

Ana Paula Dias Rodrigues

## Ocratoxina A em Vinho e Avaliação da Exposição Portuguesa

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e co-orientada pela Professora Doutora Liliana Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Paula Dias Rodrigues

# Ocratoxina A em Vinho e Avaliação da Exposição Portuguesa

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena  
e co-orientada pela Professora Doutora Liliana Silva e apresentada à Faculdade de  
Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



## **AGRADECIMENTOS**

A elaboração desta dissertação de Mestrado só foi possível devido ao contributo e colaboração de pessoas e instituições, aos quais pretendo deixar algumas palavras de gratidão.

Inicialmente à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra que me proporcionou as condições essenciais à elaboração deste projeto.

À coordenadora do Mestrado em Segurança Alimentar, Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena, agradeço o privilégio de frequentar este mestrado que veio enriquecer bastante o meu percurso académico. Mas também pela disponibilidade que manifestou para a orientação deste projeto, que elevou os meus conhecimentos científicos e estimulou a vontade de fazer sempre mais e melhor, juntamente com a acessibilidade e simpatia demonstrada.

À Doutora Liliana Silva por ter aceite ser a co-orientadora, pela incansável orientação científica, pelo tempo que dispensou durante todo este projeto, por todos os preciosos conhecimentos transmitidos, bem como, a acessibilidade, simpatia, confiança e motivação que sempre me concedeu, e que tornaram o percurso mais fácil.

Ao Professor Doutor André Pereira pela disponibilidade prestada, amabilidade, boa disposição e a atitude positiva durante toda a parte experimental.

Agradeço a todos os colegas e docentes com quem tive oportunidade de partilhar o Laboratório de Bromatologia, Hidrologia e Nutrição da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, em especial à D. Anabela e à colega Joana Oliveira que acompanhou toda a atividade laboratorial.

Quero agradecer a todas as pessoas que colaboraram para uma vasta colheita de amostras, tornando este estudo possível. A todos os meus amigos e colegas que estiveram sempre comigo para me apoiar e incentivar quando mais precisava, em especial à Andreia, Carolina, Diana, Joana e Sónia.

E por fim, um especial agradecimento à minha família, ao meu pai e ao gosto pela viticultura, que me transmitiu e ajudou na escolha do tema, à minha mãe e irmã, um obrigada por acreditarem e depositarem confiança em mim e por todos os ensinamentos.

Por todo o carinho, dedicação que incessantemente me proporcionam. A eles, dedico todo este trabalho.

A todos os que me acompanharam neste percurso, um muito obrigada.



## RESUMO

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos, por várias espécies de fungos. E representam um elevado risco para a saúde pública, mas também um impacto bastante negativo na economia dos países, devido ao seu aparecimento em diversos alimentos.

A OTA é considerada a ocratoxina mais tóxica, e é produzida por diferentes espécies de fungos, dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*. A sua presença foi verificada em diversos alimentos, como é o caso, dos cereais, grãos de café, frutos secos, ovos, animais, cerveja e vinho.

A importância de verificar o nível de contaminação destes alimentos, bem como a exposição a que a população humana está sujeita, prende-se com o facto desta micotoxina ter elevada toxicidade. Estudos realizados demonstram que a OTA tem atividade hepatotóxica, nefrotóxica, teratogénica, imunotóxica e carcinogénica em várias espécies animais, e segundo a Agência Internacional para a Pesquisa do Cancro (IARC), é classificada como possível carcinogénico humano (Grupo 2B). Relativamente ao vinho, sendo uma das bebidas alcoólicas mais consumidas em Portugal e das principais fontes de exposição humana à OTA, é essencial a realização de mais estudos de monitorização e exposição.

Neste estudo, a metodologia analítica devidamente validada, resumiu-se à injeção direta das amostras filtradas, em que a deteção e quantificação foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência com deteção de fluorescência (HPLC/FD).

Relativamente à linearidade da OTA, em fase móvel, entre 0,24 e 4,0 µg/L,  $R^2=0,9983$ , em matriz de vinho branco  $R^2=0,9998$ , entre 0,24 e 4,0 µg/L, e em matriz de vinho tinto preparada entre 0,24 e 6,0 µg/L,  $R^2=0,9974$ . Os limites de deteção foram 0,0757 e 0,3884 µg/L para vinho branco e tinto, respetivamente. E o limite de quantificação foi de 0,2293 µg/L para a matriz de vinho branco e 1,1769 µg/L para tinto.

Assim, este estudo teve como finalidade a avaliação da contaminação de 100 amostras de vinhos adquiridos em Portugal, onde, em apenas 5 amostras se detetou a presença de OTA mas não foi possível quantificar. Visou-se também, a avaliação do risco que esta micotoxina apresenta para a saúde humana, de acordo com a exposição.

**Palavras-chave:** Micotoxinas, ocratoxina A, vinho, toxicidade, HPLC/FD.



## ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by several species of fungi. They represent an elevated risk to public health, as well as a deeply negative impact on worldwide country economics due to their appearance on various foods.

OTA is considered to be the most toxic ochratoxin and is produced by different species of fungi, of genus *Aspergillus* and *Penicillium*. It's presence was found in several foods as is the case of cereals, coffee beans, nuts, eggs, animals, beer and wine.

The importance of verifying the level of contamination of these aliments, as well as the exposure that the human population is subjected to, lies with the fact that these mycotoxins have a high toxicity. Studies made show that OTA has hepatotoxic, nephrotoxic, teratogenic, immunotoxic and carcinogenic activity on several animals species, and, according to the International Agency for Cancer Research (IARC), it's classified as a possible human carcinogenic (Group 2B). Regarding wine, being one of the most consumed alcoholic drinks in Portugal and the main source of human exposure to OTA, it's essential to conduct more monitoring and exposure studies.

In this study, the validated analytical methodology consisted in the direct injection of the filtered samples, in which the detection and quantification were processed by a high efficiency liquid chromatography with fluorescent detection (HPLC/FD).

In regard to OTA linearity, in mobile phase, it's between 0.24 and 4.0  $\mu\text{g/L}$ ,  $R^2=0.9983$ , in a white wine matrix, between 0.24 and 4.0  $\mu\text{g/L}$ ,  $R^2=0.9998$  and in a red wine matrix set between 0.24 e 6.0  $\mu\text{g/L}$ ,  $R^2=0.9974$ . The detection limits were 0.0757 and 0.3884  $\mu\text{g/L}$  for white and red wine, respectively. The quantification limit was 0.2293  $\mu\text{g/L}$  for the white wine matrix and 1.1769  $\mu\text{g/L}$  for the red one.

As such, this research has as goal the evaluation of the contamination of 100 samples of wines acquired in Portugal, where, in only 5 the presence of OTA was found but not possible to quantify. The risk assessment of this mycotoxin for human health was also aimed, according to the exposure.

**Keywords:** Mycotoxins, ochratoxin A, wine, toxicity, HPLC/FD.





## INDICE

RESUMO.....	v
ABSTRACT .....	vii
PARTE I – REVISÃO DA LITERATURA .....	I
1.1. Micotoxinas .....	3
1.2. Ocratoxina A .....	6
1.2.1. Fungos produtores.....	6
1.2.2. Características físico-químicas .....	8
1.2.3. Toxicocinética.....	10
1.2.3.1. Absorção.....	10
1.2.3.2. Distribuição .....	11
1.2.3.3. Metabolismo e excreção .....	11
1.2.4. Toxicidade da OTA.....	12
1.3. Vinhos .....	13
1.3.1. História.....	14
1.3.2. Setor vitivinícola .....	15
1.3.3. Benefícios .....	16
1.3.4. Processo de produção .....	18
1.3.4.1. Vinho Tinto .....	19
1.3.4.2. Vinho Branco .....	20
1.3.4.3. Vinho Rosé, Verde e Espumante .....	21
1.4. OTA em vinhos .....	23
1.4.1. Ocorrência da OTA em vinhos .....	24
1.4.2. Descontaminação.....	30
1.4.3. Legislação relativa à OTA.....	31
1.5. Métodos de determinação .....	32
1.5.1. Preparação, extração e purificação .....	32
1.5.2. Detecção e quantificação .....	36
PARTE II – PARTE EXPERIMENTAL .....	43
2.1. Materiais e métodos .....	45
2.1.1. Objetivo .....	45
2.1.2. Amostragem.....	45

