



PRISCILLA SILVA DE ABREU

**INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM VINHOS
E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DOS
CONSUMIDORES**

LAVRAS – MG

2013

PRISCILLA SILVA DE ABREU

**INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM VINHOS E AVALIAÇÃO DA
EXPOSIÇÃO AOS CONSUMIDORES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luís Roberto Batista

Coorientadora

Dra. Carolina Valeriano

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Abreu, Priscilla Silva de.

Incidência de ocratoxina A em vinhos e avaliação da exposição
dos consumidores / Priscilla Silva de Abreu. – Lavras : UFLA, 2013.
95 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Vitivinicultura. 2. Micotoxinas. 3. Avaliação de risco. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.2

PRISCILLA SILVA DE ABREU

**INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM VINHOS E AVALIAÇÃO DA
EXPOSIÇÃO DOS CONSUMIDORES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 31 de janeiro de 2013.

Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart UNILAVRAS

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza EPAMIG

Dra. Carolina Valeriano UFLA

Dr. Luís Roberto Batista
Orientador

LAVRAS - MG

2013

A Deus, pela presença constante em minha vida, pela força, luz e proteção em
todos os momentos.

Aos meus pais, Marília e Luiz, pelo incentivo, carinho, exemplo e imenso amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela proteção e amparo, e por me dar paz, mesmo nos momentos difíceis, e à Santa Teresinha, por me ajudar a superar os obstáculos, por meio das lições de sua vida.

Ao meu orientador, Dr. Luís Roberto Batista, pela amizade, incentivo, aprendizado e pela grande oportunidade que me deu de dividir comigo o seu conhecimento! Agradeço pela confiança, paciência e por toda a ajuda ao longo desses dois anos.

A Dra. Carolina Valeriano, pela coorientação, disposição em me ajudar, e por estar sempre tão presente.

À Fundação Ezequiel Dias (FUNED), em especial ao Dr. Guilherme Prado, pela parceria e cooperação.

A Thais, à professora Graça e a todos do Laboratório de Cachaça, pela ajuda na condução do experimento.

A Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart, por ser muito mais que uma professora, e sim uma amiga especial que quero sempre ter por perto!

Aos meus pais, sem os quais esta realização não seria possível! Muito obrigada pela presença em todos os momentos da minha vida, por acreditarem em mim e pelo constante incentivo! Com vocês ao meu lado tudo se torna mais leve! Amo muito vocês!

Aos meus avós, pelas orações, pelo carinho e por me mostrarem que com fé e dedicação tudo é possível! Obrigada pelos ensinamentos e exemplos de vida!

Ao meu irmão, pela amizade e por tornar tudo mais divertido, com o seu sorriso lindo e seu jeito todo especial de ser! Você é essencial em minha vida!

A todos os meus tios, em especial a tia Lu, que sempre me apoiou e torceu pelo meu sucesso e felicidade, sem você, impossível...

Aos meus primos, pelos momentos de felicidade e diversão, e aos meus pequenos que, apesar de tão novinhos, me passaram e continuam a passar ensinamentos essenciais, uma alegria única e uma pureza que eu espero levar comigo por toda a vida!

À minha amiga, prima, irmã, Lilian, pela grande amizade, companheirismo, conselhos... Mesmo longe, neste momento você continua contribuindo muito com as minhas realizações!

Aos amigos do Laboratório de Micologia e Micotoxinas do DCA, Michelle, Fabiana Passamani, Ábiah, Fabiana Couto, Gislaine, Thaiana, Luísa, Danielli, Andreza, Nathália, Rafaela, Juliana, Léo, Natasha e Thamara. Obrigada pela ajuda, amizade e pelos muitos momentos de descontração.

A Tatiana e Roseane, pela amizade e por contribuírem para o começo de tudo isso!

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Ciência dos Alimentos e ao Laboratório de Micologia e Micotoxinas, que permitiram a realização deste trabalho, e a todos que, durante este tempo, contribuíram direta ou indiretamente para esta conquista.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro ao projeto, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO GERAL

A avaliação da exposição às micotoxinas constitui um importante aspecto para a saúde pública, tendo em vista a possibilidade de prevenir ou minimizar a incidência de doenças decorrentes da sua interação com o organismo. A OTA tem sido frequentemente encontrada como contaminante de uvas, vinhos e suco de uva, sendo considerada uma das micotoxinas mais prejudiciais à saúde humana. Neste contexto, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a ocorrência de OTA em vinhos nacionais (vinhos de mesa) e importados, bem como avaliar o risco de exposição humana à toxina. A quantificação de OTA nas amostras de vinhos foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção por fluorescência. Parte das amostras analisadas (36,84%) apresentou contaminação por ocratoxina A, sendo todas as amostras importadas. A contaminação por ocratoxina A nos vinhos foi relativamente baixa, com exceção de duas amostras provenientes da França e da Argentina, para as quais foram obtidos valores de 2,47 e 2,78 µg/L, respectivamente. Apenas duas amostras de vinhos de mesas analisadas estavam contaminadas, sendo ambas provenientes de Portugal. Do total de amostras contaminadas, 85,71% apresentaram níveis de contaminação por ocratoxina A menores que 2 µg/L. Os vinhos em que a OTA não foi detectada ou que a concentração foi inferior ao LQ <0,16 foram os de mesa tintos nacionais, brancos e *rosé*. Das amostras de vinhos nacionais, nenhuma apresentou contaminação por OTA, fato este relevante, já que a produção e o consumo da bebida no país vêm crescendo a cada ano, apesar de o consumo de importados pela população brasileira ainda ser predominante. Em relação ao risco de exposição humana à toxina por meio do consumo de vinhos, mesmo nas amostras que obtiveram valores de contaminação acima do permitido, o risco foi baixo, já que o consumo dessa bebida no Brasil ainda é limitado.

Palavras-chave: Ocratoxina A. Vinho. Exposição humana.

GENERAL ABSTRACT

The assessment of exposure to mycotoxins is an important aspect of public health in view the possibility of preventing or minimizing the incidence of diseases resulting from its interaction with the body. OTA has been frequently found as a contaminant of grapes, grape juice and wine, and is considered one of the most harmful mycotoxins to human health. In this context, this study was to evaluate the occurrence of OTA in domestic wines (table wines) and imported, as well as assess the risk of human exposure to the toxin. The quantification of OTA in wine samples was performed by the method of high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. Part of the samples (36.84%) showed contamination by ochratoxin A, all samples being imported. Ochratoxin A contamination in wine was relatively low, with the exception of two samples from France and Argentina who obtained values of 2.47 and 2.78 mg/L respectively. Only two samples of table wines analyzed were contaminated both from Portugal. Of the total number of contaminated samples, 85.71% had levels of ochratoxin A contamination by less than 2 µg/L. The wines that OTA was not detected or the concentration was below the LQ <0.16 were the national red table wine, white and rosé. Samples of national wines, showed no contamination by OTA, a fact relevant as the production and consumption of the beverage in the country are growing each year, despite the consumption of imported wines by the Brazilian population is still predominant. Regarding the risk of human exposure to the toxin through consumption of wine, even in samples that had values above the permitted contamination, the risk was low, since this beverage consumption in Brazil is still limited.

Keywords: Ochratoxin A. Wine. Human exposure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química da ocratoxina A	24
Figura 2	Etapas da análise e avaliação de risco	40
Gráfico 1	Cromatograma da amostra de vinho tinto contaminada com 10 µg/L de OTA, para o desenvolvimento da curva padrão	79
Gráfico 2	Cromatograma da amostra de vinho tinto ARG/MAL/3, com teor de ocratoxina A de 2,77 µg/L	82
Gráfico 3	Cromatograma da amostra de vinho tinto FRA/VR/1, com teor de ocratoxina A de 2,46 µg/L	83
Gráfico 4	Relação entre a presença de ocratoxina A e as variáveis analisadas. A numeração das amostras corresponde à numeração da Tabela 6 ..	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção de uvas no Brasil, em toneladas	17
Tabela 2	Elaboração de vinhos e derivados no Rio Grande do Sul – 2004 a 2011	18
Tabela 3	Principais países de origem das importações de vinho no Brasil, 2007 a 2011 (em milhões de litros)	19
Tabela 4	Consumo de vinhos finos no Brasil, 2007 a 2011	19
Tabela 5	Limites máximos tolerados (LMT) para ocratoxina A, segundo RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011	25
Tabela 6	Amostras de vinhos com os respectivos países, três anos de produção	72
Tabela 7	Resultados dos ensaios de validação do método de detecção de ocratoxina A	78
Tabela 8	Valores médios de OTA encontrados nas amostras analisadas	80
Tabela 9	Frequência por faixa de contaminação de ocratoxina A (µg/L) presente nas amostras de vinhos analisadas.....	83
Tabela 10	Contribuição à exposição à ocratoxina A, levando em consideração o consumo de uma taça (150 mL) de vinho por dia, para um consumidor de 70 kg.....	88

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral	12
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Produção de vinhos no Brasil e importação	15
2.2	Micotoxinas em alimentos	20
2.3	Ocratoxina A: estrutura química, legislação e fungos produtores	23
2.4	Incidência de ocratoxina A em alimentos e bebidas	27
2.5	Ocorrência de ocratoxina A em vinhos	30
2.6	Ocratoxina A durante o processo de vinificação	34
2.7	Métodos para a detecção de micotoxinas	37
2.8	Avaliação de risco de contaminantes em alimentos	39
2.8.1	Avaliação da exposição humana a substâncias tóxicas	42
2.8.2	Exposição cumulativa e exposição agregada	42
	REFERÊNCIAS	44
	CAPÍTULO 2 Incidência de ocratoxina a em vinhos nacionais e importados e avaliação da exposição dos consumidores	66
1	INTRODUÇÃO	69
2	MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1	Amostras	71
2.2	Análise de ocratoxina A	73
2.3	Soluções e reagentes	73
2.4	Preparo das amostras e purificação em coluna de imunoafinidade	74
2.5	Quantificação de ocratoxina A por cromatografia líquida	74
2.6	Eficiência da metodologia analítica	76
2.7	Avaliação da exposição humana	76
2.8	Avaliação da exposição agregada	76
2.9	Delineamento experimental e análise estatística dos dados	77
3	RESULTADOS	78
3.1	Padronização da metodologia analítica	78
3.2	Ocorrência e níveis de ocratoxina A em vinhos	79
4	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	90

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de ocratoxina A em alimentos vem sendo extensivamente reportada, principalmente em cereais e produtos derivados de cereais, café, cacau, cerveja, uvas, suco de uvas, frutas desidratadas, plantas medicinais e vinho, sendo este último considerado a segunda fonte mais importante de OTA para humanos (SERRATOSA et al., 2010).

A produção desta toxina pelos fungos ocratoxigênicos está relacionada a fatores abióticos, principalmente temperatura, atividade de água e substrato (QUINTELA et al., 2011; SELOUANE et al., 2009; BELLI et al., 2005; PATERAKI et al., 2007). Entretanto, a complexa interação dos fatores ecológicos que afetam o crescimento e a produção da OTA por fungos micotoxigênicos dificulta o controle da exposição de forma eficiente.

Após o primeiro relato da ocorrência de OTA em vinho (ZIMMERLI; DICK, 1996), vários estudos foram conduzidos para avaliar a presença desta micotoxina em vinhos e em produtos derivados da uva.

Na Espanha, o primeiro dado de ocorrência de OTA em vinho comercializado foi relatado por Burdaspal e Legarda (1999). Os vinhos licorosos apresentaram os maiores índices de contaminação (73%), seguidos dos vinhos *rosé*, tinto e branco. O valor mais elevado de OTA foi de 15,25 ng/mL, limite bem acima do estabelecido pela comunidade europeia. Na Itália, as maiores concentrações de OTA foram encontradas nos vinhos tintos (78,4%), seguidos do *rose* e branco. Na Alemanha, valores de 7.0 ng/ml foram encontrados em vinho tinto italiano exportado para a Alemanha. Alguns autores relataram a potencial contaminação, com ocratoxina A, em vinhos produzidos em vários países pertencentes à comunidade europeia (PIETRI et al., 2001; SOUFLEROS; TRICARD; BOLOUMPASI, 2003; STEFANAKI et al., 2003) e África do Sul (STANDER; STEYN, 2002). Recentes estudos avaliaram a presença da OTA

em 340 amostras de vinhos portugueses e os resultados revelaram que em 69 amostras os níveis dessa toxina estavam elevados e, destes, 3 excederam 500 ng/L (RATOLA; MARTINS; ALVES, 2004).

Esses resultados levantam preocupação quanto ao potencial risco à saúde humana pelo consumo desses produtos oriundos de determinadas regiões (TJAMOS et al., 2004). No Brasil, a Resolução da ANVISA n. 7, de 18 de fevereiro de 2011, estabelece os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos, os quais se referem aos resultados obtidos por metodologias que atendam aos critérios de desempenho estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*. Este regulamento aplica-se às empresas que importem, produzam, distribuam e comercializem alguns produtos descritos na mesma Resolução. Entre as bebidas encontram-se os vinhos e seus derivados e os limites máximos aceitáveis para a ocratoxina A são de 2 µg/L. No entanto, o prazo para que esta Resolução entre em vigor é de 2012 a 2014 (BRASIL, 2011).

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a incidência de ocratoxina A em vinhos nacionais e importados, bem como avaliar a exposição dos consumidores a OTA por meio do consumo de vinho tinto, *rosé* e branco.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção de vinhos no Brasil e importação

A cultura da videira tem grande valor, não apenas por representar a maior produção mundial do setor de horticultura, mas também por trazer conexões históricas com o desenvolvimento da humanidade. O produto principal, o vinho, foi considerado, pelos povos antigos, como a bebida dos deuses, estando acessível apenas aos poderosos da época (THIS; LACOMBE; THOMAS, 2006).

Não se pode situar com precisão o local e a data em que se fabricou vinho pela primeira vez. As sementes de uva mais antigas foram encontradas na Geórgia e há indícios de que sejam da variedade *Vitis vinifera sativa*. Sabe-se que se cultivavam videiras e, provavelmente, produzia-se vinho na região ao sul das montanhas do Cáucaso, há pelo menos sete mil anos (JONHSON, 2001).

A legislação brasileira define vinho como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples da uva sã, fresca e madura. A denominação vinhos finos é utilizada para designar os vinhos elaborados a partir de uvas europeias da espécie *Vitis vinifera* L. Aqueles que são produzidos de uvas americanas, como a *Vitis labrusca* e seus híbridos, são classificados como vinhos comuns. Esta classificação é empregada pela diferenciação entre as espécies de uva utilizadas na elaboração do vinho, o que não implica na qualidade das mesmas (AMORIM et al., 2000).

Os vinhos podem ser divididos em três categorias quanto à cor, sendo tinto, branco ou *rosé*, e quanto as quantificações de açúcares, podendo ser seco, com teor de açúcar menor que 5 g/L; demi-sec, com teor entre 5 e 20 g/L e suave, com mais de 20 g/L de teor de açúcar (BRASIL, 1988).

A maior concentração da produção de uvas ocorre na Europa, embora sua área e produção venham se reduzindo de forma expressiva. A área média de viticultura, em 1990/1992, representava 67,31% da área mundial, passando para 56,35% no triênio 2005/2007. Nesse mesmo período, a produção de uvas na Europa, que representava 60,12% da mundial, caiu para 43,14%. Em contrapartida, ocorreu aumento na área e na produção dos demais continentes. Considerando a média da produção dos anos 2005/2008, em relação à média 1990/1992, o continente Europeu apresentou redução na produção de uvas de 23,35%. A Ásia, a América, a África e a Oceania aumentaram a produção em 115,93%, 35,99%, 60,35% e 92,35%, respectivamente, no mesmo período (MELLO, 2009).

No Brasil, a uva foi introduzida no ano de 1532, no estado de São Paulo. Por algum tempo, o cultivo das variedades de *Vitis vinifera* procedentes de Portugal e da Espanha ficou restrito a pequenas áreas dispersas pelo território nacional (CALDAS et al., 2008). Permaneceu como cultura doméstica até o final do século XIX, tornando-se uma atividade comercial a partir do início do século XX, por iniciativa dos imigrantes italianos estabelecidos no sul do país (PROTAS et al., 2005).

