ^a	0,051 – 0,100	
	484 tinto	– ^a	< 0,05	
	94 tinto	– ^a	0,051 – 0,100	
	2 tinto	– ^a	> 0,100	
Marrocos	7 branco, 3 rosé	0,117 ^b	0,028 – 0,540	Filali <i>et al.</i> (2001)
	20 tinto	0,912 ^b	0,04 – 3,240	
Espanha (Colheita 1997)	14 tinto	0,160	0,056 – 0,316	Lopez de Cerain <i>et al.</i> (2002)
	6 branco	0,185	0,154 – 0,208	
Espanha (Colheita 1998)	14 tinto	0,133	0,074 – 0,193	
	6 branco	0,192	0,192	
Grécia	104 tinto	0,34	<0,05 – 2,69	Stefanaki <i>et al.</i> (2003)
	118 branco	0,25	<0,05 – 1,72	
	20 rosé	0,17	<0,05 – 1,16	
	14 tinto	0,44	<0,02 – 2,51	Soufleros <i>et al.</i> (2003)
	13 branco	0,27	<0,02 – 0,87	
	1 rosé	–	<0,02	
	7 doce	0,81	<0,02 – 3,20	
África do Sul	15 branco	0,16	0,04 – 0,33	Shephard <i>et al.</i> (2003)
	9 tinto	0,24	0,07 – 0,39	

^a dado não disponível^b valor correspondente à mediana

estudo consistiu na análise de 400 amostras de vinho tinto, branco e rosé de diferentes origens (país e regiões com climas distintos) e na observação de cerca de 450 dados disponíveis na literatura. Com base neste conjunto de valores de OTA em vinhos, estes investigadores foram de encontro às conclusões anteriormente referidas por Zimmerli & Dick (1996): a OTA é detectada com maior frequência em vinhos tintos (54 % de amostras com quantidades detectáveis de OTA), seguido de vinhos rosé (40 %), sendo os vinhos brancos aqueles que apresentam o menor número de amostras positivas (25 %); e a OTA é encontrada com maior frequência em vinhos originários do sul da Europa (95 %), que em vinhos do norte da Europa (12 %).

A análise dos resultados publicados na literatura da especialidade permite ainda concluir que há áreas vitivinícolas onde o risco de contaminação é particularmente elevado. Nomeadamente, Soufleros e colaboradores (2003), ao analisar vinhos oriundos de algumas ilhas gregas (não identificadas), encontraram 10 amostras positivas em 11 analisadas, com a particularidade de 3 das amostras apresentarem valores superiores a $2 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$. Outros investigadores gregos (Stefanaki *et al.*, 2003), analisaram 20 vinhos oriundos de uma ilha, tendo detectado OTA nas 10 amostras de vinho tinto analisadas, valor médio de $1,73 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$, e em 8 de 10 amostras de vinho branco analisadas, valor médio de $0,52 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$. Estes dois grupos de investigadores gregos atribuem a maior incidência de contaminação nos vinhos originários destas ilhas às condições climáticas sentidas nas mesmas.

Fora da Europa também é possível encontrar OTA em vinhos. Nomeadamente em países do Norte de África (Filali *et al.*, 2001; Markaki *et al.*, 2001) foram detectados teores de OTA semelhantes aos que são referidos para países do sul da Europa, o que permite definir a bacia mediterrânea como área de risco.

Causas da contaminação dos vinhos com ocratoxina A

Espécies responsáveis pela produção de OTA nas uvas

Os fungos filamentosos estão presentes na vinha, e mediante certas condições, podem causar podridão nas uvas. O fungo causador de podridão mais conhecido é o *Botrytis cinerea*, responsável pela podridão cinzenta, mas sabe-se que outras espécies de fungos filamentosos podem,