2.1.3. Reagentes e materiais .....	46
2.1.4. Soluções.....	46
2.1.5. Equipamentos.....	47
2.2. Procedimento experimental.....	47
2.2.1. Preparação da amostra.....	47
2.2.2. Detecção e quantificação .....	48
2.2.3. Validação da metodologia analítica .....	48
2.2.3.1. Linearidade.....	48
2.2.3.2. Ensaio de fortificação .....	49
2.2.3.3. Limites de deteção e de quantificação .....	49
2.2.3.4. Confirmação.....	49
2.3. Resultados e discussão .....	50
2.3.1. Validação da metodologia analítica .....	50
2.3.2. Ocorrência de OTA em vinhos.....	52
2.3.3. Avaliação da exposição.....	54
CONCLUSÃO .....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
ANEXO .....	65
Anexo I - Amostras de vinho analisadas.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral das ocratoxinas .....	8
Figura 2 - Estrutura química da OTA.....	10
Figura 3 - Evolução do consumo de vinho em Portugal (hl).....	16
Figura 4 - Consumo humano de vinho <i>per capita</i> (L/ habitante/ ano).....	16
Figura 5 - Fluxograma vinho tinto .....	19
Figura 6 - Fluxograma vinho branco .....	21
Figura 7 - Percentagem de géneros alimentícios contaminados por OTA.....	24
Figura 8 - Princípio do funcionamento de uma coluna de imunoafinidade .....	34
Figura 9 - Curva de calibração da OTA em fase móvel .....	50
Figura 10 - Curva de calibração em vinho branco .....	50
Figura 11 - Curva de calibração em vinho tinto .....	51

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais micotoxinas e os fungos produtores.....	4
Tabela 2 - Principais fungos produtores responsáveis pela contaminação de diferentes alimentos por ocratoxinas.....	7
Tabela 3 - Principais fungos produtores de OTA e as características ideais para o seu crescimento.....	7
Tabela 4 - Composição das diferentes ocratoxinas.....	8
Tabela 5 - Componentes maioritários do vinho e as suas quantidades em g/L.....	14
Tabela 6 - Ocorrência da OTA em diversos vinhos e países.....	28
Tabela 7 - Teores máximos de OTA em vários géneros alimentícios .....	31
Tabela 8 - Metodologias analíticas para determinação de OTA em vinhos .....	38
Tabela 9 - Exatidão e precisão da metodologia analítica para a determinação de OTA em vinhos.....	52
Tabela 10 - Frequência de OTA nas amostras de vinho.....	53



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  - Micrograma

$\mu\text{m}$  - Micrómetro

A. - *Aspergillus*

a.C. - Antes de Cristo

ACN - Acetonitrilo

$a_w$  - Atividade da água

BEN - Nefropatia Endémica Dos Balcãs

CE - Comunidade Europeia

CEE - Comunidade Económica Europeia

$\text{CH}_2\text{OH}$  - Ácido fórmico

$\text{CH}_3\text{COOH}$  - Ácido acético glacial

$\text{CH}_3\text{COONH}_4$  - Acetato de amónio

$\text{CH}_3\text{OH}$  - Metanol

$\text{CHCl}_3$  - Clorofórmio

Cl - Cloro

Da - Dalton

DL50 - Dose Letal 50

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DOC - Denominação de Origem Controlada

EDI - Ingestão Diária Estimada

EFSA - *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar)

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)

EUA - Estados Unidos Da América

EWI - Ingestão Semanal Estimada

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação)

FD - *Fluorescent Detection* (deteção por fluorescência)

FDA - *Food and Drug Administration*

GAP - *Good Agriculture Practices* (Boas Práticas Agrícolas)

GMP - *Good Manufacturing Practices* (Boas Práticas de Fabrico)

H - Hidrogénio

h - Horas

$\text{H}_2\text{O}$  - Água

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - Ácido fosfórico

HCl - Ácido clorídrico

hl - hectolitros

HPLC - *High performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)

IAC - *Immunoaffinity chromatography* (Coluna de imunoafinidade)

IARC - *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional para a Investigação de Cancro)

INE - Instituto Nacional de Estatística

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

IVV - Instituto do Vinho e da Vinha

L - Litro

LC - *Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida)

LC-FD - *Liquid chromatography with fluorescence detection* (cromatografia líquida com detetor de fluorescência)

LC-MS/MS - *Liquid chromatography with tandem Mass spectrometry* (cromatografia líquida com deteção por massa em *tandem*)

LDL - *Low Density Lipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade)

LLE - *Liquid-Liquid Extraction* (Extração Líquido-Líquido)

LOD - Limite de deteção

Log kow - Constante de equilíbrio da concentração de uma substância entre octanol e água

LOQ - Limite de quantificação

M - Molar

mL - Mililitro

MS - *Mass spectrometry* (espectrometria de massa)

MS/MS - *Tandem Mass Spectrometry* (Espectrometria de massa em *tandem*)

NaCHO<sub>3</sub> - Bicarbonato de sódio

NaCl - Cloreto de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NH<sub>3</sub> - Amoníaco

NH<sub>4</sub>Cl - Cloreto de amónio

NH<sub>4</sub>OH - Hidróxido de amónio

nm - Nanómetro

OIV - *International Organisation of Vine and Wine* (Organização Internacional da Vinha e do Vinho)

OMS - Organização Mundial de Saúde

OTA - Ocratoxina A

*p.* - *Penicillium*

p.c. - Peso Corporal

PBS - Tampão fosfato-salino

PEG - Polietileno glicol

pH - *Potential of hydrogen* (potencial de hidrogénio)

$pK_a$  - Constante de acidez

PTFE - Politetrafluoretileno

$R^2$  - Coeficiente de determinação

RNA - Ácido ribonucleico

ROS - Espécie reativa de oxigénio

SO<sub>2</sub> - Dióxido De Enxofre

SPE - *Solid phase extraction* (Extração em fase sólida)

spp. - *species*

$t_{1/2}$  - Tempo de meia vida

TWI - *Tolerable weekly intake* (Ingestão Semanal Tolerável)

UV - Ultra Violeta

V.Q.P.R.D - Vinho de Qualidade Produzido em Região Determinada

WHO - *World Health Organization*

$\lambda_{em}$  - Comprimento de onda de emissão

$\lambda_{exc}$  - Comprimento de onda de excitação





## **PARTE I – REVISÃO DA LITERATURA**



## 1.1. Micotoxinas

O estudo das micotoxinas remonta a 1962, devido ao facto de se ter repetido um elevadíssimo número de aves mortas, essencialmente perus, em Inglaterra. “*Turkey X disease*” foi o nome dado a este surto, que após alguns estudos se concluiu estar relacionado com a ração administrada aos animais. Esta, produzida à base de amendoim importado da África e do Brasil, estava contaminada com aflatoxinas (*Aspergillus flavus*), uma das micotoxinas mais tóxicas que se conhece (Bennett e Klich, 2003). A partir desta data, o estudo desta e outras micotoxinas aumentou exponencialmente por forma a perceber quais poderiam ser as implicações na saúde humana e animal (Bennett e Klich, 2003).

Por definição as micotoxinas são metabolitos fúngicos secundários, de baixo peso molecular, <1000 Dalton (Da) (Escrivá *et al.*, 2017), podendo ser sintetizadas por diferentes fungos filamentosos e, ao que tudo indica não contribuem para o crescimento e desenvolvimento da planta (Mendes *et al.*, 2015). São conhecidos, até ao momento, mais de 300 micotoxinas distintas sendo que as mais prevalentes nos alimentos e também as que apresentam maior toxicidade são as ocratoxinas, as aflatoxinas, os tricotecenos, a zearalenona e as fumonisinas (Olivares-Marín *et al.*, 2009).

A tabela I oferece uma visão geral das principais micotoxinas, os seus respetivos fungos produtores, quais os alimentos mais comumente contaminados e os principais efeitos para o Homem e animais (Abrunhosa *et al.*, 2016; Bennett e Klich, 2003; Lanças e Paulo, 2015).

A palavra micotoxina é o resultado da combinação da palavra grega “*mykes*” que significa fungo, com “*toxicum*” do latim, que significa veneno/ toxina (Petrica, Duarte e Lima, 2010). Estes metabolitos são tóxicos para os humanos e animais, mesmo a uma exposição reduzida (Abrunhosa *et al.*, 2016), e as doenças que provocam, denominadas micotoxicoses, podem resultar da ingestão de alimentos contaminados, pelo contacto dérmico ou pela via respiratória (Bennett e Klich, 2003).