Desde seu início e até a década de 1960, a viticultura brasileira ficou restrita às regiões sul e sudeste, mantendo as características de clima temperado, com ciclo vegetativo anual e período de repouso definido pela ocorrência das baixas temperaturas nos meses de inverno. A partir daquela década, o cultivo da videira foi introduzido com sucesso na região semiárida do Vale do São Francisco, o que marcou o início da viticultura tropical no Brasil. Na década de 1970 consolidou-se um polo produtor no norte do Paraná e, na década seguinte, no nordeste de São Paulo e no norte de Minas Gerais. Devido à diversidade ambiental é possível observar diferentes características bioclimáticas entre as

regiões vitivinícolas do Brasil, sendo possível encontrar videiras com um, dois ou três ciclos anuais (PROTAS et al., 2005).

De acordo com os dados estatísticos disponíveis, no ano de 2011 (Tabela 1) houve um aumento de 12,97% na produção de uvas no Brasil, totalizando 1.463.481 toneladas da fruta, das quais 57% foram destinadas ao processamento e o restante à comercialização do produto *in natura*. Os maiores aumentos da produção ocorreram nos estados de Pernambuco (24,03%) e do Rio Grande do Sul (19,76%) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

Tabela 1 Produção de uvas no Brasil, em toneladas

Estado/Ano	2008	2009	2010	2011
Pernambuco	162.977	158.515	168.225	208.660
Bahia	101.787	90.508	78.283	65.435
Minas Gerais	13.711	11.773	10.590	9.804
São Paulo	184.930	177.934	177.538	177.227
Paraná	101.500	102.080	101.900	105.000
Santa Catarina	58.330	67.546	66.214	67.767
Rio Grande do Sul	776.027	737.363	692.692	829.589
BRASIL	1.399.262	1.345.719	1.295.442	1.463.481

Fonte: IBGE. Dados de 2011 capturados em 09.01.2013

Atualmente, as regiões produtoras de vinhos no Brasil são os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, o município de São Roque, SP, a região Sul de Minas e o Vale do Submédio São Francisco abrange os estados de Pernambuco e Bahia. Dentre eles, o Rio Grande do Sul se destaca na produção de vinhos de qualidade e sucos de uva, devido às suas condições climáticas mais favoráveis para o plantio (Tabela 2) (ACADEMIA DO VINHO, 2012).

Tabela 2 Elaboração de vinhos e derivados no Rio Grande do Sul – 2004 a 2011

ANO	MILHÕES DE LITROS			TOTAL
	Vinhos viníferas	Vinhos comuns	Outros derivados da uva e do vinho	
2004	42,96	313,70	51,87	408,53
2005	45,45	226,08	53,50	325,04
2006	32,12	185,08	59,13	276,33
2007	43,18	275,25	70,89	389,32
2008	47,33	287,44	93,19	427,97
2009	39,90	205,42	96,50	341,82
2010	27,85	195,25	98,96	321,21
2011	52,20	258,73	151,15	461,07

Fonte: IBRAVIN/MAPA/SEAPA-RS, 2011

Apesar do crescente aumento na produção de uvas e da elaboração de vinhos no país, observa-se também um aumento significativo das importações do produto. Desde 2007, as importações ficavam, em média, entre 59 a 60 milhões de litros. Em 2010, observou-se um aumento de 26,5% em relação a 2009, com volume de 75,3 milhões de litros. De 2010 para 2011, o aumento foi ainda maior, 27,4%, atingindo um volume de 77,3 milhões de litros. Nos últimos dois anos, de 2009 a 2011, as importações cresceram 30,7% (BRASIL, 2011a).

O Brasil importa vinhos de 30 países, sendo 95,4% do volume total proveniente de Chile, Argentina, Itália, França, Portugal e Espanha. Os vinhos chilenos representam 34,5% das importações brasileiras e os argentinos, 22,9%, ou seja, o brasileiro consome quase 60% de vinhos provenientes dos nossos vizinhos do Mercosul. Os vinhos do Velho Mundo mais importados são da Itália, França, Portugal e Espanha. A Espanha apresentou um aumento muito expressivo nas importações de vinho para o Brasil, de 2010 para 2011, 32,4%, e a França, de 20,4% (Tabela 3).

Tabela 3 Principais países de origem das importações de vinho no Brasil, 2007 a 2011 (em milhões de litros)

Ano	Chile	Argentina	Itália	França	Portugal	Espanha	Outros	Total
2007	18,89	16,18	10,41	3,82	6,85	1,11	3,61	60,68
2008	18,75	15,43	10,79	3,43	6,28	1,25	3,47	57,94
2009	22,52	14,80	9,08	3,50	5,92	1,52	3,20	59,13
2010	26,51	18,05	13,00	4,26	8,07	2,13	2,59	75,32
2011	26,70	17,70	13,10	5,13	8,30	2,82	1,90	77,32

Fonte: BRASIL, 2012

A participação significativa dos vinhos chilenos e argentinos no consumo de vinhos pode ser entendida, do ponto de vista econômico, pelo fato de os preços dos vinhos oriundos do Mercosul serem mais competitivos, tanto pelo fator cambial como pelos custos logísticos mais baixos.

Considerando o aumento do consumo brasileiro de vinhos e que o mesmo pode constituir fonte significativa de OTA na dieta, torna-se necessário considerar não só o aspecto de qualidade sensorial, quanto de segurança dos vinhos nacionais e importados.

Analisando-se o consumo total de vinhos, observa-se que o brasileiro passou a beber muito mais vinhos finos, passando de 93,6 milhões de litros, em 2010, para 96,8 milhões de litros, em 2011, considerando os importados mais os vinhos finos nacionais (Tabela 4).

Tabela 4 Consumo de vinhos finos no Brasil, 2007 a 2011

	2007	2008	2009	2010	2011
Vinhos finos – Brasil	20,90	17,00	18,00	18,30	19,54
Importados	60,88	57,94	59,13	75,32	77,32
Total	81,78	74,94	77,13	93,62	96,86

Fonte: UVIBRA, 2011

2.2 Micotoxinas em alimentos

As micotoxinas são produzidas durante o metabolismo secundário de fungos filamentosos e podem estar presentes em alimentos, como amendoim, milho, trigo, cevada, café, leite, arroz, farinhas, nozes, castanhas, frutas secas, entre outros, podendo ameaçar a inocuidade dos mesmos. Mais de 200 substâncias já foram identificadas como micotoxinas, sendo as aflatoxinas, os tricotecenos, as fumonisinas, a zearalenona, a ocratoxina A, os alcaloides do *ergot* e a patulina as mais estudadas (BENNETT; KLICH, 2003).

Os fungos podem causar efeitos indesejáveis na agricultura e na indústria de alimentos, devido à sua versatilidade em se adaptar. Tais microrganismos são ubíquos na natureza, podendo subsistir no solo, na vegetação e na água. Consequentemente, é simples deduzir o seu potencial de contaminação (MOSS, 1996).

As micotoxinas, aparentemente, não apresentam qualquer função no metabolismo normal dos fungos. Elas são produzidas, ainda que não exclusivamente, na medida em que o fungo atinge a maturidade. As toxinas destes fungos apresentam efeitos tóxicos em seres humanos e animais, podendo estar contidas nos esporos e micélios, ou serem excretadas como exotoxinas no substrato de crescimento (PITT, 2000).

As micotoxinas estão amplamente incorporadas aos alimentos e seus derivados, constituindo um sério problema de saúde pública (BENNETT; KLICH, 2003). É importante esclarecer que nem todo crescimento fúngico resulta na formação de micotoxina. No entanto, a ausência de sinais aparentes de contaminação por fungos não significa que o alimento encontra-se livre de toxinas, já que elas podem permanecer no produto, mesmo depois do desaparecimento dos fungos responsáveis por sua produção. A contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, durante e após a colheita, o transporte, o

processamento e o armazenamento do produto (SABINO; PRADO; COLEN, 1986).

A detecção de micotoxinas em alimentos é de grande importância para a saúde pública e a economia de um país. Os surtos de micotoxicoses são normalmente sazonais, devido a condições climáticas particulares que favorecem o crescimento fúngico e/ou a produção de toxinas. A umidade e a temperatura são dois fatores críticos. Fatores geográficos, susceptibilidade da variedade e condições de armazenamento também interferem na produção de micotoxinas, podendo várias delas serem produzidas simultaneamente (SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA, 1985; BULLERMAN; TSAI, 1994).

As micotoxinas podem entrar nas cadeias alimentares humana e animal por meio de contaminação direta ou indireta. A contaminação indireta de alimentos e rações ocorre quando um ingrediente qualquer foi previamente contaminado por um fungo toxigênico e, mesmo que o fungo tenha sido eliminado durante o processamento, as micotoxinas ainda permanecerão no produto final. A contaminação direta, por outro lado, ocorre quando o produto, o alimento ou a ração se tornam contaminados por um fungo toxigênico, com posterior formação de micotoxinas. Sabe-se que a maioria dos alimentos e rações pode permitir o crescimento e o desenvolvimento de fungos toxigênicos, tanto durante a produção quanto durante o processamento, o transporte e o armazenamento (FRISVAD; SAMSON, 1992).

A ingestão de micotoxinas por seres humanos ocorre, principalmente, pela ingestão de produtos vegetais contaminados, bem como pelo consumo de produtos derivados, tais como leite, queijo, carnes e outros produtos animais (SMITH et al., 1995).

O consumo da toxina por meio de alimentos contaminados pode resultar em lesões de pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade ou genitotoxicidade, podendo chegar à

morte. As micotoxinas podem, ainda, apresentar efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos ou imunossupressores (COLE; COX, 1981; JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 2001). Como consequências diretas do consumo de micotoxinas por animais estão incluídos aumento na recusa de ração, baixa conversão alimentar, ganho de peso diminuído, aumento da incidência de doenças (devido à imunossupressão) e diminuição da capacidade reprodutiva, levando a perdas econômicas (FINK-GREMMELS; MALEKINEJAD, 2007; MORGAVI; RILEY, 2007; PESTKA, 2007; VOSS; HASCHEK, 2007; HUWIG et al., 2001; WU, 2004; WU, 2006).

Do ponto de vista econômico, a presença de micotoxinas causa prejuízos a produtores, processadores e comerciantes de alimentos e ao país como um todo, inclusive na redução de divisas, quando os produtos exportados são recusados no exterior devido à presença de micotoxinas. Micotoxinas afetam o agronegócio de muitos países, interferindo ou, até mesmo, impedindo a exportação, reduzindo a produção animal e agrícola e, em alguns países, afetando, também, a saúde humana (JELINEK; POHLAND; WOOD, 1989; MILLER, 1995; LEUNG; DIAZ-LLANO; SMITH, 2006). Do ponto de vista de saúde pública, a ONU estima que 40% da redução na expectativa de vida em países pobres estejam relacionados à existência de micotoxinas na dieta destas populações (KAWASHIMA, 2004).

A ocorrência de micotoxinas em alimentos e derivados não é um problema apenas de países em desenvolvimento. No entanto, como os produtos de boa qualidade são normalmente exportados, aquelas commodities de qualidade inferior, as quais apresentam níveis de micotoxinas superiores aos permitidos nos países importadores, são vendidas e consumidas no mercado interno, com riscos evidentes para a saúde da população (DAWSON, 1991).

No Brasil, as micotoxinas têm sido objeto de pesquisa, principalmente no centro-sul e, recentemente, na região sul do país. Nas demais regiões há uma

grande lacuna de informações sobre a contaminação de alimentos por estas toxinas. Por outro lado, há um grande número de alimentos nacionais que ainda não foram analisados para micotoxinas, assim como várias toxinas que não foram pesquisadas no país (KAWASHIMA, 2004).

Entre as principais micotoxinas que ocorrem frequentemente em alimentos está a ocratoxina A.

2.3 Ocratoxina A: estrutura química, legislação e fungos produtores

As ocratoxinas formam um grupo de micotoxinas estruturalmente relacionadas e, dentro deste grupo, a ocratoxina A é considerada a mais tóxica, devido à presença do átomo de cloro na posição C5, adicionado à presença de um OH fenólico. O grupo também inclui ocratoxina C (OTC), 4-hidroxiocratoxina A (4-OH OTA), ocratoxina B (não contém o átomo de cloro no 5C da di-idro-metil-isocumarina) e a ocratoxina α (OT α , em que a fenilalanina está ausente) (DUARTE; LINO, 2010). Essas micotoxinas são compostas, basicamente, de dois grupamentos: uma di-hidroxi isocumarina, ligada através do seu grupo 7-carboxi à amida do grupamento L- β -fenilalanina (essa ligação é muito estável em relação à hidrólise e temperatura), com exceção da OT α em que o grupamento fenilalanina está ausente (RINGO et al., 2006).

A OTA é um composto branco cristalino cujo nome químico é (R)-N-[(5-cloro-3,4-di-hidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopiran-7-il) carbonil] – L-fenilalanina. É pouco solúvel em água e solúvel em solução aquosa de bicarbonato de sódio. Sua fórmula empírica é C₂₀H₁₈O₆NCl (Figura 1) e o peso molecular é de 403,82 g mol⁻¹ (ANLI; ALKIS, 2010).

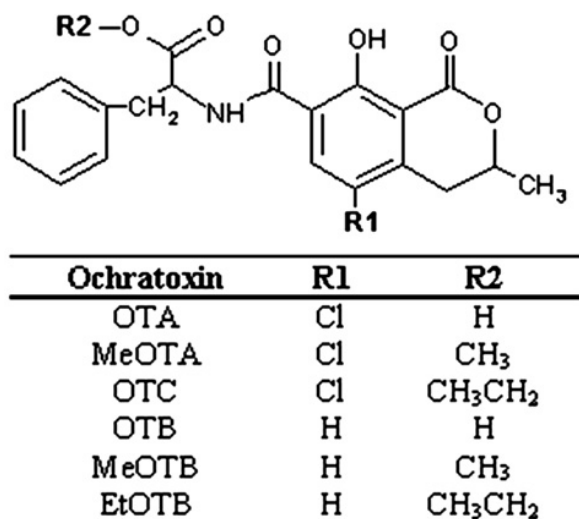


Figura 1 Estrutura química da ocratoxina A

A ocratoxina A é uma molécula moderadamente estável ao calor que permanece intacta durante a maioria das operações de processamento dos alimentos e, portanto, pode aparecer nos produtos finais (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007). É produzida como metabólito secundário por fungos de gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo considerada nefrotóxica e imunossupressora em humanos (MONACI; PALMISANO, 2004; KAPETANAKOU et al., 2009).

A presença natural de OTA em produtos alimentares é comum, especialmente em países de climas temperados (VARGA; KOZAKIEWICS, 2006). Como esses alimentos fazem parte da dieta normal das populações, a ocratoxina A tem sido detectada em fluidos biológicos, como leite humano e plasma (NOBA et al., 2009).

Em alguns países da Europa, níveis máximos de ocratoxina A de 5 µg/kg em cereais e 1 µg/kg para alimento destinado à população infantil têm sido sugeridos como forma de orientação (VAN EGMOND, 1996; VERARDI; ROSNER, 1995). No Brasil, foram estabelecidos, recentemente, limites

máximos toleráveis de ocratoxina A, para alguns alimentos, como cereais, feijão, café moído e vinho, entre outros, conforme publicado no Diário Oficial da União n.7, Seção 1, p.756 de 18 de fevereiro de 2011 (Tabela 5).

Tabela 5 Limites máximos tolerados (LMT) para ocratoxina A, segundo RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011

Alimento	LMT (µg/kg)
Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10
Feijão	10
Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel	10
Vinho e seus derivados	2
Suco de uva e polpa de uva	2
Especiarias	30
Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	2
Produtos de cacau e chocolate	5
Amêndoa de cacau	10
Frutas secas e desidratadas	10

Estudos têm demonstrado que a ocratoxina A tem ação nefrotóxica, teratogênica, carcinogênica, imunossupressora e está relacionada com a nefropatia endêmica dos Balcãs, doença degenerativa dos rins, que afeta exclusivamente a população adulta rural (KHOURY et al., 2008).

Foram descritas evidências de uma possível correlação entre ocratoxina A e o desenvolvimento de tumores no trato urinário de seres humanos, na Bulgária (ESTEBAN et al., 2004; LOBEAU et al., 2005). Foi demonstrado em estudos que esta toxina é nefrotóxica e pode causar câncer em animais de laboratório e suínos, apresentando também atividade teratogênica em ratos, camundongos e cricetos (“hamsters”) (BENFORD et al., 2001).