isolados ou em conjunto, causar podridão nas uvas, como é o caso de espécies de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* (podridão verde), *Rhizopus*, e *Aspergillus*, em particular *Aspergillus* negros (podridão negra). Salvo o caso da podridão nobre, que seca o bago enriquecendo-o em açúcares e aromas, a podridão não é benéfica: leva a estragos e prejuízos, e à alteração das uvas, com conseqüente perda de qualidade, por produção de aromas desagradáveis e de enzimas que dificultam ou impedem o processo de vinificação. A podridão caracteriza-se, pois, por alterações visíveis nos bagos e por afectar as características organolépticas das uvas. Mas, adicionalmente a estas manifestações visíveis dos fungos, certas espécies podem produzir micotoxinas. No entanto, um dado produto pode estar contaminado com micotoxinas, sem apresentar sinais visíveis de contaminação fúngica. O fungo pode invadir os tecidos vegetais sem formar estruturas reprodutoras, ou micélio visível a olho nú. Nestas condições, as características organolépticas das uvas podem não ser afectadas de modo perceptível. Existem apenas dois géneros de fungos filamentosos que compreendem espécies produtoras de OTA (ocratoxigénicas), que são *Penicillium* e *Aspergillus*. As espécies ocratoxigénicas de *Penicillium*, *P. verrucosum* e *P. nordicum*, são responsáveis pela presença desta micotoxina em cereais, queijos e carnes de países de climas frios, como os países nórdicos. Os *Aspergillus* compreendem várias espécies ocratoxigénicas, pertencentes a 3 secções diferentes: secção *Flavi* (*A. alliaceus*), secção *Circumdati* (*A. ochraceus*) e secção *Nigri* (*A. niger* e *A. carbonarius*).

Os fungos produtores de OTA possuem requisitos ecofisiológicos distintos para crescer e produzir a micotoxina. Por isso, a contaminação dos alimentos com OTA é devida a espécies diferentes, consoante o tipo de alimento. Para se conhecerem as espécies presentes nas uvas capazes de produzirem OTA, elaboraram-se rastreios em vinhas em diversos países, incluindo Portugal (Serra *et al.*, 2002, 2003).

Dos rastreios feitos por vários investigadores em diversos países, verificou-se que as espécies responsáveis pela produção de OTA nas uvas são *Aspergillus* negros. Os *Aspergillus* caracterizam-se por possuir estruturas de reprodução assexual, os aspergilli, em forma de aspersor, como o aspergidor de água benta, donde advém o nome do género (figuras 2 e 3). Os aspergilli são compostos pelo conidióforo e por uma vesícula terminal, onde se encontram as células produtoras dos esporos, as fiálides (figura 3). Os esporos são designados por conídios. Os conídios nos *Aspergillus* negros, como o nome indica, são muito pigmen-

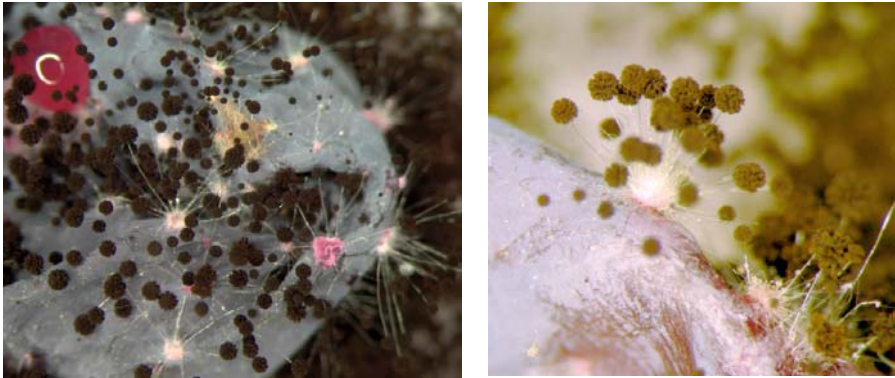


Figura 2. Detalhe de *Aspergillus negros* a crescer na superfície da uva. Observam-se as estruturas reprodutoras escuras