Estas doenças e os sintomas que provocam diferem com o tipo de micotoxina em questão, mas também, com a concentração de metabolitos e a duração a que o indivíduo esteve exposto, bem como o seu estado de saúde, idade, sexo e a possível interação desta micotoxina com outras (Bennett e Klich, 2003). Deste modo, a exposição a estas micotoxinas pode resultar, no pior cenário, na toxicidade aguda que pode dar origem à morte do indivíduo em resultado de uma grande exposição à micotoxina. Noutras situações, pode fomentar perdas de peso e, nos animais, também resulta na diminuição da produção,

como é o caso do leite e dos ovos. Uma exposição crónica, resultante da exposição continuada a níveis de concentração reduzidos, pode induzir a inibição das resistências às infeções e aumentar a probabilidade do aparecimento de doenças crónicas e tumores (Escrivá *et al.*, 2017).

**Tabela I** - Principais micotoxinas e os fungos produtores adaptado de (Abrunhosa *et al.*, 2016; Bennett e Klich, 2003; Lanças e Paulo, 2015).

<b>Micotoxinas</b>	<b>Espécies de fungos produtores</b>	<b>Alimento contaminado</b>	<b>Efeitos biológicos em várias espécies</b>
<b>Aflatoxinas</b>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> e outras <i>Aspergillus</i> spp.	Amendoim e milho	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogénica em humanos
<b>Ocratoxinas</b>	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. Carbonarius</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> e <i>P. nordicum</i> .	Cereais, café e vinho	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogénica para suínos, aves e ratos
<b>Zearalenona</b>	<i>Fusarium graminearum</i>	Cereais e água	Baixa toxicidade, síndrome da masculinização e feminização em suíno
<b>Tricotecenos T2, Neosolaniol, Fusanona x, Nivalenol Deoxinivalenol</b>	<i>Fusarium</i> spp. <i>Myrothecium</i> sp <i>Strachybotrys</i> sp <i>Trichothecium</i> sp	Milho, cevada, trigo, aveia e centeio	Hemorragias, vómitos e dermatites em porcos
<b>Fumonisinias</b>	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> e outras <i>Fusarium</i> spp.	Milho	Cancro no esófago em humanos, leucoencefalomalácia em equinos e coelhos, edema pulmonar em suínos e apoptose no fígado de ratos

Do elevadíssimo número de fungos que se conhece os géneros mais predominantes são *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. (Escrivá *et al.*, 2017). Os metabolitos secundários produzidos por estas espécies de fungos são considerados altamente prejudiciais à saúde humana e animal, visto que, são encarados como cancerígenos, mutagénicos, citotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, teratogénicos e imunossupressores de estrogénio (Escrivá *et al.*, 2017).

Os metabolitos secundários produzidos pelos fungos constituem uma real ameaça para a saúde pública e para a segurança alimentar. É de salientar, que nos países em desenvolvimento, em que o cultivo de alimentos é a forma de subsistência e onde é efetuado um menor controlo, este problema é ainda mais evidente, dando origem a uma elevada morbilidade (FAO, 1997). Já nos países desenvolvidos o controlo dos produtos e processos é muito mais rigoroso, resultando numa taxa mais reduzida do aparecimento destas micotoxinas (Abrunhosa *et al.*, 2016). Apresenta ainda um grande impacto comercial e económico, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Por exemplo, estima-se que cerca de 5 a 10% da produção mundial de alimentos é totalmente perdida devido a contaminações por micotoxinas (Abrunhosa *et al.*, 2016).

As micotoxinas podem ocorrer em qualquer fase, desde o campo, à colheita, ao transporte e armazenamento do produto, quando estão garantidas as condições ideais de temperatura, atividade da água, pH, disponibilidade de nutrientes e luz para que estes metabolitos se desenvolvam (Escrivá *et al.*, 2017; Murphy *et al.*, 2006). Países tropicais apresentam maiores níveis de contaminação, uma vez que o clima é mais favorável ao desenvolvimento de fungos (Lanças e Paulo, 2015).

Tendo em vista a redução dos riscos para a saúde e segurança dos consumidores é importante que os níveis de micotoxinas nos alimentos sejam reduzidos tanto quanto possível (Bennett e Klich, 2003). Deste modo, foram estabelecidos limites máximos de micotoxinas nos alimentos, num elevado número de países, de forma a minimizar os riscos para estas populações. O cumprimento dos níveis estabelecidos é bastante importante no que toca à economia, de modo a assegurar ou expandir o mercado de exportação (FAO, 1997).

Assim, é essencial a aplicação de medidas preventivas eficazes não só na agricultura mas também nas indústrias alimentares. Como estes metabolitos aparecem irrevogavelmente sujeitos a certas condições ambientais, é importante que existam processos físicos, químicos e biológicos que consigam garantir a eliminação destas micotoxinas, uma vez que mesmo eliminando o fungo produtor estas micotoxinas podem permanecer no alimento. Outras medidas capazes de prevenir as consequências destes metabolitos é a expansão e criação de legislação em todos os países, que estabeleça limites máximos destes compostos nos alimentos (Abrunhosa *et al.*, 2016).

## **1.2. Ocratoxina A**

No Egito, as crenças apontavam para a vida depois da morte, então, no túmulo junto da múmia do faraó eram colocados todos os bens que este iria necessitar noutra vida. A grande maioria dizia respeito a bens alimentares, essencialmente cereais. Como estes eram fechados durante milhares de anos, as condições tornavam-se propícias ao crescimento e desenvolvimento de fungos e bactérias (Pfohl-Leszkowicz, 2009; Ramos, Ferreira e Lopes, 2010).

Reza a lenda, que quem incomodasse os túmulos egípcios estaria condenado à morte. No ano de 1922, o arqueólogo Howard Carter e a sua equipa descobriram o túmulo do faraó Tutankhamon. Passados 5 anos da descoberta, onze dos membros da equipa de arqueólogos já tinham falecido, foi então chamada a "maldição de Tutankhamon" (Pfohl-Leszkowicz, 2009; Ramos, Ferreira e Lopes, 2010; Duarte, Pena e Lino, 2009).

Estas mortes, evidentemente nada tiveram a ver com uma maldição, mas sim com a inalação de esporos de *Aspergillus ochraceus*, que continham ocratoxinas, aquando da abertura do túmulo. Estas micotoxinas causaram aos arqueólogos insuficiência renal aguda, dando origem às mortes (Pfohl-Leszkowicz, 2009; Ramos, Ferreira e Lopes, 2010).

Apesar de não se ter entendido o porquê destas mortes, visto que, o interesse pelas micotoxinas surgiu principalmente a partir de 1962, com o surto de perus na Inglaterra, estas depois começaram a ser cada vez mais estudadas e compreendidas pelos investigadores (Bennett e Klich, 2003).

No ano de 1965, foi descoberta a ocratoxina (Duarte *et al.*, 2009), na África do Sul, produzida pelo género *Aspergillus ochraceus* (Mateo *et al.*, 2007). E os seus três tipos, a ocratoxina A (OTA) que apresenta maior toxicidade, a ocratoxina B e a ocratoxina C (Olivares-Marín *et al.*, 2009).

### **1.2.1. Fungos produtores**

A ocratoxina A é uma micotoxina produzida principalmente por fungos dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Essencialmente *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* e *Penicillium verrucosum* (Blesa *et al.*, 2004). Estes fungos contaminam principalmente cereais,

como o trigo, cevada, milho e aveia, mas também pode ser detetada em feijões, amendoins, especiarias, frutas secas e grãos de café (Bellver Soto et al., 2014). Algumas bebidas também a podem conter, como a cerveja, o vinho e sumos de uva, como apresentado na tabela 2 (Dall’Asta et al., 2004).

**Tabela 2** - Principais fungos produtores responsáveis pela contaminação de diferentes alimentos por ocratoxinas adaptado de (Ringot et al., 2006).

Principal fungo produtor	Alimento
<i>P. verrucosum</i>	Cereais
<i>P. nordicum</i>	Carne e Queijo
<i>A. niger</i> e <i>A. carbonarius</i>	Uvas e Vinho
<i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> e <i>A. carbonarius</i>	Café e Temperos

A ocratoxina pode ser encontrada em todo o mundo e numa grande diversidade de meios, visto que, esta se desenvolve em condições bastante diferentes de humidade, pH e temperatura (Olivares-Marín et al., 2009). No entanto os géneros *Aspergillus* e *Penicillium* crescem em diferentes condições, o género *Penicillium* desenvolve-se melhor em regiões temperadas frias tais como o norte da Europa e o Canada e para um crescimento mais favorável ao fungo do género *Aspergillus* as condições indicadas são os climas tropicais e subtropicais, este é também o principal responsável pelo aparecimento de ocratoxina A em alimentos. A tabela 3 revela as principais características dos fungos produtores de ocratoxina A (Nogueira e Oliveira, 2006).