De acordo com estudos, a dose diária tolerável de OTA é muito baixa e varia de 300-890 µg/dia, para uma pessoa de 60 kg. A ingestão de 12.000-3.000.000 µg por uma pessoa de 60 kg pode causar toxicidade aguda (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ; CARRASCOSA, 2009). Com relação aos humanos, a OTA foi encontrada no plasma de pacientes com insuficiência renal

crônica em concentrações de 0-11,7 µg/L e, em indivíduos saudáveis, em concentrações 0-4 µg/L. Esses valores são semelhantes aos relatados em outros países europeus (PÉREZ-DE-OBANOS et al., 2001).

A presença desse contaminante químico na dieta humana, especialmente na dieta de grupos vulneráveis da população, como os lactentes, é de grande preocupação (ALVITO et al., 2010). De acordo com a International Agency for Research on Cancer (1993), a ocratoxina A está inserida no grupo 2B, como um possível agente carcinogênico para humanos (KHOURY et al., 2008). Recentemente, a quantidade de OTA em alimentos tem sido regulamentada pela Commission of the European Communities (2002).

Ela foi originalmente descrita como um metabólito secundário de *Aspergillus ochraceus* (VAN DER MERWE; STEYN; FOURIE, 1965). Atualmente, sabe-se que é produzida por várias espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (LASRAM et al., 2008).

Os principais fungos produtores de OTA são *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger*. Outros, como *Aspergillus albertensis*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus sclerotiorum*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus wentii*, têm sido reportados como produtores da toxina, mas a produção ainda não é bem estabelecidas (NAPOLITANO et al., 2007). Em países da América do Sul são três as principais espécies produtoras de ocratoxina A: *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* (MAGNOLI et al., 2007).

As espécies de fungos membros da Seção *Nigri* estão distribuídas em todo o mundo, crescendo em vários tipos de substratos. São comumente considerados fungos de deterioração alimentar. *Aspergillus niger*, espécie mais comum da seção *Nigri*, é reconhecido como um patógeno oportunista e seus membros são, geralmente, vistos como fungos benignos. Pode ser perigoso para

os seres humanos, se inalado em grandes quantidades, causando graves problemas pulmonares, como a aspergilose. Adicionalmente, a inalação de esporos de *A. niger* e de enzimas por ele produzidas na forma de pó pode causar alergia e asma (ABARCA et al., 2004).

Aspergillus carbonarius é capaz de formar escleródios em cultura. Os escleródios são estruturas de resistência que podem permitir a sobrevivência do fungo no solo ou em materiais vegetais. Os escleródios de *Aspergillus carbonarius* têm concentrações elevadas de OTA e verificou-se que a micotoxina tem propriedades inseticidas contra larvas detritívoras, o que aumenta a possibilidade de sobrevivência do fungo. É uma importante fonte de OTA em uva e vinho (PITT et al., 2000). *Aspergillus ochraceus* foi a primeira espécie produtora de OTA descrita e é considerada de grande importância por contaminar café, uva e cereais (MAGNOLI et al., 2007). É capaz de se desenvolver em uma grande faixa de temperatura, de 8 a 30 °C, a temperatura ótima de crescimento varia de 25 a 30 °C e a atividade de água mínima para o seu desenvolvimento é de 0,76. Já para a produção de ocratoxina A, a atividade de água mínima é de 0,85, com a faixa ótima variando de 0,95-0,99 (SUÁREZ-QUEIROZ et al., 2005).

2.4 Incidência de ocratoxina A em alimentos e bebidas

Anualmente, de 25% a 50% da safra de frutas e vegetais são deteriorados por fungos (KAWASHIMA, 2004). Devido aos modernos métodos análises e a um crescente interesse por este campo de pesquisa, mais de trezentas diferentes micotoxinas foram diferenciadas até o momento (ERDER; BINDER, 2004).

De acordo com Kawashima (2004), no Brasil, as micotoxinas têm sido pesquisadas, principalmente no centro-sul do país. Recentemente, núcleos de

pesquisadores têm surgido na região sul, nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Como consequência da distribuição não homogênea dos grupos de pesquisa e das dimensões continentais do país, tem-se uma distribuição também não homogênea nos conhecimentos já adquiridos sobre a presença de micotoxinas em alimentos nacionais, ou seja, a situação dos alimentos produzidos e consumidos em algumas regiões do país continua uma grande incógnita.

Abordagens para prevenir micotoxicoses incluem estratégias de pré e pós-colheita e estes são frequentemente classificados em métodos físicos, químicos e biológicos (JOUANY, 2007). A melhor maneira seria a prevenção da formação de micotoxinas ainda no campo, que é apoiada pela rotação de culturas e a administração de doses adequadas de fungicidas no tempo certo. Se houver indícios de toxinas, são necessárias medidas que ajam especificamente contra tal (LEIBTSEDER, 2005).

A lista de fungos que produzem a OTA tem se expandido, assim como a variedade de alimentos que podem ser contaminados por ocratoxina A. A OTA tem sido detectada em diversos tipos de alimentos, incluindo trigo (RIBA et al., 2008), milho (SEKIYAMA et al., 2005; MAGNOLI et al., 2007), café (LEONI et al., 2000; LEONG et al., 2007), cacau (MOUNJOUENPOU et al., 2008), cevada (VISWANATH et al., 2007), cerveja (KAWASHIMA et al., 2007), figos secos (KARBANCIOLU-GULER; HEPERKAN, 2008), queijo (DALL'ASTA et al., 2008), centeio (JORGENSEN; JACOBSEN, 2002), pão (ZINEDINE et al., 2006), uva (LASRAM et al., 2007) e produtos derivados, incluindo suco e vinho (BURDASPAL; LEGARDA, 2007).

A cerveja, uma bebida derivada de cereais, principalmente a cevada, é amplamente consumida em todo o mundo. A ocratoxina A é carregada através dos produtos contaminados, principalmente a cevada, mas também com os adjuntos, para as cervejarias. Os processos de fermentação variam de uma

idústria para outra, mas a forma como a toxina é transportada para a cerveja é, basicamente, a mesma. A OTA é estável ao calor e, mesmo após todo o processamento, níveis da toxina são encontrados na bebida (MATEO et al., 2007).

A presença de ocratoxina A em vinho ocorre devido à contaminação por *Aspergillus niger*, principalmente cepas de *Aspergillus carbonarius* e outros, pertencentes à Seção Nigri (PERRONE et al., 2006). A presença de OTA em uvas é influenciada pelas condições climáticas e áreas geográficas, bem como pela variedade de uva, pelo sistema de cultivo e pelos danos causados nas uvas por insetos, infecção fúngica ou excesso de irrigação e chuva. A OTA presente nas uvas é transferida para o vinho durante o processo de vinificação, sendo que um aumento na concentração de OTA ocorre após a maceração das uvas. Durante o envelhecimento do vinho, observa-se que a toxina permanece estável, pois a mesma concentração de OTA é encontrada no vinho após um ano de armazenamento (WELKE et al., 2009). A ocratoxina A é um contaminante frequente do vinho, com um aparente aumento em vinhos provenientes de áreas do sul da Europa, onde o clima é mais quente (OTTENEDER; MAJERUS, 2000). Alto índice de contaminação por OTA também foi verificado em frutas secas, como uvas passas e figo (ZINEDINE et al., 2006).

Os frutos de café estão expostos à contaminação por uma variedade de microrganismos, principalmente de fungos capazes de afetar fases de pré e pós-colheita, resultando em perda no rendimento, descoloração, redução do valor nutricional e contaminação por micotoxinas (SOUZA; CARVALHO, 1997). O primeiro relato sobre a incidência de OTA em grãos de café foi publicado por Levi, Trenk e Mohr (1974), reportando-se a uma concentração de 30 a 230 mg/kg, em cinco amostras visivelmente contaminadas. No entanto, uma análise posterior conduzida em 68 amostras comerciais (sem contaminação visível) revelou baixo nível de contaminação por OTA, indicando que concentrações

significativas da toxina seriam o resultado de intensa proliferação fúngica (LEVI, 1980). A ocorrência natural de ocratoxina A em café verde tem sido relatada em concentrações na faixa de 0,2 a 360 mg/kg. Devido a fatores como distribuição não homogênea da toxina no café, forma de contaminação (inoculação de cepa toxigênica x adição de padrão), níveis de ocratoxina A, metodologia analítica empregada e condições de torrefação, os relatos da estabilidade da ocratoxina A variam de 0 a 100%, provocando grande preocupação no consumo dos produtos de café (VATINNO et al., 2008).

A ocratoxina A também tem sido encontrada no sangue e em outros tecidos animais e no leite, inclusive em leite humano (MARQUARDT; FROHLICH, 1992), bem como em carne suína para consumo humano (FINK-GREMMELS, 1999).

2.5 Ocorrência de ocratoxina A em vinhos

Durante algum tempo, os cereais e produtos animais foram considerados os principais alimentos contaminados com OTA. Na atualidade, sabe-se que esta micotoxina pode estar presente em diversos alimentos. Entre eles, o vinho é considerado uma das principais fontes de OTA para os seres humanos, devido à elevada incidência desta micotoxina neste produto (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003; VISCONTI; PASCALE; CENTONZE, 1999).

A contaminação do vinho se dá quando as uvas destinadas ao processamento foram alvo do desenvolvimento de fungos. Assim, a matéria-prima é a responsável pela maior fonte de OTA nos vinhos e sua condição fitossanitária para a qualidade final deles (NUNEZ, 2008). Durante a maturação das uvas ocorrem aumento no teor de açúcar e amolecimento da película da baga e, até a colheita, as uvas tornam-se mais susceptíveis à infecção por fungos do

gênero *Aspergillus* (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006; LEONG et al., 2006; LEONG et al., 2007). Assim, o retardamento da colheita de uvas pode aumentar o risco de contaminação com OTA (GAMBUTI et al., 2005).

A OTA foi detectada, pela primeira vez, em vinhos da Suíça, por Zimmerli e Dick (1996). Posteriormente, vários estudos foram realizados para avaliar os níveis desta toxina em sucos de uva e vinhos da Europa e da África do Sul. Dados sobre a ocorrência de OTA em vinho apresentaram níveis de até 7,0 µg/L, tendo os níveis mais elevados sido detectados nos vinhos tintos elaborados na Europa (KOZAKIEWICZ et al., 2003; LO CURTO et al., 2004; SAGE et al., 2002; STEFANAKI et al., 2003) e na África do Sul (SHEPHERD et al., 2003). Em países da Europa, vários estudos têm sido realizados para mapear áreas de risco e apontar os pontos críticos de controle, o que auxilia na prevenção e no controle dos níveis de OTA nas uvas. Esta micotoxina tem se tornado um problema, principalmente para o sul da Europa (ZIMMERLI; DICK, 1996; OTTENEDER; MAJERUS, 2000; CABAÑES et al., 2002).

Os primeiros dados sobre a ocorrência e a concentração de OTA em vinho comercializado na Espanha foram apresentados em estudos de Burdaspal e Legarda (1999). Maiores incidência e teor desta micotoxina foram detectados em vinhos de sobremesa (cerca de 73%), seguidos de *rosé*, tinto e branco. Posteriormente, estudos mostraram a estabilidade da toxina em vinhos do norte daquele país (pelo menos por 12 meses) e a enorme importância de fatores, como o ano da colheita. As mudanças nas condições climáticas de ano para ano resultam em diferentes porcentagens de vinhos contendo OTA (LÓPEZ-DECERAIN et al., 2002).

Ratola, Martins e Alves (2004), ao analisarem 340 vinhos portugueses, revelaram que 69 amostras continham níveis detectáveis de OTA, das quais três excederam 0,5 µg/L, tendo a concentração máxima detectada sido de 2,1 µg/L.

Na Grécia, mais de 66% das amostras apresentaram níveis detectáveis de OTA e os vinhos tintos e doces apresentaram os níveis mais elevados (MARKAKI et al., 2001; SOUFLEROS; TRICARD; BOLOUMPASI, 2003; STEFANAKI et al., 2003). Mais de 50% das amostras analisadas no Chipre e em 100% das amostras da Turquia apresentaram-se contaminadas com esta toxina (ANLI et al., 2005; IOANNOU-KAKOURI et al., 2004). Sugita-Konishi et al. (2006) estudaram os vinhos comercializados no Japão e mostraram que 60% continham OTA.

Estudos demonstraram que os vinhos elaborados no sul da Europa e no norte da África, com clima mediterrâneo, apresentaram maior contaminação com OTA do que os vinhos de regiões mais temperadas da Europa Central (OTTENEDER; MAJERUS, 2000; ZIMMERLI; DICK, 1996). Também foi relatado o efeito do clima sobre a ocorrência de OTA (BATTILANI et al., 2003) e a produção desta micotoxina por fungos em uvas viníferas (BELLÍ et al., 2005; SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005; SERRA et al., 2003).

O impacto dos efeitos geográficos sobre a ocorrência de OTA em vinhos tintos também foi relatado por Stefanaki et al. (2003), na Grécia e por Ratola, Martins e Alves (2004), em vinhos portugueses e em vinhos chilenos (DÍAZ et al., 2009). A variação entre o teor de OTA em vinhos e a origem geográfica estão relacionadas com as condições climáticas das regiões vitivinícolas e com a microflora das uvas (SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005). A ocorrência e as preocupações relativas à OTA em uvas e vinhos têm sido abordadas em diversos estudos (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006; HOCKING et al., 2007; LEONG et al., 2006).

Em outros estudos realizados na costa do Mediterrâneo foi demonstrado que a concentração de OTA nos vinhos analisados variou no intervalo de $0,01-0,76\ \mu\text{g/L}$ e os autores estimaram o seu consumo em $0,00001\ \mu\text{g/kg/dia}$ (BLESA et al., 2004).

No Brasil, o primeiro trabalho apontando a ocorrência de OTA em vinhos e sucos foi conduzido por Rosa et al. (2004). Estes autores relataram a ocorrência da micotoxina em 28,75% dos vinhos analisados, com concentrações que variaram de 0,0283 a 0,0707 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, ressaltando que as maiores concentrações foram encontradas em vinhos tintos.

Shundo et al. (2006) pesquisaram vinhos de diferentes regiões brasileiras e detectaram OTA em 31% das amostras estudadas. Apenas duas, das 22 amostras oriundas do estado do Rio Grande do Sul, apresentaram concentrações de OTA de 0,10 e 0,24 $\mu\text{g}/\text{L}$. O nível mais elevado (1,33 $\mu\text{g}/\text{L}$) foi encontrado no vinho produzido no Vale do São Francisco, localizado na região nordeste do Brasil, do qual todas as amostras estavam contaminadas em concentrações variando de 0,36 a 1,33 $\mu\text{g}/\text{L}$.

De acordo com Chulze, Magnoli e Dalcerro (2006), os estudos realizados com sucos de uva e vinhos da América do Sul mostraram que estes contêm níveis de OTA inferiores aos detectados na Europa. Entretanto, mais informações são necessárias para permitir uma melhor determinação do risco de consumo entre as populações destes países.

Por ser relatada em vários estudos como contaminante de vinho, suco de uva e uva, avaliações de risco têm sido realizadas para estimar a relevância do consumo humano desta micotoxina (BENFORD et al., 2001; COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002; VISCONTI et al., 2008). Em 2002, uma avaliação sobre a ingestão de OTA pela população de países da União Europeia concluiu que o vinho contribui com 13% da média de ingestão total, tornando-o a segunda fonte mais relevante. Os cereais foram considerados os contribuintes mais importantes (50%) (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002).

Em geral, a ocorrência e a concentração de OTA são maiores em ano quente e úmido, em regiões temperadas e no sul, em vinhos doces feitos a partir

de uvas mais maduras ou uvas passas, e aumentam a partir de vinho branco a rosado ao vinho tinto (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; BATTILANI; PIETRI, 2002; BAU et al., 2005; BEJAOUI et al., 2006; BURDASPAL; LEGARDA, 1999; LASRAM et al., 2007; SERRA et al., 2003). A elevada concentração desta micotoxina em vinhos tintos, provavelmente, ocorre como resultado de diferenças existentes no processamento dos vinhos (LASRAM et al., 2008).