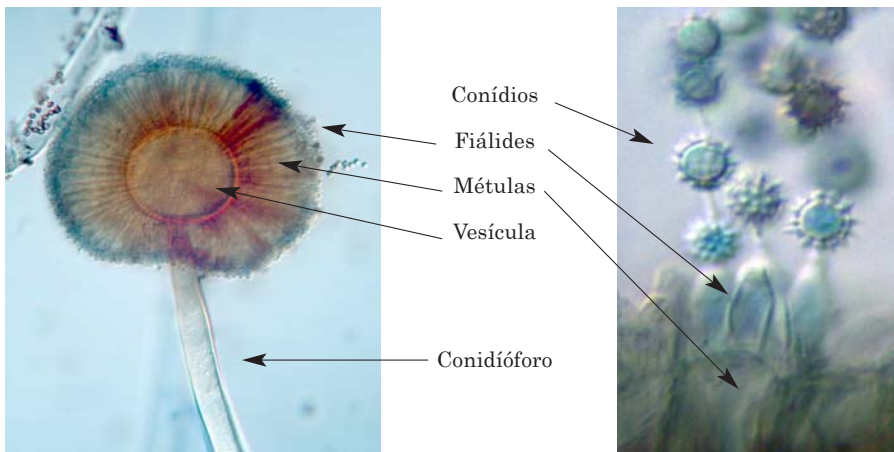


Figura 3. Imagens de microscopia óptica de aspergilli. Em A, observa-se o conidióforo, com a vesícula terminal, na qual se situam as fiálides, onde se dá a produção de esporos. Em B, detalhe das fiálides e dos esporos a serem produzidos. Quando os esporos são jovens, são hialinos, tornando-se depois fortemente pigmentados. A ornamentação dos conídios é variável. (Imagens obtidas com microscópio de Nomarski, com ampliação de $400\times$ em A e $1000\times$ em B)

tados, de cor negra, devido à acumulação de melanina, o que lhes confere uma grande resistência à radiação solar.

Dentro desta secção, existem várias espécies. Apenas duas produzem OTA: agregado *A. niger* e *A. carbonarius*. Morfologicamente, são bastante semelhantes, distinguem-se essencialmente pelo tamanho dos esporos, de 3,5 a 5 µm de diâmetro em *A. niger* e de 6 a 11 µm de diâmetro em *A. carbonarius*. A capacidade destas duas espécies produzirem OTA não é a mesma. As primeiras estirpes que se descobriram capazes de produzir a micotoxina pertenciam ao agregado *A. niger* (Abarca *et al.*, 1994). No entanto, verificou-se mais tarde que a produção de OTA por esta espécie só ocorre em cerca de 4 % das estirpes. Pelo contrário, a maioria das estirpes de *A. carbonarius* produz OTA. Nas uvas, grande parte das estirpes produtoras de OTA detectadas pertencem a *A. carbonarius*, por isso, esta espécie tem sido apontada como a principal responsável pela contaminação das uvas (Cabañes *et al.*, 2002; Sage *et al.*, 2002; Battilani *et al.*, 2003). A identificação até à espécie no agregado *A. niger* só é possível recorrendo a ferramentas moleculares. Duas espécies, *A. niger* e *A. tubingensis*, indistinguíveis morfologicamente, fazem parte deste agregado e constituem o tipo N (*A. niger*) e o tipo T (*A. tubingensis*) (Accensi *et al.*, 1999). Até agora, só foram encontradas espécies produtoras de OTA tipo N (*A. niger*).

Em Portugal, para se averiguar quais as espécies produtoras de OTA presentes nas uvas, fizeram-se rastreios em 11 vinhas, em 4 regiões demarcadas: Vinhos Verdes, Douro, Ribatejo e Alentejo (tabela 2). Para se avaliar em que estado da maturação as uvas são contaminadas com estes fungos, o rastreio foi feito no bago ervilha, pintor e bago maduro (momento da vindima).

Verifica-se que à medida que o processo de maturação avança, a incidência de fungos ocratoxigénicos nas uvas aumenta. No bago verde, não foi detectada a presença de fungos ocratoxigénicos e, no pintor, foram detectadas estirpes de *A. carbonarius* em 2 % dos bagos num local (vinha 7). Grande parte das estirpes produtoras de OTA foi detectada na vindima. Neste rastreio, a vinha com maior incidência de fungos produtores de OTA (38 % dos bagos colonizados) está localizada no Alentejo (vinha 10). Das estirpes produtoras de OTA isoladas nas vinhas portuguesas, 73 % pertencem à espécie *A. carbonarius*. No entanto, existe uma vinha no Douro com elevada incidência (20 %) de estirpes *A. niger* ocratoxigénicas (vinha 5). Quanto à distribuição dos fungos pelas regiões, verifica-se que nas vinhas da região dos vinhos verdes quase

