

Impacto da Contaminação Fúngica sobre a Competitividade de Vinhos

Ocratoxina A

Editores

António Cerdeira
Armando Venâncio
Arminda Alves
Paulo Barros
Tomás Simões

Apoios

ACIBEV

ALABE

ANDOVI

BARROS ALMEIDA & CIA, VINHOS SA

CVRA

CVRVV

ELNOR SA

FENADEGAS

IVP

IVV

MANOEL D. POÇAS JÚNIOR - VINHOS SA

QUINTA DO MINHO – AGRICULTURA E TURISMO

SANDEMAN & CIA, SA

VICAM

MANUEL GUERRA - TESTES E EQUIPAMENTOS VETERINÁRIOS, LDA.

W. & J. GRAHAMS

Impacto da Contaminação Fúngica sobre a Competitividade de Vinhos

Ocratoxina A

Editores

António Cerdeira

Armando Venâncio

Arminda Alves

Paulo Barros

Tomás Simões



Esta publicação reúne as comunicações apresentadas na conferência «*Impacto da contaminação fúngica sobre a competitividade de vinhos - Ocratoxina A*» realizada a 13 de Junho de 2003, na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal.

O texto integral que aqui se apresenta é da responsabilidade dos respectivos autores e não reflecte necessariamente a posição ou opinião da Micoteca da Universidade do Minho, bem como das instituições representadas na Comissão Organizadora.

A Micoteca da Universidade do Minho e a Comissão Organizadora agradecem o apoio dado à edição desta Obra.

Ficha Técnica

Impacto da contaminação fúngica sobre a competitividade de vinhos Ocratoxina A

Editores: António Cerdeira
Armando Venâncio
Arminda Alves
Paulo Barros
Tomás Simões

Edição: Micoteca da Universidade do Minho

Capa: Zaprunder, Composição Gráfica e Design, Lda - Porto

Execução Gráfica: Barbosa & Xavier, Lda., Artes Gráficas - Braga

Tiragem: 300 exemplares
Braga, Junho 2003

Depósito Legal: 196559/03

ISBN: 972-97916-2-7

Distribuição: Livraria Minho – Ferreira & Salgado, Lda.
Largo da Senhora-a-Branca, 66
4710-443 Braga

Índice

7 Prefácio

A contaminação fúngica e a Ocratoxina A em vinho

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

- 9 Introdução
- 11 A ocorrência de Ocratoxina A em vinho
- 14 Causas da contaminação dos vinhos com Ocratoxina A
- 14 *Espécies responsáveis pela produção de OTA nas uvas*
- 18 *Biologia e ecologia das espécies produtoras de OTA na vinha*
- 19 *Influência da origem e do tipo de vinho*
- 21 Avaliação da exposição à Ocratoxina A na União Europeia
- 23 Conclusões
- 24 Agradecimentos
- 24 Bibliografia

Primera aproximación al control de la Ocratoxina A en vino – estudios micológicos

Bellí, N., Marín, S., Ramos, A.J. y Sanchis, V.

- 29 Introducción
- 30 Análisis del riesgo de ocratoxina A
- 30 Evaluación del riesgo
- 31 *Evaluación del peligro*
- 33 *Evaluación de la exposición*
- 38 *Caracterización del riesgo*
- 38 Comparación del riesgo
- 39 Comunicación del riesgo
- 40 Gestión del riesgo
- 43 Estudios micológicos
- 49 Conclusión
- 50 Bibliografía

Pastreio de ocratoxina A em uvas e vinhos portugueses*A. Alves*

53	Sumário
54	Introdução
55	A análise de ocratoxina A em vinhos
57	Incidência de ocratoxina A em vinhos
58	<i>Incidência de ocratoxina A em vinhos portugueses</i>
59	Material e métodos
60	Resultados e discussão
60	Avaliação da incerteza associada aos resultados de ocratoxina A em vinhos
63	Rastreio de ocratoxina A em vinhos portugueses
66	Rastreio de ocratoxina A em uvas
68	Conclusões
69	Agradecimentos
69	Bibliografia

Biodinámica de implantación de micobiotica y efectividad de fungicidas en el control de las especies ota-génicas en el viñedo. Resultados de la reducción del contenido en ota en el vino*S. Minguez*

71	Introducción
74	Resultados obtenidos en la lucha contra la OTA
79	Bibliografía

Ocratoxina A – ações desenvolvidas no plano internacional*A. S. Curvelo-Garcia*

81	Introdução
82	Ocorrência em vinhos de ocratoxina A – a actividade desenvolvida no seio do OIV
87	Conclusões
87	Bibliografia

Prefácio

Há cerca de dez anos, adiantou-se a possibilidade da ocorrência de contaminação de vinhos por uma micotoxina – a ocratoxina A. A partir daí, estima-se que se tenham tornado públicas análises realizadas a mais de 2500 vinhos das mais diversas origens, com uma especial incidência sobre vinhos originários da bacia Mediterrânea, apontada como sendo uma zona de risco elevado. Na Península Ibérica também se tem feito sentir algum esforço no sentido de avaliar o real impacto deste contaminante em vinhos, embora nos dados tornados públicos predominem vinhos de origem espanhola. Na conferência **Impacto da contaminação fúngica sobre a competitividade de vinhos – Ocratoxina A** pretende-se, entre outros objectivos, dar um contributo para um melhor conhecimento da presença de ocratoxina A em vinhos com origem em Portugal e consumidos um pouco por todo o Mundo.

Hoje, é aceite que a génese da contaminação com ocratoxina A de vinhos esteja na contaminação das uvas, ainda na fase de maturação, com fungos filamentosos da secção dos *Aspergillus* negros. Assim, neste fórum em que se pretende avaliar o impacto da contaminação fúngica não podia faltar a menção à micoflora de uvas e às condições ecológicas que favorecem a colonização das uvas por estes microrganismos, a síntese de ocratoxina A e, finalmente, a sua presença e acumulação em uvas.

De igual modo, reveste-se de importância a menção ao combate que o Homem exerce sobre esta microflora, isto é, os tratamentos fitossanitários. O impacto da micoflora das uvas pode traduzir-se em danos visí-

veis, a podridão, em simultâneo, ou não, com a ocorrência de danos invisíveis, as micotoxinas. O tratamento fitossanitário ideal deve evitar ambas as situações.

No panorama político, também a ocratoxina A tem revelado as suas facetas e este fórum não podia alhear-se deste facto. Com avanços e recuos, com determinação ou hesitação, a comunidade internacional tem evoluído no sentido de definir as doses toleráveis de exposição a ocratoxina A e na definição dos limites admissíveis deste contaminante nos géneros alimentares em que se encontra mais vulgarmente presente.

É na confluência desta abordagem multifacetada que esta conferência se centra. Dado que o tema carece de maior atenção e aprofundamento, os organizadores decidiram publicar os contributos nela apresentados dando origem à presente obra.

OS EDITORES

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 hematotóxicos (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).

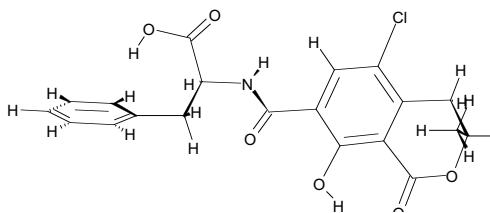


Figura 1. Estrutura molecular da ocratoxina A

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 comercializados 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-

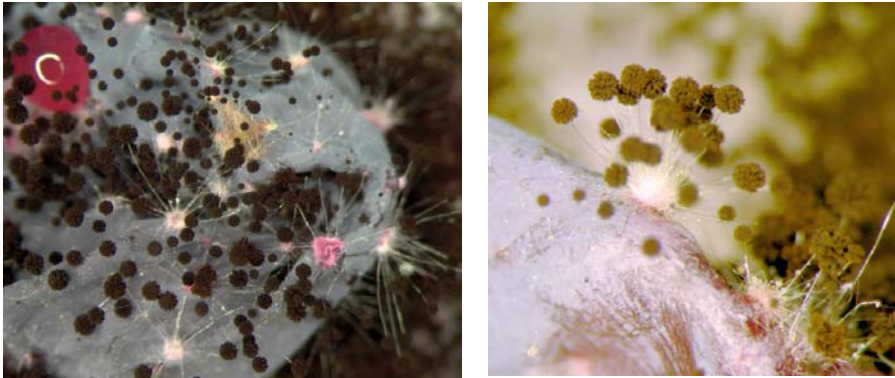


Figura 2. Detalhe de *Aspergillus negros* a crescer na superfície da uva. Observam-se as estruturas reprodutoras escuras

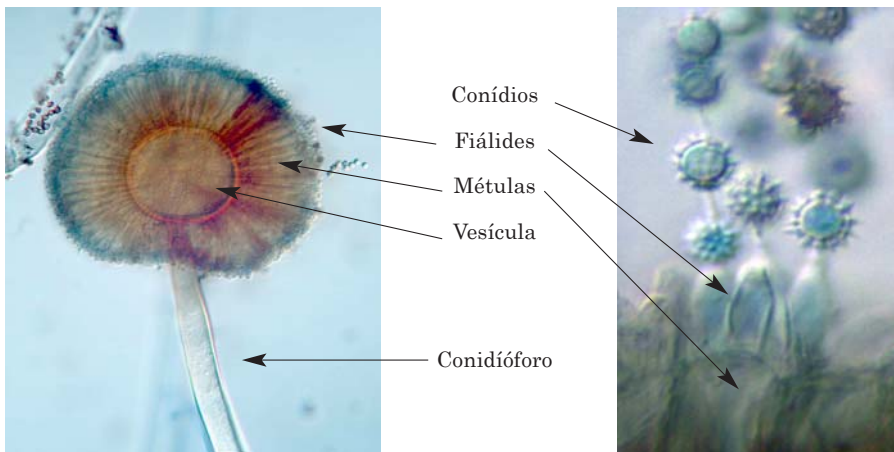


Figura 3. Imagens de microscopia óptica de aspergilli. Em A, observa-se o conidióforo, com a vesícula terminal, na qual se situam as fiálides, onde se dá a produção de esporos. Em B, detalhe das fiálides e dos esporos a serem produzidos. Quando os esporos são jovens, são hialinos, tornando-se depois 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 morfológicamente, 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.

Primera aproximación al control de la ocratoxina A en vinos. Estudios micológicos

Bellí, N., Marín, S., Ramos, A.J. y Sanchis, V.

Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad de Lleida
Av. Alcalde Rovira Roure 191, (25198) Lleida, Spain
Tel. 34 973 702535; Fax. 34 973 702596

E-mail: vsanchis@tecal.udl.es

Introducción

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos capaces de crecer en gran variedad de sustratos bajo las más diversas condiciones ambientales, contaminando con frecuencia alimentos, y provocando respuestas tóxicas en humanos y animales. Las ocratoxinas son micotoxinas producidas por diferentes especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, que crecen de forma natural en determinados productos vegetales, en la propia planta y durante su almacenamiento y transporte bajo determinadas condiciones de humedad y/o temperatura. Dentro de las ocratoxinas, la ocratoxina A (OTA), descubierta en 1965 como producto de una cepa de *A. ochraceus* (van der Merwe *et al.*, 1965), es la más tóxica. Desde el punto de vista estructural, la OTA es un derivado clorado de la isocumarina con un grupo amida unido a la fenilalanina.

El objetivo de este capítulo es ofrecer una aproximación al control de la OTA en alimentos y en particular en vinos. Se ha abordado este objetivo en dos grandes bloques:

En primer lugar, exponemos un procedimiento para demostrar el posible riesgo sanitario que representa la OTA para la salud de los consumidores. Para ello, proponemos seguir una línea de análisis del riesgo dentro del marco de la bioseguridad alimentaria, recomendada por la FAO/WHO (1995), para los peligros de índole sanitaria (figura 1).

En el segundo bloque abordaremos algunos estudios micológicos que se están realizando para controlar el problema de OTA en vinos.

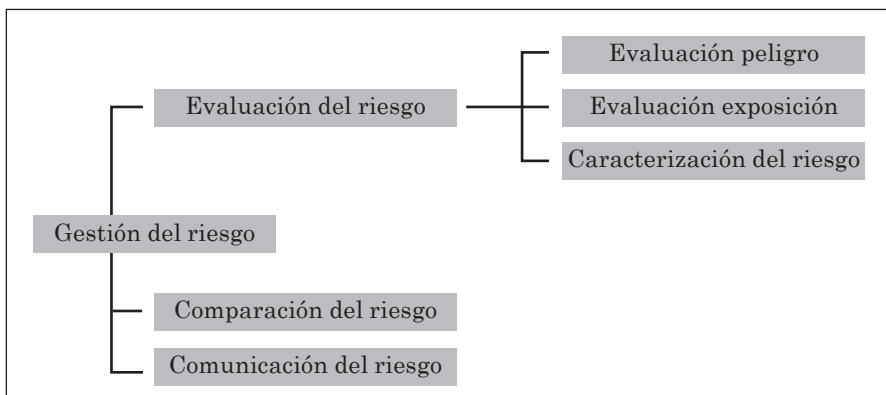


Figura 1. Esquema del análisis del riesgo dentro del marco de la bioseguridad alimentaria (FAO/WHO, 1995)

Análisis del riesgo de ocratoxina A

La metodología para analizar el riesgo que representa la OTA para la salud de los consumidores, trata los siguientes aspectos:

1. Evaluación del riesgo
2. Comparación del riesgo
3. Comunicación del riesgo
4. Gestión del riesgo

1. Evaluación del riesgo

La evaluación del riesgo es el resultado de las evaluaciones de los peligros y de la exposición. Los factores que la hacen posible, entre otros, son los siguientes:

- Evaluación del peligro, que se compone de:
 - Identificación de los peligros basada en la toxicidad animal y en datos epidemiológicos.
 - Caracterización de los peligros. Cálculo de la dosis diaria admisible y tolerable.

- Evaluación de la exposición del hombre al agente tóxico basada en datos sobre concentraciones reales en productos básicos y en niveles en suero sanguíneo.
- Caracterización del riesgo, colocando en paralelo los datos de exposición y las dosis que pueden provocar los peligros.

1.1. Evaluación del peligro

Para evaluar un peligro se debe realizar una identificación y una caracterización de éste. En este caso el peligro son las micotoxinas, pues son altamente tóxicas para los animales y potencialmente tóxicas para el hombre. Los problemas sanitarios derivados de su ingestión dependen de:

- Toxicidad del compuesto
- Cantidad de toxina ingerida
- Peso corporal y condiciones físicas de los individuos
- Presencia de otras micotoxinas
- Biodisponibilidad humana a los distintos metabolitos de las micotoxinas.
- Otros factores relacionados con la dieta

Los géneros más importantes productores de micotoxinas son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, productores principalmente de las siguientes micotoxinas:

- Las **aflatoxinas**, las más estudiadas, afectan fundamentalmente al hígado y son muy cancerígenas. Los principales mohos productores son *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Se descubrieron en los años 60 y, debido a su elevada toxicidad y al gran número de estudios existente, están actualmente reguladas. Dentro de las aflatoxinas, la B₁ es la más tóxica.
- Las **ocratoxinas** son producidas también por especies de *Aspergillus* y por *Penicillium*. La ocratoxina A está siendo intensamente estudiada actualmente y está regulada en sus contenidos

máximos en determinados alimentos. Es nefrotóxica, cancerígena y muy termorresistente. La población humana sana tiene un nivel en suero relativamente alto, pues el consumo de pequeñas cantidades de esta toxina durante largo tiempo produce acumulación en algunos tejidos.

- La **zearalenona**, **tricotecenos** y **fumonisin**as son micotoxinas producidas por *Fusarium*. La zearalenona sobre todo ocasiona problemas estrogénicos. Su origen es el maíz que se usa en la formulación de muchos piensos. Dentro de los tricotecenos, destacan la toxina T-2, por ser altamente tóxica y el deoxynivalenol, mucho más común aunque menos tóxico. Las fumonisin, en particular la B₁, tienen gran importancia debido a ser las responsables de enfermedades graves como la encefalomalacia equina o el edema pulmonar en cerdos.
- Finalmente, la **patulina**, descrita en un inicio como antibiótico, es producida principalmente por *P. expansum* y afecta al hígado y pulmón.

Las propiedades nefrotóxicas y carcinogénicas de las micotoxinas han sido el principal punto de atención en la evaluación de la inocuidad y el análisis de riesgo por las autoridades reglamentarias. En 1970, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) inició un programa de evaluación del riesgo carcinogénico de distintos compuestos en humanos. Las primeras micotoxinas evaluadas fueron la aflatoxina y la esterigmatocistina. En el caso particular de la OTA, se le han descrito propiedades carcinogénicas, nefrotóxicas, teratogénicas e inmunotóxicas y posiblemente neurotóxicas, pues desde hace tiempo se viene reconociendo como una de las principales micotoxinas contaminantes de los alimentos almacenados y se la ha asociado a la nefropatía porcina tras una exposición a piensos contaminados (Krogh, 1976). Sobre la base de algunas analogías en la patología existe una posible asociación con la nefropatía endémica de los seres humanos pero hasta la fecha las pruebas aportadas siguen sin ser concluyentes (Plestina, 1996) y por esto está considerada como un posible agente cancerígeno humano (Grupo 2B) (tabla 1).