2.6 Ocratoxina A durante o processo de vinificação

Em vários estudos tem sido investigado o destino da OTA ao longo da vinificação experimental (CARIDI et al., 2006; CECCHINI et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; GAMBUTI et al., 2005; LEONG et al., 2006; RATOLA; MARTINS; ALVES, 2004) e os autores mencionam que há um decréscimo no teor desta toxina durante este processo.

Resultados de pesquisas têm sugerido que maior diminuição desta toxina durante a vinificação ocorre após etapas de separação das fases sólido:líquido, por meio da decantação de precipitados sólidos do vinho (FERNANDES et al., 2003; FERNANDES et al., 2007; LEONG et al., 2006). Muitos dos sólidos presentes no suco de uva têm afinidade com a OTA, podendo precipitar a toxina da solução (ROSET, 2003).

Leong, Hocking e Scott (2004) relataram reduções na concentração de OTA em torno de 80%, durante a vinificação tanto de vinho tinto quanto de branco. O principal modo de remoção dessa toxina foi por meio de sua ligação aos componentes sólidos da uva e a proteínas, conforme também foi relatado por Fernandes et al. (2003). As partes sólidas da uva são, na sua maioria, removidas durante a prensagem, etapa em que foi observada redução de 70% no teor de

OTA. Nesse estudo, após a vinificação, os vinhos tintos retiveram três vezes mais OTA do que os vinhos brancos.

Ratola, Martins e Alves (2004) também observaram significativa diminuição da concentração de OTA durante o processo de microvinificação de vinho do porto. Os níveis da toxina diminuíram em todas as etapas do processo de produção do vinho, tendo a diminuição sido mais pronunciada no mosto inicial do que após o início da fermentação. Segundo os autores, embora tenha sido relatado em diversos estudos que certa quantidade de OTA é removida juntamente com a remoção das partes sólidas, sabe-se que elevados níveis de OTA em uvas representam elevado risco de contaminação no vinho.

Lasram et al. (2008), ao avaliarem o teor de OTA durante a microvinificação de vinho tinto, observaram que, após a maceração, a concentração de OTA aumentou significativamente, indicando que a casca da uva é, provavelmente, a parte mais contaminada do fruto. Os mesmos autores também mostraram que a fermentação alcoólica reduziu significativamente o teor de OTA contido inicialmente nas uvas. Ao final do processo observou-se um decréscimo de 41% no conteúdo inicial. Resultados semelhantes foram observados durante o processo de macrovinificação dos vinhos.

As influências sobre a diminuição do teor de OTA durante as etapas iniciais de vinificação estão associadas com o efeito da remoção de sólidos por precipitação (DEL-PRETE et al., 2007; NUNEZ et al., 2008). Entretanto, ao final do processo, essa redução está relacionada com outros eventos, além da precipitação e da filtração de sólidos (ANGIONI et al., 2007).

A remoção de OTA durante a fermentação alcoólica é relatada por diversos autores. Abrunhosa, Fernandes e Venâncio (2005) demonstraram que 31% do teor inicial de OTA foram reduzidos após a fermentação alcoólica de vinho tinto. Lataste et al. (2004) também relataram que houve uma redução linear da concentração de OTA durante este processo. De acordo com alguns

estudos, essa redução ocorre como resultado de mecanismos de adsorção e não de biodegradação da toxina (BEJAOUI et al., 2006; BEZZO; MAGGIOROTTO; TESTA, 2002; BRAGULAT; ABARCA; CABANES, 2001; CARTESIO; CAMPOS, 1988; CECCHINI et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; LATASTE et al., 2004; LEBRIHI, 2004).

A adsorção de OTA, provavelmente, ocorre pela parede da célula de levedura que contém manoproteínas, que são compostos capazes de se ligar a micotoxinas, como, por exemplo, o mananligossacarídeo modificado derivado da célula de *Saccharomyces* (DEVEGOWDA; ARAVIND; MORTON, 1996). Além disso, de acordo com Cecchini et al. (2006), as leveduras adsorvem OTA diferentemente quando se tem mosto tinto ou branco.

A OTA encontra-se, fundamentalmente, na casca da uva (LASRAM et al., 2008) e, portanto, apresenta-se em maior quantidade nos vinhos tintos, em relação aos rosados e brancos, devido às características do processo de vinificação (MORUNO, 2002).

No caso do vinho branco, após o desengace e o esmagamento, as partes sólidas da uva são separadas do mosto, havendo pouco contato deste com as cascas e sementes (SOUFLEROS; TRICARD; BOLOUMPASI, 2003). Já no vinho tinto e rosado, após o desengace e o leve esmagamento, as partes sólidas permanecem em contato com o mosto para potencializar a extração de cor e aromas, sendo este tempo maior para os tintos. É nesta fase que ocorre maior extração da micotoxina, quando está presente nas uvas (FERNANDES et al., 2003).

2.7 Métodos para a detecção de micotoxinas

O monitoramento de toxinas constitui um procedimento prático, capaz de garantir a qualidade e a segurança na cadeia produtiva de alimentos. A conduta requer desenvolvimento de métodos analíticos eficazes, simples e econômicos para a detecção de toxinas em alimentos, das quais a ocratoxina A (OTA) é um dos representantes tóxicos com repercussão direta na saúde pública e na economia do país (ARROYO; MARTELL, 2001; WHITAKER, 2003).

Existem vários tipos de métodos cromatográficos disponíveis para análise de micotoxinas (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009). Os métodos desenvolvidos para se proceder às análises quantitativas e qualitativas de toxinas de origem biológica incluem cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS) e cromatografia gasosa-espectroscopia infravermelho (GC-IV). Além da metodologia química, os imunoenaios, representados por “enzyme linked immunosorbent assay” - ELISA, aglutinação de látex – RPLA, imunodifusão, imunoafinidade, imuno-histoquímica, biosensores e separação imunomagnética, vêm despontando, pela praticidade acoplada à sensibilidade (PALLARON; VON HOLST, 2003; PESTKA et al., 1994; PETERSSON; ABERG, 2003; SCOTT; TRUCKSESS, 1997; SOLEAS; YAN; GOLBERG, 2001; VAN DER GAAG, 2003).

A confirmação química de micotoxinas detectadas em amostras é essencial para minimizar resultados falsos. A coincidência dos aspectos visíveis ou das propriedades cromatográficas não garante que o composto isolado do extrato seja quimicamente idêntico à referência (padrões). Entre as técnicas disponíveis destacam-se a espectrofotometria de massa de alta resolução, a

ressonância magnética nuclear, a mudança de fase móvel, a derivatização e a cocromatografia (JIAO et al., 1992; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1998).

No entanto, entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ainda ocupa um lugar de destaque, devido à sua facilidade em efetuar a separação, a identificação e a quantificação das espécies, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrometria de massas (COLLINS; GUIMARÃES, 1993). Em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel é, então, forçada através de uma fase estacionária imiscível fixa colocada na coluna ou em uma superfície sólida (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A análise individual de micotoxinas é um trabalho difícil, pois são conhecidos mais de trezentos compostos e é comum uma toxina estar presente em concentrações mínimas em uma matriz orgânica complexa. A maioria das micotoxinas é analisada por cromatografia em camada delgada (CCD), além da utilização de identificador molecular. O uso de marcadores de DNA para a detecção de *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. carbonarius* pode ser útil para substituir métodos convencionais (SARTORI et al., 2006).

No entanto, o alto poder de separação e melhores parâmetros de exatidão e precisão da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) têm como consequência um aumento do uso deste método. Os métodos para análise química são, em geral, seletivos e poucos são realmente específicos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

2.8 Avaliação de risco de contaminantes em alimentos

Nos alimentos que consumimos está presente uma grande variedade de substâncias químicas, como os nutrientes essenciais para a manutenção da saúde, e algumas potencialmente tóxicas, como micotoxinas, resíduos de pesticidas, aditivos e metais pesados. A falta de algum nutriente ou a presença excessiva no alimento de substâncias tóxicas podem significar risco para a saúde humana (JARDIM; CALDAS, 2009).

A preocupação com a presença de substâncias químicas nos alimentos iniciou-se na década de 1940, nos Estados Unidos. Em 1954, Lehman e Fitzhugh, dois toxicologistas da *Food and Drug Administration* (FDA), definiram as bases para o que hoje é chamado de ingestão diária aceitável, ou IDA (JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 2001). Posteriormente, o Conselho Nacional de Pesquisa americano elaborou o relatório “Avaliação do risco do governo federal: gerenciando o processo”, no qual foram estabelecidas as bases dos processos de avaliação de risco (COMMITTEE ON THE INSTITUTIONAL MEANS FOR ASSESSMENT OF RISKS TO PUBLIC HEALTH, 1983).

A avaliação de risco é uma ferramenta utilizada para a redução das doenças transmitidas por alimentos e por água e para o fortalecimento dos sistemas de segurança dos alimentos. As conclusões de uma avaliação de risco podem orientar a definição de prioridades em saúde pública, a elaboração de padrões para o comércio internacional e a definição de políticas de inocuidade dos alimentos (SLOVIC, 1987).

Enquanto a avaliação do risco é um processo de base científica, o **gerenciamento do risco** envolve tomada de decisões pelas agências reguladoras que levam em consideração, além de informações técnicas relevantes relacionadas ao dano à saúde e ao risco, fatores políticos, sociais e econômicos.

A troca de informações sobre o risco entre avaliadores, gerenciadores, mídia, grupos de interesse e público em geral se dá no âmbito da **comunicação de risco** (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). A avaliação, o gerenciamento e a comunicação do risco são processos que interagem entre si, sendo partes de um processo maior, a **análise do risco** (Figura 2)



Figura 2 Etapas da análise e avaliação de risco
Fonte: Jardim; Caldas (2009)

Um problema de segurança dos alimentos é definido como uma situação em que uma ameaça à saúde pública (real ou ainda não comprovada), envolvendo um ou vários patógenos e um ou diversos produtos, exige atividades de gerenciamento para o manejo do risco associado. O problema de segurança dos alimentos deve ser claramente identificado (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2004), o que pode ocorrer de diversas maneiras, como, por exemplo, nas atividades de inspeção, de vigilância sanitária e de monitoramento ambiental. Pode ocorrer também em uma investigação de um surto, em pesquisas científicas ou por meio de alertas dos próprios consumidores (COLEMAN; MARKS, 1999).

O propósito da avaliação de risco é fornecer todas as informações científicas necessárias para a compreensão da natureza e da extensão do risco para a saúde e, quando necessário, analisar as opções de manejo. É formada por quatro componentes: (a) identificação do perigo, (b) caracterização do perigo, (c) avaliação da exposição e (d) caracterização do risco (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1999), tendo em vista produzir uma estimativa da probabilidade da ocorrência e da magnitude de efeitos adversos causados por perigos potenciais, para se avaliar se o risco é aceitável ou não, devendo descrever também as incertezas associadas à estimativa (DUBUGRAS; PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2009).

As informações obtidas em cada um dos componentes são combinadas para representar uma cadeia de causa e efeito, descrevendo desde a prevalência e a concentração do patógeno até a probabilidade e a magnitude do efeito. A estimativa de risco deve ser expressa de forma apropriada, apresentando as informações necessárias para as decisões do gerenciamento (REIJ; SCHOTHORST, 2000).

Por meio da avaliação de risco, é possível identificar os diferentes pontos de controle na cadeia de produção e consumo de alimentos, as opções de intervenções e os custos e benefícios de cada medida, permitindo o gerenciamento eficiente dos riscos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Sempre que possível, as estimativas do risco devem ser reavaliadas ao longo do tempo em comparação com dados independentes sobre doenças humanas, sendo possível que uma avaliação de risco microbiológico necessite ser reavaliada à medida que novas informações relevantes estejam disponíveis (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2004).

2.8.1 Avaliação da exposição humana a substâncias tóxicas

Dentre as substâncias que podem estar presentes nos alimentos e apresentar potencial risco à saúde humana estão as advindas do processamento e da estocagem dos alimentos, como acrilamida e nitrosaminas, toxinas de fungos (micotoxinas), de bactérias e de outros organismos, metais pesados presentes naturalmente no ambiente e compostos orgânicos ou inorgânicos advindos da atividade industrial e/ou doméstica, como metais pesados e dioxinas (JARDIM; CALDAS, 2009).

Avaliação da exposição é definida como a estimativa qualitativa e/ou quantitativa da ingestão provável de agentes biológicos, químicos ou físicos via alimento, bem como a exposição de outras fontes, se relevante (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997). Para estimar a exposição humana às substâncias químicas presentes nos alimentos são necessários três dados essenciais: a concentração da substância no alimento (mg/kg), o consumo do alimento (kg) e o peso corpóreo (kg) (individual ou da população em estudo) (JARDIM; CALDAS, 2009).

2.8.2 Exposição cumulativa e exposição agregada

A exposição humana a substâncias potencialmente tóxicas pode ocorrer de duas formas, cumulativa ou agregada. A exposição simultânea a várias substâncias químicas na dieta (cumulativa) e/ou advinda de várias fontes de exposição (agregada), e suas consequências para a saúde humana, tem sido motivo de preocupação de órgãos reguladores e da população em geral.

Os efeitos tóxicos de duas ou mais substâncias no organismo podem ser independentes, aditivos ou interativos (como sinergismo, potenciação ou antagonismo) (WILKINSON et al., 2000; FERON; GROTEN, 2002). O efeito

aditivo ocorre quando os compostos individuais de uma mistura têm o mesmo mecanismo de ação tóxica (grupo de compostos com mecanismo comum - GMC), diferindo apenas da potência desse efeito (BOOBIS et al., 2007). Nesse caso, o efeito final da exposição a um GMC é equivalente à soma dos efeitos de cada composto do grupo corrigido para a sua potência tóxica equivalente. A exposição a um GMC é chamada de cumulativa. A avaliação da exposição agregada a substâncias químicas considera as várias fontes de exposição possíveis de ocorrer além do consumo de alimentos, como de água e solo, e a exposição dérmica e inalatória em ambientes residenciais ou exteriores (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS, 2001).

REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L. et al. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 33-49, July 2004.

ABRUNHOSA, L.; FERNANDES, A.; VENÂNCIO, A. Ochratoxin A removal during the main steps of wine making. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DOS ALIMENTOS, 7., 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: IPV, 2005. p. 13-16.

ACADEMIA DO VINHO. **Regiões vinícolas**. Belo Horizonte: Market Press, 2012. Disponível em: <http://www.academiadovinho.com.br/regiao mostra.php?reg_num=BR>. Acesso em: 03 jan. 2013.

ALVITO, P. C. et al. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. **Food Analytical Methods**, London, v. 3, n. 1, p. 22-30, 2010.

AMORIM, S. S. et al. Occurrence of mycotoxins in food and feed in Brazil. In: OFFICIAL PROGRAM AND ABSTRACT BOOK OF INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXIN AND PHYCOTOXIN, 10., 2000, São Paulo. **Symposium...** São Paulo: IUPAC, 2000. p. 141.

ANGIONI, A. et al. In vitro interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 5, p. 2043-2048, Mar. 2007.

ANLI, E. et al. Ochratoxin A in Turkish wines. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 29, n. 6, p. 611-623, Dec. 2005.

ANLI, E.; ALKIS, I. M. Ochratoxin A and brewing technology: a review. **Journal of Institute Brewing**, London, v. 116, n. 1, p. 23-32, Jan. 2010.

ARROYO, J. V.; MARTELL, A. C. Food safety: reality and global challenge. **Food, Nutrition Agricultural**, Washington, v. 28, p. 4-15, 2001.

BATTILANI, P. et al. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 4, p. 633-636, Apr. 2003.

BATTILANI, P.; GIORNI, P.; PIETRI, A. Epidemiology of toxin producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 715-722, Apr. 2003.

BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 52-54, Sept. 2006.

BATTILANI, P.; PIETRI, A. Ochratoxin A in grapes and wine. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 7, p. 639-643, Mar. 2002.

BAU, M. et al. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 125-130, Feb. 2005.

BEJAOU, H. et al. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 255, n. 6, p. 203-208, June 2006.

BELLÍ, N. et al. Ochratoxin A-producing fungi in Spanish wine grapes and their relationship with meteorological conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 113, n. 3, p. 233-239, Nov. 2005.

BELLI, N. et al. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 4, p. 839-844, Apr. 2005a.

BENFORD, D. et al. Ochratoxin A. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION FOOD ADDITIVES SERIES N. 47. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Geneva: WHO, 2001. p. 281-415.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, July 2003.