Tabela 2. Fungos produtores de OTA detectados em uvas portuguesas, entre Junho e Setembro de 2001

Região	Vinha	% de uvas com fungos produtores de OTA		
		bago ervilha	pintor	uvas maduras (vindima)
Vinhos verdes	1	nd	nd	nd
	2	nd	nd	2 % <i>A. carbonarius</i>
	3	nd	nd	nd
Douro	4	nd	nd	8 % <i>A. carbonarius</i>
	5	nd	nd	20 % <i>A. niger</i>
	6	nd	nd	2 % <i>A. niger</i>
Ribatejo	7	nd	2 % <i>A. carbonarius</i>	12 % <i>A. carbonarius</i>
	8	nd	nd	2 % <i>A. carbonarius</i>
	9	nd	nd	nd
Alentejo	10	nd	nd	38 % <i>A. carbonarius</i> 2 % <i>A. niger</i>
	11	nd	nd	2 % <i>A. carbonarius</i>

nd – não detectado

não foram detectados *Aspergillus* negros. A região com mais incidência de fungos ocratoxigénicos nas uvas foi o Alentejo, seguida do Douro e do Ribatejo.

Biologia e ecologia das espécies produtoras de OTA na vinha

As informações respeitantes à fisiologia do grupo são difíceis de atribuir a uma só espécie, pois é provável que no passado várias espécies tenham sido referidas como a mais comum, *A. niger*. Em geral, como já foi referido, estes fungos resistem à exposição solar e radiação ultravioleta, devido à protecção dos seus esporos com melanina, e conseguem crescer a baixas actividades de água ($a_w = 0,77$ a 35 °C) e a temperaturas até aos 47 °C. Têm uma distribuição ubíqua, estão presentes no solo e ar, e estão entre os fungos mais frequentemente reportados em alimentos, em particular alimentos secos ao sol, como uvas passas (Pitt & Hocking, 1997).

São fungos essencialmente saprófitas. Os esporos são secos, e dispersam-se pelo ar. *A. carbonarius* tem a capacidade de produzir esclerócios, que são estruturas de resistência em que se detecta OTA (Wicklow *et al.*, 1996). Os esporos destas espécies podem manter-se viáveis no solo durante anos. Por isso, conseguem manter-se na vinha ano após ano, podendo, quando existem condições adequadas, infectar os bagos e produzir a OTA. A incidência destas espécies nas vinhas está relacionada com o clima, tendo-se observado frequências elevadas destes fungos em vinhas de climas mediterrânicos, quentes e secos no Verão, onde a sua morfologia e fisiologia lhes confere uma vantagem adaptativa (Serra *et al.*, 2003). Estes fungos são saprófitas adaptados ao ambiente das vinhas mediterrânicas, de elevada exposição solar e baixos teores de humidade.

Ainda estão a decorrer estudos sobre as condições climáticas que influenciam a produção de OTA nas uvas. Tem sido referido que a temperatura, chuva e humidade relativa são factores chave que influenciam a produção de OTA nas uvas (Battilani *et al.*, 2002). Certos autores referiram que foram registados níveis de OTA superiores no vinho em anos chuvosos (Lopez de Cerain *et al.*, 2002). Quando, após o pintor ocorrem chuva, temperatura e humidades elevadas, aumenta o risco de infecção por fungos. Este risco é maior em castas com cachos muito fechados ou mais danificados, com mais fissuras na película dos bagos, devidas por exemplo ao granizo, traça, oídio, pássaros ou excessiva secura (Aguilar *et al.*, 2001).

Do que se sabe até à data, recomenda-se que a prevenção e o controlo da OTA na vinha se faça através da minimização dos danos nas uvas, controlando os factores acima citados.

Influência da origem e do tipo de vinho

Como já foi mencionado, tem-se vindo a verificar que os diferentes tipos de vinho apresentam níveis de contaminação diferentes, estando os vinhos brancos menos contaminados que os rosés, e estes por sua vez menos contaminados que os tintos. Observa-se também que os vinhos doces estão mais contaminados que os restantes. A origem geográfica do vinho também parece ter influência, com os vinhos oriundos do sul da Europa e norte de África mais contaminados que os oriundos de zonas a norte.