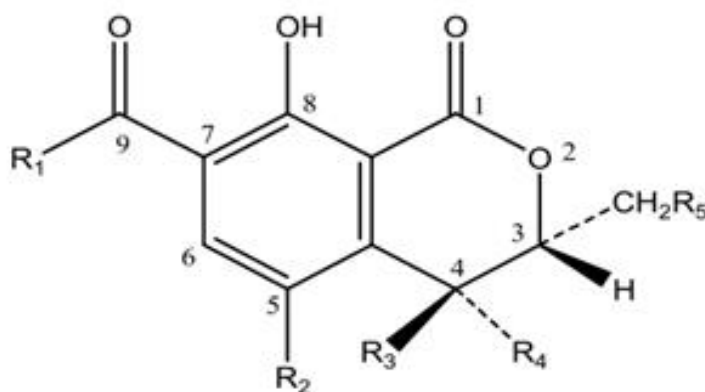
**Tabela 3** - Principais fungos produtores de OTA e as características ideais para o seu crescimento adaptado de (Nogueira e Oliveira, 2006).

Género <i>Aspergillus</i>
<i>Aspergillus ochraceus</i> - temp 8 - 37°C; $a_w \geq 0,77$ ; pH= 3,0 - 10
<i>Aspergillus carbonarius</i> - temp 32 - 35°C; $a_w \geq 0,82$ ; pH= 5,0 - 6,5
<i>Aspergillus niger</i> - temp 8 - 47°C; $a_w$ até 0,72; pH= 4,0 - 6,5
Género <i>Penicillium verrucosum</i>
Crescimento a temperatura $\leq$ a 30°C
$a_w \geq 0,8$
pH= 6,0 - 7,0



## 1.2.2. Características físico-químicas

Segundo os autores André el Khoury e Ali Atoui, o grupo de ocratoxinas existentes é vasto, apesar da OTA ser a mais abundante, existem outros tipos. A figura 1 representa a estrutura geral destes metabolitos e a tabela 4 mostra a composição de cada um deles (Khoury e Atoui, 2010).



**Figura 1** - Estrutura geral das ocratoxinas (Khoury e Atoui, 2010).

**Tabela 4** - Composição das diferentes ocratoxinas adaptado de (Khoury e Atoui, 2010).

Nome	R1	R2	R3	R4	R5
<b>Ocratoxinas naturais</b>					
Ocratoxina A	Fenilalanina	Cl	H	H	H
Ocratoxina B	Fenilalanina	H	H	H	H
Ocratoxina C	Etil-ester, Fenilalanina	Cl	H	H	H
Ocratoxina A Metil-ester	Metil-ester, Fenilalanina	Cl	H	H	H
Ocratoxina B Metil-ester	Metil-ester, Fenilalanina	H	H	H	H
Ocratoxina B etil-ester	Etil-ester, Fenilalanina	H	H	H	H
Ocratoxina $\alpha$	OH	Cl	H	H	H
Ocratoxina $\beta$	OH	H	H	H	H
4-R- hidroxiocratoxina A	Fenilalanina	Cl	H	OH	H
4-s- hidroxiocratoxina A	Fenilalanina	Cl	OH	H	H
10- hidroxiocratoxina A	Fenilalanina	Cl	H	H	OH
Análogo da tirosina de OTA	Tirosina	Cl	H	H	H
Análogo da serina de OTA	Serina	Cl	H	H	H
Análogo da hidroxiprolina de OTA	Hidroxiprolina	Cl	H	H	H
Análogo da lisina de OTA	Lisina	Cl	H	H	H

**Tabela 5** - Composição das diferentes ocratoxinas adaptado de (Khoury e Atoui, 2010) (continuação).

Nome	R1	R2	R3	R4	R5
<b>Ocratoxinas sintéticas</b>					
d- Ocratoxina A	d- Fenilalanina	Cl	H	H	H
Ocratoxina A Ethyl amid	Ehyl amid, Fenilalanina	Cl	H	H	H
O-metil ocratoxina A	Fenilalanina, CH <sub>3</sub> OH em C-8	Cl	H	H	H

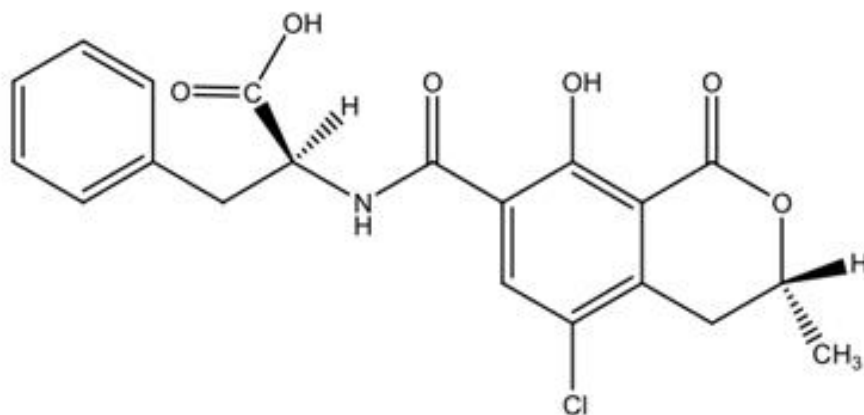
A OTA apresenta uma estrutura cristalina que varia de incolor a branco, sem odor, apresenta fluorescência nativa, pouco solúvel em água, cerca de 0,4246 mg/L a 25°C (Tao et al., 2018), bastante solúvel em solventes orgânicos polares e solúvel em soluções de hidrogenocarbonato de sódio (Ringot et al., 2006). Devido à boa estabilidade a temperaturas elevadas, os processos convencionais de preparação de alimentos, não são suficientes para conduzir à sua destruição. A degradação ocorre a temperaturas acima dos 250°C, durante alguns minutos, e é também degradável pela luz ultra violeta (UV) (EFSA, 2006).

Relativamente aos pontos de fusão da ocratoxina A são 90°C e 171°C, quando recristalizados a partir do benzeno e do xileno, respetivamente. Quanto ao  $pK_a$  o grupo carboxilo de fração fenilalanina está entre os valores 4,2 e 4,4 e o grupo hidroxilo fenólico de isocumarinas está compreendido entre valores 7,0 e 7,3 (Ringot et al., 2006). Apresenta um valor de log Kow de 4,74 o que nos indica uma ligeira mobilidade das espécies de OTA no solo (TOXNET, 2017).

O pH é a grande influência para a absorção de luz e a fluorescência da ocratoxina A. A molécula apresenta elevada fluorescência na cor verde sujeita a condições ácidas e azul sujeita a condições alcalinas, sobre luz UV (Chemical Properties, 2015). Assim, quando o pH se encontra em valores inferiores a 4,5 a OTA possui absorção máxima a um comprimento de onda de 333 nm, para valores superiores a 4,5 de pH o comprimento de onda máximo é de 380 nm. Acima de pH 9 o comprimento de onda máximo é de 465 nm (Dohnal, Pavlíková e Kuca, 2010).

Das ocratoxinas a A é a que apresenta maior toxicidade e a sua fórmula empírica é C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>NCl, resultado de uma ligação entre uma dihidroisocumarina, a uma L-β-Fenilalanina através de uma ligação amina. Segundo a IUPAC o nome químico da OTA é *L-fenilalanina-N* -[[[5-cloro-3,4-di-hidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2- benzopirran-7-il] carbonil]

- [ R ], tendo um peso molecular de 403,81 g/mol (Anli e Bayram, 2009; Khoury, el e Atoui, 2010). A sua estrutura química está representada na figura 2.



**Figura 2** - Estrutura química da OTA (Khoury, el e Atoui, 2010).

### 1.2.3. Toxicocinética

#### 1.2.3.1. Absorção

A OTA apresenta valores de  $pK_a$  de 4,2 a 4,4 e 7,0 a 7,3 do grupo carboxilo da fenilalanina e do grupo hidroxilo de isocumarinas, respetivamente, que são bastante importantes na absorção desta micotoxina (Ringot *et al.*, 2006). De acordo com as espécies animais já estudadas é possível perceber que a absorção da OTA ocorre inicialmente ao nível do estômago, principalmente devido às suas propriedades ácidas. No entanto, a absorção máxima ocorre no intestino delgado mais concretamente no jejuno, dependendo do pH da superfície da mucosa. Esta micotoxina é lipossolúvel, logo é absorvida pela membrana lipídica do trato gastrointestinal na sua forma não ionizada. Seguidamente sofre uma hidrólise pela carboxipeptidase A e quimiotripsina, bem como pelos microrganismos do trato gastrointestinal transformando-se em  $OT\alpha$  que não apresenta toxicidade. Já na corrente sanguínea pode ocorrer uma distribuição desta micotoxina pelos tecidos (Marin, Tabuc e Burgehelea, 2009). De acordo com alguns estudos realizados foi possível estimar a percentagem média de absorção de OTA por várias espécies animais: 66% em porcos, 56% em ratos e coelhos e 40% em frangos (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives., 2001).