Tabla 1. Evaluación y clasificación de algunas micotoxinas en función de su toxicidad (IARC, 1993)

	Evidencia de carcinogenicidad *		Clasificación IARC **
	humana	animal	
Aflatoxinas	S	S	1
Ocratoxina A	I	S	2B
Fumonisinias	I	S	2B
Esterigmatocistina	–	S	2B
Zearalenona	–	L	–
Toxina T-2	–	L	–
Patulina	–	I	3

* Tipo de evidencia: (S) suficiente, (L) limitada, (I) insuficiente

** Criterios de clasificación:

Grupo 1: agente carcinogénico en humanos

Grupo 2A: agente probablemente carcinogénico en humanos

Grupo 2B: agente posiblemente carcinogénico en humanos

Grupo 3: agente no clasificable

1.2. Evaluación de la exposición

Además de la evaluación de los peligros, se debe tener en cuenta otro aspecto para que la evaluación de los riesgos sea posible: la evaluación de la exposición. Para ello, se necesitan datos sobre la presencia de micotoxinas en varios alimentos y suero sanguíneo, así como datos sobre su ingestión.

1.2.1. Presencia de OTA en alimentos y suero sanguíneo

Esta micotoxina se ha encontrado en cereales, cacao, cerveza, frutos secos, especias y café (Majerus *et al.*, 1993), en distintas cantidades dependientes del tipo de alimento. Existen varios estudios sobre presencia de OTA en café, con concentraciones que varían entre 0,1-80 mg/kg para café verde y 0,05-23,5 para café tostado, con un alto porcentaje de muestras contaminadas, llegando en muchos casos al 100%, como en el estudio realizado por Pardo *et al.* (2003), donde se analizaron

57 muestras de café verde obteniendo unas concentraciones medias de 6,9 mg/kg (*Coffea arabica*) y 6,1 mg/kg (*C. robusta*) de OTA.

Desde 1996 se viene estudiando la contaminación por OTA en zumos de uva y vinos (Zimmerli y Dick, 1996). La presencia de esta toxina en los vinos ha suscitado un interés creciente en los últimos años. De ello deriva la aparición de numerosos estudios que detectan OTA en estas bebidas a distintas concentraciones (tabla 2) (modificada de Bellí *et al.*, 2002). De la tabla se concluye que aproximadamente un 45% del total de los vinos blancos analizados contiene OTA con concentraciones que oscilan entre 0,011-0,535 mg/l (máx. 1,2 mg/l), un 66% de las muestras de vino rosado (0,025-1,348 mg/l; máx. 2,4 mg/l), un 71% de los vinos tintos (0,039-1,802 mg/l; máx. 7,6 mg/l) y entre un 60-100% de los vinos especiales (0,010-3,8 mg/l; máx. 15,3 mg/l).

Tabla 2. Resultados de varios estudios sobre la presencia de OTA en vinos, mostos y zumos de uva (modificado de Bellí *et al.*, 2002)

Muestras	n	Positivas (%)	Media (µg/l)	Mediana (µg/l)	Rango (µg/l)	LD (µg/l)	Referencia
Vino blanco	69	65,2	0,020	n.d.	<LD-0,267	0,003	Burdaspal
Vino rosado	32	90,6	0,031	n.d.	<LD-0,161		and Legarda
Vino tinto	91	92,3	0,054	n.d.	<LD-0,603		(1999)
Vino de aperitivo	47	74,5	0,040	n.d.	<LD-0,254		
Vino espumoso	12	83,3	0,012	n.d.	<LD-0,037		
Vino licoroso	16	93,7	1,048	n.d.	<LD-2,540		
Mosto y zumo de uva	18	100	0,045	n.d.	0,015-0,102		
Total	285						
Vino tinto en botella	23	86,9	0,385	0,195	<LD-1,340	0,080	Cerutti <i>et al.</i>
Vino tinto en tetrapak	6	100	1,802	2,125	0,143-2,933		(2000)
Vino rosado en botella	1	0	<LD	<LD	<LD		
Vino rosado en tetrapak	2	50	1,348	1,348	<LD-1,348		
Vino blanco en botella	18	50	0,264	0,195	<LD-0,456		
Vino blanco en tetrapak	10	50	0,144	0,108	<LD-0,289		
Total	60						

n.d.- no disponible

LD – límite de detección

Muestras	n	Positivas (%)	Media (µg/l)	Mediana (µg/l)	Rango (µg/l)	LD (µg/l)	Referencia
Vino blanco	7	100	0,072	0,048	0,028-0,540	0,01	Filali <i>et al.</i> (2001)
Vino rosado	3	100	0,223	0,09	0,04-0,54		
Vino tinto	20	100	0,912	0,785	0,04-3,24		
Total	30						
Vino blanco (criado en acero)	27	7,4	0,015	0,015	0,01-0,02	0,01	Larcher and Nicolini (2001)
Vino tinto (criado en acero)	36	22,2	0,041	0,04	0,01-0,1		
Vino tinto (criado en bodega)	8	0	0	0	–		
Vino orgánico	7	0	0	0	–		
Vino espumoso	9	0	0	0	–		
Vino Santo	7	0	0	0	–		
Mosto	40	0	0	0	–		
Mosto concentrado	17	100	1,55	0,85	0,06-6,18		
Mosto conc. rectificado	6	16,6	0,03	0,03	0,03		
Total	157						
Vino blanco	41	34	n.d.	0,07	<LD-1,2	0,01	Majerus and Ottender (1996)
Vino rosado	14	43	n.d.	0,1	<LD-2,4		
Vino tinto	89	45	n.d.	0,19	<LD-7,0		
Zumo de uva blanca	6	17	n.d.	n.d.	<LD-0,73		
Zumo de uva tinta	14	86	n.d.	1,8	<LD-4,7		
Total	164						
Vino blanco	58	24	n.d.	<0,01	<LD-1,4	0,01	Majerus <i>et al.</i> (2000)
Vino rosado	51	35	n.d.	<0,01	<LD-2,4	µg/l	
Vino tinto	172	46	n.d.	<0,01	<LD-7,0		
Zumo de uva blanca	27	78	n.d.	0,09	<LD-1,3		
Zumo de uva tinta	64	88	n.d.	0,27	<LD-5,3		
Total	372						
Vino tinto	31	100	n.d.	n.d.	0,010-3,4	0,002	Markaki <i>et al.</i> (2001)
Total	31						

n.d.- no disponible

LD – límite de detección

Muestras	n	Positivas (%)	Media (µg/l)	Mediana (µg/l)	Rango (µg/l)	LD (µg/l)	Referencia
Vino blanco	6	16,6	0,16	0,16	<0,01-0,16	0,01	Ospital et al., (1998)
Vino rosado	2	50	0,11	0,11	<0,01-0,11		
Vino tinto	21	57	0,08	0,075	<0,01-0,27		
Total	29						
Vino tinto	96	85	0,419	0,090	<0,001-3,177	0,001	Pietri et al. (2001)
Vino licoroso	15	60	0,736	0,008	<0,001-3,856		
Total	111						
Vino blanco	362	3,9	n.d.	n.d.	0,051-0,100	0,05	Soleas et al. (2001)
Vino tinto	580	16,6			0,051-0,200		
Total	942						
Vino tinto de mesa (brick)	31	96,7	0,94	1,045	<LD-3,80	0,013	Tateo et al. (2000)
Total	31						
Vino tinto (comercial)	27	96,3	1,269	0,895	<LD-7,63	0,010	Visconti et al. (1999)
Vino tinto (casero)	11	100	1,185	0,660	0,46-4,72		
Vino rosado (comercial)	6	83,3	0,804	1,010	<LD-1,15		
Vino rosado (casero)	2	100	0,525	0,525	0,41-0,64		
Vino blanco (comercial)	7	28,6	0,045	0,045	<LD-0,06		
Vino blanco (casero)	2	100	0,535	0,535	0,10-0,97		
Vino licoroso (Marsala)	1	100	0,29	-	0,29		
Total	56						
Vino blanco	24	33,3	0,011	<LD	<LD-0,178	0,005	Zimmerli and Dick (1996)
Vino rosado	15	93,3	0,025	0,019	<LD-0,123		
Vino tinto	79	78,5	0,039	0,013	<LD-0,388		
Vino de Oporto	6	n.d.	0,011	<LD	<LD-0,017		
Vino de Jerez	2	100	0,042	n.d.	0,029-0,054		
Marsala	2	100	0,191	n.d.	0,044-0,337		
Malaga	3	100	0,290	n.d.	0,049-0,451		
Vermut	2	n.d.	<LD	n.d.	n.d.		
Zumo de uva tinta	8	n.d.	0,188	0,235	<LD-0,311		
Zumo de uva blanca	3	0	0,116	n.d.	<LD		
Extractos de zumo de uva	17	0	<LD	n.d.	<LD		
Total	161						

n.d.- no disponible

LD – límite de detección

Finalmente, debemos mencionar que también se ha encontrado OTA en productos de origen animal, como en carne de cerdo y en sus vísceras, siempre procedente de animales que se han contaminado a través de su alimentación (Kuiper-Goodman y Scott, 1989).

Por otro lado, la presencia de OTA en muestras de sangre humana ha sido constatada de forma habitual en toda una serie de investigaciones realizadas en distintos países. En los estudios más actuales y quizá debido al uso de técnicas analíticas con límites de detección muy bajos, se detectan altos porcentajes de muestras contaminadas aunque a niveles bajos (Burdaspal y Legarda, 1998, Jiménez *et al.*, 1998).

1.2.2. Estimación de la ingesta

En 1994, la Comisión Europea estableció un grupo de cooperación científica (SCOOP Task 3.2.2.) para proporcionar datos sobre la exposición alimentaria a la OTA en la Unión Europea. Trece Estados miembros colaboraron en esta encuesta, constituyendo el estudio más reciente y completo de que actualmente se dispone. Ocho países estimaron las ingestas sobre la base de los datos nacionales de consumo; éstas oscilaban de 0,7 a 4,6 ng/kg peso corporal/día, con una media de 1,8 ng/kg peso corporal/día. Debido a su largo período de vida en la sangre humana, unos 35 días, los niveles plasmáticos constituyen un biomarcador útil de ingesta para varios días y partiendo de estos datos, cinco países estimaron unas ingestas entre 0,2-2,4 ng/kg peso corporal/día (media de 0,9 ng/kg peso corporal/día) (Comisión Europea, 1996).

En la tabla 3, aparecen las aportaciones estimadas de OTA debidas al consumo de alimentos contaminados derivadas de datos de consumo europeos (FAO/OMS/PNUMA, 1999).

Los datos identifican efectivamente las fuentes principales de OTA en la alimentación y ponen de relieve varias consideraciones en relación con la contaminación de la dieta. En primer lugar, los cereales son a todas luces los principales elementos que contribuyen a la exposición alimentaria, mientras que los grandes bebedores de vino tinto pueden recibir de esta fuente una ingesta importante. En segundo lugar, la fuerte contaminación de algunos productos, como uvas pasas y especias, da a entender que durante la producción y el almacenamiento pueden darse condiciones poco idóneas con posibilidad de mejora.

Tabla 3. Ingesta de OTA (cuadro adaptado de la tercera conferencia internacional mixta FAO/OMS/PNUMA, 1999)

Alimento	Concentración media de OTA (µg/kg)	Consumo (g/día)	Ingesta diaria de OTA (ng/kg peso corporal*)	% de ingesta total
Cereales	0,50	226	1,90	54
Vino tinto	0,19	171	0,54	15
Café	0,90	29	0,43	12
Cerveza	0,07	234	0,27	7,6
Carne de cerdo	0,10	76	0,13	3,7
Uvas pasas	2,80	2,3	0,11	3,1
Espicias	11,00	0,05	0,09	2,6
Aves de corral	0,03	53	0,03	0,9
Legumbres	0,10	12	0,02	0,6
Zumo de uva	1,00	50**	0,8**	19**

* Se supone un peso corporal de 60 kg

** No se dispone de datos fiables sobre el consumo; no se ha tenido en cuenta en la cifra total de ingesta

1.3. Caracterización del riesgo

Sería prudente reducir todo lo posible la exposición a la OTA y garantizar que las exposiciones se sitúen más cerca del límite inferior de las ingestas diarias tolerables, calculadas en 1,2-14 ng/kg de peso corporal por día. Pese a todo, el riesgo para la salud humana de un individuo en condiciones normales es ínfimo debido a que las concentraciones mencionadas de esta toxina en alimentos son muy bajas. El problema estribaría en los grupos de población llamados “grupos de riesgo” por sus deficientes condiciones de salud, ya que no se sabe el efecto que pueden producir las micotoxinas en estos individuos. Finalmente, añadir que por su complejidad, no se dispone de estudios de toxicidad de la micotoxina a largo plazo, y esta podría verse aumentada debido a otras sustancias de la dieta que pueden potenciar su efecto.

2. Comparación del riesgo

La siguiente etapa trata de comparar el riesgo de la OTA con el riesgo que suponen otras sustancias de la dieta humana y animal. Centrán-

Tabla 4. Ingesta diaria tolerable (TDI) de las principales micotoxinas

Micotoxina	TDI ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ pv*/día)	Referencia
Ocratoxina A	1,2-5,7	Comisión Europea (1998)
Fumonisina B ₁	1	Comisión Europea (2000a)
Deoxinivalenol	1	Comisión Europea (2002)
Nivalenol	0,7	Comisión Europea (2002)
Zearalenona	0,2	Comisión Europea (2000b)
Toxina T-2	0,06	Comisión Europea (2002)
Aflatoxina B ₁	0,014	Kuiper-Goodman (1991)

*pv- peso vivo

donos en los compuestos micotóxicos con riesgo cancerígeno, vemos que pese a las posibles propiedades carcinogénicas de la OTA, existen otras micotoxinas mucho más peligrosas (tabla 4).

3. Comunicación del riesgo

Los problemas emergentes relacionados con los alimentos constituyen una cuestión de alcance mundial que debe abordarse mediante un enfoque unificado y conjunto de todos los países. Dentro de este enfoque, un aspecto de máxima relevancia es la comunicación, pues el consumidor tiene derecho a estar bien informado sobre temas de calidad e inocuidad de los alimentos que consume. La comunicación del riesgo se define como el intercambio interactivo de información y opiniones en relación con los factores de peligro y los riesgos, que se establece entre los responsables de la determinación y los responsables de la gestión del riesgo, los consumidores, las empresas alimentarias y la comunidad científica en general. En este intercambio está incluida la explicación de los resultados de la determinación del riesgo y la motivación de las decisiones relacionadas con la gestión del riesgo. Aparte de este tipo de comunicaciones, también es importante incidir en la educación de los responsables de la fabricación y manipulación en este caso de los vinos, para conseguir finalmente el control de la OTA en ellos.

En el mundo se elaboran anualmente unos 264 millones de hectolitros de vino. Francia e Italia son grandes potencias vitivinícolas de la UE, con producciones que rondan los 54 millones de hectolitros en ambos

casos. En tercer lugar aparece España (22 millones de hectolitros) y, por debajo de ésta se sitúan Alemania (11,5 millones de hectolitros), Portugal (3,6 millones), Grecia (3,5 millones) y Austria (2,3 millones). La producción total de los 15 países miembros de la UE es de unos 163 millones de hectolitros. Las estadísticas ponen de manifiesto que el consumo medio de vino por persona en Europa se encuentra en 29,3 l/año, mientras que en algunos países dicha cifra llega a superar los 50 l/año (Sáinz, 2001). Pese a que se puede detectar OTA en el vino, las concentraciones encontradas siempre han sido ínfimas, aunque no debemos descartar que esta toxina puede llegar a representar un problema para la economía de Europa, que representa el 40% del viñedo mundial, con 2,8 millones de hectáreas, y que supone el 75% de la producción vinícola mundial.

4. Gestión del riesgo

Para poder llevar a cabo una correcta y eficiente gestión del riesgo son necesarios todos los pasos anteriores incluyendo la instauración de procedimientos y recomendaciones para la reducción, así como para la prevención del riesgo. Así pues, se deberá llegar a un consenso en relación tanto con la evaluación del riesgo como con los procedimientos necesarios de gestión de este, como la instauración de límites de control.

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas en los años sesenta, en muchos países se han establecido reglamentaciones para proteger a los consumidores de los efectos nocivos de las micotoxinas que pueden contaminar los alimentos. Existen varios factores a tener en cuenta en el proceso de adopción de decisiones para establecer límites para las micotoxinas. Entre ellos, **factores científicos** como la disponibilidad de datos toxicológicos, de datos de las investigaciones, conocimiento sobre la distribución de las micotoxinas en los productos básicos y metodología analítica. Influyen también **factores económicos** como el rechazo injustificado de lotes aceptables, la necesidad de mejoras tecnológicas y equipos sofisticados para la detección de alguna micotoxina, la suficiencia del abastecimiento de alimentos, etc. Finalmente en el establecimiento de la reglamentación de las micotoxinas también influyen **factores políticos** como el conocimiento de la legislación en otros países con los que existen contactos comerciales, siendo necesario conseguir un equilibrio entre la protección al consumidor y evitar barreras innecesarias al comercio.