Regra geral, admite-se que a contaminação dos vinhos com OTA é feita antes da fermentação, pois considera-se que as condições anaeróbias que se geram nesta fase não favorecem o crescimento de fungos filamentosos. Cada vez mais, a produção da OTA é vista como um fenómeno ligado à vinha e às uvas. É nesta lógica de pensamento que se considera que a distribuição geográfica da OTA nos vinhos é devida à incidência mais elevada de *A. carbonarius* nas vinhas de climas mediterrânicos que em climas temperados. No entanto, a relação entre a OTA e os tipos de vinho branco, rosé e tinto, parece prender-se com os processos de vinificação. Na vinificação dos vinhos brancos, as uvas são esmagadas e o mosto assim obtido é fermentado sem presença das películas. Pelo contrário, na fermentação dos vinhos tintos, o mosto e as películas fermentam em conjunto, para permitir a extracção de compostos corados e aromas. Tem sido apontado que este processo maximiza a passagem da eventual micotoxina presente nas películas para o mosto, contribuindo para os níveis de OTA mais elevados observados nos vinhos tintos. O caso da contaminação mais elevada dos vinhos doces prende-se com outras razões. Os vinhos doces naturais, desenvolvidos na baía do mediterrâneo, desde a época clássica, dependem da concentração de açúcares nas uvas antes da fermentação. Nesta categoria, estão muitos vinhos italianos (*e.g.*, *vin santo* e *recioto della Valpolicella*). Para concentrar os açúcares, as uvas são deixadas a secar na vinha ou em esteiras após a colheita. Este passo facilita a invasão por *Aspergillus* negros, pois no processo de secagem, as películas sofrem pequenos danos e fissuras, ficando mais vulneráveis à infecção. O conhecimento que se possui de uvas passas e sultanas elucida bem este problema: em uvas passas, foram registados níveis de contaminação com OTA da ordem dos 50 µg/kg (MacDonald *et al.*, 1999; Stefanaki *et al.*, 2003), e *A. carbonarius* foi o fungo apontado como responsável (Abarca *et al.*, 2003).

O vinho do Porto é um vinho doce fortificado, com um processo de fabrico distinto destes vinhos. As uvas são colhidas e fermentadas. Antes da fermentação estar completa, é adicionada aguardente vínica. O açúcar residual não fermentado é o que confere doçura ao vinho, não estando envolvido qualquer processo de concentração prévio de açúcares; além do mais, as películas estão pouco tempo em contacto com o mosto. Até à data, não se registaram elevados níveis de contaminação neste tipo de vinho.

Avaliação da exposição à ocratoxina A na União Europeia

Em Janeiro de 2002, a União Europeia publicou um relatório onde incluiu todos os dados disponíveis naquele momento sobre a ocorrência de OTA em vinhos comercializados no espaço europeu (Miraglia & Brera, 2002).

Os dados constantes neste relatório englobam 10 países da UE (Tabela 3). Apesar de os limites de detecção diferirem bastante de laboratório para laboratório (entre 0,003 a $1 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$), de um total de 1470 vinhos analisados detectou-se OTA em 59 % destas amostras. Estes valores variaram entre $0,003 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$ (em Espanha) e $15,60 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$ (em Itália). A média dos valores referidos para cada país varia entre $0,01 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$ (em Portugal) e $1,29 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$ (em Itália).

De entre os vários tipos de vinho branco, rosé, tinto e doce é possível afirmar que são os vinhos doces aqueles onde a quantidade de OTA e a percentagem de amostras positivas é habitualmente maior, variando as médias nestes vinhos entre $0,01 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$ (em Portugal) e $1,09 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$ (em Espanha). Apenas num país (Itália) o valor médio de OTA em vinhos doces é ultrapassado pelo valor em vinhos tintos.

Em termos globais, nas 1470 amostras de vinho analisadas, foram encontradas 872 amostras positivas (420 no norte da Europa e 452 a sul) com um teor médio de OTA de $0,357 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$ ($0,181 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$ no norte da Europa e $0,636 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$ a sul).

Outro dado relevante extraído da literatura é o número de amostras de vinho tinto comercializado em Itália com teores de OTA superiores a $3 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$. Segundo Miraglia & Brera (2002), em 244 amostras de vinho tinto analisadas verificou-se que 9 amostras continham valores entre 3 a $4,9 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$, 12 apresentavam valores de 5 a $9,9 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$ e 7 valores entre 10 a $15,6 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$.