### **1.2.3.2. Distribuição**

A OTA ao entrar na corrente sanguínea liga-se facilmente às proteínas do plasma, cerca de 99% à albumina, favorecendo a absorção na forma não ionizada tal pode justificar os elevados tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) que, para o ser humano, são aproximadamente 840 horas, 510 horas em macacos, entre 72 a 120 horas para o porco, 55 a 120 horas para ratos e 4,1 horas para as galinhas. No caso dos ruminantes grande parte da OTA é degradada no rúmen, proporcionando a estes animais uma maior tolerância à exposição desta micotoxina relativamente a outras espécies. Assim sendo, apenas uma pequena parte da OTA não se liga às proteínas plasmáticas, sendo que esta porção também está dependente da espécie animal: 0,02% em humanos e ratos, 0,08% em macacos, 0,1% em porcos e 22% em peixes (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives., 2001; Marin, Tabuc e Burgehelea, 2009).

Depois da OTA estar presente na corrente sanguínea é distribuída até vários tecidos, sendo que alguns destes apresentam uma concentração superior aos demais. Por ordem decrescente, no caso do porco, os órgãos mais afetados são o sangue, rim, bexiga, fígado, baço, músculo e gordura. Relativamente às galinhas os órgãos mais atingidos são o rim, seguido do fígado e do músculo; os coelhos apresentam também maiores danos no rim e no fígado, seguido da glândula mamária e por fim o músculo. Vários fatores influenciam a concentração da OTA nos tecidos, principalmente a espécie animal, a dose que é administrada, a via pela qual é feita a administração, o estado higieno-santitário do animal e a composição da dieta (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives., 2001; Marin, Tabuc e Burgehelea, 2009). Verificou-se ainda a transferência de OTA para o leite de ratos, coelhos e humanos. No caso dos ruminantes esta transferência é bastante inferior devido à microflora do rúmen (Bakker *et al.*, 2002).

### **1.2.3.3. Metabolismo e excreção**

A OTA é considerada uma micotoxina inibidora da síntese de proteínas *in vivo* e *in vitro*. Esta consegue provocar a inibição do alongamento peptídico pela competição com fenilalanina em reações catalisadas pela fenilalanina t-RNA sintase, tal como a inibição da síntese de RNA e DNA dando origem aos principais efeitos tóxicos da OTA (Marin, Tabuc e Burgehelea, 2009).

A eliminação da OTA por excreções fecais e urinárias é bastante importante, no entanto pode ser muito prolongada e esta está dependente da via de administração, dose, grau de ligação da OTA às proteínas e circulação entero-hepática (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives., 2001). A forma como a OTA é eliminada depende também da espécie, no caso dos ratos a excreção é feita essencialmente por via biliar, no caso dos primatas a principal forma de eliminar a OTA é por via renal (Pfohl-Leskowicz e Manderville, 2007).

#### **1.2.4. Toxicidade da OTA**

A OTA devido às suas propriedades nefrotóxicas é associada a varias doenças que afetam determinadas espécies. Esta micotoxina é conhecida como o agente etiológico da nefropatia porcina dinamarquesa. Em humanos é considerada responsável pela Nefropatia Endémica dos Balcãs (BEN) caracterizada pela redução da função renal (Batuman, 2006; Pena *et al.*, 2010; Varga e Kozakiewicz, 2006).

A OTA, tal como outras micotoxinas, pode provocar diversos efeitos tóxicos, resultantes de uma exposição aguda ou crónica. A toxicidade aguda resulta da exposição a uma dose elevada da micotoxina durante um curto período de tempo, já a crónica resulta de uma exposição a níveis reduzidos desta micotoxina mas prolongada no tempo. Fatores como a via de administração, por via oral, inalação ou contacto cutâneo, a espécie do animal e o sexo deste, são bastante relevantes aquando da avaliação das consequências que esta micotoxina pode acarretar (Bennett e Klich, 2003).

A  $DL_{50}$ , ou seja a quantidade de substância necessária, para causar a morte a 50% de uma população em estudo, é utilizada para avaliar a toxicidade aguda da OTA, e varia bastante de espécie para espécie. Considerando uma administração oral da toxina estes valores são: 30,3 mg/kg de peso corporal para os ratos machos, 20 mg/ kg de peso corporal para ratos fêmeas, 3,6 mg/kg de peso corporal em galinhas, 0,2 mg/kg de peso corporal no cão e 1 mg/kg de peso corporal no porco (Bayman e Baker, 2006). Assim, os ratos são considerados as espécies que apresentam maior resistência à OTA, contrariamente aos cães e porcos que parecem ser as espécies mais sensíveis à toxicidade aguda desta micotoxina, provocando hemorragias em vários órgãos, nefrose, necrose hepática e linfóide e enterite com atrofia das vilosidades (Government of Hong Kong, 2006; Marin, Tabuc e Burgehelea, 2009; Benites *et al.*, 2017).

A nível crónico a OTA é bastante mais preocupante pois é considerada uma micotoxina nefrotóxica, hepatotóxica, teratogénica, imunotóxica e carcinogénica para algumas espécies (Manique *et al.*, 2008). Esta pode provocar ainda diminuição do peso corporal, aumento da diurese (produção de urina pelo rim), proteinúria (perda excessiva de proteínas através da urina), pela glicosúria (perda de glicose pela urina) e transporte urinário alterado. As lesões causadas pela OTA no túbulo proximal podem causar problemas na reabsorção de proteínas que leva à proteinúria. Apresenta ainda efeito diabetogénico, uma vez que inibe a síntese de insulina ou há liberação desta pelas células pancreáticas com a diminuição da glicólise e da glicogénese e aumento da neoglucogénese e da glicogénese. A inibição da síntese proteica resulta da competição entre a OTA e t-RNA sintase de fenilalanina que impede o alongamento do peptídeo (Marin, Tabuc e Burgehelea, 2009).

Ao nível da carcinogenicidade a OTA foi classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC) como possível carcinogénica para humanos (Grupo 2B). Estudos em ratos revelam a formação de tumores renais, hepáticos, mamários e testiculares. A mortalidade pré-natal, é de aproximadamente 20%, em ratos expostos a 4 mg de OTA/ kg corporal aos 7, 8 e 9 dias após a gravidez. Foram verificadas ainda algumas perturbações do sistema nervoso central no feto, e mal formações ao nível ocular e do esqueleto (Marin, Tabuc e Burgehelea, 2009).

### **1.3. Vinhos**

O vinho é uma bebida que provém da vinificação/ fermentação alcoólica, que pode ocorrer de forma parcial ou total, de uvas frescas, que podem estar inteiras, esmagadas ou em mostos, com proveniência de vários tipos de castas. Esta fermentação ocorre graças à ação das leveduras que transformam o açúcar da fruta em álcool (Moraes e Locatelli, 2010; *IVV // A Vinha e o Vinho em Portugal*, 2016).

Na sua constituição é possível encontrar vários componentes, na sua maioria a água e o álcool. Adicionalmente encontram-se outros elementos como é o caso do glicerol, ácidos (tartárico, málico, láctico), açúcares, potássio, substâncias azotadas, compostos fenólicos e substâncias aromáticas. Na tabela 5 apresentam-se os componentes maioritários do vinho, bem como as suas quantidades expressas em g/L (*Chemical Composition*, 2018).

Relativamente aos tipos de vinho, estes classificam-se em vinho tranquilo, espumante e generoso. Os vinhos tranquilos são geralmente brancos, tintos e rosés que não contêm gás,

contrariamente a vinhos espumantes e frisantes. Estes apresentam dióxido de carbono resultante da fermentação secundária. A junção de álcool durante a fermentação do vinho leva à produção do vinho generoso ou licoroso (IVV // *A Vinha e o Vinho em Portugal*, 2016).

**Tabela 6** - Componentes maioritários do vinho e as suas quantidades em g/L adaptado de (*Chemical Composition*, 2018).