Todo esto incide en que los aspectos legislativos sobre los niveles máximos tolerados de las micotoxinas en los alimentos sean difíciles de definir. No obstante, cada día existen más países que presentan leyes o recomendaciones para regular este problema. En su último estudio, la FAO compiló información a escala mundial sobre las concentraciones máximas tolerables de micotoxinas en alimentos y piensos mostrando que 77 países disponen ya de leyes o regulaciones, aunque no son uniformes en cuanto a los alimentos que deben ser controlados, ni engloban el mismo tipo o número de micotoxinas. Nueve países cuentan con legislación específica para la OTA con unos límites que van de 5 a 50 mg/kg aplicados a cereales concretos, a algunos alimentos o a todos los alimentos (van Egmond y Dekker, 1995). De todos modos, la Comisión de la Unión Europea cree absolutamente necesario procurar que se lleven a cabo las oportunas investigaciones y que se tomen todas las medidas preventivas posibles para reducir al máximo el contenido de OTA, a la espera de fijar límites máximos con arreglo al **principio ALARA** (“tan bajo como razonablemente sea posible”, en sus siglas inglesas) (Recomendación de la Comisión de 12 de marzo de 2002).

Para evitar la presencia de estas micotoxinas, el Grupo de expertos de contaminantes agrícolas de la Comisión Europea está estudiando la fijación de límites máximos de OTA y los métodos de muestreo y de análisis. Según el Reglamento (CE) n° 472/2002 de la Comisión, de 12 de marzo de 2002, que modifica el Reglamento (CE) n°466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, se establece el contenido máximo de OTA (mg/kg o ppb) en algunos alimentos (tabla 5). Esta norma regula la presencia de OTA en alimentos que no estaban regulados, y obliga a rechazar lotes de alimentos cuyos contenidos superen los límites legales. Para llevar a cabo este análisis, está previsto incrementar el número de controles oficiales por las autoridades sanitarias en los productos procedentes de países terceros, de las comunidades autónomas y entidades locales en los de producción comunitaria.

Las nuevas condiciones aprobadas pretenden establecer un mayor nivel de protección a los consumidores frente a la micotoxina en los cereales y sus derivados y uvas pasas, siendo los primeros los alimentos con un mayor consumo en la dieta alimentaria europea. La Comisión revisará las disposiciones de los puntos 2.2.2. y 2.2.3. para el 31 de diciembre de 2003 a más tardar, por lo que respecta al contenido máximo de OTA en las uvas pasas y con vistas a introducir un contenido máximo de OTA

Tabla 5. Límites permitidos de OTA en algunos alimentos (Reglamento (CE) n° 472/2002 de la Comisión, de 12 de marzo de 2002)

	Producto	Contenido máximo (µg/kg o ppb)	Método de toma de muestras	Método de análisis de referencia
2.2.1.	Cereales (incluido el arroz y el alforfón) y productos derivados de los mismos:			
2.2.1.1.	Cereales en grano sin transformar (incluido el arroz sin transformar y el alforfón)	5	Directiva 2002/27/CE de la Comisión	Directiva 2002/27/CE
2.2.1.2.	Productos derivados de los cereales (incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales en grano destinados al consumo humano directo)	3	Directiva 2002/27/CE	Directiva 2002/27/CE
2.2.2	Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	10	Directiva 2002/27/CE	Directiva 2002/27/CE
2.2.3.	Café verde y tostado y productos del café, vino, cerveza, zumo de uva, cacao y productos del cacao y especias	– *		

*Pendiente de próxima aprobación

en el café verde y tostado y los productos basados en café, el vino, la cerveza, el zumo de uva, el cacao y los productos a base de cacao y especias, atendiendo a las investigaciones realizadas y las medidas preventivas aplicadas para reducir la presencia de OTA en dichos productos.

Aunque puede ser justificable la introducción de límites máximos para los alimentos que son la fuente principal de exposición, la mejor forma de asegurar la protección de la salud humana es la aplicación de **medidas preventivas** para reducir al máximo la acumulación de OTA en los alimentos susceptibles de contaminación por esta micotoxina.

Bajo este concepto aparece la necesidad de establecer los programas de análisis de peligros y de puntos de control críticos (**HACCP**) para identificar y controlar las causas de contaminación por OTA de los alimentos. La implementación y buena práctica de este programa proporcionará beneficios tanto desde el punto de vista de la salud humana como el económico, mediante un suministro de alimentos adecuados, sanos e inocuos y una reducción de los índices de deterioros y descartes.

El HACCP es un sistema de control de la inocuidad de los alimentos basado en la determinación y evaluación sistemáticas de sus peligros y la definición de los medios para controlarlos. Es un instrumento preventivo, que confía a sistemas de gestión de los alimentos la protección de los suministros alimentarios contra peligros microbiológicos, químicos y físicos.

Estudios micológicos

Bajo el propósito de evitar el riesgo de exposición a las micotoxinas por los consumidores mediante el establecimiento de sistemas integrados de gestión basados en el concepto HACCP, surgen unos proyectos de investigación financiados por la UE, entre los que destacan:

1. *Prevention of ochratoxin A in cereals* (QLK1-CT-1999-00433)
2. *Prevention of Fusarium mycotoxins entering the human and animal food chain* (QLK1-CT-1999-00996)
3. *Early detection of toxigenic Fusarium species and ochratoxigenic fungi in plant products* (QLK1-CT-1999-001380)
4. *Risk assessment and integrated ochratoxin A (OTA) management in grape and wine* (QLK1-CT-2001-01761)

En este último proyecto, referente al control de la OTA en vinos, colaboran 12 grupos (10 grupos de investigación, 1 grupo de investigación aplicada y 1 cooperativa) de 7 países. El objetivo general de este proyecto multidisciplinar es evaluar el riesgo de OTA en uva y vino, y proteger la salud del consumidor, disminuyendo la cantidad de toxina de estos productos con la ayuda de la gestión integrada de la producción y procesado. El primer paso en esta investigación es identificar y caracte-

rizar los hongos responsables de la contaminación de OTA en uvas. Para ello se muestrean cada año (2001-2003) 107 viñedos de distintos países de la UE, siguiendo un protocolo común. Los muestreos se realizan en distintos estadios comprendidos entre la formación del grano y la recolección de la uva. Los mohos que con mayor frecuencia se han aislado de uva española se muestran en la tabla 6.

La mayoría de géneros empiezan a colonizar la uva en los primeros estadios aumentando su infestación conforme avanza el desarrollo del fruto y llegando a infestar la totalidad de los granos en la fase final, próxima a la recolección. La infestación de otros géneros como *Alternaria* puede sufrir un ligero descenso en el estado final de la uva, debido al cambio de composición de ésta y sobretodo al cambio en su disponibilidad de agua. En general, también se produce un aumento en el número de cepas potencialmente ocratoxigénicas conforme se acerca la época de cosecha, siendo el número de *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Nigri* mayor que los de la sección *Circumdati* (figuras 2 y 3).

Tabla 6. Mohos detectados en uvas españolas muestreadas entre Junio y Septiembre (2001-2002)

Género
<i>Alternaria</i> spp.
<i>Aspergillus</i> spp.
<i>Aureobasidium</i> spp.
<i>Botrytis</i> spp.
<i>Cladosporium</i> spp.
<i>Epicoccum</i> spp.
<i>Fusarium</i> spp.
<i>Penicillium</i> spp.
<i>Rhizopus</i> spp.
<i>Ulocladium</i> spp.

Posteriormente, en el laboratorio, se procede a la identificación y aislamiento de las cepas potencialmente ocratoxigénicas. Como se ha dicho anteriormente, las especies productoras de OTA pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. *P. verrucosum* y los *Aspergillus* de la

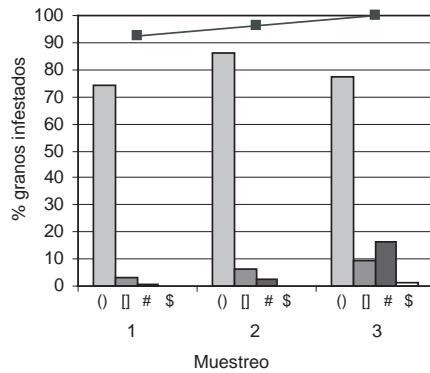


Figura 2. Porcentaje promedio de granos infestados en los tres periodos de muestreo: (1) un mes después de la formación del grano, (2) envero y (3) justo antes de la cosecha, por (O) *Alternaria* spp., (□) *Epicoccum* spp., (#) *Aspergillus* sección *Nigri* y (\$) *A.* sección *Circumdatti*, en el año 2002. La línea —■— representa el total de granos infestados en cada muestreo.

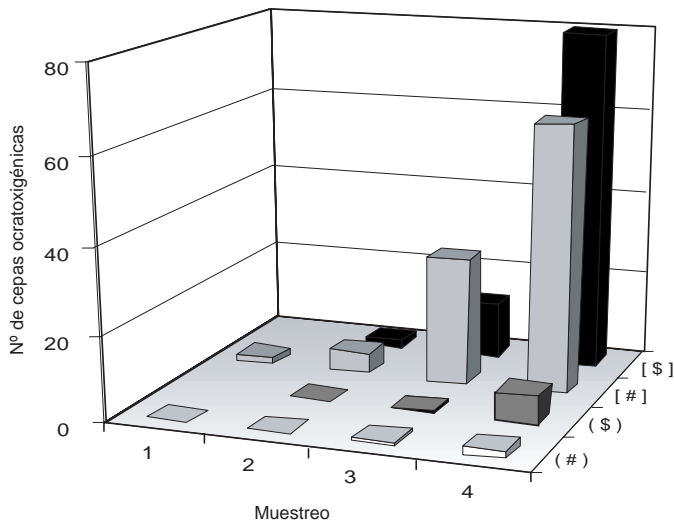


Figura 3. Número de cepas de *Aspergillus* pertenecientes a las secciones (□) *Nigri* y (#) *Circumdatti*, aisladas de uvas españolas durante el # 2001 y \$ 2002. Los periodos de muestreo fueron (1) formación del grano, (2) un mes después de la formación del grano, (3) envero y (4) justo antes de la cosecha.

sección *Circumdati* (grupo *A. ochraceus*) son las especies productoras más estudiadas hasta la fecha. Recientemente, muchos estudios coinciden en destacar los *Aspergillus* de la sección *Nigri* como los principales causantes de los niveles de OTA encontrados en uva, zumo y vino.

Los *Aspergillus* de la sección *Nigri* son frecuentes en uva. Varios autores han propuesto agrupar las especies pertenecientes a esta sección según criterios morfológicos y culturales (Raper y Fennell, 1965; Al Musallam, 1980; Klich y Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989; Accensi *et al.*, 2001) y otros según criterios moleculares (Kuster van Someren *et al.*, 1991; Mégnégneau *et al.*, 1993; Varga *et al.*, 1993; Parenicová *et al.*, 1997; Accensi *et al.*, 1999). En este capítulo, se dividen las especies pertenecientes a la sección *Nigri* según si son uniseriadas o biseriadas. Dentro de las biseriadas destaca *A. carbonarius* por presentar algunas particularidades, y el resto queda englobado en lo que se conoce por agregado *A. niger*.

De los resultados de los muestreos de uva de los años 2001 y 2002 se concluye que dentro de esta sección, *A. carbonarius* es menos común que las especies del agregado *A. niger* o los uniseriados (tabla 7), aunque el número de cepas productoras de OTA no sea proporcional a las aisladas, pues al analizar la capacidad productora de OTA de estas cepas, se ve que ningún *Aspergillus* uniseriado produce toxina y el agregado *A. niger* sólo ocasionalmente y en bajas concentraciones; por otro lado, la mayoría de cepas aisladas de *A. carbonarius* son capaces de producir OTA, en concentraciones variables. En consecuencia, *A. carbonarius* es probablemente la principal fuente de OTA en el zumo de uva, mostos, así como en el vino.

Tabla 7. Número de cepas aisladas de uva española y porcentaje de cepas productoras de OTA de *A.* secciones *Nigri* y *Circumdati* en el año 2002.

Espece	Número de cepas aisladas	% cepas productoras de OTA
uniseriados	45	0
agregado <i>A. niger</i>	181	2
<i>A. carbonarius</i>	17	82
<i>A.</i> sección <i>Circumdati</i>	23	26

El principal objetivo de los estudios micológicos con cepas ocratoxigénicas aisladas de uva, llevados a cabo en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Lleida (España), es la identificación de los parámetros ecofisiológicos que les influyen en el crecimiento y producción de OTA. Se está estudiando el efecto de algunos factores como la actividad de agua, la temperatura y el tiempo de incubación en el crecimiento de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de uvas de distintos países europeos y en la producción de OTA de cepas pertenecientes al agregado *A. niger* y sobre todo de *A. carbonarius*. Por el momento existen pocos estudios ecofisiológicos sobre *A. carbonarius*, debido a que no hace muchos años que se le asocia con la producción de OTA (Téren *et al.*, 1996; Heenan *et al.*, 1998).

Resultados preliminares realizados sobre medio sintético de uva, muestran que existen diferencias significativas ($P < 0.01$) en el crecimiento miceliar de los distintos grupos de *Aspergillus* negros (uniseriados, agregado *A. niger* y *A. carbonarius*), pero también entre las cepas de dentro de cada grupo. Tanto la a_w como la temperatura y su interacción influyen en el crecimiento de las cepas estudiadas. El país de origen de las cepas no influye estadísticamente en los resultados. Se han estudiado rangos de temperaturas que oscilan entre 10 y 37 °C y de a_w entre 0,90 y 0,99. Todas las cepas ensayadas hasta el momento crecen mejor a temperaturas altas (30-37 °C) que a bajas y en general, el crecimiento es más rápido a 30 °C que a 37 °C, excepto cuando los niveles de a_w son bajos. A 10 °C y a bajas a_w (0,90-0,93) el crecimiento de los *A.* sección *Nigri* es imperceptible. Para todas las cepas y temperaturas ensayadas, las velocidades de crecimiento incrementan al hacerlo la a_w , estando el óptimo entre 0,95 y 0,98. La figura 4 muestra el efecto conjunto de la temperatura y la a_w en el crecimiento de cuatro cepas de *Aspergillus* negros.

Según los resultados del muestreo en campo, las especies ocratoxigénicas de *A.* sección *Nigri* se encuentran en la uva antes de la cosecha. En esa época del año y en relación a los estudios ecofisiológicos que se han llevado a cabo, se deduce que las temperaturas pueden favorecer el crecimiento de estas especies. Además, los niveles de a_w en la superficie de la uva también serán favorables al crecimiento. Por todo ello, las medidas preventivas que se puedan tomar en este punto tendrán gran importancia.

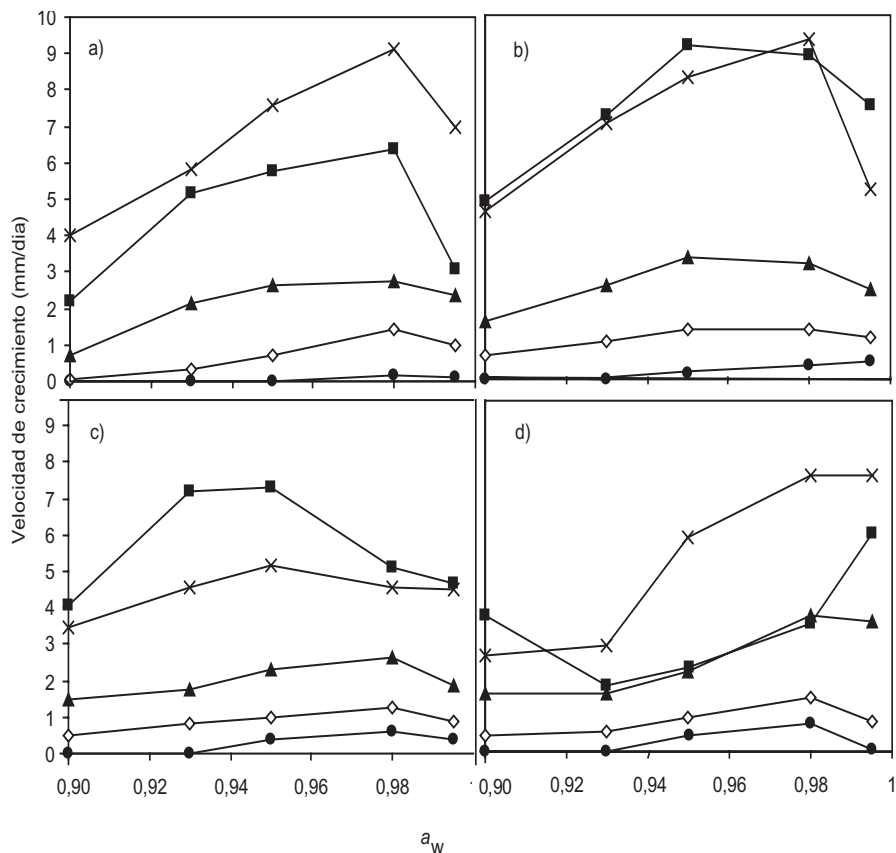


Figura 4. Efecto de la actividad de agua y la temperatura en las velocidades de crecimiento (mm/día) de las siguientes cepas de *Aspergillus* sección *Nigri*: (a) *A. carbonarius* 01UAS294, (b) *A. carbonarius* Mu644, (c) agregado *A. niger* W119 y (d) uniserial W118. Las temperaturas ensayadas fueron: 10 °C (●), 15 °C (◊), 20 °C (▲), 30 °C (■) y 37 °C (×).