BEZZO, G.; MAGGIOROTTO, G.; TESTA, F. **A method for the determination of specific mycotic contaminants random occurring in wines**. Paris: Office International de la Vigne et Du Vin, 2002.

BLESA, J. et al. Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian Community, Spain. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 154, n. 1-2, p. 397-401, Oct. 2004.

BOOBIS, A. R. et al. Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 180, n. 2, p. 137-150, Aug. 2007.

BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABANES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 2-3, p. 139-144, Dec. 2001.

BRASIL. Lei no 7.678, de 08 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 nov. 1988. Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/legislacao/Leis/Ant2001/lei767888.htm>>. Acesso em: 21 dez. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária . Resolução RDC n 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 05 nov. 2012.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 140-146, Oct. 2007.

BULLERMAN, L. B.; TSAI, W. J. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 57, n. 6, p. 541-546, June 1994.

BURDASPAL, P. A.; LEGARDA, T. M. Ochratoxin A in wines and grape musts and juices produced in Spain and other European countries. **Alimentaria**, Bogotá, v. 299, n. 8, p. 107-113, 1999.

BURDASPAL, P.; LEGARDA, T. Occurrence of ochratoxin A in sweet wines produced in Spain and other countries. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 24, n. 9, p. 976-986, 2007.

CABAÑES, F. J. et al. What is the source of ochratoxin A in wine? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 79, n. 3, p. 213-215, Dec. 2002.

CALDAS, G. M. M. et al. Occurrence of patulin in grape (*Vitis vinifera* L. cv. 'Rubi') with indication of the sour rot. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 14-18, jan./fev. 2008.

CARIDI, A. et al. Ochratoxin A removal during winemaking. **Enzyme and Microbial Technology**, London, v. 40, n. 1, p. 122-126, Dec. 2006.

CARTESIO, M. S.; CAMPOS, T. V. Malolactic fermentation in wine: improvement in paper chromatographic techniques. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 39, n. 2, p. 188-189, June 1988.

CECCHINI, F. et al. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 5, p. 411-417, Aug. 2006.

CHULZE, S. N.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. S5-S9, Sept. 2006.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment CAC/GL-30**. Rome: FAO, 1999.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Proposed draft principles and guidelines for the conduct of microbiological risk management**. Washington: World Health Organization, 2004.

COLE, R. J.; COX, R. H. **Handbook of toxic fungal metabolites**. New York: Academic Press, 1981.

COLEMAN, M. E.; MARKS H. M. Qualitative and quantitative risk assessment. **Food Control**, Guildford, v. 10, n. 4-5, p. 289-297, 1999.

COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. **Cromatografia líquida de alta eficiência: introdução a métodos cromatográficos**. 5. ed. Campinas: UNICAMP, 1993.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission regulation (EC) no 472: amending regulation (EC) no 466 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. **Official Journal of the European Communities**, Brussels, 16 Mar. 2002. p. L75/18-L75-20.

COMMITTEE ON THE INSTITUTIONAL MEANS FOR ASSESSMENT OF RISKS TO PUBLIC HEALTH. **Risk assessment in the Federal Government: managing the process**. Washington: National Academy Press, 1983.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY.
DESJARDINS, Anne. **Mycotoxins**: risks in plants, animal and human systems.
Missouri: Department of Plant Pathology, 2003. (Report, 139).

DALL'ASTA, C. et al. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. **Food Chemistry**, London, v. 106, n. 2, p. 729-734, Feb. 2008.

DAWSON, R. J. A global view of the mycotoxin problem. IN:
INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE FUNGI AND MYCOTOXINS
IN STORED PRODUCTS, 1991, Bangkok. **Proceedings...** Canberra: ACIAR,
1991. p. 22-28.

DEL-PRETE, V. et al. In vitro removal of Ochratoxin A by wine lactic acid
bacteria. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 7, n. 9, p. 2155-2160,
Sept. 2007.

DEVEGOWDA, G.; ARAVIND, B. I. R.; MORTON, M. G. *Saccharomyces cerevisiae* and mannanoligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers.
In: AUSTRALIAN POULTRY SCIENCES SYMPOSIUM, 8., 1996,
Melbourne. **Proceedings...** Melbourne: APS, 1996. p. 103-106.

DÍAZ, G. A. et al. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean
vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 133, n. 1-2, p. 195-199, July 2009.

DUARTE, S. C.; LINO, C. M. A review on ochratoxin A occurrence and effects
of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**,
London, v. 27, n. 2, p. 187-198, Apr. 2010.

DUBUGRAS, M. T. B.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, E. **Revisão sistemática como ferramenta de riscos microbiológicos**. Rio de Janeiro: OPAS/OMS, 2009.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS. **General principles for performing aggregate exposure and risk assessments**. Washington: [s.n.], 2001.

ESTEBAN, A. et al. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. **Research in Microbiology**, Paris, v. 15, n. 10, p. 861-866, Dec. 2004.

FERNANDES, A. et al. Change in ochratoxin A concentration during winemaking. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 58, n. 1, p. 92-96, Mar. 2007.

FERNANDES, A. et al. Fate of ochratoxin A during a vinification trial. **Aspects of Applied Biology**, London, v. 68, n. 1, p. 73-80, Nov. 2003.

FERON, V. J.; GROTEN, J. P. Toxicological evaluation of chemical mixtures. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 825-839, 2002.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins: their implications for human and animal health. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 21, n. 4, p. 115-120, 1999.

FINK-GREMMELS, J.; MALEKINEJAD, H. Biochemical mechanisms and clinical effects associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. In: MORGAVI, D. P.; RILEY, R. T. (Ed.). *Fusarium* and their toxins: mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, p. 326-341, 2007.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. In: ARORA, D. K.; MUKERJII, K. G.; MARTH, E. H. (Ed.). **Food and Feeds**. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 31-68.

GAMBUTI, A. et al. Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 56, n. 2, p. 155-162, Feb. 2005.

HOCKING, A. D. et al. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 84-88, Feb. 2007.

HUWIG, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 179-188, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Rio de Janeiro: IBGE, 2011: Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 30 de novembro de 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: IARC, 1993.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Secretaria de Estado da Saúde. **Micotoxinas**. São Paulo: Seção de Química Biológica/Bioquímica, 1998.

IOANNOU-KAKOURI, E et al. Occurrence and control of mycotoxins in foodstuffs in Cyprus. In: IOANNOU-KAKOURI, E. et al. **An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. p. 51-65.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 2009.

JELINEK, C. F.; POHLAND, A. E.; WOOD, G. E. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds, an update. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 72, n. 2, p. 223-230, 1989.

JIAO, Y. et al. Identification of ochratoxin A in food samples by chemical derivatization and gas chromatography mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, Amsterdam, v. 95, n.1-2, p. 364-367, Mar. 1992.

JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva: World Health Organization, 2001.

JONHSON, H. A. **História do vinho**. São Paulo: Companhia das Letras, 2001.

JORGENSEN, K.; JACOBSEN, J. S. Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992-99. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 12, p. 1184-1189, 2002.

JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. In: MORGAVI, D. P.; RILEY, R. T. (Ed.). *Fusarium* and their toxins: mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, p. 299-325, 2007.

KAPETANAKOU, A. E. et al. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 725-732, 2009.

KARBANCIOLU-GULER, F.; HEPERKAN, D. Natural occurrence of ochratoxin A in dried figs. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 617, n. 1-2, p. 32-36, 2008.

KAWASHIMA, L. M. et al. Fumonisin B1 and ochratoxin A in beers made in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 317-323, abr./jun. 2007.

KAWASHIMA, L. M. **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. 2004. 110 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

KHOURY, A. et al. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 2244-2250, Feb. 2008.

KOZAKIEWICZ, Z. et al. Making wine safer: the case of ochratoxin A. In: KOZAKIEWICZ, Z. et al. **Meeting the mycotoxin menace**. Netherlands: Wageningen Academic, 2003. p. 133-142.

LASRAM, S. et al. Evolution of ochratoxin A content during red and rose vinification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, n. 10, p.1696-1703, Aug. 2008.

LASRAM, S. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 3, p. 376-379, Mar. 2007.

LATASTE, C. et al. Evolution de la contamination en ochratoxine A: du vignoble Français au vin. **Progres Agricole et Viticole**, Année, v. 121, n. 2, p. 57-64, 2004.

LEBRIHI, A. **Evolution de la contaminación en ochratoxine A du vignoble Français au vin**. Paris: ITV, 2004.

LEIBTSEDER, J. Decontamination and detoxification of mycotoxins. In: MOSENTHIN, R.; ZENTEK, J.; ZEBROWSKA, T. (Ed.). **Biology of Nutrition in Growing Animals**. Vienna: Elsevier, 2005. v. 4, p. 439-465.

LEONG, S. L. et al. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. S10-S17, Sept. 2006.

LEONG, S. L. et al. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 301-306, Sept. 2007.

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; SCOTT, E. S. Ochratoxin A: from grapes to wine. In: AUSTRALIAN WINE INDUSTRY TECHNICAL CONFERENCE, 20., 2004, Melbourne. **Proceedings...** Melbourne: Australian Wine Industry Technical, 2004. p. 299.

LEUNG, M. C. K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 26, p. 9623-9635, 2006.

LEVI, C. P. Mycotoxins in coffee. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 63, n. 6, p. 1282-1285, 1980.

LEVI, C. P.; TRENK, H. L.; MOHR, H. K. Study of the occurrence of Ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 57, n. 4, p. 866-870, 1974.

LO CURTO, R. et al. Ochratoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatments on grapes. **Food Chemistry**, London, v. 84, n. 1, p. 71-75, Jan. 2004.

LOBEAU, M. et al. Development of a new clean-up tandem assay column for the detection of ochratoxin A in roasted coffee. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 538, p. 57-61, 2005.

LÓPEZ-DE-CERAIN, A. et al. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 11, p. 1058-1064, Nov. 2002.

MAGNOLI, C. E. et al. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 163, n. 5, p. 249-260, May 2007.

MARKAKI, P. et al. Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 4, p. 533-537, Apr. 2001.

MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 12, p. 3968-3988, Dec. 1992.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A. J.; CARRASCOSA, A. V. HACCP to control microbial safety hazards during winemaking: ochratoxin A. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 5, p. 469-475, Sept. 2009.

MATEO, R. et al. An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 79-83, Oct. 2007.

MELLO, R. M. R. de. **Área e produção de uvas: panorama mundial**. [S.l.]: Embrapa Uva e Vinho, 2009. Disponível em: < <http://www.cnpuv.embrapa.br/download.php?file=publica/artigos/producaomundial.pdf>>. Acesso em: 13 jan. 2012.

MILLER, J. D. Mycotoxins. In: WORKSHOP ON MYCOTOXINS IN FOOD IN AFRICA, 1995, Cotonou. **Proceedings...** Croydon: International Institute for Tropical Agriculture, 1995. p. 18-22.

MONACI, L.; PALMISANO, F. Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 378, n. 1, p. 96-103, Jan. 2004.

MORGAVI, D.; RILEY, R. T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. In: MORGAVI, D. P.; RILEY, R. T. (Ed.). *Fusarium* and their toxins: mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, p. 201-212, 2007.

MORUNO, E. G. **La determinación de la Ocratoxina A en la uva y en los cultivos de hongos**. Paris: OIV, 2002. (Bulletin, 1170).

MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, p. S5-S9, 1996.

MOUNJOUENPOU, P. et al. Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 121, n. 2, p. 234-241, 2008.

NAPOLITANO, A. et al. Natural occurrence of ochratoxin a and antioxidant activities of green and roasted coffees and corresponding byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 25, p. 10499-10504, Dec. 2007.

NOBA, S. et al. Determination of ochratoxin A in ready-to-drink coffee by immunoaffinity cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 14, p. 6036-6040, July 2009.

NUNEZ, Y. P. et al. Effects of aging and heat treatment on whole yeast cells and yeast cell walls and on adsorption of ochratoxin A in a wine model system. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 7, p. 1496-1499, July 2008.

OTTENEDER, H.; MAJERUS, P. Otteneder and P. Majerus, occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 9, p. 793-798, Sept. 2000.

PALLARONI, L.; VON HOLST, C. Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 993, n. 1-2, p. 39-45, 2003.

PATEKI, M. et al. Influence of sulphur dioxide, controlled atmospheres and water availability on in vitro germination, growth and ochratoxin A production by strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 141-149, May 2007.

PÉREZ-DE-OBANOS, A. et al. Ocratoxina A en plasma humano: nuevos datos de exposición en España. **Revista de Toxicología**, Pamplona, v. 18, n. 1, p. 19-23, 2001.

PERRONE, G. et al. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 1, p. 680-685, Jan. 2006.

PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and health risks. In: MORGAVI, D. P.; RILEY, R. T. (Ed.). *Fusarium* and their toxins: mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, p. 283-298, 2007.

PESTKA, J. J. et al. Comparative assessment of fumonisin in grain based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 2, p. 169-172, Feb. 1994.

PETTERSSON, H.; ABERG, L. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. **Food Control**, Guildford, v.14, n. 4, p. 229-232, June 2003.

PIETRI, A. et al. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 7, p. 647-654, July. 2001.

PITT, J. I. et al. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, London, v. 38, n. 1, p. 41-46, 2000.

PROTAS, J. F. S. et al. Programa de desenvolvimento estratégico da vitivinicultura do Rio Grande do Sul: visão 2005. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 10., Bento Gonçalves, 2005. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. p. 109-130. (Documentos, 55).

QUINTELA, F. M. Mammalia, Chiroptera, Rio Grande, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Check List: journal of species lists and distribution**, Rio Grande do Sul, v. 7, n. 4, p. 443-447, 2011.

RATOLA, N.; MARTINS, L.; ALVES, A. Ochratoxin A in wines: assessing global uncertainty associated with the results. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 513, n. 1, p. 319-324, June 2004.

REIJ, M. W.; SCHOTHORST, M. V. Critical notes on microbiological risk assessment of food. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 1-8, Jan./Mar. 2000.

RIBA, A. et al. Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 1-2, p. 85-92, Feb. 2008.

RINGOT, D. et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 159, n. 1, p. 18-46, Jan. 2006.

ROMANI, S. et al. Influence of roasting levels on ochratoxin A content in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 17, p. 5168-5171, Aug. 2003.

ROSA, C. A. R. et al. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 21, n. 4, p. 358-364, Apr. 2004.

ROSET, M. Survey on ochratoxin A in grape juice. **Fruit Processing**, Schönborn, v. 13, n. 2, p. 167-172, Nov. 2003.

SABINO, M.; PRADO, G.; COLEN, G. Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em milho de Minas Gerais, Parte 1. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 46, n. 1-2, p. 65-71, jun. 1986.

SAGE, L. et al. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 5, p. 1306-1311, Feb. 2002.

SARTORI, D. et al. PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. **Research in Microbiology**, Paris, v. 157, n. 4, p. 350-354, May 2006.

SCOTT, P. M.; TRUCKSESS, M. W. Application of Immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 80, n. 5, p. 941-949, Sept./Oct. 1997.

SEKIYAMA, B. L. et al. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, p. 289-294, 2005.

SELOUANE, A. et al. Impact of some environmental factors on growth and production of ochratoxin A of/by *Aspergillus tubingensis*, *A. niger*, and *A. carbonarius* isolated from Moroccan grapes. **Journal Microbiology**, London, v. 47, n. 4, p.411–419, Aug. 2009.

SERRA, R. et al. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 63-68, Nov. 2003.

SERRA, R.; BRAGA, A.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 4, p. 515-521, May 2005.

SERRATOSA, M. P. et al. Compostos fenólicos obtidos de uvas secas em câmara com temperatura controlada da casta Pedro Ximénez. In: SIMPÓSIO DE VITIVINICULTURA DO ALENTEJO; EVENTO ALENTEJO DAS GASTRONOMIAS MEDITERRÂNICAS – FESTIVAL INTERNACIONAL, 8., 2010, Évora. **Anais...** Évora: ERT, 2010. p. 123-131. Disponível em: <http://cvra.mikroelement.pt/media/documents/250510_1274806852.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2013.

SHEPHERD, A. et al. Larsen ice shelf has progressively thinned science, **Science**, London, v. 302, n. 5646, p. 856-859, Oct. 2003.

SHUNDO, L. et al. Ochratoxin A in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 533-537, Oct./Dec. 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SLOVIC, P. Perception of risk. **Science**, London, v. 236, n. 4799, p. 280-285, 1987.