Componente	Quantidade em g/L
Água	800-900
Álcoois	80-150
Glicerol	3-14
Ácido tartárico	1-6
Ácido málico	0-8
Ácido láctico	1-5
Ácido acético	0,2-1,5
Açúcares redutores	0,5-5
Potássio	0,5-2
Compostos fenólicos	0,1-5

### 1.3.1. História

Desde muito cedo que a produção de vinho é uma tradição em Portugal (Cardeira, 2009), e o fruto da videira é o produto mais importante na agricultura. Suspeita-se que cerca de 2000 anos antes de Cristo (a.C.) se cultivou a vinha pela primeira vez em terras da Península Ibérica e, já nesta época, o vinho servia como moeda de troca no comércio com outros povos (IVV // *A Vinha e o Vinho em Portugal*, 2016). Os povos fenícios, gregos e celtas mantiveram a produção e o consumo mas foi com a chegada dos romanos que a necessidade de produção aumentou bastante, devido à elevada procura (Wines of Portugal, 2010).

A partir do ano de 1143, quando o território português é conquistado aos mouros começam lentamente a ser construídas ordens, nomeadamente religiosas, ao qual o vinho estava associado, desde muito cedo, às cerimónias. Nesta altura, o vinho já fazia parte da dieta medieval. Anos mais tarde a exportação começou a crescer gradualmente principalmente para a Inglaterra. Em 1756, foi finalmente criada a Companhia Geral da Agricultura das Vinhas do Alto Douro com a função de demarcar a região e regularizar a produção e o comércio destes vinhos (Wines of Portugal, 2010).

A partir do século XIX, a vitivinicultura teve um grande declínio devido à doença do oídio seguida da praga de filoxera que devastou grande parte das regiões vinícolas portuguesas. No início do século XX esta advertência foi superada e foi criada a regulamentação oficial para várias denominações de origem, bem como, a Federação de Vinicultores do Centro e Sul de Portugal em 1933, e a Junta Nacional do Vinho em 1937. Com a adesão de Portugal à Comunidade Económica Europeia (CEE), a Junta Nacional do Vinho é substituída pelo Instituto da Vinha e do Vinho (IVV) no ano de 1986, e é uniformizado o conceito de Denominação de Origem relativamente a regulamentação e legislação. Hoje em dia são reconhecidas 31 Denominações de Origem e 12 Indicações Geográficas em Portugal (Wines of Portugal, 2010).

### **1.3.2. Setor vitivinícola**

O setor vitivinícola tem cada vez mais impacto na economia dos países produtores. Em Portugal, este tem vindo a crescer exponencialmente, sendo considerado o setor da agricultura que mais se adequou à concorrência do restante mercado Europeu. Portugal foi já considerado o quinto país da Europa com maior produção de vinho, imediatamente depois da Alemanha e mais distanciado dos grandes produtores e exportadores mundiais, Itália, França e Espanha. Não é só ao nível europeu que Portugal e os seus vinhos se destacam, a nível mundial o nosso país apresenta uma relação exportação/ produção bastante notável, sendo das mais elevadas a nível mundial, tal como o Chile. Com a elevada produção aumenta também o consumo, colocando Portugal junto de França e Itália como os maiores consumidores de vinho na Europa (Simões, 2008).

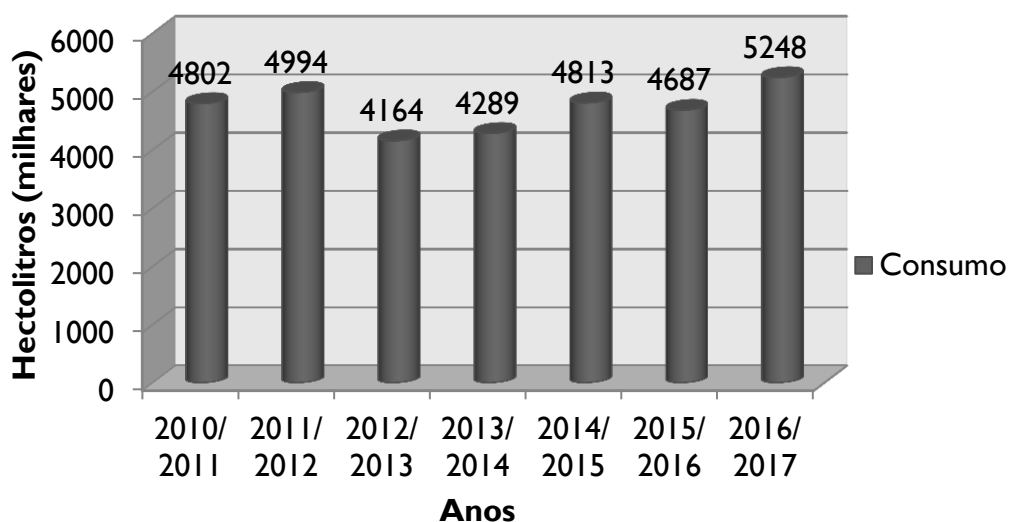
De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (INE) o consumo de vinho em Portugal desde 2010 a 2012 rondava valores anuais na ordem dos 4,9 milhões de hectolitros, no entanto em 2012/ 2013 ocorreu um abrupto decréscimo no consumo para valores na ordem de 4,2 milhões hectolitros. Este facto pode ter sido consequência da crise económica que se fez sentir em Portugal, principalmente devido a impostos associados, e ao decréscimo do poder de compra do consumidor (*Portal do Instituto Nacional de Estatística, 2018*).

A partir de 2013/ 2014 verificou-se uma recuperação, sendo que em 2016/ 2017 se verificou o maior consumo dos últimos anos, chegando aos 5,2 milhões de hectolitros (hl), como apresentado no gráfico da figura 3.

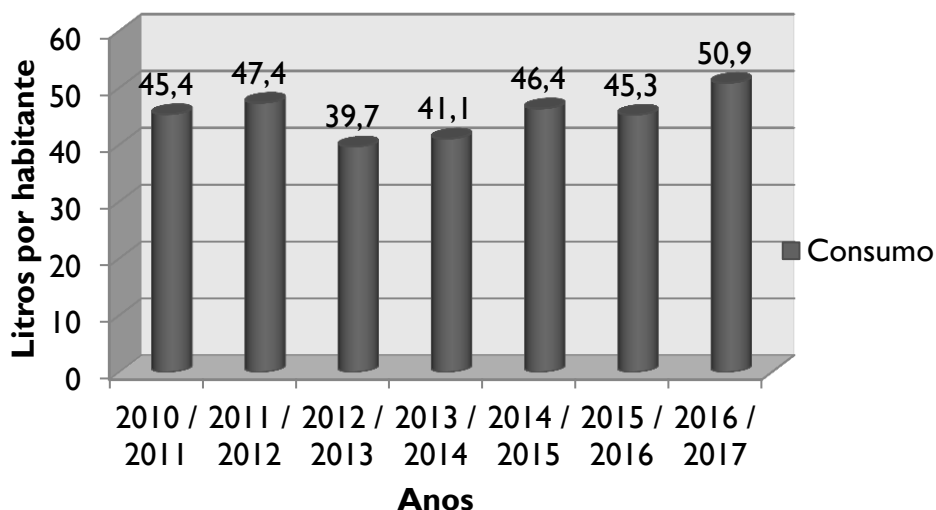


O gráfico da figura 4 representa o consumo de vinho, em litros (L) por habitantes/ ano, em Portugal. Em 2012/ 2013 o consumo foi o mais baixo dos últimos anos, com uma média de 39,7 L por habitante. No entanto, em 2016/ 2017 o consumo apresenta os valores mais elevados, próximos dos 51 L por habitante (Portal do Instituto Nacional de Estatística, 2018).

De acordo com os valores fornecidos pelo INE é possível estimar que em 2016/ 2017 o consumo de vinho diário de cada habitante em Portugal era aproximadamente 139 mL.



**Figura 3** - Evolução do consumo de vinho em Portugal (hl) (Portal do Instituto Nacional de Estatística, 2018).



**Figura 4** - Consumo humano de vinho *per capita* (L/ habitante/ ano) (Portal do Instituto Nacional de Estatística, 2018).

### **1.3.3. Benefícios**

O vinho não se destaca apenas na economia, historicamente este já era utilizado em cuidados de saúde, considerado como anti-séptico, capaz de tratar problemas dermatológicos e digestivos e também apresentava efeito analgésico. Mas, apenas em 1990 os benefícios do vinho foram salientados pelo Paradoxo Francês (Guilford e Pezzuto, 2011).