Los resultados del estudio de la influencia del tiempo de incubación y la a_w en la producción de OTA permiten agruparse según si la cepa pertenece al agregado *A. niger* o es un *A. carbonarius*. La figura 5 muestra la superficie de respuesta para una cepa de *A. carbonarius*, que permite predecir la producción de toxina a las distintas condiciones de a_w a 25 °C. El tiempo óptimo de producción de OTA por *A. carbonarius* a

25 °C es de 5 días para cualquier a_w . A partir de aquí, la producción desciende con el tiempo. A los 5 días, la mayor producción de OTA se dio a 0,96 a_w . Para las cepas del agregado *A. niger*, el tiempo óptimo para producir la toxina también es de 5 días a 0,995 a_w , pero aumenta al disminuir los niveles de a_w , llegando a los 13 días a 0,90 a_w . De estos resultados se deduce que la producción de OTA en el campo podría ser máxima al poco tiempo de germinar las esporas de estos hongos, sin haber síntomas evidentes de crecimiento fúngico.

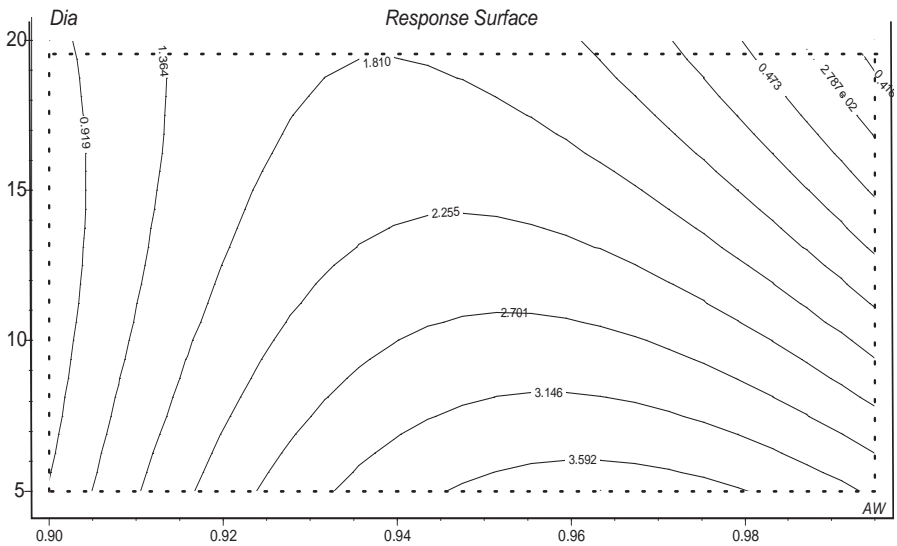


Figura 5. Superficies de respuesta del efecto de la actividad de agua y el tiempo de incubación sobre la producción de OTA ($\mu\text{g g}^{-1}$) por la cepa *A. carbonarius* (ScpW120) a 25 °C en medio sintético de uva

Conclusión

La ocratoxina A es una micotoxina que está adquiriendo una gran importancia hoy en día debido a su presencia en un gran número de alimentos. Dada su toxicidad y sus efectos acumulativos a largo plazo ha surgido la necesidad de reducir su ingesta por los consumidores. Para ello se han establecido límites de contenido máximo en los alimentos y

se están desarrollando una serie de proyectos de investigación encaminados a entender mejor la ecofisiología de los mohos ocratoxigénicos y a facilitar los procedimientos de control de esta toxina.

Se ha detectado que *A. carbonarius* es el principal causante de la acumulación de OTA en la uva y en el mosto con el que posteriormente se producirá el vino. Los estudios preliminares que se están desarrollando van dirigidos al control de este hongo y a la producción de esta toxina.

Bibliografía

- Accensi, F., Cano, J., Figuera, F., Abarca, M.L., Cabañes, F.J. (1999). New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiological Letters* 180, 191-196.
- Accensi, F., Abarca, M.L., Cano, J., Figuera, L., Cabañes, F.J. (2001). Distribution of ochratoxin A-producing strains in the *A. niger* aggregate. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 365-370.
- Al Musallam, A. (1980). Revision of the black *Aspergillus* species. *PhD Thesis*, University of Utrecht, The Netherlands.
- Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. (2002). Review: Ochratoxin A (OTA) in wines, musts and grape juices: occurrence, regulations and methods of analysis. *Food Science Technology International* 8, 325-335.
- Burdaspal, P.A., Legarda, T. M. (1998). Datos sobre la presencia de OTA en plasma humano en España. *Alimentaria* 292, 103-109.
- Burdaspal, P.A., Legarda, T.M. (1999). Ochratoxin A in wines and grape products originating from Spain and other European countries. *Alimentaria* 36, 107-113.
- Cerutti, G., D'amato, A., Zucchetti, M. (2000). Sulla presenza di ocratossina A, nitrato e nitrito nel vino. *Imbottigliamento* 23, 39-43.
- Comisión Europea. (1996). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population in EU member States. Working document in support of a SCF risk assessment of ochratoxin A. SCOOP task 3.2.2. Task coordinator: Denmark. EUR Report.
- Comisión Europea. (1998). Opinion of the scientific committee on food on ochratoxin A. Reports of the Scientific Committee for Food.
- Comisión Europea (2000a). Opinion of the scientific committee on food on *Fusarium* toxins. Part 3: Fumonisin B₁. Reports of the Scientific Committee for Food. SCF/CS/CNTM/Myc/24 Final.
- Comisión Europea (2000b). Opinion of the scientific committee on food on *Fusarium* toxins. Part 2: Zearalenone. Reports of the Scientific Committee for Food. SCF/CS/CNTM/Myc/22 Rev 3 Final.

- Comisión Europea (2002). Opinion of the scientific committee on food on *Fusarium* toxins. Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol. Reports of the Scientific Committee for Food. SCF/CS/CNTM/Myc/27 Final.
- FAO. (1995). The use of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) principles in food control. FAO Food and Nutrition Paper 58. FAO, Rome.
- FAO/OMS/PNUMA. (1999). 3ª conferencia internacional mixta FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas. Túnez, 3-6 Marzo de 1999.
- 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.
- Heenan, C.N., Shaw, K.J., Pitt, J.I. (1998). Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology* 1, 63-72.
- IARC. (1993). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC (International Agency for Research on Cancer), Lyon, 56, 489-521.
- Jiménez, A.M., López de Cerain, A., González-Peñas, E., Bello, J., Betbeder, A.M., Creppy, E.E. (1998). Exposure to ochratoxin A in Europe: comparison with a region of northern Spain. *Journal of Toxicology –Toxins Reviews* 17, 479-491.
- Klich, M.A., Pitt, J.I. (1988). A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde.
- Kozakiewicz, Z. (1989). *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers* 161, 1-188.
- Krogh, P. (1976). Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy. *Nordisk Veterinaermedicin* 28, 452-458.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical Environmental Science* 2, 179-248.
- Kuiper-Goodman, T. (1991). Risk assessment to human mycotoxins in animal-derived food products. *Veterinary Human Toxicology* 33, 325-333.
- Kusters van Someren, M.A., Samson, R.A., Visser, J. (1991). The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: reinterpretation of *Aspergillus niger* aggregate. *Current Genetics* 19, 21-26.
- Larcher, R., Nicolini, G. (2001). Survey of ochratoxin A in musts, concentrated musts and wines produced or marketed in Trentino (Italy). *Journal Commodity Science* 40, 69-78.
- Majerus, P., Cutka, I., Dreyer, A., El-Dessouki, S., Eyrich, W., Reusch, H., Schurer, B., Waiblinger, H.U. (1993). The ochratoxin A contamination situation of foods of plant origin. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 89, 112-114.
- Majerus, P., Ottender, H. (1996). Nachweis und vorkommen von ochratoxin A in wein und traubensaft. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 92, 338-390.

- Majerus, P., Bresch, H., Ottender, H. (2000). Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 51, 81-128.
- 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, 533-537.
- Mégnégneau, B., Debets, F., Hoekstra, R.F. (1993). Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. *Current Genetics* 23, 323-329.
- Ospital, M., Cazabeil, J.M., Betbeder, A.M., Tricard, C., Creppy, E., Medina, B. (1998). L'ochratoxin A dans les vins. *Revue Française d'Oenologie* 169, 16.
- Pardo, E., Marín, S., Ramos, A.J., Sanchis, V. (2003). Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee varieties from different origins. *European Food Research and Technology* (en prensa).
- Parenicová, L., Benen, J.A.E., Samson, R.A., Visser, J. (1997). Evaluation of RFLP analysis of the classification of the selected black *Aspergilli*. *Mycological Research* 101, 810-814.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G. (2001). Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants* 18, 647-654.
- Plestina, R. (1996). Nephrotoxicity of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 13, 49-50.
- Raper, K.B., Fennell, D.I. (1965). *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Sáinz, H. (2001). La actitud de los consumidores ante los vinos con Denominación de Origen. *Distribución y Consumo* diciembre2000-enero2001, 131-146.
- 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.
- Tateo, F., Bononi, M., Lubian, E. (2000). Survey on ochratoxin A in wines. Data concerning the market of table wines in brik. *Bulletin O.I.V.* 73, 773-783.
- Téren, J., Varga, J., Hamari, Z. (1996). Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 134, 171-176.
- 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, 1112-1113.
- Van Egmond, H.P., Dekker, W.H. (1995). Worldwide regulations of mycotoxins in 1994. *Natural Toxins* 3, 332-336.
- Varga, J., Kevei, F., Fekete, C., Coenen, A., Kozakiewicz, Z., Croft, J.H. (1993). Restriction fragment length polymorphisms in field in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. *Mycological Research* 97, 1207-1212.
- 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.
- Zimmerli, B., Dick, R. (1996). Ochratoxin A in table wines and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants* 13, 655-668.

Rastreo de ocratoxina A em uvas e vinhos portugueses

Arminda Alves

LEPÆ – Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente e Energia
Departamento de Engenharia Química
Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
Rua Dr. Roberto Frias, s/n, 4200-465 Porto

e-mail: aalves@fe.up.pt

Sumário

Hoje em dia, as técnicas analíticas são cada vez mais capazes de detectar um maior número de compostos em menores concentrações. Este facto, mais de que a descoberta de novos contaminantes, tem aumentado a discussão em torno das questões relacionadas com a segurança alimentar. Por outro lado, nem sempre é possível estabelecer em tempo útil a dose máxima admissível de um composto de forma a não causar efeitos negativos na saúde humana, uma vez que os estudos toxicológicos e epidemiológicos caminham a par da detecção crescente deste tipo de substâncias. Em alguns casos, este facto conduz à imposição de limites legais baseados em factores de segurança, o que acarreta necessariamente consequências económicas negativas, tanto para o produtor como para o consumidor. Embora cientes das consequências, aos níveis da segurança alimentar, económico, e da imagem do produto, decorrentes da detecção de um contaminante num determinado tipo de vinho, um rastreo alargado é um contributo fundamental na avaliação do problema, para depois se poder avançar para formas de prevenção e/ou eliminação. Neste trabalho foi efectuado o rastreo de ocratoxina A em 340 vinhos nacionais e em 122 amostras de uvas das Regiões Demarcadas dos Vinhos Verdes e do Douro. Este estudo está englobado em dois projectos – Projecto Agro n.º 255 – *Prevenção da Contaminação Fúngica em Vinho do Porto e em Vinho Verde*, e Protocolo de Colaboração entre a Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto e o Instituto da Vinha e do Vinho – *Ocratoxina A (OTA) em Vinhos Nacionais*. Tendo como referência o limite máximo recomendado pela OIV de 2 µg/L, não foram detectados níveis de ocratoxina A preocupantes nos vinhos analisados, sendo que dos 340 vinhos analisados, 67 apresentaram teores de OTA inferiores a 0,5 µg/L. Das 58 amostras de uvas analisadas até ao presente (de 122 recolhidas na vindima de 2002), apenas uma amostra revelou um nível detectável de OTA (0,1 µg/L).

Introdução

Os principais factores de apreciação de qualidade de um vinho têm sido, ao longo dos anos, a cor, o aroma e o sabor. Contudo, o desenvolvimento de novas práticas agrícolas e o aumento de controlo de qualidade analítico, em particular associado à melhoria da capacidade de resolução instrumental que permite a detecção um maior número de compostos presentes e menores quantidades (os chamados compostos *vestigiais*), tem colocado a segurança alimentar como um dos principais factores que condicionam a opinião dos consumidores. E, por esta razão, também a segurança alimentar tem sido usada como estratégia de *marketing*. Entre diversos compostos com potenciais efeitos indesejáveis para a saúde humana, que têm sido investigados nos vinhos, podem referir-se o carbamato de etilo, as aminas biogénicas, o chumbo, os pesticidas e actualmente a ocratoxina A.

O necessário esforço multidisciplinar de epidemiologistas, toxicologistas, químicos analíticos e enólogos, tendente a uma tomada de posição cientificamente fundamentada, é por vezes difícil de obter, pois requer tempo que não existe, já que período que decorre entre a detecção do contaminante e o consumo do produto pode ser curto e as decisões devem ser tomadas rapidamente. É por isso que as preocupações em torno de alguns compostos com potencial efeito negativo para a saúde humana, conduzem muitas vezes à recomendação de limites máximos, antes ainda de existir um estudo epidemiológico/toxicológico consistente e até antes de serem efectuados ensaios interlaboratoriais para uniformizar métodos de análise. Contudo, (e felizmente) na generalidade, não tem havido razão para preocupação no que respeita aos vinhos, embora a detecção esporádica de um ou outro caso de contaminação justifique o estudo do problema e a adopção de estratégias de prevenção e de controlo.

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina (metabolito secundário proveniente da actividade fúngica) produzida maioritariamente por *Aspergillus* e *Penicillium*. Embora genericamente as espécies maiores produtoras de OTA sejam *Aspergillus ochraceus* (abundante em climas temperados) e *Penicillium verrucosum* (abundante em climas tropicais), nas uvas são os *Aspergillus* negros (*A. niger* e *A. carbonarius*) (Abrunhosa *et al.*, 2001, 2002; Serra *et al.*, 2003; OIV, 1998).

Quimicamente a OTA é uma isocumarina ligada pelo grupo carboxilo a L-fenilalanina (fig. 1), que se caracteriza pela sua estabilidade. Uma

das propriedades toxico-cinéticas mais significativas é a sua alta afinidade pelas proteínas plasmáticas, determinante na persistência da toxina no sangue e, portanto, na sua toxicidade (López de Cerain *et al.*, comunicação pessoal 2001). Parece que a produção de OTA nas uvas é favorecida pela presença de ácido glutâmico e prolina. É um composto com reconhecida actividade nefrotóxica, sendo-lhe atribuída responsabilidade na crise endémica dos Balcãs. A sua carcinogenicidade foi até ao momento provada em estudos laboratoriais com ratos (IARC, 1993).

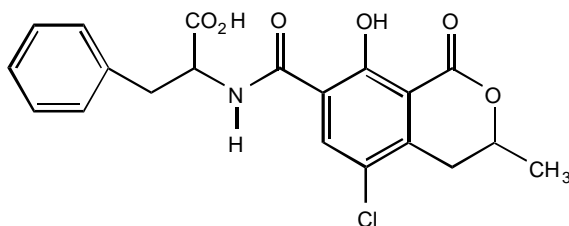


Figura 1. Fórmula estrutural da ocratoxina A

A problemática da OTA no que concerne à segurança alimentar, prende-se com o facto da sua presença no organismo humano ser devida à ingestão de pequenas quantidades presentes em vários tipos de alimentos, como cafés, cereais, frutos secos, uvas, cerveja e vinho, entre outros. As concentrações observadas são da ordem de 0,3-1,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em cereais, 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em cafés e 0,01-0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em vinho (European Commission, 1996).

A análise de ocratoxina A em vinhos

Quando se pretende comparar níveis de ocratoxina A em diferentes vinhos, em uvas ou mostos, observando-se um limite máximo recomendado, ou seja um valor numérico que não deve ser excedido para segurança do consumidor, duas questões fundamentais devem ser tidas em consideração: (i) se o método analítico utilizado está ou não uniformizado, ou se os diferentes métodos usados foram sujeitos a estudos comparativos (ensaios interlaboratoriais), e (ii) qual o significado do valor

obtido, isto é, o valor em si e a incerteza que lhe está associada, que se calcula pelos correntes processos de validação intralaboratorial do método analítico.

Relativamente ao método analítico, os primeiros estudos de ocratoxina A em vinhos foram realizados, na sua maioria, utilizando uma extracção líquido-líquido e a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência (Majerus e Otteneder, 1996; Ospital *et al.*, 1998). O procedimento de extracção, além de extremamente demorado, apresenta fraca reprodutibilidade, devido às inúmeras operações de manuseamento laboratorial. Além disso, exige um grande cuidado na detecção cromatográfica, pois várias substâncias que não a ocratoxina A podem ser confundidas com esta (co-eluição), gerando valores anormalmente elevados. Vários laboratórios europeus, entre os quais o nosso, participaram num estudo colaborativo (Tricard *et al.*, 1999), cuja conclusão mais significativa foi a muito baixa reprodutibilidade dos resultados obtidos pelos diferentes laboratórios, para teores de OTA em vinho da ordem de 0,2 µg/L (coeficiente de variação de cerca de 100 %).