SMITH, J. E. et al. Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. **Natural Toxins**, England, v. 3, n. 4, p. 187-192, July/Aug. 1995.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 68, n. 6, p. 1128-1130, 1985.

SOLEAS, G. J.; YAN, J.; GOLDBERG, D. M. Assay of ochratoxin A in wine and beer by high pressure liquid chromatography photodiode array and gás chromatography mass selective detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 6, p. 2733-2740, June 2001.

SOUFLEROS, E. H.; TRICARD, C. H.; BOLOUMPASI, E. C. Occurrence of ochratoxin A in Greek wines. **Journal of Science of Food and Agriculture**, Easton, v. 83, n. 3, p. 173-179, Jan. 2003.

SOUZA, S. M. C.; CARVALHO, V. L. Efeitos de microrganismos na qualidade da bebida do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 21-23, 1997.

STANDER, M. A.; STEYN, P. S. Survey of ochratoxin A in South African wines. **Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 23, n. 1, p. 9-13, Mar. 2002.

STEFANAKI, I. et al. Ochratoxin A concentration in Greek domestic wines and dried vine fruits. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 20, n. 1, p. 74-83, Jan. 2003.

SUÁREZ-QUEIROZ, M. L. et al. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 629-634, Dec. 2004.

SUAREZ-QUIROZ, M. et al. The impact of roasting on the ochratoxin A content of coffee. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 605-611, June 2005.

SUGITA-KONISHI, Y. et al. Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, and fumonisins in retail foods in Japan. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, n. 6, p. 1365-1370, June 2006.

THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **Trends in Genetics**, London, v. 22, n. 9, p. 511-519, Sept. 2006.

TJAMOS, S. E. et al. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth raisin and wine-producing vineyards in Greece: population composition, ochratoxin A production and chemical control. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 4, p. 250-255, Apr. 2004.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 632, n. 2, p. 168-180, Jan. 2009.

UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA. **Comercialização de vinhos e suco de uva provenientes do Rio Grande do Sul e litros – 2007/2010**. Rio Grande do Sul: UVIBRA, 2012. Disponível em: < <http://www.uvibra.com.br> >. Acesso em: 20 dez. 2012.

VAN DER GAAG, B. et al. Biosensors and multiple mycotoxin analysis. **Food Control**, Guildford, v. 14, n. 4, p. 251-254, 2003.

VAN DER MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, London, v. 205, n. 976, p. 1112-1113, Mar. 1965.

VAN EGMOND, H. P. Analytical methodology and regulations for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, p. S11-S13, 1996.

VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin A in grapes and grape- derived products. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 72-81, 2006.

VATINNO, R. et al. Determination of Ochratoxin A in green coffee beans by solid-phase microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1187, n. 1-2, p. 145-150, Apr. 2008.

VERARDI, G.; ROSNER, H. Some reflections on establishing a community legislation on mycotoxins. **Natural Toxins**, New York, v. 3, n. 4, p. 337-340, 1995.

VISCONTI, A. et al. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 25, n. 2, p. 193-202, Apr. 2008.

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTOZE, G. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean – up and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 864, p. 89-101, 1999.

VISWANATH, P. et al. A survey of ochratoxin a in wheat and barley in India. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 27, n. 2, p. 111-123, May 2007.

VOSS, K. A.; HASCHEK, W. M. Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. In: MORGAVI, D. P.; RILEY, R. T. (Ed.). *Fusarium and their toxins: mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact*. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, p. 299-325, 2007.

WELKE, J. E. et al. Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 48-52, 2009.

WHITAKER, T. B. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. **Food Control**, Guildford, v. 14, n. 4, p. 233-237, 2003.

WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva: World Health Organization, 2001.

WILKINSON, C. F. et al. Assessing the risks of exposures to multiple chemicals with a common mechanism of toxicity: how to cumulate? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Duluth, v. 31, p. 30-43, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A guide for national food safety authorities**. Rome: FAO/WHO, 2006. (FAO Food and Nutrition Paper, 87). Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/a0822e/a0822e.pdf>>. Acesso em 15 jan. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for predicting dietary intake of pesticides residues**. Geneva: Global Environment Monitoring System Food Contamination Monitoring and Assessment Programme, 1997.

WU, F. Economic impact of fumonisin and aflatoxin regulations on global corn and peanut markets. In: BARUG, D. et al (Ed.). **The mycotoxin factbook: food and feed topics**. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2006. p. 83-93.

WU, F. Mycotoxins risk assessment for the purpose of setting International Regulatory Standards. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 15, n. 38, p. 4049-4055, 2004.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. 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 clean-up: methodology and Swiss data. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 666, n. 1, p. 85-99, Apr. 1996.

ZINEDINE, A. et al. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 11, p. 868-874, Nov. 2006.

CAPÍTULO 2

INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM VINHOS NACIONAIS E IMPORTADOS E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DOS CONSUMIDORES

RESUMO

Algumas espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* sintetizam, como metabólito secundário tóxico, uma toxina natural denominada ocratoxina A. Essa micotoxina é um composto químico, estável, de baixo peso molecular, que apresenta propriedades nefrotóxicas para os animais e efeitos imunodepressivo, tetrogênico e genotóxico para humanos, tendo sido incluída no Grupo 2B (potencialmente carcinogênica para humanos) pela Agência de Pesquisa do Câncer. A frequente detecção de OTA no soro sanguíneo de humanos saudáveis sugere a contínua exposição dos consumidores à micotoxina, por meio do consumo de alimento contaminado. Na Europa, tem sido estimado que o vinho é a segunda mais importante fonte de ocratoxina A na dieta, depois dos cereais. Com a finalidade de proteger a saúde dos consumidores, no Brasil estabeleceu-se, em 2011, o limite máximo aceitável de ocratoxina A em vinhos de 2 µg/L. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a incidência de ocratoxina A em vinhos nacionais e importados, bem como avaliar a exposição dos consumidores à OTA por meio do consumo de vinho tinto, *rosé* e branco. Foram analisadas 38 amostras de vinhos (27 tintos, 7 brancos, 2 *rosés* e 2 fortificados), de Brasil (17), Argentina (8), Portugal (6), Chile (3), França (2), Uruguai (1) e África do Sul (1). As amostras foram escolhidas considerando preços populares de, no máximo, 20 reais. As amostras foram analisadas por HPLC. O limite de detecção do método foi de 0,16 µg/kg e o limite de quantificação foi de 0,56 µg/kg. Do total de amostras contaminadas, 85,71% apresentaram níveis de contaminação por ocratoxina A inferiores a 2 µg/L, limite máximo em vinho estabelecido pelo Ministério da Saúde do Brasil e pela União Europeia. Somente duas amostras, provenientes da França e da Argentina, apresentaram valores acima do tolerado, de 2,47 e 2,78 µg/L, respectivamente. Os resultados demonstram que os principais tipos de vinhos consumidos no Brasil não são fontes significativas de ocratoxina A, para os consumidores moderados.

Palavras-chave: Fungos, Micotoxinas, Consumo.

ABSTRACT

Some species of fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* synthesize as toxic secondary metabolite, a natural toxin called ochratoxin A. This mycotoxin is a chemical compound, stable, low molecular weight, which has nephrotoxic properties for animals and effects immunodepressive, teratogenic, genotoxic to humans and has been included in Group 2B (potentially carcinogenic to humans) by the International Agency on Research Cancer (IARC). The OTA frequent detection in blood serum of healthy humans suggests the continued exposure of consumers to mycotoxin through consumption of contaminated food. In Europe, it has been estimated that the wine is second most important source of ochratoxin A in the diet after cereals. Intended to protect the health of consumers Brazil established in 2011 the maximum acceptable limit for ochratoxin A in wines $2\mu\text{g} / \text{L}$. This study aimed to evaluate the incidence of ochratoxin A in domestic and imported wines, as well as evaluating the exposure, that of consumers to OTA through the consumption of red wine, rose and white. We analyzed 38 samples of wines (27 red, 7 white, 2 rosés and fortified 2), Brazil (17), Argentina (8), Portugal (6), Chile (3), France (2), Uruguay (1) and South Africa (1). The samples were chosen considering popular prices, of up to 20 reais. The samples were analyzed by HPLC. The detection limit of the method was $0.16\mu\text{g} / \text{L}$ and the limit of quantification was $0.56\mu\text{g} / \text{L}$. Of the total samples analyzed, 85.71% had levels of ochratoxin A contamination below $2\mu\text{g}/\text{L}$, Ceiling of ochratoxin A in wine established by the Ministry of Health of Brazil and the European Union. Only two samples from France and Argentina had values above the tolerated, of 2.47 and 2.78 mg / L respectively. The results demonstrated that the main types of wine consumed in Brazil are not significant sources of ochratoxin A for moderate drinkers.

Keywords: Fungi, Mycotoxins, Consumption.

1 INTRODUÇÃO

A ocratoxina A é uma micotoxina produzida, principalmente, pelas espécies *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* e, raramente, por *Aspergillus niger*. Está presente em vários alimentos que fazem parte da dieta da população, apresentando propriedades nefrotóxicas e carcinogênicas. A ocratoxina A foi classificada, pela International Agency for Research on Câncer (IARC), em 1993, como um possível agente carcinogênico (Grupo 2B) para humanos. Dentre os alimentos mais citados em relação à presença de ocratoxina A incluem-se trigo (RIBA et al., 2008), milho (SEKIYAMA et al., 2005; MAGNOLI et al., 2007), café (LEONI et al., 2000; LEONG et al., 2007), cacau (MOUNJOUENPOU et al., 2008), cevada (VISWANATH et al., 2007), cerveja (KAWASHIMA et al., 2007), figos secos (KARBANCIOLU-GULER; HEPERKAN, 2008), queijo (DALL'ASTA et al., 2008), centeio (JORGENSEN; JACOBSEN, 2002), pão (ZINEDINE et al., 2006), uva (LASRAM et al., 2007) e produtos derivados, incluindo suco e vinho (BURDASPAL; LEGARDA, 2007).

Na Europa, depois dos cereais, o vinho é a maior fonte de OTA ingerida pela população (MIRAGLIA; BRERA, 2002).

O vinho tem sido reconhecido por trazer benefícios fisiológicos para a saúde humana, sendo o seu consumo moderado recomendado regularmente. Entretanto, toda esta atenção voltada para o vinho e o atual incentivo para seu consumo torna-se também motivo de preocupação, pois a presença de substâncias tóxicas, como a ocratoxina A, compromete o aspecto de segurança do produto. Diante desse fato, recentemente, no Brasil, foram estabelecidos limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos e bebidas, por meio da Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, sendo o valor máximo permitido em vinhos e seus derivados de 2 µg/L.

O uso de ferramentas que não só identifiquem a presença da toxina no alimento, mas que também avaliem o risco de exposição a esta substância pela população, torna-se de extrema importância. Um modelo que vem sendo cada vez mais utilizado nos trabalhos realizados é a avaliação de risco, que contribui por meio de evidências científicas para que medidas de controle sejam tomadas.

A análise de risco em alimentos, particularmente a avaliação do risco, é uma ferramenta de importância capital, principalmente para países em que o agronegócio representa significativa parcela da balança comercial, como o Brasil. Além de avaliar os riscos associados ao consumo dos alimentos produzidos no país e também dos importados, a análise de risco protege o país contra a imposição de barreiras comerciais “mascaradas” como medidas sanitárias e/ou fitossanitárias.

Considerando a importância da avaliação de risco na gestão da segurança dos alimentos e o pouco conhecimento no país sobre o assunto, bem como o crescente aumento da ingestão de vinho pela população brasileira, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o risco de exposição humana à ocratoxina A pelo consumo de vinhos nacionais e importados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

As amostras de vinhos foram coletadas ao acaso, em diferentes estabelecimentos comerciais, em Lavras, MG, no período de 2011-2012, e encaminhadas ao Laboratório de Micologia de Alimentos, no Departamento de Ciências dos Alimentos e, posteriormente, ao Laboratório de Cachaça, do Departamento de Química, ambos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), para a realização das análises.

Foram analisadas, no total, 38 amostras de vinhos, sendo 27 tintos, 7 brancos, 2 *rosés* e 2 fortificados. As amostras foram divididas em nacionais (vinhos de mesa) e importadas (vinhos finos), provenientes da França, de Portugal, da Argentina, do Chile, do Uruguai e da África do Sul (Tabela 6). A maior parte das amostras analisadas era de vinhos de mesa produzidos no Brasil (17), seguidos pelos vinhos argentinos (8), portugueses (6), chilenos (3), franceses (2), uruguaios (1) e sul-africano (1).

Tabela 6 Amostras de vinhos com os respectivos países, três anos de produção

	Amostras de vinhos	Tipo de vinho	Ano de elaboração	País de produção
1	BRA/VMT/SU1		2011	
2	BRA/VMT/SU2		2011	
8	BRA/VMT/SU3		2011	
9	BRA/VMT/SU4		2011	
10	BRA/VMT/SU5	Vinho de mesa tinto suave	2011	Brasil
11	BRA/VMT/SU6		2011	
3	BRA/VMT/SE1	Vinho de mesa tinto seco	2011	Brasil
7	BRA/VMT/SE3		2011	
6	ARG/VMT/SE2	Vinho de mesa tinto seco	2011	Argentina
4	BRA/VMR/SU1	Vinho de mesa <i>rosé</i> suave	2011	Brasil
5	BRA/VMR/SU2		2011	
12	BRA/VMB/SU1		2011	
14	BRA/VMB/SU2		2011	
16	BRA/VMB/SU3	Vinho de mesa branco suave	2011	Brasil
17	BRA/VMB/SU4		2011	
13	BRA/VMB/SE1		2011	
15	BRA/VMB/SE2	Vinho de mesa branco seco	2011	Brasil
18	BRA/VMB/SE3		2011	
19	URU/CS/1	Vinho fino tinto	2010	Uruguai
20	ARG/MER/1		2009	
23	ARG/MAL/1		2010	
26	ARG/CS/2		2009	
28	ARG/MAL/2	Vinho fino tinto	2010	Argentina
27	ARG/MAL/3		2010	
30	ARG/MAL/4		2009	
34	ARG/CS/3		2009	
21	PORT/VP/1	Vinho do porto	-	Portugal
36	PORT/VP/2		-	
22	PORT/VMT/SE1		2010	
31	PORT/VMT/SE2	Vinho de mesa	2010	Portugal
32	PORT/VMT/SE3		2007	
25	PORT/RL/1	Vinho fino tinto	2010	Portugal
24	FRA/VR/1	Vinho fino tinto	2010	França
37	FRA/JP/2		2011	
29	AFR/CS/1	Vinho fino tinto meio seco	2010	África do Sul
33	CHI/MER/1		2011	
35	CHI/MER/2	Vinho fino tinto	2010	Chile
38	CHI/CS/2		2010	

2.2 Análise de ocratoxina A

A quantificação de ocratoxina A (OTA) nas amostras de vinhos foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção por fluorescência, conforme descrito em EN 14133/2003 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2003). As análises foram realizadas no Laboratório de Cachaça, no Departamento de Química da UFLA.

2.3 Soluções e reagentes

A solução de diluição foi preparada com a dissolução de 10 g de polietilenoglicol 8000 e 50 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), em 1.000 mL de água purificada (q.s.p.). Para a obtenção da solução de lavagem, dissolveram-se 25 g de cloreto de sódio (NaCl) e 5 g de bicarbonato de sódio em 1.000 mL de água purificada (q.s.p.). Solução estoque de OTA Sigma (St. Louis, MO, USA) foi preparada em tolueno:ácido acético (99:1, v/v). A concentração foi determinada de acordo com a Association of Official Analytical Chemists - Association Of Official Analytical Chemists (1997), sendo verificada em espectrofotômetro UV a 333 nm, com $\epsilon = 5.440 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. L. Solução de trabalho foi preparada por diluição apropriada em tolueno:ácido acético (99:1, v/v), para os testes de recuperação e curva de calibração. Para a fase móvel, foram utilizados acetonitrila:metanol:ácido acético aquoso (35:35:30), seguindo-se da filtração a vácuo em membrana de celulose regenerada PTFE de 0,45 μm . Ácido acético aquoso foi preparado com uma solução de ácido acético glacial em água purificada (1:29, v/v). As soluções foram armazenadas à temperatura de $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, no escuro.