Desde cedo se percebeu que a alimentação é crucial para a saúde. Desta forma os cientistas ficaram intrigados com o facto dos franceses apesar do elevado consumo de gorduras saturadas e dos elevados níveis de colesterol, apresentarem mortalidade bastante reduzida devido a doença coronária. Ao que tudo indica, este facto está relacionado com o elevado consumo de vinho que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), diminui a mortalidade causada por doenças cardiovasculares. Desta forma surgiu a designação Paradoxo Francês (Moraes e Locatelli, 2010).

Desde então o estudo de bebidas alcoólicas tem aumentando e foi provado que um consumo moderado poderia ter benefícios para a saúde. Quanto ao vinho, o tinto, no geral, apresenta mais benefícios que o branco devido à sua elevada concentração de polifenóis que são provenientes das películas e grainhas da uva. Outros compostos tais como, a melatonina, luteína, catequina, ácido elágico, quercetina e resveratrol presentes na uva também apresentam benefícios (Guilford e Pezzuto, 2011).

Assim, o vinho consumido de forma moderada pode originar um grande número de vantagens para quem o consome, tais como o efeito antioxidante resultante da ação dos polifenóis, devido à sua capacidade de eliminar e proibir a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), bem como ao elevado teor de antocianinas, flavonóides, procianidinas, ácidos fenólicos e resveratrol (Fia *et al.*, 2018). Está também relacionado com alterações na homeostase lipídica que provocam uma diminuição dos níveis de colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade), associados a doenças como a aterosclerose, obesidade e diabetes tipo 2, resultantes de uma alimentação rica em gorduras. Favorece ainda a resposta imune e diminui a inflamação (Guilford e Pezzuto, 2011). O composto fenólico mais importante do vinho, o resveratrol, provoca uma inibição da agregação plaquetária e coagulação. Tem ainda uma ação anti-inflamatória e é regulador do metabolismo lipoproteico (Moraes e Locatelli, 2010).

Assim, o vinho com os seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e as modificações nos perfis lipídicos está associado à diminuição da principal causa de morte mundial, as doenças

cardiovasculares, mas também à prevenção de muitos tipos de cancro. Qualquer alimento para ser benéfico é essencial que seja consumido de forma moderada e regular, no caso do vinho está recomendada, de forma geral, a ingestão de 150 mL e 300 mL diários, para indivíduos do sexo feminino e masculino, respetivamente. Aliado a um estilo de vida saudável este pode ser bastante vantajoso (Guilford e Pezzuto, 2011).

#### **1.3.4. Processo de produção**

A elaboração dos vinhos tintos, brancos, rosés, espumantes e generosos é feita de formas distintas. Em seguida são apresentadas as etapas de produção destes tipos de vinho de forma a compreender melhor o que os distingue, com exceção dos generosos, uma vez que neste estudo esse tipo de vinhos não foi analisado.

Os processos como a colheita, transporte e receção são iguais para os vinhos tintos, brancos, rosés e espumantes. A primeira etapa da produção é a vindima, que depende essencialmente da maturação das uvas e do teor de açúcar. Esta pode ser feita de forma manual ou mecânica. Apesar da eficiência da colheita mecânica a manual permite uma melhor escolha das uvas, para que entrem no processamento apenas uvas de qualidade, sem que estejam danificadas (Andrade, *et al.*, 2006).

Segue-se o transporte, este deve ser realizado o mais rápido possível e nas melhores condições sanitárias, garantindo que as uvas não são pisadas ou amassadas, de forma a evitar uma fermentação precoce. A receção na adega deve garantir as condições de higiene adequadas e é necessário realizar o registo dos pesos, data, hora, quem forneceu a carga, o conteúdo em açúcares e a região onde foi realizada a colheita (Andrade, *et al.*, 2006).

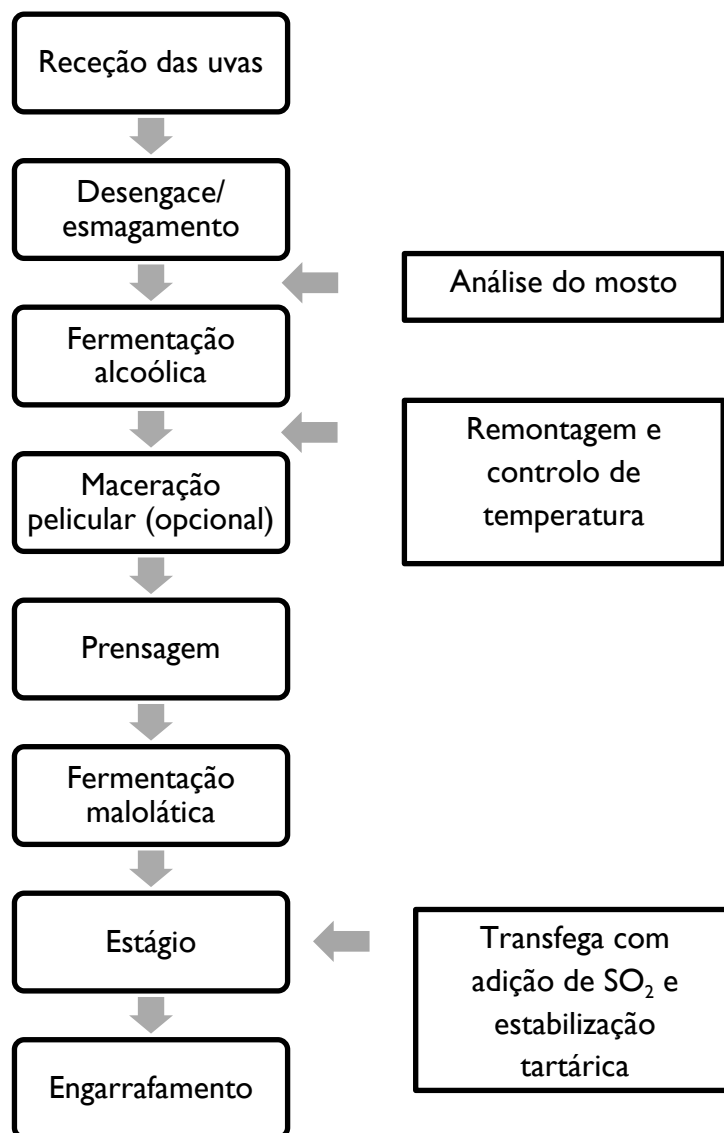
O desengace visa a retirada dos engaços (parte lenhosa) que pode ser total ou parcial, dependendo do vinho. Geralmente vinhos brancos e rosés sofrem o desengace total, os tintos nem sempre. De seguida o esmagamento, que pode ser realizado por humanos ou mecanicamente, para que o sumo da uva se liberte (Andrade, *et al.*, 2006).

A partir desta etapa o método é variável de acordo com o tipo de vinho que se pretende elaborar.

### I.3.4.1. Vinho Tinto

Na figura 5 é possível observar um fluxograma resumido do processo de produção do vinho tinto.

Depois da receção das uvas é feito o desengace e o esmagamento segue-se a fermentação alcoólica que é feita com o mosto em contacto com as partes sólidas (grainhas e películas). O açúcar do mosto transforma-se em álcool e é produzido gás carbónico que faz com que as partes sólidas fiquem à superfície dos tanques de fermentação. Por vezes a temperatura e a distribuição das leveduras não é uniforme devido à subida das partes sólidas, então é essencial fazer com que o líquido circule e se misture, dá-se a este processo o nome de remontagem (Andrade, *et al.*, 2006).



**Figura 5** - Fluxograma vinho tinto adaptado de (Andrade, *et al.*, 2006).

Na produção de vinho tinto a fermentação acontece antes da prensagem para que as propriedades destes sólidos sejam transferidos para o vinho. De seguida é feita a encuba do mosto-vinho e inoculação com bactérias de ácido láctico para que ocorra a fermentação malolática que consiste na transformação do ácido málico em ácido láctico. Seguidamente o vinho é sujeito a um estágio de descanso onde, com o tempo, as partículas em suspensão se vão depositar, sendo necessária a transfega com adição de anidrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>). O processo de clarificação nem sempre é realizado em vinhos tintos mas é necessária a estabilização tartárica, geralmente realizada a partir da adição de goma-arábica, seguida do engarrafamento (Julia, 2007).