Posteriormente, Visconti *et al.* (1999) usaram colunas de imunoafinidade para a extracção de OTA de vinhos e cerveja, após diluição da amostra numa solução aquosa de polietilenoglicol e NaHCO₃. Em 2000, a Comunidade Europeia propôs a utilização de um método analítico (prEN 14133) que envolve um procedimento de extracção com as referidas colunas de imunoafinidade e a análise por HPLC-fluorescência. A diferença entre este método e o anterior reside no procedimento de extracção, que é muito mais selectivo e exacto. Os ensaios interlaboratoriais referentes a este método (OIV, 2001) apontam para uma maior precisão e exactidão dos resultados (coeficiente de variação de 40 % para 1 µg/L). Falta no entanto validar este método e conduzir estudos interlaboratoriais para diferentes tipos de vinho, dada a inexistência de dados relativos à interferência do etanol ou dos açúcares no processo de extracção.

Quanto à incerteza global associada aos resultados, verifica-se que a maioria dos estudos refere, de uma forma mais ou menos consistente, os parâmetros de validação do método (linearidade, limites de detecção, precisão e exactidão), mas para gamas de concentração normalmente mais elevadas do que as encontradas nos vinhos. Poucos utilizam o conceito de incerteza global, conforme é definido pela Eurachem (2000). Além disso a maioria dos resultados de OTA em vinhos situa-se abaixo

de 0,5 µg/L, muito próximo da capacidade de detecção do método analítico, ou seja a fronteira entre mencionar o vinho como «teor de OTA não detectado» ou um teor de 0,5 µg/L é muito ténue. Por isso, este trabalho também visou avaliar a incerteza global associada aos resultados, de forma a poder atribuir-se um significado efectivo aos dados obtidos.

Incidência de ocratoxina A em vinhos

No que diz respeito aos vinhos, embora alguns estudos refiram a presença de ocratoxina A em valores que atingem os 8 µg/L, a recomendação da OIV é um máximo de 2 µg/L. Como referido anteriormente, apesar de ser difícil a comparação dos resultados obtidos com diferentes métodos analíticos, a Tabela 1 apresenta os principais resultados publicados em literatura.

Zimmerli e Dick, 1996	118 vinhos tranquilos 15 licorosos	<0,003 a 0,178 µg/L (brancos) <0,003 a 0,388 µg/L (tintos) 0,003 – 0,017 µg/L (Porto)	Vinhos tintos, vinhos do sul da Europa e norte de África com teores mais elevados
Majerus <i>et al.</i> , 1996	114 vinhos	0,007 µg /L (brancos) 0,200 µg /L (tintos) vinho da Argélia – 1,85 µg/L	50 % contaminados
Gilbert, 1998	10 vinhos	0,02 µg/L	
Visconti <i>et al.</i> , 1999	38 tintos	<0,010 a 7,63 µg/L	
Pietri <i>et al.</i> , 2001	96 tintos 15 brancos	<0,001 a 3,856 µg/L	norte de Itália – 100 % < 0,2 µg /L sul de Itália – 80% > 1 µg/L
DGCCRF, Bordéus 2001	230 vinhos	1% ultrapassa 1 µg/L	

Tabela 1. Teores de ocratoxina A encontrados em vinhos

Otteneder e Majerus (2000) estudaram a influência do tipo de vinho e da sua origem geográfica nos teores de OTA, tendo concluído que:

- (i) a origem geográfica parece afectar as diferenças encontradas entre os teores de OTA de vinhos do norte e do sul da Europa, verificando-se maior incidência nos vinhos tintos do sul da Europa;
- (ii) a tecnologia de vinificação também é muito importante, pois existem diferenças significativas entre vinhos brancos e tintos (que contêm mais OTA). Nestes últimos, os tratamentos com enzimas pectolíticas apresentam maiores teores. A explicação parece residir no maior contacto entre as películas e o mosto, destinada a favorecer a extracção dos compostos responsáveis pela cor, associada a maiores temperaturas e inibição da fermentação alcoólica.

Incidência de ocratoxina A em vinhos portugueses

Relativamente aos vinhos portugueses, apesar de literatura estrangeira citar teores máximos da ordem de 0,337 $\mu\text{g/L}$ num conjunto de 5 vinhos licorosos analisados (Zimmerli e Dick, 1996), um trabalho anteriormente efectuado por nós provou, através de uma amostragem de 64 vinhos (Vinho do Porto e Vinho Verde), que o teor máximo de OTA não excedeu 0,080 $\mu\text{g/L}$ (Festas *et al.*, 2000). Admitindo a possibilidade da Comunidade Europeia adoptar limites máximos legais num futuro próximo, urge a obtenção de um banco de dados nacional, que possam ajudar nessa tomada de decisão. Foi esse um dos objectivos subjacentes aos dois projectos cujos resultados hoje se apresentam.

O projecto Agro n.º 255 – *Prevenção da Contaminação Fúngica em Vinho do Porto e em Vinho Verde*, em colaboração com a Universidade do Minho, o Instituto do Vinho do Porto e a Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes, tem como objectivos:

- (i) Promover a segurança alimentar, através da avaliação da extensão da contaminação fúngica e/ou presença de ocratoxina A em vinhos de qualidade da Região Norte – Vinho do Porto e Vinho Verde;

- (ii) Definir as origens da contaminação desde a vinha até ao vinho, no sentido de ajudar à prevenção antes do processo de fermentação. Embora se reconheça que a prevenção passe pela adopção de boas práticas agrícolas, que incluem a utilização de variedades resistentes, a protecção integrada das culturas, a utilização de uvas em estado sanitário apropriado e as correctas condições de manuseamento à data da vindima, o conhecimento de outros factores que possam influenciar o aparecimento de OTA nos vinhos (como os climatológicos e a predisposição de certas regiões/castas para a contaminação fúngica), não é de desprezar. Por outro lado, pretende avaliar-se, no caso da contaminação fúngica existir, quais os processos tecnológicos de vinificação que influenciam, negativa ou positivamente, o nível final de OTA no vinho.
- (iii) Reduzir a contaminação de OTA nos vinhos, nas situações em que não tenha sido possível, através de mecanismos apropriados de prevenção, evitar o seu aparecimento. Nestes casos, pretende-se elucidar quais os processos tecnológicos mais apropriados para eliminar a OTA dos vinhos, sem perder características sensoriais.

Relativamente ao projecto em colaboração com o IVV – *Ocratoxina A em Vinhos Nacionais* – pretendeu-se conhecer a situação efectiva dos vinhos nacionais e fundamentar cientificamente a eventual adopção futura de um limite.

Material e métodos

Amostras. Foram analisadas 340 amostras de vinho (189 Vinhos do Porto, 85 Vinhos Verdes e 66 Vinhos de outras regiões nacionais, onde se incluíram VQPRD, VLQPRD e Vinhos Regionais). Relativamente ao controlo das uvas efectuou-se uma amostragem na Região do Douro e dos Vinhos Verdes, na vindima de 2002, correspondente a um total de 122 amostras. Este estudo apenas reporta os resultados obtidos até ao momento – 58 amostras analisadas.

Reagentes e Equipamento. Utilizaram-se reagentes e solventes orgânicos de grau de pureza apropriado para detecção por fluorescência. O padrão de ocratoxina A foi adquirido através da Sigma-Aldrich. Na extracção usaram-se colunas de imunoafinidade Ochratest, da Vicam e

um evaporador rotativo Heidolph com bomba de vácuo KNF Neuberger. O HPLC estava equipado com detector de fluorescência e injetor automático programável Merck Hitachi e a coluna cromatográfica era Nucleosil 100-5 C18, de 5 μm .

Método analítico. Para a análise de vinhos utilizou-se o método descrito no projecto de Norma Europeia – prEN 14133, com as seguintes alterações:

- (i) desgasificaram-se 10 mL de vinho durante 15 min, à excepção do Vinho Verde (5 min);
- (ii) a solução-mãe do padrão de OTA foi preparada em tolueno/ácido acético (99:1) e os padrões de calibração foram obtidos a partir deste por diluição na fase móvel usada no HPLC;
- (iii) após a extracção de OTA, evaporou-se o metanol à secura no evaporador rotativo (em vez de corrente de azoto) e retomou-se em 1 mL de fase móvel (em vez de 250 μL);
- (iv) o volume de injeção foi de 118 μL em vez de 100 μL ;
- (v) os parâmetros de operação da análise cromatográfica foram optimizados e estão descritos em Festas et al (2000).

Para análise de uvas/mostos não existe método de referência, pelo que se utilizou o descrito por Pietri *et al.* (comunicação pessoal, 2001).

Resultados e discussão

Avaliação da incerteza associada aos resultados de ocratoxina A em vinhos

Numa primeira fase deste trabalho procedeu-se a ensaios de optimização do método analítico para determinação de OTA em vinhos, que permitiu adoptar a Norma Europeia (prEN 14133), com as alterações já referidas. Apresentam-se nas Figuras 2 e 3 os cromatogramas de um padrão de OTA, de um vinho contendo um teor de 2 $\mu\text{g/L}$ de OTA.

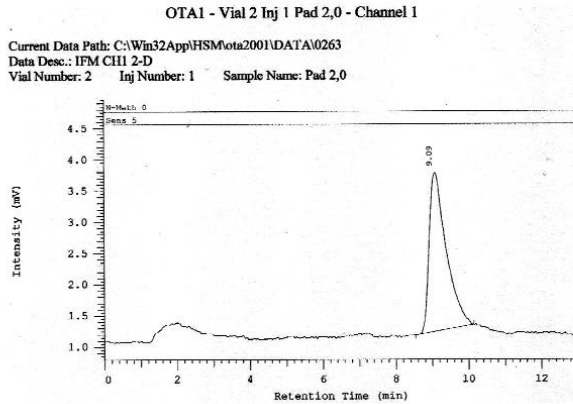


Figura 2. Cromatograma de um padrão de OTA 2 µg/L

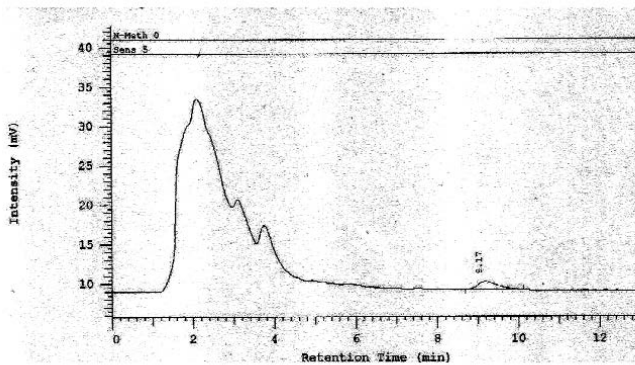


Figura 3. Cromatograma de um vinho tinto

Após a obtenção dos principais parâmetros de validação – linearidade e limite de detecção, repetibilidade e precisão intermédia, e exactidão através da percentagem de recuperação, calculou-se a incerteza global associada aos resultados.

As principais características deste método são:

- (i) O limite de detecção do método situa-se em $0,084 \mu\text{g/L}$ para vinhos e $0,105 \mu\text{g/L}$ para uvas (o que equivale em média a $0,064 \mu\text{g/Kg}$ uva);
- (ii) A precisão do método, quer avaliada pela repetibilidade (coeficiente de variação obtido a partir de 6 ensaios independentes executados nas mesmas condições analíticas, no mais curto intervalo de tempo), quer pela precisão intermédia (coeficiente de variação obtido com 6 ensaios independentes em dias diferentes), é de 4,9 % e 6,2 %, respectivamente, para um padrão de $1 \mu\text{g/L}$, e de 1,0 % e 1,3 %, respectivamente, para um padrão de $4 \mu\text{g/L}$;
- (iii) A exactidão do método, expressa em percentagem de recuperação (obtida por adição de 3 níveis de padrão a 5 amostras) foi de $105,7 \pm 26,9 \%$ para Vinho do Porto e $116,9 \pm 18,8 \%$ para Vinho Verde;
- (iv) Foi ainda estudada a especificidade do método, através da avaliação da interferência do teor em açúcar e do etanol, na eficiência da extracção de OTA pelas colunas de imunoafinidade. Nenhuma interferência significativa destes parâmetros no processo de extracção de OTA foi encontrada;
- (v) A incerteza global depende do intervalo de concentrações a que se reporta o resultado. Para níveis de OTA superiores a $0,500 \mu\text{g/L}$, a incerteza global é de 36,8 % e, para teores de OTA sucessivamente mais baixos, a incerteza vai aumentando até cerca de 70 %, na proximidade do limite de detecção – $0,084 \mu\text{g/L}$ (fig. 4).

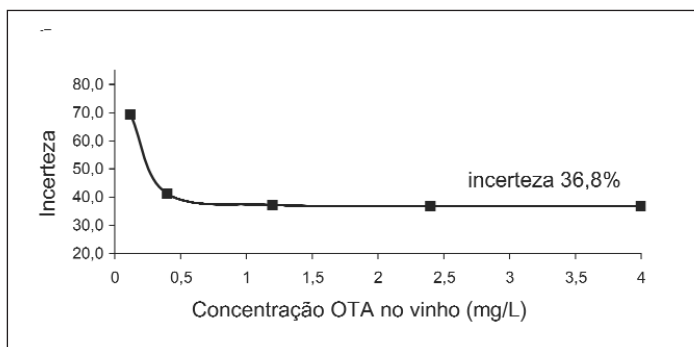


Figura 4. Incerteza global associada aos resultados

Realizou-se um ensaio preliminar de intercomparação, entre os laboratórios envolvidos no projecto AGRO – LEPÆ-DEQ-FEUP e DEB-UMINHO, não se tendo verificado diferenças significativas, ao nível da incerteza referida atrás. Julga-se, no entanto, imperiosa a realização de um ensaio colaborativo internacional, envolvendo o maior número possível de laboratórios experientes neste tipo de análises, de forma a validar definitivamente a técnica nas matrizes estudadas – Porto e Verde. Esta acção já foi promovida, encontrando-se na fase de arranque.

Rastreo de ocratoxina A em vinhos portugueses

A Tabela 2 descreve a amostragem efectuada aos vinhos nacionais, bem como os principais resultados obtidos. Por serem os vinhos abrangidos especificamente pelo Projecto AGRO, o Vinho do Porto e o Vinho Verde contribuem com um maior número de amostras estudadas, sendo por isso os seus resultados apresentados em detalhe (figs. 6 e 7).

	Origem	Vinhos analisados (n.º)	Vinhos com OTA superior a limite de detecção (nº / %)	Nível de OTA Média/Máximo µg/L
Amostragem do Projecto AGRO	Vinho do Porto	189	33 / 17 %	0,1368 / 0,4744
	Vinho Verde	85	20 / 24 %	0,1202 / 0,2411
Vinhos nacionais Amostragem do IVV	6 Bairrada 8 Dão 4 Trás-os-Montes 3 Pico 8 Setúbal 3 Távora 6 Douro 3 Bucelas 1 Arruda 4 Madeira 12 Alentejo 8 Ribatejo	66	16 / 24 %	0,2152 / 0,3344 *
	Global	340	69 / 20 %	0,1371 / 0,4744

* Para efeito de média e valor máximo foram excluídos dois vinhos com teores superiores a 0,5 µg/L (2,08 e 0,96 µg/l)

Tabela 2. Resultados médios de ocratoxina A em Vinhos Portugueses

Foi detectada ocratoxina A em cerca de 20 % dos vinhos totais analisados, não havendo distinção relativamente a maior incidência em algum tipo de vinho e/ou região. Destes 69 vinhos, 2 continham OTA em teores superiores a $0,5 \mu\text{g/L}$ e os restantes situaram-se abaixo deste valor (fig. 5). É de salientar que a incerteza associada a níveis de concentração de OTA abaixo de $0,5 \mu\text{g/L}$ é da ordem dos 70 %, o que significa que a fronteira entre os vinhos que contêm OTA abaixo de $0,5 \mu\text{g/L}$ e os que figuram como «OTA não detectada», é muito ténue.

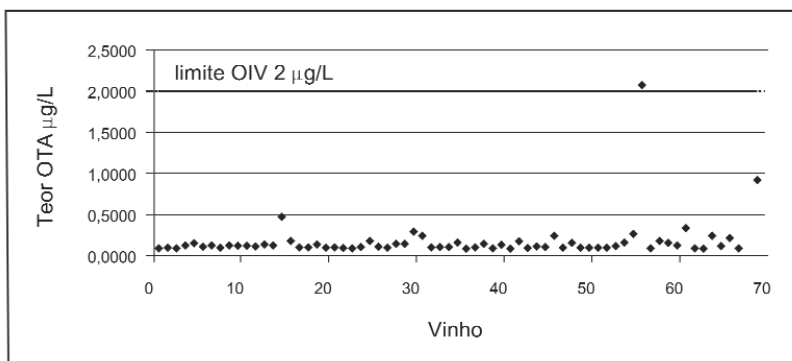


Fig. 5. Teores de OTA encontrados em 69 dos 340 vinhos nacionais analisados (limite de detecção = $0,084 \mu\text{g/L}$)

As figuras 6 e 7 traduzem os resultados das análises efectuadas ao Vinho do Porto e Verde. Como se pode verificar, não existe influência do tipo de vinho nos teores encontrados. Em particular, relativamente ao Vinho do Porto, parece constatar-se que os teores de OTA se dispersam entre vinhos de diferentes tipos, bem como de diferentes idades. A amostragem do Vinho do Porto incluiu vinhos de colheita, vinhos com indicação de idade e categorias especiais. Em particular destaca-se um conjunto de 30 vinhos Vintage 2000, nos quais foi detectada OTA em 8 dos mesmos, em quantidades vestigiais. Este facto não aparenta ser significativamente diferente dos restantes tipos de vinho analisados, mesmo aqueles com idade superior a 40 anos.