2.4 Preparo das amostras e purificação em coluna de imunoafinidade

Inicialmente, as amostras foram resfriadas a 4 °C. De cada amostra, 40 mL foram adicionados a 40 mL da solução de diluição e homogeneizados sob agitação mecânica em *shaker*, em velocidade média, por 30 minutos. Esta solução foi submetida à filtração a vácuo (2 mL/min) em membrana GFA e 40 mL do filtrado foram passados por uma coluna de imunoafinidade (Ochraprep, R-Biopharm Rhône Ltd) adaptada ao sistema Visiprep™ SPE *Vacuum Manifold*. A coluna foi lavada com 10 mL da solução de lavagem e, em seguida, com 10 mL de água purificada, para a remoção dos resíduos não específicos. Posteriormente, adicionaram-se 2 mL de metanol à coluna para liberação da OTA vinculada ao anticorpo, com repetição do procedimento por três vezes. O eluato obtido foi evaporado com aquecimento (± 50 °C) da amostra sob atmosfera de nitrogênio. Este extrato seco foi reconstituído em 250 μ L de fase móvel. Injetaram-se, então, 50 μ L das soluções padrão de OTA e dos extratos das amostras no cromatógrafo líquido.

2.5 Quantificação de ocratoxina A por cromatografia líquida

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU 20A₃, interface modelo CBM-20A injetor automático modelo SIL-10AF e detector de fluorescência RF-10 A_{XL}. A coluna usada foi a Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m) conectada a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5 μ m).

Foram seguidas as condições cromatográficas de comprimentos de onda: excitação de 332 nm e emissão de 476 nm. O fluxo utilizado em toda a análise foi de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume injetado das amostras e do padrão foi de $20 \text{ }\mu\text{L}$. A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (metanol:acetonitrila:água:ácido acético). A quantificação da OTA nas amostras foi feita por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ($y = 1,11756 \times 10^7 x - 2592,1485$; em que $y = \text{área do pico}$ e $x = \text{concentração de OTA}$), correlacionando a área do pico *versus* a concentração da respectiva solução padrão, tendo o coeficiente de determinação (r^2) obtido sido de 0,9999. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, sendo calculados pelas respectivas relações matemáticas: $\text{LD} = 3\text{DP}/m$ e $\text{LQ} = 10\text{DP}/m$ (em que DP = estimativa do desvio padrão da linha de regressão e $m =$ coeficiente angular da linha de calibração) (HARRIS, 2008). Para estes, foram encontrados os valores de 0,0004 e $0,0016 \text{ }\mu\text{g/g}$, respectivamente. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, enquanto as soluções padrão de OTA foram injetadas em triplicata.

A confirmação da presença de OTA foi determinada pela formação de ésteres metílicos, sendo observado um aumento no tempo de retenção das amostras devido à derivatização da OTA. A partir do cálculo da área dos picos de OTA dos extratos das amostras e das soluções padrões foi quantificado o teor de OTA das amostras. Nas condições de análise, o tempo de retenção foi de, aproximadamente, $9,99 \pm 0,15$ minutos. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram $0,16 \text{ }\mu\text{g/L}$ e $0,56 \text{ }\mu\text{g/L}$, respectivamente.

2.6 Eficiência da metodologia analítica

Para garantir a qualidade analítica dos resultados foram realizados ensaios de recuperação. Os vinhos foram fortificados em três níveis com concentrações iguais a 1,0 ng/mL, 2,0 ng/mL e 4,0 ng/mL, em triplicata. Foram extraídos com metanol e analisadas conforme método descrito no item 2.5.

Foram obtidas as seguintes recuperações 82%, 82% e 98%, respectivamente. Tais recuperações comprovaram a excelente reprodutibilidade do método e atende à determinação do CODEX, nos critérios de desempenho de métodos analíticos, entre 70% e 110% de recuperação (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1995).

2.7 Avaliação da exposição humana

Para se avaliar a exposição humana à ocratoxina A presente nos elementos estudados foi feita uma análise da quantidade média ingerida diariamente de vinho. De acordo com os valores obtidos, foi feita uma estimativa da exposição por meio da seguinte equação:

$$\text{Exposição} = \frac{\text{Concentração da substância} \times \text{Consumo do alimento}}{\text{Peso corporeo}}$$

2.8 Avaliação da exposição agregada

O cálculo para se realizar a avaliação da exposição agregada foi feito de acordo com o método determinístico, em que foram utilizados valores fixos, pontuais, de concentração e consumo, de acordo com os resultados obtidos nas análises dos vinhos.

O cálculo da ingestão diária, em mg/kg peso corpóreo/dia, foi feito considerando o somatório da ingestão do consumo de vinho pela população em estudo, de acordo com a Equação 2.

$$\text{Ingestão} = \sum (R_i \times C_i) / \text{Peso corpóreo}$$

em que R será o valor da concentração da substância, no vinho *i*, em mg/kg e C o consumo diário, em L, dessa bebida pela população/indivíduo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

2.9 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Foi empregado o delineamento inteiramente casualizado nos ensaios. Foram utilizadas dez repetições por tratamento. A análise de variância e as médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott (1974), a 5% de significância. As análises foram efetuadas no programa Sisvar.

Uma análise exploratória, relacionando os teores de ocratoxina A com a origem, o tipo de uva e o tipo de vinho, foi realizada por meio de análise de componentes principais (ACP). Os dados foram organizados em uma matriz com as amostras de vinho dispostas em linhas e as variáveis em colunas. As variáveis qualitativas consideradas foram Brasil, Uruguai, Argentina, Portugal, França, África do Sul e Chile, para origem; de mesa, cabernet sauvignon, merlot, do porto, malbec e cabernet-syrah, para variedade das uvas e tinto suave, tinto seco, *rosé* suave, branco suave, branco seco, vinho fino tinto e fortificado para tipo de vinho. Tais variáveis foram expressas em valores binários: 0 - não pertence à classe e 1 - pertence à classe. Os dados foram autoescalados e a ACP foi executada. Os resultados foram apresentados na forma de gráficos de escores e pesos, para as duas primeiras componentes principais. A análise foi realizada no programa Chemoface versão 1.5 (NUNES et al., 2012).

3 RESULTADOS

3.1 Padronização da metodologia analítica

A curva de calibração obtida a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados, foi linear, na faixa de 0,4 a 10 µg/L.

Os valores de recuperação e os coeficientes de variação para vinho foram, em média, de 87,5% e 5,3%, respectivamente (Tabelas 7). Estes resultados estão dentro das normas recomendadas em EC 401/2006 (COMMISSION REGULATION, 2006), para valores de contaminação inferiores a 1,0 µg/L e entre 1,0 e 10 µg/L.

Tabela 7 Resultados dos ensaios de validação do método de detecção de ocratoxina A

	Nível de contaminação (µg/L)	Recuperação (%)	Desvio padrão	CV (%)	Limite de detecção (µg/kg)	Limite de quantificação (µg/kg)
OTA	0,20	82,3	2,300084	2,79	0,16	0,56
	0,40	82,3	3,498698	4,25		
	0,80	97,9	8,630532	8,82		
	Média	87,5	4,809771	5,3		

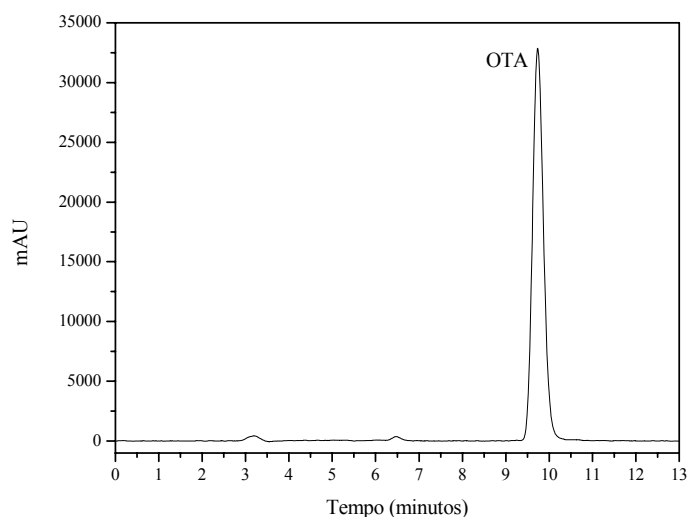


Gráfico 1 Cromatograma da amostra de vinho tinto contaminada com 10 µg/L de OTA, para o desenvolvimento da curva padrão

3.2 Ocorrência e níveis de ocratoxina A em vinhos

A incidência e os valores médios (mínimos e máximos) de OTA encontrados nas amostras de vinhos estão descritos na Tabela 8. Conforme se observa, os níveis médios de OTA dos vinhos contaminados são considerados diferentes entre os seis grupos definidos estatisticamente (a, b, c, d, e, f), pelo teste Scott e Knott (1974), a $p < 0,05$.

O contraste entre os vinhos tintos de mesa brasileiros, brancos, *rosé*, os vinhos de mesa importados e os vinhos tintos finos contaminados com OTA foi estatisticamente significativo. Desse modo, é possível inferir que o nível médio de contaminação das amostras positivas de vinhos tintos finos diferiu significativamente do nível detectado nos vinhos brancos, *rosé* e de mesa.

Tabela 8 Valores médios de OTA encontrados nas amostras analisadas

Amostras de vinho	Ocratoxina A ($\mu\text{g/L}$)
BRA/VMB/SU3	0,00 a
BRA/VMB/SU4	0,00 a
BRA/VMB/SE3	0,00 a
BRA/VMB/SE1	0,00 a
BRA/VMB/SU2	0,00 a
BRA/VMB/SE2	0,00 a
ARG/CS/3	0,00 a
ARG/CS/2	0,00 a
ARG/MAL/2	0,00 a
CHI/MER/2	0,00 a
PORT/VP/1	0,00 a
PORT/VMT/SE1	0,00 a
BRA/VMR/SU1	0,00 a
BRA/VMR/SU2	0,00 a
ARG/VMT/SE2	0,00 a
BRA/VMT/SU1	0,00 a
BRA/VMT/SU2	0,00 a
BRA/VMT/SE1	0,00 a
BRA/VMT/SU4	0,00 a
BRA/VMT/SU6	0,00 a
BRA/VMT/SU3	0,00 a
BRA/VMB/SU1	0,00 a
BRA/VMT/SE3	0,00 a
BRA/VMT/SU5	0,00 a
CHI/MER/1	0,44 b
AFR/CS/1	0,44 b
ARG/MAL/4	0,45 b
CHI/CS/2	0,50 b
URU/CS/1	0,50 b
PORT/VP/2	0,56 b
ARG/MER/1	0,59 b
ARG/MAL/1	0,60 b
PORT/VMT/SE2	1,20 c
FRA/JP/2	1,39 c
PORT/VMT/SE3	1,58 d
PORT/RL/1	1,79 d
FRA/VR/1	2,46 e
ARG/MAL/3	2,77 f

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade

De acordo com os dados da Tabela 8, observa-se que 14 (36,84%) das 38 amostras analisadas apresentaram contaminação por ocratoxina A e estes valores variaram de 0,44 µg/L a 2,77µg/L, tendo os vinhos importados, principalmente provenientes dos países Argentina e França, sido os mais contaminados. Todos os vinhos brasileiros analisados não apresentaram teores da toxina

A contaminação por ocratoxina A nos vinhos foi relativamente baixa, com exceção de duas amostras provenientes da França e da Argentina, que obtiveram valores de 2,47 e 2,78 µg/L, respectivamente. Do total de amostras contaminadas, 85,71% apresentaram níveis de contaminação por ocratoxina A menores que 2 µg/L. Dos vinhos estudados, 100% dos nacionais não apresentaram contaminação, 50% dos vinhos argentinos estavam contaminados com valores variando de 0,45 a 2,77 µg/L e 66,7% dos vinhos portugueses apresentaram contaminação entre 0,56 a 1,79 µg/L. Das amostras provenientes do Chile, a contaminação foi observada em 66%, com valores de OTA variando de 0,44 a 0,50 µg/L. Dos vinhos franceses, 100% estavam contaminados pela toxina, sendo os valores de 1,39 e 2,46 µg/L. O mesmo ocorreu com as amostras provenientes da África do Sul e do Uruguai, nas quais os valores encontrados foram de 0,44 e 0,50 µg/L, respectivamente. Tais resultados demonstram que, embora os vinhos finos tradicionalmente preferidos pela origem, como França, Portugal e Argentina, não estejam preenchendo o requisito de segurança alimentar tão exigido pelos consumidores, eles estão cada vez mais conscientes no sentido de não ingerir alimentos que causem qualquer dano à saúde.

Em nenhuma amostra dos vinhos branco e *rosé* foi encontrada a presença de ocratoxina A, fato já esperado, visto que, em diversos estudos, tem sido observada maior incidência e níveis de contaminação nos vinhos tintos em relação aos brancos. Dentre as amostras analisadas, os vinhos tintos finos obtiveram maior contaminação por OTA e, entre estes, os de origem argentina e

francesa foram os que apresentaram maior concentração, excendo o limite máximo de 2 $\mu\text{g/L}$, estabelecido pela Comunidade Europeia e pela legislação brasileira.

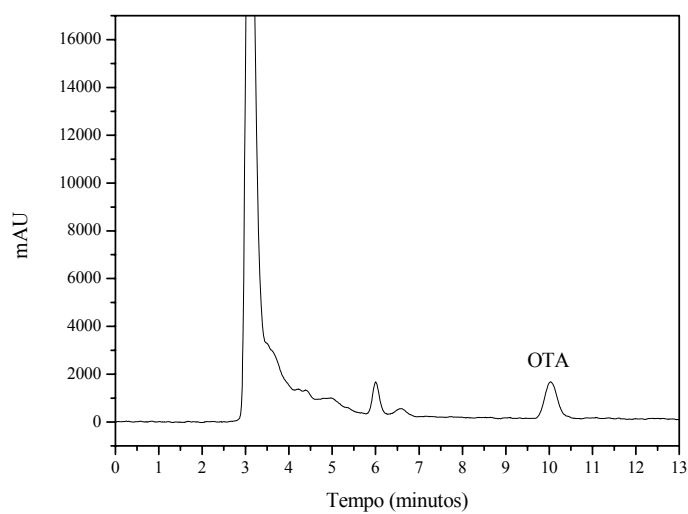


Gráfico 2 Cromatograma da amostra de vinho tinto ARG/MAL/3, com teor de ocratoxina A de 2,77 $\mu\text{g/L}$

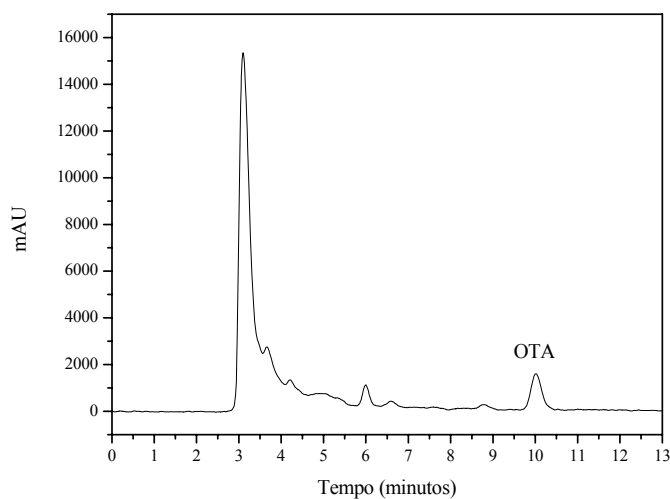


Gráfico 3 Cromatograma da amostra de vinho tinto FRA/VR/1, com teor de ocratoxina A de 2,46 $\mu\text{g/L}$

Os níveis de contaminação e os respectivos países de origem das amostras analisadas encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 Frequência por faixa de contaminação de ocratoxina A ($\mu\text{g/L}$) presente nas amostras de vinhos analisadas

Ocratoxina A ($\mu\text{g/L}$)	Vinhos Brasil	Vinhos Argentina	Vinhos Uruguai	Vinhos Portugal	Vinhos França	Vinhos África	Vinhos Chile
<0,16	17	4	-	2	-	-	1
0,17 – 0,60	-	3	1	1	-	1	2
0,61 – 1,40	-	-	-	1	-	-	-
1,41 – 1,80	-	-	-	2	1	-	-
1,81 – 2,50	-	-	-	-	1	-	-
>2,50	-	1	-	-	-	-	-

*ND – não detectado (limite de detecção: 0,16 $\mu\text{g/L}$)

Os resultados deste estudo estão de acordo com os obtidos por Shundo et al. (2006), que consideraram que os vinhos brasileiros podem ser fonte inferior de ocratoxina A, quando comparados com a de outros países produtores de

vinhos no Mercosul (Argentina e Chile) e com outros países tradicionalmente produtores de vinho.