Com base nestes dados, determinou-se a exposição média diária à OTA da população europeia, tendo-se concluído que o vinho contribui globalmente em 10 % para a exposição à OTA. Este valor é apenas superado pelo contributo de cereais (44 %) e é seguido pelo contributo de café (9 %) e de cerveja (7 %). Ao analisar individualmente cada país, o relatório refere que em Itália e na Holanda o vinho surge como o principal responsável pela exposição a esta micotoxina, contribuindo para esta exposição em 76 % e 44 %, respectivamente.

Tabela 3. Dados relativos à presença de ocratoxina A em vinhos consumidos na Europa: país onde a análise foi realizada, número e características das amostras, número de amostras positivas, média e máximo dos valores obtidos (adaptado de Miraglia & Brera, 2002)

País	Amostras				Média ($\mu\text{g/l}$)	Máximo ($\mu\text{g/l}$)
	Ano	Tipo	total	Positivas		
Alemanha	1995/98	B	56	12	0,10	1,36
	1995/98	D	1	1		1,04
	1995/98	R	51	18	0,14	2,38
	1995/98	T	172	79	0,23	7,00
Espanha	1997	A	27	23	0,06	0,25
	1997	B	44	36	0,03	0,27
	1997	D	16	15	1,09	2,54
	1997	E	12	10	0,01	0,24
	1997	T	72	66	0,04	0,60
	1997	R	26	24	0,03	0,16
Finlândia	1999	B	10	7	0,14	0,39
	1998/99	T	166	113	0,14	1,9
França	1998/99	Nacionais	34	14	0,05	0,36
	1998/99	Importados	70	50	0,22	1,64
Grécia	1999	B	45	23	0,13	1,17
	1999	D	7	6	0,54	1,68
	1999	R	5	3	0,07	0,13
	1999	T	38	21	0,16	2,61
Holanda	1999	B	20	2	0,16	2,10
	1999	T	150	61	0,24	3,10
Itália	1999	B	20	7	0,60	8,86
	1988/97	D	15	9	0,74	3,86
	1999	R	4	2	0,13	0,28
	1992/99	T	244	210	1,29	15,6
Portugal	1999	Vinho Verde	30	0	–	–
	1999	Vinho do Porto	31	0	–	–
Reino Unido	1997	B	10	0		
	1997/99	T	60	28	0,17	1,10
Suécia	1999	T	32	31	0,21	2,47

Tipo de vinhos:

A – aperitivo; B – branco; D – doce; E – espumante; R – rosé; T – tinto

A exposição total diária de OTA recomendada pela SCF (*Scientific Committee for Food, Working Group on Contaminants*) é de 5 ng/kg_{peso corporal}/dia. O mesmo estudo revela que esta exposição, na pior situação (Reino Unido, crianças até aos 4,5 anos, sendo os alimentos de risco: frutos secos (62 %), cacau (19 %) e cereais (17 %)) é de 3,55 ng/kg_{peso corporal}/dia. O vinho surge com alguma relevância na população adulta consumidora em Itália (83 % de 3,52 ng/kg_{peso corporal}/dia), na Holanda (75 % de 1,26 ng/kg_{peso corporal}/dia) e na Grécia (48 % de 0,23 ng/kg_{peso corporal}/dia). Em Portugal, o vinho contribui com 2 % para a estimativa de exposição total diária à OTA – 1,16 ng/kg_{peso corporal}/dia. Contudo, convém ter presente que o número de amostras de vinhos Portugueses contabilizados neste estudo foi bastante baixo (61 vinhos analisados).

Conforme já foi referido anteriormente, este relatório reúne os dados disponíveis até 2001. Dado o crescente interesse que a presença de micotoxinas em alimentos tem despertado junto de autoridades públicas e de agentes económicos, tem-se vindo a efectuar mais regularmente o controlo destes compostos em alimentos. Nos últimos dois anos publicaram-se alguns trabalhos sobre a presença de OTA em vinhos Europeus que podem alterar ligeiramente os dados constantes neste relatório.