Estes resultados permitem questionar se a presença de OTA nos vinhos existiu em quantidades vestigiais desde sempre, sendo só possível a sua detecção com as capacidades analíticas actuais. Diversos autores

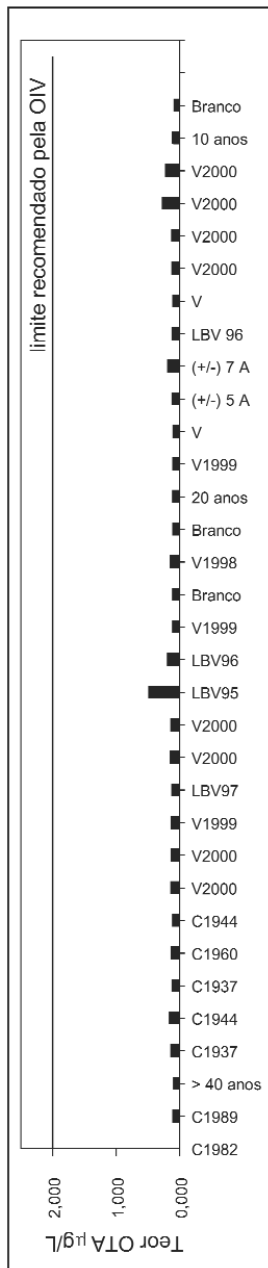


Fig. 6. Teores de ocratoxina A em Vinho do Porto (C - Colheita; V - Vintage; > x anos - Com indicação de idade; LBV - Late Bottled Vintage)

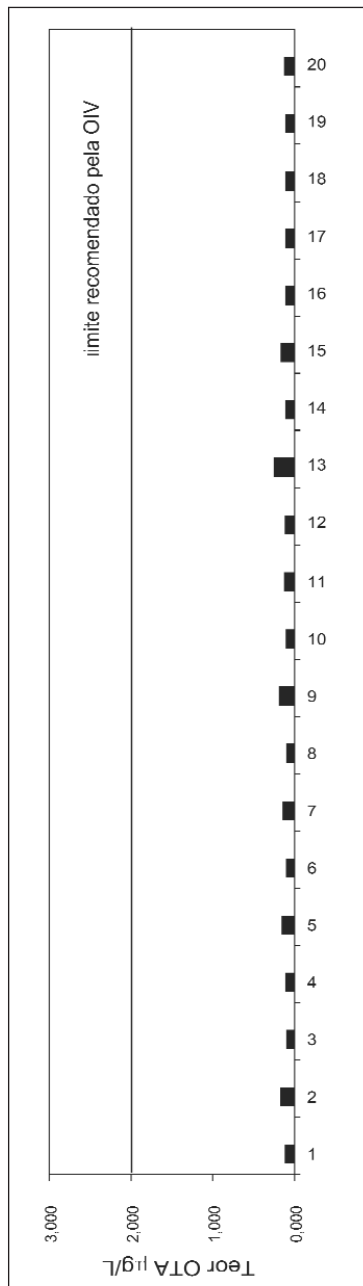


Fig. 7. Teores de ocratoxina A em Vinho Verde

apontam para teores mais elevados de ocratoxina A em vinhos de ambos os tipos, mas o teste de significância aplicado às médias do teor de OTA dos vinhos brancos e dos vinhos tintos, não revelou diferenças significativas, talvez fruto dos baixos níveis detectados em todos os vinhos.

Excluindo dois vinhos que apresentavam teores de OTA superiores a $0,5 \mu\text{g/L}$, dos 109 vinhos brancos analisados, 29 continham OTA em concentração inferior a $0,2411 \mu\text{g/L}$. Relativamente aos vinhos tintos, 40 dos 229 vinhos revelaram quantidades de OTA menores que $0,4744 \mu\text{g/L}$.

Rastreio de ocratoxina A em uvas

Durante a vindima de 2002 foram recolhidas 122 amostras de uvas, das quais 58 se encontram até ao presente analisadas. Com critérios de amostragem pré-estabelecidos, que incluíram uma percentagem idêntica de uvas sãs e com sinais de podridão, as amostras distribuíram-se pelos locais assinalados nas Figuras 8 e 9, do seguinte modo:

- (i) Região Demarcada do Douro – 14 quintas; 75 amostras, distribuídas pelas castas: touriga nacional, 13; touriga francesa, 12; tinta barroca, 13; tinta roriz, 13; tinto cão, 11; tinta amarela, 5; malvasia fina, 2; rabigato, 1; viosinho, 1; códega, 1; esgana cão, 1 e gouveio, 1.
- (ii) Região Demarcada dos Vinhos Verdes – 14 quintas; 47 amostras, distribuídas pelas castas: vinhão, 9; trajadura, 7; arinto, 10; borraçal, 5; loureiro, 6; pedernã, 4; azal, 4 e avesso, 2.

Para avaliar os teores de OTA em uvas, e devido à inexistência de um método analítico de referência, foi necessário executar ensaios preliminares para comparação dos resultados obtidos com diferentes processos de extracção, bem como validar a metodologia implementada. Obteve-se um limite de detecção de $0,105 \mu\text{g/L}$ e uma incerteza global associada aos resultados idêntica à obtida com vinho.

De seguida procedeu-se à análise das uvas, tendo sido detectada ocratoxina A em apenas uma das 58 amostras analisadas até ao momento, com um teor de $0,1102 \mu\text{g/L}$.

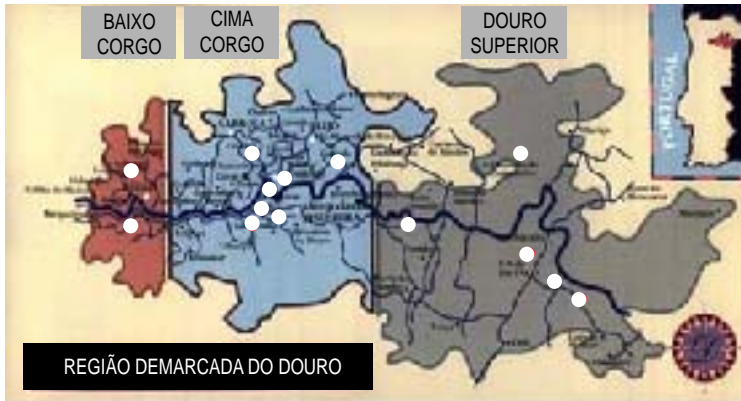


Fig. 8. Amostragem de uvas na Região Demarcada do Douro (locais assinalados com círculo branco)



Fig. 9. Amostragem de uvas na Região Demarcada dos Vinhos Verdes com indicação das castas (locais assinalados com círculo branco)

Estes resultados são, em certa medida, concordantes com os obtidos nos vinhos, os quais apresentam apenas quantidades residuais de ocratoxina A. A presença de OTA nos vinhos pode resultar da existência do composto na própria uva ou da sua produção durante o processo de vinificação, através de fungos ocratoxigénicos. Neste caso, uma vez que os teores encontrados são extremamente baixos, tanto nas uvas como nos vinhos, devemos questionar o método utilizado na análise das uvas, pois o procedimento de extracção pode não ser suficientemente eficiente para tornar detectáveis os níveis provavelmente baixíssimos. De qualquer forma, este estudo permite concluir que os teores encontrados em uvas e vinhos são claramente baixos e não preocupantes.

Conclusões

Para avaliar a presença de ocratoxina A em uvas e vinhos portugueses e retirar um significado fiável dos níveis obtidos, procurou-se estudar, em primeiro lugar, a incerteza associada aos resultados, na gama de concentrações encontrada. Concluiu-se que a incerteza é elevada, da ordem de 70 % para concentrações inferiores a 0,5 µg/L, reduzindo-se para 37 % para concentrações superiores a este valor. Ou seja uma concentração de 0,20 µg/L estará associada a uma incerteza de $\pm 0,14$ µg/L, o que equivale a um valor máximo de 0,34 µg/L e um valor mínimo de 0,06 µg/L (que se situa abaixo do limite de detecção da técnica). Assim sendo, o significado atribuído aos vinhos onde foi detectada OTA a níveis inferiores a 0,5 µg/L é semelhante ao daqueles em que esta não é detectada.

Quanto aos resultados obtidos, foi detectada ocratoxina A em cerca de 20 % dos 340 vinhos analisados, não havendo distinção relativamente a maior incidência em algum tipo de vinho e/ou região. Destes 69 vinhos, 2 continham OTA em teores superiores a 0,5 µg/L e os restantes situaram-se abaixo deste valor

Relativamente à distinção entre vinhos brancos e tintos, dos 110 vinhos brancos analisados, 29 continham OTA, encontrando-se um teor máximo de 0,2411 µg/L. Relativamente aos vinhos tintos, 40 dos 229 vinhos revelaram quantidades de OTA inferiores a 0,4744 µg/L.

Quanto à análise das uvas provenientes da vindima de 2002 (112 amostras), foi detectada ocratoxina A em apenas uma das 58 amostras analisadas até ao momento (teor de 0,1102 µg/L).

De uma forma global pode afirmar-se que a situação geral nacional no que se refere à contaminação de vinhos com Ochratoxina A não é de forma alguma preocupante.

Agradecimentos

A todos quantos directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho, em particular aqueles que participaram na árdua tarefa de execução dos ensaios analíticos: Nuno Ratola Neto (FEUP); Luís Filipe Martins (FEUP); M.^a da Conceição Mota (IVP) e Stefanie Cocquijt (Estagiária Erasmus).

Bibliografia

- Abrunhosa, L., Paterson, R. R. M., Kozakiewicz, Z., Lima, N. e Venâncio, A. (2001) Mycotoxin Production from fungi isolated from grapes. *Letters in App. Microb.*, 32: 240-242.
- Abrunhosa, L., Serra, R. e Venâncio, A. (2002) Biodegradation of ochratoxin A by fungi Isolated from grapes. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7493-7496
- Anonymous. (1998). Overview of the occurrence and significance of mycotoxins in grape juice, dried grapes and wine. Office International de la Vigne et du Vin. F. Bleu 47-2535/020398
- Castellari, M., Fabbri, S., Fabiani, A., Amati A. e Galassi, S. (2000). Comparison of different immunoaffinity clean-up procedures for high-performance liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in wines. *J. Chromatogr. A*, 888: 129-136.
- European Commission, (1996). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states, SCOOP Report DG III Publisher.
- European Committee for Standardization (2001). Foodstuffs – Determination of Ochratoxin A in wine and beer – HPLC method with clean-up on a immunoaffinity column. prEN14133.
- Festas, I. Herbert, P., Santos, L. Cabral, M. e Alves, A. (2000). Ochratoxin A in some Portuguese wines: method validation and screening in Port wine and Vinho Verde. *Am. J. Enol. Vitic.* 51:150-154
- International Agency for Research on Cancer (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: 56: 489-521.
- Majerus, P. e Otteneder, H. (1996). Nachweis und vorkommen von ochratoxin A in wein und traubensaft, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 92 (12): 388-390.
- Otteneder, H. e Majerus, P. (2000). Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Addit. Contam.*, 7: 793-798.

- Pietri, A. Bertuzzi, T., Pallaroni, L. e Piva, G. (2001). Occurrence of ochratoxin A in Italian Wines. *Food Addit. Contam.* 18:647-654.
- Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z. e Venâncio, A. (2003). Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int. J. Food Microbiology* 2736: 1-6.
- Tricard, C. J.B. Bourguignon, M. Labardin, J. M. Cazabeil e B. Medina. (1999). Dosage de Ochratoxine A dans les vins: validation interlaboratoire, Feuillet Vert OIV, OIV, n.º 1090.
- Visconti, A., Pascale e M., Centonze, G.. (1999). Determination of Ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 864:89-101.
- Zimmerli, B. e Dick, R. (1996). Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit. and Contam.*, 13: 655-668.

Biodinámica de implantación de micobiotica y efectividad de fungicidas en el control de las especies ocratoxigénicas en el viñedo. Resultados de la reducción del contenido en ocratoxina en el vino

Santiago Mínguez

Instituto Catalán de la Viña y el Vino. Estación de Viticultura y Enología
Vilafranca del Penedès. Barcelona. España

e-mail: incavi.vila@troc.es

Introducción

La ocratoxina A, (OTA), es un contaminante alimentario identificado en cereales, oleaginosas, cacao, café, frutos secos, cerveza, pan, carnes y en la última década en pasas, mostos y vinos (Zimmerli, 1996). Tras el consumo de alimentos contaminados, su presencia se puede constatar en la sangre, suero y tejidos de las personas. Los efectos tóxicos son muy amplios como demostraron Creppy y col., en 1995. Su presencia en los vinos va desde contenidos no detectables (con límites de detección situados en 0.003 µg/L), hasta niveles que superan los 10 µg/L.

Ante esta situación la FAO-OMS, en una sesión de la Comisión del *Codex Alimentarius* sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes (FAO-OMS, 1997) tomó postura y impulsó a que todos los Estados tomasen conciencia del problema de salud que puede representar la OTA y para que establecieran y asegurasen las buenas prácticas agrícolas y de elaboración que permitiesen evitar o disminuir la presencia de aquella en los alimentos y bebidas.

Por su parte, la Oficina Internacional de la Viña y el Vino, llamó paralelamente la atención sobre el problema que podía suponer en el futuro esta micotoxina y, en una llamada a través de sus Grupos de Expertos, impulsó la búsqueda de los medios de prevención de dicha contaminación, así como también, caso de producirse aquella, de los medios que

disminuyan el contenido de OTA a niveles sin riesgo para la salud humana.

El agente causal de la generación de OTA fue durante un tiempo desconocido, siendo después relacionado su presencia a los hongos de las especies *Penicillium verrucosum* en países septentrionales y *Aspergillus ochraceus* en países meridionales (Majerus y Otteneder, 1996; Pittet, 1998; Ospital y col., 1998; Otteneder y Majerus, 1999). Sin embargo, Cabañes y col., (2001 y 2002) han demostrado que los agentes principales causantes de la contaminación de OTA en la totalidad de los viñedos controlados en diversas experiencias realizadas en España, pertenecen a la especie *Aspergillus carbonarius*.

Los estudios sobre los niveles de contaminación existente en los vinos, han demostrado que la mayoría de los valores de OTA se encuentran en orden creciente desde los vinos blancos a los rosados y los tintos. Sin embargo aún es posible encontrar valores más altos en vinos de licor (Zimmerli, 1996; Majerus y Otteneder, 1996; MAFF 1998; Ospital y col., 1998; Burdaspal y Legarda, 1999; Otteneder y Majerus, 1999; Mínguez y col., 2000; Tateo y col., 2000; Mínguez y col., 2001; Tateo y Bononi, 2001).

La contaminación de OTA en los vinos puede ser un condicionante del desarrollo comercial de los productos vitivinícolas. Ciertos estudios han concluido que los vinos que proceden de las áreas meridionales poseen mayor contenido de OTA que aquellos procedentes de áreas más septentrionales (Majerus y Otteneder, 1996; Ospital, 98; Otteneder y Majerus, 1999). Al mismo tiempo se contempla a corto plazo una regulación sobre el contenido de dicho contaminante en los vinos (MAFF, 1997).

Actualmente la producción del vino de las áreas cálidas está sometida a inspecciones sanitarias en muchos países importadores. La respuesta de los países de estas áreas cálidas debe desarrollarse en dos vertientes: por un lado, deben dar una respuesta político-sanitaria, consistente en demostrar la falacia de la generalización del problema y por otro ofrecer una eficaz respuesta técnica, consistente en identificar los factores de producción que la hacen posible dicha contaminación, planteando el código de técnicas vitivinícolas que pueden minimizar o eliminar el riesgo de la presencia de dicha micotoxina.

En España, el sector vitivinícola en sus diversos niveles productivos y las diferentes Administraciones (Central y Autonómicas), estuvieron interesados en atender dicha llamada y apoyaron diferentes equipos de trabajos que tuvieron interés por conocer el origen del problema, las

claves de su resolución y, por ello, orientar la normativa que debe ser establecida sobre límites máximos.

Entre de los diferentes equipos equipos deben destacarse:

- el configurado por los Dres. P. A. Burdaspal y T. M. Lagarda en el Ministerio de Sanidad y Consumo, que realizó el primer estudio, por su amplitud, en España sobre los valores de Ocratoxina en vinos,
- el perteneciente al Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Lleida, coordinado por el Dr. V. Sanchís, con enfoque en estudios sobre la micología responsable de la producción de OTA, y
- el configurado entre la Unidad de Microbiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona (coordinado por el Dr. Cabañes) con acciones en micobiótica, el Laboratorio Arbitral Agroalimentario del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (coordinado por el Sr. A. Pons), con acciones analíticas de OTA, el Servicio de Protección de los Vegetales de la Generalidad de Cataluña (coordinado por el Sr. G. Barrios), con acciones de lucha fitosanitaria, la bodega Coop. de Sarral, SCCL (coordinado por el Sr. S. Guardiola) con acciones experimentales en bodega, la bodega La Baronía de Turís, Coop.V. (coordinado por la Sra. M. Blasco y V. Riera), con acciones experimentales en bodega, el Grupo Syngenta (coordinado por el Dr. P. Margot y J.M. Cantus) con acciones de lucha fitosanitaria y el Instituto Catalán de la Viña y el Vino, que actuó como coordinador general.