Terra et al. (2012), ao estudarem amostras de vinhos e sucos de uva elaborados no vale do submédio São Francisco, nordeste do Brasil, observaram a presença de OTA em 75% dos vinhos analisados, porém, os níveis de contaminação foram considerados baixos (0,03-0,62 µg/L), sendo inferiores ao limite máximo tolerável.

A OTA foi detectada em 14 (36,84%) amostras analisadas, em concentrações entre 0,10 a 2,77 µg/L. Todas as amostras positivas foram de vinhos tintos, sendo todos importados. Apenas duas amostras de vinhos de mesa analisados estavam contaminadas por OTA, ambas de Portugal. Os vinhos em que a concentração de OTA foi inferior ao LQ<0,16 foram os de mesa branco e *rosé*.

No Gráfico 4 observa-se a relação entre a concentração de ocratoxina A e as variáveis: variedade (vinho de mesa – vm; cabernet sauvignon – cs; merlot – me; do porto – dp; malbec – ma; e cabernet-sirah – csi), origem (Brasil – Br; Argentina – Ar; Uruguai – Ur; África do Sul – AfrS; França – Fr; Portugal – Por; e Chile – Ch), tipo (tinto suave – tin su; tinto seco – ti-se; rosé suave – ros; branco suave – br-su; branco seco – br-se; vinho fino tinto – fi-ti; e vinho fortificado – fort) e a concentração de ocratoxina A.

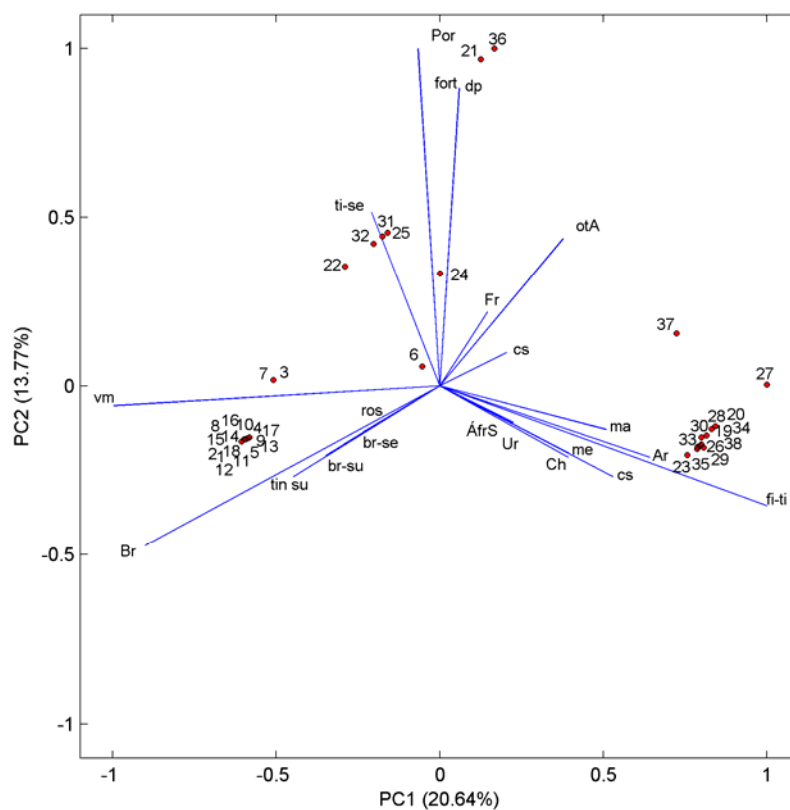


Gráfico 4 Relação entre a presença de ocratoxina A e as variáveis analisadas. A numeração das amostras corresponde à numeração da Tabela 6

Observa-se relação positiva entre ocratoxina A, França, cabernet sauvignon, malbec e Argentina.

Segundo Medina et al. (2005), as variedades de uvas utilizadas na elaboração dos vinhos, bem como a região onde são cultivadas, podem exercer forte influência sobre o teor de ocratoxina A.

Em estudo realizado por Teixeira et al. (2011), em que foi analisada a presença de ocratoxina A em vinhos da região sul do Brasil, foi encontrada baixa incidência desta toxina na região em estudo, tendo sido encontradas apenas

cinco amostras contaminadas (5,7%), todas com concentrações inferiores às estabelecidas pela legislação.

Shephard et al. (2003) analisaram vinhos da África do Sul e detectaram níveis que variaram de 0,04 a 0,39 $\mu\text{g/L}$. A amostra com maior nível de contaminação muito próxima da contaminação foi detectada na amostra deste estudo, que foi de 0,45 $\mu\text{g/L}$.

Ponsone et al. (2007) analisaram vinhedos da Argentina e, apesar da presença de espécies produtoras de OTA nas uvas, a toxina não foi observada. No entanto, Chiotta et al. (2009) analisaram vinhedos em áreas similares da Argentina, encontrando contaminação nas uvas por OTA em torno de 0,1 a 1,2 $\mu\text{g/g}$. A variedade mais susceptível à contaminação por *A. carbonarius* foi a cabernet sauvignon.

Labrinea et al. (2011) analisaram a presença de ocratoxina A em vinhos provenientes da Grécia, incluindo vinhos tintos, brancos, *rosé* e de sobremesa. Alta incidência da toxina foi observada nos vinhos (69%), no entanto, os níveis de contaminação foram relativamente baixos, com somente uma amostra excedendo ao limite máximo estabelecido de 2 $\mu\text{g/L}$.

Krüger et al. (2012) observaram a presença de OTA em vinhos nacionais e importados adquiridos no estado do Rio de Janeiro. A ocratoxina A esteve presente em 31,3% das amostras analisadas, apresentando níveis superiores a 0,02 $\mu\text{g/L}$. A toxina não foi observada em vinhos importados (Argentina e Chile). Dos 26 vinhos de mesa analisados, 69,2% estavam contaminados.

Em relação ao risco de exposição à ocratoxina A por meio do consumo de vinho, foi feita uma estimativa da exposição, utilizando-se valores prescritos na literatura, de que o consumo médio no Brasil é de, aproximadamente, 1,8 L/pessoa/ano (INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO, 2012) e o peso médio de um adulto brasileiro saudável é de 70 kg (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011).

Por meio dos cálculos realizados, mesmo para os valores que ultrapassaram o limite de 2 µg/L, o risco de exposição é baixo, tanto para exposição humana quanto para a exposição agregada. Considerando o consumo de vinho no Brasil de 5 mL/dia, os maiores níveis de OTA encontrados no presente trabalho (2,77 µg/L ou 2,77 ng/mL e 2,46 µg/L ou 2,46 ng/mL) e o peso corpóreo médio de 70 kg, o consumo diário estimado de OTA foi de 0,20 ng/kg p.c/dia e 0,18 ng/kg p.c/dia respectivamente, o que corresponde a 1,42% e a 1,29% do limite máximo tolerado (14 ng/kg p.c/dia), não representando risco para a população em estudo.

Tal fato pode ser explicado pelo baixo consumo da bebida no país. Na Europa, em países como Itália e França, o consumo médio chega a quase 50 L/pessoa/ano. Até mesmo em países vizinhos, como Argentina, Uruguais e Chile, é observado um consumo bem mais elevado, de 28,3 L/pessoa/ano, 25,9 L/pessoa/ano e 17,9 L/pessoa/ano, respectivamente (UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA, 2012).

Considerando a média das amostras de cada país e levando em consideração o consumo de uma taça (150 mL) (BREDA, 2003) de vinho por dia, a contribuição para exposição à ocratoxina, de acordo com as amostras analisadas, pode ser observada na Tabela 10.

Tabela 10 Contribuição à exposição à ocratoxina A, levando em consideração o consumo de uma taça (150 mL) de vinho por dia, para um consumidor de 70 kg

Média de contaminação em ng/mL	País de origem	Limite de segurança diário (WHO)	Limite de exposição	Participação no consumo diário, em %
0,63	Argentina	14 ng/kg p.c/dia	1,3 ng/kg p.c/dia	9,3%
0,50	Uruguai	14 ng/kg p.c/dia	0,75 ng/kg p.c/dia	5,4%
0,86	Portugal	14 ng/kg p.c/dia	1,84 ng/kg p.c/dia	13,1%
1,93	França	14 ng/kg p.c/dia	4,13 ng/kg p.c/dia	29,5%
0,45	África do Sul	14 ng/kg p.c/dia	0,96 ng/kg p.c/dia	6,86%
0,31	Chile	14 ng/kg p.c/dia	0,66 ng/kg p.c/dia	4,71%

Considerando a participação à exposição do vinho chileno (4.71%), o mais consumido no Brasil, dentre os vinhos importados, e que uma garrafa de vinho que contem 750 mL, para que um consumidor seja exposto a 50% do limite diário aceitável pela Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997) seria necessário o consumo de 1.592,35 mL, ou seja, duas garrafas de vinho e mais 123 mL, por dia. Isso demonstrando que os vinhos chilenos analisados não representam uma fonte importante de exposição. Em relação ao vinho francês analisado, duas taças de vinho, seriam necessárias para atingir 59% do limite diário aceitável.

Sabendo-se que existem várias fontes de OTA na dieta, deve-se considerar que o risco de malefícios pelo consumo de vinhos importados torna-se relevante, o que conduziria à necessidade de gerenciar este risco. Outros estudos sobre a exposição à OTA por meio do consumo de vinhos são necessários, para permitir uma melhor compreensão dos fatores que contribuem significativamente para a incidência e o teor da toxina neste produto, a fim de minimizar o potencial risco da presença dessa toxina e facilitar a manutenção de baixos níveis de contaminação, conforme observado neste estudo.

4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que parte das amostras analisadas estava contaminada por ocratoxina A, no entanto, a concentração da toxina foi baixa na maior parte, exceto em duas que obtiveram resultados acima do limite estabelecido pela legislação, de 2 µg/L.

Mesmo nas amostras que apresentaram contaminação acima de 2 µg/L, o consumo dos vinhos analisados não implica em risco de contaminação por OTA para a população, já que o consumo dessa bebida no Brasil ainda é baixo, cerca de 1,8 L/pessoa/ano.

Nenhum vinho brasileiro apresentou teores de ocratoxina A, sendo a toxina encontrada exclusivamente em vinhos importados.

O risco de exposição aumenta com a elevação do consumo de vinho, levando-se em consideração as outras fontes de exposição à toxina presentes na dieta, prevendo-se que um aumento no consumo de vinhos brasileiros torna-se mais seguro para o consumo interno e externo.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington: AOAC, 1997.

BREDA, J. **Fundamentos de alimentação, nutrição e dietética**. Coimbra: Mar da Palavra, 2003.

BURDASPAL, P.; LEGARDA, T. Occurrence of ochratoxin A in sweet wines produced in Spain and other countries. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 24, n. 9, p. 976-986, 2007.

CHIOTTA, M. L. et al. Aspergillus section Nigri species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, p. 137–141, Aug. 2009.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment CAC/GL-30**. Rome: FAO, 1995.

COMMISSION REGULATION. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs: text with EEA relevance n° 401/2006 of 23 february 2006. **Official Journal of the European Union**, Berlin, p. L12-L34, 2006. Disponível em: <<http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/es401-2006.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

DALL'ASTA, C. et al. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. **Food Chemistry**, London, v. 106, n. 2, p. 729-734, Feb. 2008.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. **EN 14133**: foodstuffs: determination of ochratoxin A in wine and beer, HPLC method with immunoaffinity column clean-up. Brussels: CEN, 2003.

HARRIS, A. **Distributed leadership in schools: developing the leaders of tomorrow**. Abingdon: Routledge & Falmer Press, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção de uvas no Brasil**. São Paulo: IBGE, 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/Ispa/Ispa_20120.pdf>. Acesso em: 27 dez. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. **Histórico: a vitivinicultura brasileira**. Bento Gonçalves: IBRAVIN, 2012. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/brasilvitivinicola.php>>. Acesso em: 03 jan. 2013.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: IARC, 1993.

JORGENSEN, K.; JACOBSEN, J. S. Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992-99. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 12, p. 1184-1189, 2002.

KARBANCIOLU-GULER, F.; HEPERKAN, D. Natural occurrence of ochratoxin A in dried figs. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 617, n. 1-2, p. 32-36, 2008.

KAWASHIMA, L. M. et al. Fumonisin B1 and ochratoxin A in beers made in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 317-323, abr./jun. 2007.

KRUEGER, S. et al. North Atlantic Deep Water and Antarctic Bottom Water variability during the last 200 ka recorded in an abyssal sediment core off South Africa. **Global and Planetary Change**, Amsterdam, v. 80-81, p. 180-189, Jan. 2012.

KRUGER, C. D. **Ocratoxina A em suínos abatidos no Estado do Rio de Janeiro sob Inspeção Sanitária. I. Determinação de níveis séricos por Cromatografia Líquida. II. Correlação com as lesões renais e hepáticas.** 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Higiene veterinária e processamento tecnológico de produtos de origem animal) - Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Niterói.

LABRINEA, E. P. et al. A survey of ochratoxin A occurrence in Greek wines. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 4, n. 1, p. 61-66, Mar. 2011.
LASRAM, S. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 3, p. 376-379, Mar. 2007.

LEONG, S. L. et al. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. S10-S17, Sept. 2006.

LEONG, S. L. et al. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 301-306, Sept. 2007.

LEONI, L. A. B. et al. Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 10, p. 867-870, 2000.

MAGNOLI, C. E. et al. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 163, n. 5, p. 249-260, May 2007.

MEDINA, C. L. et al. Fisiologia dos citros. In: MATTOS JÚNIOR, D. et al. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2005. p. 148-195.

MIRAGLIA, M.; BRERA, C. **Assessment of dietary intake of ochratoxin A by population of EU member states:** reports on tasks for scientific cooperation, reports, of experts participating in task 3.2.7. Rome: General Health and Consumer Protection, 2002.

MOUNJOUENPOU, P. et al. Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 121, n. 2, p. 234-241, 2008.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 10, p. 2003-2010, out. 2012.

PONSONE, M. L. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 131-135, Mar. 2007.

RIBA, A. et al. Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 1-2, p. 85-92, Feb. 2008.

RIBA, A. et al. Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 1-2, p. 85-92, Feb. 2008.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Arlington, v. 30, n. 2, p. 507-512, Sept. 1974.

SEKIYAMA, B. L. et al. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 289-294, July/Sept. 2005.

SHEPHARD, G. S. et al. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 4, p. 1102-1106, 2003.

SHUNDO, L. et al. Ochratoxin A in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 533-537, Oct./Dec. 2006.

TEIXEIRA, T. R. et al. Determination of ochratoxin a in wine from southern region of Brazil by thin layer chromatography with a charge-coupled detector. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 4, n. 4, p. 289-293, 2011.

TERRA, M. F. et al. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 17, n. 6, p. 1-5, June 2012.

UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA. **Comercialização de vinhos e suco de uva provenientes do Rio Grande do Sul e litros – 2007/2010**. Rio Grande do Sul: UVIBRA, 2012. Disponível em: < <http://www.uvibra.com.br> >. Acesso em: 20 Dez. 2012.

VATINNO, R. et al. Determination of Ochratoxin A in green coffee beans by solid-phase microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1187, n. 1-2, p. 145-150, Apr. 2008.

VISWANATH, P. et al. A survey of ochratoxin a in wheat and barley in India. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 27, n. 2, p. 111-123, May 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A guide for national food safety authorities**. Rome: FAO/WHO, 1997. (FAO Food and Nutrition Paper, 87). Disponível em: < <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/a0822e/a0822e.pdf> >. Acesso em: 15 jan. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for predicting dietary intake of pesticides residues**. Geneva: Global Environment Monitoring System Food Contamination Monitoring and Assessment Programme, 1997.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. 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 clean-up: methodology and Swiss data. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 666, n. 1, p. 85-99, Apr. 1996.

ZINEDINE, A. et al. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 11, p. 868-874, Nov. 2006.