Conclusões

Os dados sobre a incidência de OTA em vinhos referidos neste trabalho totalizam cerca de 2500 determinações, sendo que a referência a vinhos portugueses é inferior a 100 determinações e que apenas uma publicação dedicada a vinhos de origem portuguesa foi encontrada. Os dados apresentados nas Tabelas 1 e 3 contemplam 10 países da União Europeia e, conforme se pode verificar, em seis destes é possível encontrar vinhos com teores de OTA superiores ao limite máximo recomendado pelo OIV de 2 µg/l. Deste sobressai a Itália pelo elevado número de amostras de vinho com valores superiores ao limite proposto pelo OIV. Na maior parte das publicações, onde são analisadas amostras provenientes deste país o limite recomendado é excedido (Majerus & Otteneder, 1996; Visconti *et al.*, 1999; Ottener & Majerus, 2000; Pietri *et al.*, 2001; Miraglia & Brera, 2002).

As ilhas gregas representam outra área de risco uma vez que, o número de amostras com um teor de OTA superior ao limite recomendado pelo OIV é considerável. De salientar, que em determinadas ilhas a média

dos valores encontrados aproxima-se perigosamente do valor limite recomendado.

A situação dos vinhos oriundos da Península Ibérica, quando comparada com o panorama europeu, parece boa, no sentido em que os vinhos analisados não excedem, em geral, o limite proposto pelo OIV de $2 \mu\text{g}_{\text{OTA}}/\text{l}_{\text{vinho}}$. A única excepção que se apresenta é a dos vinhos doces que envolvem secagem prévia das uvas. No entanto, são necessários mais estudos para se poder avaliar com maior precisão o risco de contaminação de vinhos com OTA e definir os respectivos pontos críticos de controlo, para garantir a segurança sanitária dos produtos oriundos desta região.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da União Europeia, Programa Qualidade de Vida (QoL), Acção chave 1 (KA1) sobre Alimentação, Nutrição e Saúde; número de contrato QLK1-CT-2001-01761 - Wine-Ochra Risk, e o apoio do INIAP-Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, Programa AGRO, medida 8.1, projecto nº 255. R. Serra é bolseira da Fundação para a Ciência e Tecnologia: referência SFRH/BD/1436/2000.

Bibliografia

- Abarca, M. L., Accensi, F., Bragulat, M. R., Castella, G., & Cabañes, F. J. (2003). *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection*. 66 (3), 504-506.
- Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castella, G., & Cabañes, F. J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (7), 2650-2652.
- Accensi, F., Cano, J., Figuera, L., Abarca, M. L., & Cabañes, F. J. (1999). New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiology Letters*. 180 (2), 191-196.
- Aguiar, A., Mexia, A., Couto, C., Ramadas, I., Garrido, J., Costa, J., Ribeiro, J. A., Freitas, J., Trigueiros, J., Inglez, M. A., Ferreira, M. A., Raposo, M. A., Amaro, P. (2001). A protecção integrada da vinha na região norte. Instituto Superior de Agronomia/PRESS. Lisboa. pp. 148.
- Battilani, P. & Pietri, A. (2002). Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology*. 108 (7), 639-643.

- Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P. & Kozakiewicz, Z. (2003). Occurrence of ochratoxin A–Producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection*. 66, 633-636.
- Bhatnagar, D., Lillehoj, E. B. & Arora, D. K. (Eds) (1992). *Handbook of Applied Mycology*. Vol. 5: Mycotoxins in ecological systems. Marcel Dekker, New York.
- Blateyron, L., Michel, G. & Delteil, D. (2001). Determination de L'ochratoxine A par extraction en phase solide et chromatographie liquide HPLC – essai de réduction de la teneur an ochratoxine A par collage sur des vins rouge naturellement riches en cette molécule. XXVI Congresso Mundial da Vinha e do Vinho. Adelaide, Austrália, pp. 313-320.
- Burdaspal, P. & Legarda, T. M. (1999) Ochratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros países Europeos. *Alimentaria*, Enero-Febrero, 107-113.
- Cabañes, F. J., Accensi, F., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Castella, G., Minguez, S., & Pons, A. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*. 79, 213-215.
- Castellari, M., Versari, A., Fabiani, A., Parpinello, G. P. & Galassi, S. (2001). Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 49, 3917-3921.
- Dumeau, F. & Trioné, D. (2000). Influence de différents traitements sur la concentration en ochratoxine A des vins rouges. *Revue Française d'Œnologie*. 95, 37-38.
- Festas, I, Herbert, P., Santos, L., Cabral, M., Barros P. & Alves A. (2000). Ochratoxin A in some Portuguese wines: method validation and screening in Port wine and Vinho Verde. *American Journal of Enology and Viticulture*. 51, 150-154.
- Filali, A., Ouammi, L., Betbeder, A. M., Baudrimont, I., Soulaymani, R., Benayada, A. & Creppy, E. E. (2001). Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food Additives and Contaminants*. 18, 565-568.
- Lopez de Cerain, A., González-Peñas, E., Jiménez, A. & Bello, J. (2002). Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food Additives and Contaminants*. 19, 1058-1064.
- MacDonald, S., Wilson, P., Barnes, K., Damant, A., Massey, R., Mortby, E., & Shepherd, M. J. (1999). Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. *Food Additives and Contaminants*. 16 (6), 253-260.
- Majerus, P. & Otteneder, H. (1996). Nachweis und vorkommen von ochratoxin A in wein und traubensaft. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 92, 388-390.
- Markaki, P., Delpont-Binet, C., Grosso, F. & Dragacci, S. (2001). Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Protection*. 64, 533-53.
- Miraglia, M. & Brera, C. (2002). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. Report on Tasks for Scientific Cooperation, Directorate-General Health and Consumer Protection.

- Ospital, M., Cazabeil, J. M., Betbeder, A. M., Tricard, C., Creppy, E. E., & Médina, B. (1998). L'ochratoxine A dans les vins. *Revue Française d'Oenologie*. 169, 16-18.
- Otteneder, H. & Majerus, P. (2000). Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants*. 17, 793-798.
- Petzinger, E. & Weidenbach, A. (2002). Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science*. 76, 245-250.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L. & Piva, G. (2001). Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants*. 18, 647-654.
- Pitt, J. & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic & Professional, London:
- Rousseau, J. & Blateyron, L. (2002). Ochratoxine A dans les vins: pas de solution curative sur vin, priorité à la maîtrise sanitaire au vignoble. *Revue des Œnologues*. 104, 14-16.
- Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F. & Creppy, E. E. (2002). Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 1306-1311.
- Serra, R., Abrunhosa, L. & Venâncio, A. (2002). Micoflora das uvas e micotoxinas. *In: Santos, I. M., Venâncio, A., Lima, N. (Eds), Ecologia dos fungos*. Micoteca da Universidade do Minho, Braga. pp. 47-54.
- Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z. & Venâncio, A. (2003). Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*. no prelo.
- Shephard, G, Fabiani, A., Stockenstrom, S., Mshicileli, N. & Sewram, V. (2003). Quantification of ochratoxin A in South African wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 1102-1106
- Soleas, G. J., Yan, J. & Goldberg, D. M. (2001). Assay of ochratoxin A in wine and beer by high pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 2733-2740.
- Soufleros, E., Tricard, C. & Bouloumpasi, E. (2003). Occurrence of ochratoxin A in Greek wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83, 173-179.
- Stefanaki, I., Foufa, E., Tsatsou-Dritsa, A., & Dais, P. (2003). Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried vine fruits. *Food Additives and Contaminants*. 20, 74-83.
- van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., & Theron, J. J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*. 205 (976), 1112-1113.

- Visconti, A., Pascale, M. & Centonze, G. (1999). Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 864, 89-101.
- Wicklow, D. T., Dowd, P. F., Alfatafta, A. A., & Gloer, J. B. (1996). Ochratoxin A: an antiinsectan metabolite from the sclerotia of *Aspergillus carbonarius* NRRL 369. *Canadian Journal of Microbiology*. 42 (11), 1100-1103.
- Wijnands, L. M. & van Leusden, F. M. (2000). An overview of adverse health effects caused by mycotoxins and bioassays for their detection. RIVM- National Institute of Public Health and the Environment. Report 257852 004. Bilthoven, pp. 55-62.
- Zimmerli, B. & Dick, R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B*. 666, 85-89.
- Zimmerli, B. & Dick, R. (1996). Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*. 13, 655-668.