En base a éste último equipo interdisciplinar se acometieron y en fase de desarrollo diferentes proyectos de trabajo:

- *Incidencia de la sanidad de la vendimia y de las prácticas enológicas sobre el contenido de Ocratoxina A (OTA) en el vino (VIN00-022-C3), financiado por INIA (Ministerio de Ciencia y Tecnología),*
- *Riesgos de contaminación y control integral de Ocratoxina A en uva y vino (OTA-Wine Risk), proyecto europeo (QLK1-CT-2001-*

01761) en colaboración interdisciplinar con diferentes países del área mediterránea,

- *Estudio de la biodinámica de implantación de Aspergillus spp en el viñedo, efecto de la lucha preventiva y de las técnicas postcosecha, para reducción del contenido de Ocratoxina A en los vinos de licor, (VIN02-023), financiado por el INIA (MCyT), y en el que participan también el Instituto Valenciano de Calidad Agroalimentaria (Valencia) coordinado por el Dr. J.V. Guillem, y en Andalucía el CIFA-Rancho de la Merced (coordinado por la Sra. A. Jimenez y el Dr. A. García) y la E.T.S.I. Agrónomos de Córdoba, coordinado por el Dr. F. Pérez Camacho.*
- *Efectividad de la lucha fitosanitaria, en colaboración con el Grupo Syngenta.*

Resultados obtenidos en la lucha contra la OTA

En un estudio preliminar, realizado por nuestro equipo, realizado en el año 2000, se observó que los posibles factores condicionantes de la presencia y contenido de OTA se sitúan tanto en el ámbito de la protección fitosanitaria de la viña, como en el de las operaciones prefermentativas y postfermentación (Mínguez y col, 2000).

En dicho trabajo, se pudo observar que las condiciones de sanidad de la vendimia, en relación directa con la maduración y sobremaduración, podían jugar un papel destacado en la presencia de Ocratoxina A en el vino, por lo que debían desarrollarse los mecanismos más eficaces para evitar la proliferación de los hongos causantes.

También se observaba que los niveles de OTA podían estar en relación con las condiciones en que se desarrollaba la clarificación. Asimismo, las pautas técnicas de la extracción del mosto, (principalmente la energía del prensado), de la maceración y de la clarificación del vino podrían ser los elementos más condicionantes de los niveles de OTA en el vino cuando la contaminación está presente en la uva.

Cuando la presencia de hongos en la uva es importante, especialmente de la *Sección Nigri* del género *Aspergillus* spp., existen muchas posibilidades de tener una contaminación del mosto significativa en OTA, puesto que a ésta sección pertenecen las cepas que son productoras de OTA.

En los trabajos realizados hasta ahora por nuestro equipo de trabajo y en el área productiva mediterránea española, se ha visto que si bien en la uva se dan una serie de poblaciones de la *Sección Nigri* del género *Aspergillus*, las cepas potencialmente OTA-génicas pertenecen a *A. ochraceus*, *Agregado A. niger* y *A. carbonarius*. Una de las características apreciadas en estos estudios es que las cepas de *A. niger* que se han aislado en los viñedos muestreados no son productoras de OTA.

Por el contrario, todas las cepas de *A. carbonarius* y *A. ochraceus* aisladas han expresado su producción de OTA, habiendo demostrado nuestro equipo científicamente y por primera vez que han sido las responsables del contenido de OTA en sus vinos, (Cabañes y col., 2001). Posteriormente Sage y col. (2002) también han encontrado que tras inoculación de *A. carbonarius* y *Penicillium chrysogenum* en uvas (experiencia en laboratorio), sólo *A. carbonarius* era OTA-génica.

La estrategia de la lucha preventiva a realizar en el viñedo estará en función de la dinámica de presencia de *Aspergillus* en el racimo. En controles realizados en diferentes viñedos, se observa una evolución creciente de la población durante todo el proceso de maduración (fig. 1).

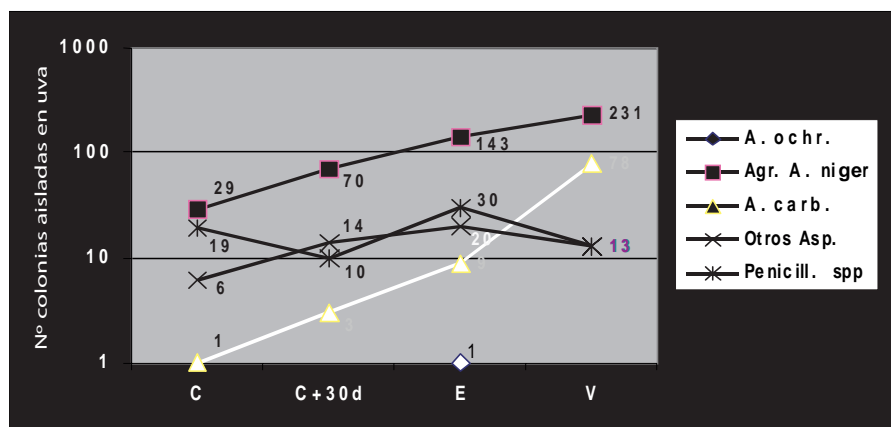


Fig. 1. Evolución de especies relacionadas con la producción de ocratoxina A. (Accensi y col., 2001a). Análisis: Depto. Microbiología e Inmunología (UAB). Proyecto: OTA-INIA

Por las observaciones realizadas hasta la fecha, es posible afirmar que en todas aquellas prácticas culturales que favorezcan la sanidad de la viña, (abonados y riego racionales, vigor moderado, entre otros), así como la protección fitosanitaria del viñedo (lucha química y biológica principalmente) están las claves de la contención del problema de la presencia de OTA en mosto y la contaminación inherente del vino.

La protección fitosanitaria contra la población de *Aspergillus* ha de basarse en que los productos anticriptogámicos a emplear deben tener una verdadera eficacia en el control del hongo (fig. 2) y en el periodo de cobertura de la protección que realizan (Mínguez, 2000). Este hecho es importante principalmente para los viñedos destinados a la producción de vinos con uva de buena maduración o sobremaduras por deshidratación (ya sea en la cepa o después de vendimiar).

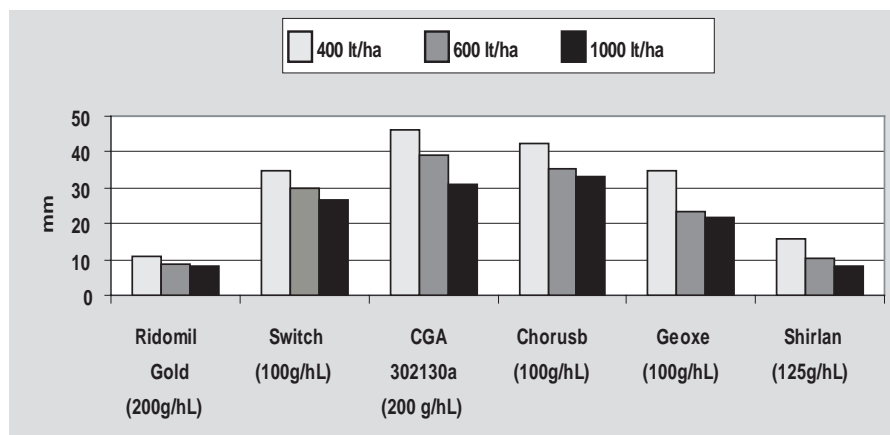


Fig. 2. Efectividad de los fungicidas *in vitro* sobre especies OTA-génicas (Accensi y col, 2001b). Método: Difusión en agar (*Screening*); Datos: medida de halos de inhibición; Hongo: *Aspergillus carbonarius*, cepa: P23D3.; Analisis: Depto. Microbiología e Inmunología (UAB). Proyecto: OTA – INIA- Syngenta

Los vinos de mayor graduación o aquellos que se producen con técnicas de sobremaduración son, aquellos que tienen más riesgos de poseer un nivel de contaminación de la OTA A más elevado. Estos vinos, debido a las temperaturas que se producen durante la maduración, la vendimia

y la consiguiente época posterior, son característicos de los países meridionales y cálidos.

Desear llegar a una completa madurez o sobremadurez, habitual en los viñedos cuyo destino es producir vinos singulares y de licor, tiene el riesgo que la protección fitosanitaria realizada por el último tratamiento desaparezca.

Puesto que el grupo *Aspergillus* spp. tiene más posibilidades de desarrollarse en la época de mayor temperatura, y que la piel de la uva se ablanda y se vuelve más sensible al ataque de la micoflora en dicha época, todo conduce a que en los vinos procedentes de una alta madurez tengan más riesgos de presencia indeseable de OTA.

Las experiencias conducidas sobre estrategia de tratamientos anti-botrytis en el viñedo han permitido ver que, en la mayoría de los casos en que ésta ha sido correctamente realizada, se correlaciona bien con una inexistente o testimonial concentración de OTA en mosto y vino (Giralt y col., 2003; Mínguez y col., 2003) (fig. 3).

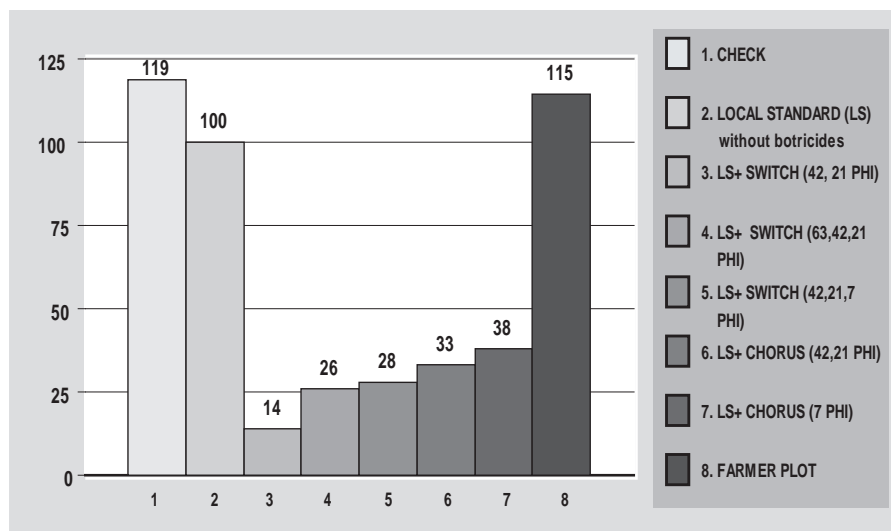


Fig. 3. Mycotoxin trials 209-2002. OTA in grape juice, % in relation to treat. n° 3. (Giralt y col., 2003). Variety: Tempranillo; Protocol: according OTA-INIA-Group Syngenta. Vinification: INCAVI-Reus; Analysis: INCAVI, LAA-MAPA

Asimismo se ha comprobado que, una vez la contaminación de OTA se ha producido en mosto y vino, los tratamientos que han disminuido de forma más eficaz la concentración de OTA en dichos productos ha sido la clarificación con carbón activo, dejando sus niveles en niveles testimoniales o con reducciones de hasta el 90 % del valor inicial (Mínguez y col., 2000 y 2001) (cuadros 1, 2, 3 y 4)

Cuadro 1. Incidencia de las prácticas enológicas: Energía del prensado (Mínguez, 2000)

Vinificación	Tratamiento	Ocratoxina A en vino ($\mu\text{g/L}$)
OTA-1. Vinif. c/ maceración	Prensada suave	1.67
OTA-2. Vinif. c/ maceración	Mosto segundas	2.21

Cuadro 2. Incidencia de las prácticas enológicas: Sulfitado (Mínguez, 2000)

Vinificación	Tratamiento	Ocratoxina A ($\mu\text{g/L}$)
Garnacha blanca	Vinificación con maceración SO_2 : 4 g/hL	2.81
Garnacha blanca	Vinificación con maceración SO_2 : 8 g/hL	1.05

Cuadro 3. Incidencia de las prácticas enológicas: Clarificación (Mínguez, 2000)

Vinificación	Antes de clarificar	Después de clarificación
OTA- 1	1.67	1.32
OTA- 2	3.16	2.15
OTA- 3	2.81	1.54
OTA- 4	1.05	0.76

Cuadro 4. Incidencia de las prácticas enológicas: Tratamiento enológico correctivo con Carbón (Mínguez, 2001)

Agitación 60 horas	OTA ($\mu\text{g/L}$)	Disminución %
Testigo	1.976	1.32
Carbón (20g/hL)	0.081	96
Carbón (30 g/hL)	0.04	98
Carbón (40 g/hL)	0.045	97

Bibliografía

- Accensi F. y col., 2001a. Memòria Tècnica de l'INCAVI Año 2001.
- Accensi F. y col., 2001b. Memòria Tècnica de l'INCAVI Año 2001.
- Burdaspal P.A. y Legarda T. M., 1999, *Alimentaria*, Enero-Febrero, 107-113
- Cabañes F.J. y col., 2001, Int. Symp. Of Bioactive Fungal Metabolites Impact and Exploitation, *Act. Symp.*, Swansea. U.K.
- Cabañes F.J. y col., 2002, *J. Food Microbiology*, en prensa
- Giralt Ll. y col., 2003. Memòria Tècnica de l'INCAVI Año 2003.
- Leitner, A. y col, 2002, *J. Analytica Chim. Acta*, 453, (1), 33-41
- MAFF, 1997, Joint Food Safety and Standards Group, *Food Surveillance Inform.*, Sheet n° 130
- Majerus P. y Otteneder H., 1996, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 92, 388
- Mínguez S. y col., 2000, *Compte rendu G.E. Technologie du Vin*, OIV, mars, Paris
- Mínguez S. y col., 2001, *Compte rendu G.E. Technologie du Vin*, OIV, mars, Paris
- Mínguez S. y col., 2002, *Compte rendu G.E. Maladies et Ravageurs de la Vigne*. OIV., mars. Paris
- Ospital M. y col, 1998, OIV, *Feuille Bleu*, n° 45, S.A. 2520/290198
- Otteneder H. y Majerus P., 1999, Congreso de la OIV, Maguncia, *Actas de Enologia*, 184-192
- Pittet A., 1998, Mycotox 98, Symp Internat., *Revue Méd. Vet.*, 149 (6), 479-492
- Sage L. y col. , 2002, *J. Agric. Food. Chem.* 50, 1306-1331
- Tateo F. y col., 2000, *Bull. OIV*, 73 (837-838), 773-783
- Tateo F. y Bononi M., 2001, *Bull. OIV*, 74, (849-850), 773-780
- Zimmerli B. y Dick R., 1996, *Foods additives and contamination*, 13 (6), 655-68

Ocratoxina A – acções desenvolvidas no plano internacional

A. S. Curvelo-Garcia

Estação Vitivinícola Nacional
(Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas)

e-mail: evn.dir@oninet.pt

Introdução

No plano internacional, a definição dos limites em vinhos de espécies químicas consideradas nocivas para o consumidor, bem como o estabelecimento das práticas enológicas a usar para a minimização da sua ocorrência, compete ao OIV (Office International de la Vigne et du Vin), organização inter-governamental, hoje constituída por quase meia centena de Estados membros. São essas definições estabelecidas em Resoluções, aprovadas pela Assembleia Geral da organização, devendo seguidamente os Estados transpô-las para a sua legislação nacional. A elaboração de uma Resolução do OIV obedece a uma tramitação por 8 etapas, nas quais os respectivos Projectos de Resolução são alternadamente analisados pelos Estados e pelos peritos do OIV, igualmente designados por estes, no âmbito dos Grupos de Peritos, Subcomissões e Comissões com competência na respectiva matéria.

Mais concretamente para o caso que estamos a abordar (espécies químicas consideradas nocivas para o consumidor), compete à “Subcomissão Convencional para a Unificação dos Métodos de Análise e de Apreciação de Vinhos” (SCMA) a preparação das Resoluções visando o estabelecimento dos limites e dos respectivos métodos de análise, competindo à “Subcomissão de Nutrição e Saúde” (SCNS), muito principalmente ao seu Grupo de Peritos de Segurança Alimentar, a recolha de estudos científicos de âmbito médico sobre os efeitos fisiológicos e toxicológicos no consumidor. Em opinião que já expressei no órgão oficial do OIV (Curvelo-Garcia, 1999), poderão os projectos de Resolução, nestes casos, ter o ponto de partida em qualquer destas Subcomissões, mas deverão necessariamente ser analisadas pelas duas, bem como inclusi-

vamente por outros Grupos de Peritos com competência em matérias ligadas ao assunto.

Foi o que aconteceu no caso da ocorrência de ocratoxina A (OTA) em vinhos, para a definição dos seus limites e do seu método de análise, processo que decorreu em poucos anos, considerando a complexidade inerente à aprovação de Resoluções em matérias tão sensíveis, e que seguidamente irei descrever.

Ocorrência em vinhos de ocratoxina A – a actividade desenvolvida no seio do OIV

Na 5.^a sessão (1998) do Grupo de Peritos de Segurança Alimentar da SCNS do OIV, foi já o assunto agendado (OIV, 1998a), com apresentação da situação geral do problema e a posição das organizações internacionais (Ruf, 1998). Nessa exposição, são designadamente referidas a posição da “International Agency for Research on Cancer / WHO” (clasificando a OTA no grupo 2B, e considerando ainda insuficientes os estudos científicos existentes para extrapolação para o homem os efeitos cancerígenos encontrados em animais de laboratório), do “Comité misto de Peritos FAO-OMS sobre Aditivos Alimentares / JECFA” (referindo uma dose tolerável diária provisória de 14 ng/kg_{peso corporal}, embora as delegações do Canadá e de países do Norte da Europa tivessem proposto valores bem inferiores, na ordem de 5 ng/kg_{peso corporal}/dia), da “Comissão Científica para os alimentos da Comissão Europeia” (concluindo que o nível de segurança aceitável seria da ordem de “alguns” ng/ kg_{peso corporal}/dia) e do “Comité do Codex Alimentarius sobre os Aditivos e os Contaminantes” (tendo em análise um documento da Suécia, apontando para recomendar níveis de OTA os mais baixos possíveis, para o aprofundamento do exame desses níveis em vinhos e fixando um limite de 5 µg/kg para os cereais e produtos à base de cereais).

Nessa mesma sessão da SCNS, foi também apresentado um documento do Reino Unido (Gilbert, 1998), onde se refere que não tendo embora sido realizado nenhum controlo sistemático sobre a presença de micotoxinas em uvas secas, sumos de uva e vinhos, parece verificar-se a presença de OTA em uvas e uvas secas em teores relativamente elevados (50 µg/kg) e em sumos de uva e vinhos, especialmente de uvas tintas (com teores relativamente baixos, da ordem de 1-2 µg/L).

Ainda nessa sessão, refere-se ainda uma contribuição da França (Ospital *et al.*, 1998), onde os autores apresentam dados de OTA em alguns vinhos franceses e de outros países, comparando-os com os apresentados por outros autores; o número de amostras é contudo, em nossa opinião, muito reduzido e sobretudo sem uma base científica de amostragem. Assim, por estas razões, as conclusões dos autores terão um significado muito reduzido, em termos de perspectivação de definição de limites.

Da discussão havida nessa 5.^a sessão do Grupo de Peritos de Segurança Alimentar da SCNS do OIV, pareceu claro que o factor climático poderá ser importante na ocorrência de OTA em uvas e vinhos, particularmente tintos e que essa ocorrência poderá ter mais significado em vinhos provenientes de determinadas regiões (África do Sul e regiões mediterrânicas, europeias e do Magreb). Concluiu-se parecer não haver grandes problemas de risco derivados dos níveis de ocorrência de OTA em vinhos, embora tenha sido considerada a importância de continuar a ser desenvolvido trabalho nesta área, tendo designadamente sido solicitado a análise do problema a outros Grupos de Peritos do OIV (“Uvas secas e uvas de mesa”, “Tecnologia do vinho” e “Microbiologia do vinho”), considerando essencialmente os aspectos mais preocupantes no que se refere às uvas secas e uvas de mesa. Na 31.^a sessão do Grupo de Peritos de “Tecnologia do vinho” foi já o assunto agendado, tendo os seus membros sido informados do ponto da situação sobre o problema (OIV, 1998b).

Por outro lado, também em 1998, a SCMA do OIV agendou esta questão (OIV, 1998c), sobretudo no âmbito da definição de uma metodologia de análise da OTA em vinhos. Foi apresentado um método de doseamento por HPLC, após extracção por tolueno, apresentando um limite de detecção de 0,01 µg/L (Tricard *et al.*, 1998). Já nessa sessão, o Reino Unido informou a utilização, para o doseamento da OTA em vinhos, por recurso a uma coluna de imunoafinidade.

No ano seguinte, na 6.^a sessão do Grupo de Peritos de Segurança Alimentar, continuou o assunto agendado (OIV, 1999a). Ruf (1999) apresentou um documento da “Finland National Food Administration” (apresentando dados de OTA em vinhos tintos de diversas proveniências, com valores podendo atingir 1,9 µg/L), bem como pareceres sobre o assunto do “Comité Científico” da Comissão Europeia e da Comissão do “Codex Alimentarius”; (indicando valores para a dose diária admissível entre 0,35 e 0,98 µg, constituindo o vinho, a seguir aos cereais, a segunda maior fonte).

Também a SCMA continuou em 1999 com o assunto em agenda (OIV, 1999b), tendo tomado conhecimento do ponto de situação dos trabalhos da SCNS, mas focando essencialmente a sua atenção para a fixação de um método analítico reconhecido internacionalmente. Lehtonen (1999) apresentou um método onde se realiza previamente uma purificação do vinho com uma coluna de imunoafinidade, seguida da análise por HPLC com detecção por fluorimetria. Por outro lado, foi a SMA informada de ter sido recentemente validado o método apresentado no ano anterior por Tricard *et al.* (1998). Foram ainda apresentados dados da presença de OTA em vinhos espanhóis e portugueses (Vinhos do Porto e Vinhos Verdes), concluindo-se não haver razões para qualquer alarme.

Ainda em 1999, foi o tema também agendado, no âmbito da Comissão de Viticultura, pelo grupo de Peritos de “Doenças, Pragas e Protecção da Videira” (OIV, 1999c). O debate havido focou essencialmente o ponto actual do conhecimento sobre as condições de ocorrência de OTA nas uvas, em ligação com o desenvolvimento de fungos dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, facilitado em variedades com bago de película fina, por climas húmidos e em sequência a ataques de oídio ou de depraadores.

Na 7.^a sessão do Grupo de Peritos de Segurança Alimentar (OIV, 2000a), foram designadamente analisadas algumas práticas enológicas orientadas para a redução dos teores de OTA em vinhos, como o emprego de carvão enológico (permitindo uma redução de cerca de 50%, parecendo contudo introduzir alterações no aroma) ou de sílica e gelatina (conduzindo a uma redução de 50% até 90%, sem produzir modificações nos índices de cor ou de polifenóis totais). Foi bem vincado, designadamente com base numa exposição do Reino Unido (Jones & Goldwin, 2000) que o principal problema da presença de OTA é no caso de uvas secas, pelo que a investigação a desenvolver deverá ser sobretudo nesse âmbito.

Evidentemente, também a SCMA continuou em 2000 com o assunto em agenda (OIV, 2000b). A delegação italiana apresentou ainda um método com o emprego de colunas de imunoafinidade (Bezzo *et al.*, 2000), tendo-se estabelecido grande debate essencialmente sobre os princípios de validação usados para os diferentes métodos em apreciação. Tomou ainda a SCMA conhecimento das metodologias enológicas em estudo, sobre a eliminação de OTA em vinhos, e já apresentadas à SCMA. Face à urgência do tema, foi ainda decidido propor ao “Comité Científico e Técnico” (CST) do OIV a aceleração do processo de aprovação do método analítico.

Ainda em 2000, também o Grupo de Peritos de “Tecnologia do Vinho” do OIV agendou o assunto, analisando concretamente diversos factores que poderão influenciar a presença de OTA em vinhos, com base num documento apresentado por Espanha (Minguez *et al.*, 2000): os tratamentos fitossanitários (anti-míldio e anti-podridão) e as práticas enológicas (maceração, clarificação do mosto, prensagem, sulfitagem, clarificação do vinho). Segundo esse documento, a sanidade da vindima é fundamental na prevenção de fungos que poderão originar a formação de OTA, a maceração pelicular origina um incremento da migração de OTA da uva para o mosto/vinho, elevados níveis de dióxido de enxofre na maceração minimizam a ocorrência de OTA nos vinhos, elevadas pressões na prensagem aumentam os teores de OTA e uma correcta clarificação dos mostos e vinhos contribui significativamente para uma diminuição desses teores de OTA nos vinhos.

No âmbito das diferentes especialidades, o conhecimento científico começava assim a ficar estabelecido. Assim, a actividade científica desenvolvida em 2001 e 2002 haveria de ser decisiva, levando à aprovação dos dois documentos-chave, no plano internacional.

Na 8.ª sessão do Grupo de Peritos de Segurança Alimentar (OIV, 2001a), foi analisado um ante-projecto de Resolução, com base no conhecimento já adquirido, propondo um limite máximo de OTA em vinhos de 1 µg/L e propondo o prosseguimento dos estudos visando a redução dos teores de OTA nos vinhos e em outros produtos de origem vitícola, quer no âmbito vitícola quer enológico. Esta proposta teve essencialmente o apoio da Finlândia, com apoio designadamente de Marrocos, e uma oposição muito frontal da Espanha, que sublinhou a necessidade de se dispor de mais estudos sobre o assunto, muito em especial sobre os efeitos cancerígenos da OTA. Foi decidido fazer avançar este ante-projecto na etapa 3, com conhecimento à SCMA.

Em 2001, a SCMA (OIV, 2001b), após longa discussão, acaba por dar parecer favorável ao texto para o projecto de Resolução relativo ao método de análise de OTA em vinhos, com emprego de colunas de imunoafinidade. Não foi possível, por outro lado, encontrar um consenso relativamente ao limite de 1 µg/L, considerado por alguns Estados como o limite desejável (face ao conhecimento existente sobre os efeitos na saúde do consumidor e às possibilidades tecnológicas de conseguir atingir este limite) e por outros como injustificadamente (pelo conhecimento existente quanto a efeitos sobre a saúde do consumidor) penalizador para certos tipos de vinhos; foi decidido aguardar por mais dados,

a apresentar na sessão de 2002, antes de dar um parecer favorável a este projecto.

A 81.^a Assembleia Geral do OIV, realizada ainda em 2001 em Adelaide (Austrália) aprovou a Resolução OENO 16/2001, relativa ao método de determinação de OTA em vinhos, após passagem por coluna de imunoafinidade, por HPLC com detecção fluorimétrica (OIV, 2001c). Com o reconhecimento internacional do método analítico, estava assim concluído o primeiro passo nesta acção.

Ainda neste ano e em 2002, o Grupo de Peritos de “Tecnologia do Vinho” analisou esta questão (OIV, 2001d; OIV, 2002a), designadamente no que se refere à influência de diversos tratamentos ou práticas enológicas visando a minimização de OTA em vinhos. O principal documento em análise foi o apresentado por Dumeau *et al.* (2000).

No essencial, estava ainda aberto a definição do limite máximo de OTA em vinhos. Em 2002, na sua 9.^a sessão, o Grupo de Peritos de Segurança Alimentar debate longamente o problema (OIV, 2002b). Não tendo sido possível a obtenção de consenso sobre a definição deste valor limite, foi decidido levar a questão ao CST do OIV, decisão posteriormente assumida pela própria SCNS. Também em 2002, a SCMA, na sua 42.^a sessão (OIV, 2002c), não conseguindo a obtenção de um consenso sobre o valor limite de OTA em vinhos, decide solicitar a arbitragem do CST, embora propondo um limite provisório de 3 µg/L (5 µg/L para certos vinhos especiais, designadamente provenientes de uvas tendo sofrido uma sobre-maturação).

Foi assim o assunto discutido pelo CST do OIV, na sua sessão de Março de 2002. Foi aprovado um texto, fixando um limite provisório de 2 µg/L e com o objectivo de diminuir este limite significativamente até Janeiro de 2005.

Finalmente, a 82.^a Assembleia Geral do OIV, realizada ainda em 2002 em Bratislava (Eslováquia) aprovou a Resolução CST 1/2002 (OIV, 2002d), fixando um teor máximo de 2 µg/L de OTA em vinhos, a partir da colheita de 2005, incentivando os Estados membros a prosseguir a actividade científica objectivada para a minimização da ocorrência de OTA em vinhos. Ainda assim, a Finlândia apresentou uma declaração, lamentando que os Estados membros não tenham conseguido um consenso sobre a entrada em vigor desse limite de 2 µg/L a partir de 2002.

Conclusões

Foram assim estabelecidos os documentos base, reconhecidos internacionalmente, para o controlo da presença de OTA em vinhos, num lapso de tempo relativamente curto (cerca de 5 anos): o método analítico e o limite máximo admissível. Seguir-se-á ainda provavelmente novas acções por parte do OIV, designadamente no que se refere a indicações relativas a práticas tendentes a minimizar a ocorrência de OTA em vinhos, seja no âmbito vitícola seja no âmbito enológico. Contudo, o percurso até aqui seguido, sempre baseado em critérios científicos e com o concurso das diversas instâncias do OIV envolvidas no assunto, constitui felizmente mais um bom exemplo do funcionamento da sua actividade, facto que nem sempre tem acontecido, como eu próprio há algum tempo o referi (Curvelo-Garcia, 1999).

Bibliografia

- Bezzo, G., Maggiorotto, G., Testa, F. (2000). A method for the determination of specific mycotic contaminants random occurring in wines. OIV, Feuillet Vert, 1097, 2706/070200.
- Curvelo-Garcia, A. S. (1999). Les limites des limites dans le contrôle analytique des vins. Bulletin de l'OIV, 72, 185-191.
- Dumeau, F., Trione, D., Tricard, Ch., Labardin, M., Medina, B. (2000). Influence de divers traitements sur la concentration en ochratoxine A des vins rouges. OIV, Feuillet Bleu, 85, 2722/140200.
- Gilbert, J. (1998). Overview of the occurrence and significance of mycotoxins in grape juice, dried grapes and wine. OIV, Feuillet Bleu, 47, 2535/020398.
- Jones, B. & Goldwin, G. (2000). The occurrence of ochratoxine A in grape products in the UK. (Ref. OIV, 2000a).
- Lehtonen, P. (1999). Quantitative detection of ochratoxin A in wine, Feillet Vert, 1095, 2647/010399.
- Minguez, S., Vilavella M., Nasqué, C., Bartra, E., Sella, J., Villaroya, A., Reyes, J., Giralt, E., Garcia, J., Pons, A., Rodriguez, G., Cabanes, F. (2000). Factores que inciden sobre la presencia de ocratoxina A en el vino. GP "Technologie du Vin", OIV.
- OIV (1998a). Compte Rendu de la 5^e session du Groupe d'experts "Sécurité Alimentaire". OIV, 2572/98-28, 110598.
- OIV (1998b). Compte Rendu de la 31^e session du Groupe d'experts "Technologie du vin". OIV, 2569/98-1, 110598.

- OIV (1998c). Compte Rendu de la 38^e session de la “Sous-Commission Conventiionelle d’Unification des Méthodes d’Analyse et d’Appréciation des vins”. OIV, 2595/98-28, 011098-18.
- OIV (1999a). Compte Rendu de la 6^e session du Groupe d’experts” Sécurité Alimentaire”. OIV, 2667-28, 230899.
- OIV (1999b). Compte Rendu de la 39^e session de la “Sous-Commission Conventiionelle d’Unification des Méthodes d’Analyse et d’Appréciation des vins”. OIV, 2665-99-18, 16081999.
- OIV (1999c). Compte Rendu de la 8^e session du Groupe d’experts” Maladies, Ravageurs et Protection de la Vigne”. OIV, 2663/99-25, 170699.
- OIV (2000a). Compte Rendu de la 7^e session du Groupe d’experts”Sécurité Alimentaire”. OIV, 2787-28, 121200.
- OIV (2000b). Compte Rendu de la 40^e session de la “Sous-Commission Conventiionelle d’Unification des Méthodes d’Analyse et d’Appréciation des vins”. OIV, 2764/00-18.
- OIV (2001a). Compte Rendu de la 8^e session du Groupe d’experts”Sécurité Alimentaire”. OIV, 2830/160701.
- OIV (2001b). Compte Rendu de la 41^e session de la “Sous-Commission Conventiionelle d’Unification des Méthodes d’Analyse et d’Appréciation des vins”. OIV, 2838-18, 100901.
- OIV (2001c). Résolutions de la 81^e Assemblée Générale de l’OIV. OIV.
- OIV (2001d). Compte Rendu de la 34^e session du Groupe d’experts”Technologie du Vin”. OIV, 2765-1, 070900.
- OIV (2002a). Compte Rendu de la 35^e session du Groupe d’experts”Technologie du Vin”. OIV, CII-TECHNO CR 03.2002.
- OIV (2002b). Compte Rendu de la 9^e session du Groupe d’experts”Sécurité Alimentaire”. OIV, CII-SECUAL CR-03.2002.
- OIV (2002c). Compte Rendu de la 42^e session de la “Sous-Commission Conventiionelle d’Unification des Méthodes d’Analyse et d’Appréciation des vins”. OIV, CII-SCMAV-03.2002.
- OIV (2002d). Résolutions de la 82^e Assemblée Générale de l’OIV. OIV.
- Ospital, M., Cazabeil, J. M., Betbeder, A. M., Tricard, C., Creppy, E., Médina, B. (1998). L’Ochratoxine A dans les vins. OIV, Feuillet Bleu, 45, S.A.2519/290198.
- Ruf, J. C. (1998). Situation générale et positions des organisations internationales. OIV, Feuillet Bleu, 46, S.A.2520/100298.
- Ruf, J. C. (1999). Ochratoxine A in wine.
- Tricard, C., Ospital, M., Cazabeil, J. M., Médina, B. (1998). Méthode de dosage de l’ochratoxine A dans les vins. OIV, Feuillet Vert, 1065, 2526/050298.