#### **1.3.4.2. Vinho Branco**

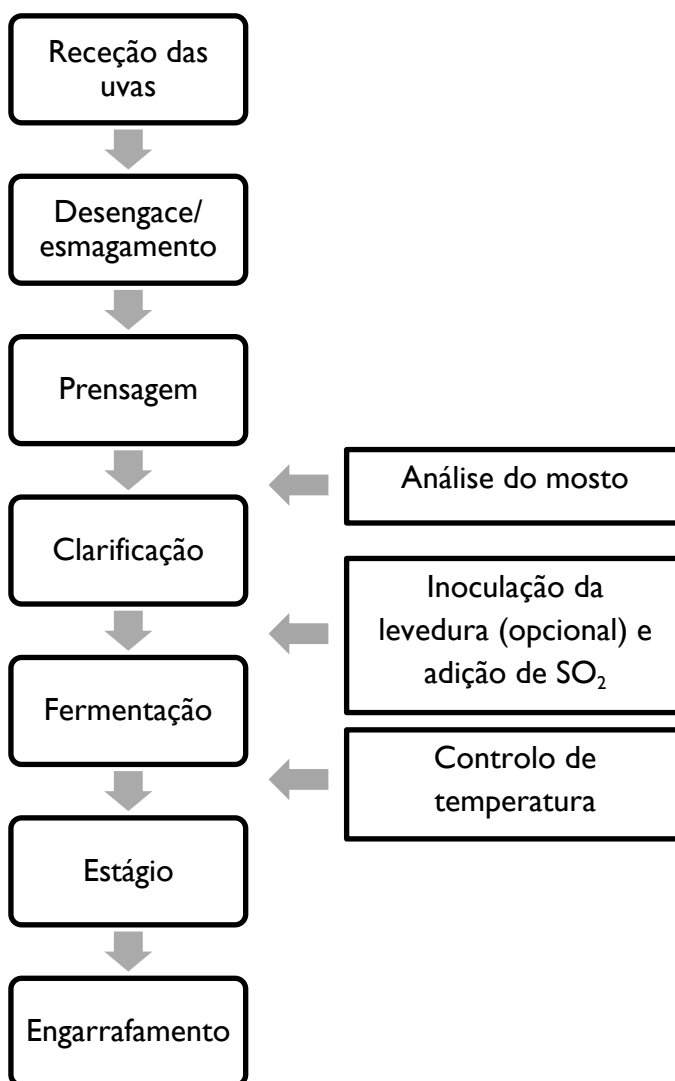
Na figura 6 é possível observar de forma sucinta os principais passos do fabrico de vinho branco.

Para a elaboração do vinho branco, após a receção é realizado o desengace e o esmagamento, segue-se a prensagem que tem como finalidade a separação da parte líquida (mosto) dos sólidos (películas e grainhas). Este processo de vinificação é denominado de “bica aberta”. Nesta fase por vezes é adicionado SO<sub>2</sub> de forma a evitar a rápida oxidação (Andrade, *et al.*, 2006).

Segue-se a clarificação que consiste na eliminação das partes sólidas que estão em suspensão, esta pode ser feita de forma natural, por decantação onde ocorre deposição no fundo da cuba para que sejam eliminadas ou de forma induzida a partir de filtrações. A seguinte etapa tem uma duração de quinze a vinte dias e consiste na transformação do açúcar em álcool, por ação de leveduras presentes no mosto ou leveduras selecionadas e adicionadas a este, a esta etapa dá-se o nome de fermentação. O vinho é então retirado da cuba para outra que se encontra limpa por forma a separá-lo de possíveis borras que se tenham depositado, designa-se a este processo transfega, nesta fase normalmente também pode ser adicionada uma pequena dose de SO<sub>2</sub> com o objetivo de conservação, evitando assim a oxidação (Andrade, *et al.*, 2006).

Antes da etapa final de engarrafamento o vinho passa por um período de estágio, sendo necessário clarifica-lo novamente para o tornar mais límpido. Esta etapa pode ser feita naturalmente por deposição o que pode demorar vários meses, ou então pode ser realizada através de duas técnicas, a colagem ou a filtração. A colagem consiste na adição de um

produto que coagula e sedimenta as partículas indesejadas, um dos produtos mais utilizados é a bentonite. Já a filtração consiste na passagem do vinho por um filtro onde ficam retidas as partículas indesejadas (Andrade, *et al.*, 2006).



**Figura 6** - Fluxograma vinho branco adaptado de (Andrade, *et al.*, 2006).

#### **1.3.4.3. Vinho Rosé, Verde e Espumante**

O vinho rosé geralmente é produzido a partir de uvas tintas ou mistura de uvas tintas e brancas e pode ser elaborado a partir de dois métodos distintos, o método branco e o tinto que diferem a partir do desengace e esmagamento (Andrade, *et al.*, 2006).

No método branco é feita a prensagem tal como na produção de vinho branco, seguida da decantação, onde são retiradas as partes sólidas para que o mosto siga para a fermentação.

Como o contacto com as películas foi muito reduzido a coloração deste tipo de vinho vai ser mais clara. Os seguintes processos de trasfega, clarificação e engarrafamento são realizados da mesma forma que no vinho branco (Andrade, *et al.*, 2006).

No método tinto em vez da prensagem o vinho é sujeito à maceração onde o mosto permanece em contacto com as partes sólidas durante um período que pode ir de algumas horas até cerca de três dias. Esta fase influencia bastante a cor e os taninos presentes no vinho. Seguidamente as partes sólidas são retiradas e o mosto segue para a fermentação. Quando a fermentação estiver completa, segue-se o estágio, trasfega e o engarrafamento tal como na produção de vinho tinto (Andrade, *et al.*, 2006).

O vinho espumante pode ser branco, tinto ou rosé e começa com a elaboração de um vinho tranquilo de acordo com um dos métodos explicados anteriormente. Depois de completa a fermentação alcoólica e antes de engarrafar o vinho é necessária a adição do licor de fermentação ou de tiragem que é constituído por mosto parcialmente fermentado, açúcar e leveduras que darão origem à segunda fermentação (Sogrape-Vinhos de Portugal, 2018).

A segunda fase da produção pode variar tendo em conta quem o produz, pode ser utilizado o método tradicional, de cuba fechada ou de transferência. No método tradicional é o mais comum, onde a segunda fermentação ocorre dentro da garrafa durante alguns meses e a uma temperatura indicada de 11°C e 12°C. Para a remoção das borras que se depositam durante o processo de fermentação é necessário colocar as garrafas em cavaletes de forma a que todo o depósito se acumule no gargalo da garrafa, seguidamente estas garrafas são colocadas num equipamento que congela a pequena fração de vinho e borras junto ao gargalo para de seguida serem retiradas, a esta etapa dá-se o nome de descabeçamento. Seguidamente é adicionado o licor de expedição, composto por vinho e açúcar ou apenas vinho caso se pretenda um espumante bruto, por fim as garrafas são rolhadas ainda sujeitas a baixas temperaturas para que não se perca a pressão (Sogrape-Vinhos de Portugal, 2018).

No método de transferência a segunda fermentação ocorre exatamente da mesma forma que no método tradicional mas posteriormente as garrafas são abertas e o vinho é colocado numa cuba onde são retiradas as borras, segue-se a adição do licor de expedição e depois o engarrafamento. No método de cuba fechada a segunda fermentação não ocorre dentro da garrafa mas sim numa cuba durante pelo menos 18 dias, depois o vinho é filtrado e está pronto para ser engarrafado (Andrade, *et al.*, 2006).

O vinho verde é o resultado das uvas provenientes da região Demarcada dos Vinhos Verdes que abrange todo o noroeste do país. As condições naturais e as castas autóctones desta região proporcionam aos vinhos as suas características únicas (*Vinho Verde*, 2018). Estes vinhos podem ser de vários tipos dependendo das castas utilizadas para a sua produção, tais como, vinho verde branco, vinho verde rosé, vinho verde tinto e espumante de vinho verde (Andrade, *et al.*, 2006).

#### **1.4. OTA em vinhos**

Inicialmente, a presença de OTA, produzida pelos fungos dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, estava relacionada essencialmente com cereais. No entanto, ao longo dos tempos foi possível perceber que a OTA estava presente em variadíssimos alimentos, nomeadamente a uva, e como consequência no vinho (N. e M., 2004). Sendo considerada a segunda maior fonte de ingestão diária de OTA (Cabañes *et al.*, 2002). A contaminação do vinho é iniciada na vinha, principalmente em uvas danificadas, sendo que esta contaminação é originada maioritariamente por fungos do género *Aspergillus Carbonarius* (N. e M., 2004). No entanto, para que possa ocorrer o desenvolvimento do fungo e a produção da toxina é essencial que as condições climáticas e de atividade da água sejam garantidas (Nogueira e Oliveira, 2006), condições estas já descritas na tabela 3.

Tendo em conta a forma como são produzidos os vinhos e o facto dos fungos produtores de OTA se desenvolverem na película da uva, principalmente em uvas danificadas, é de prever que o vinho tinto apresente maior contaminação do que os outros vinhos, uma vez que nestes, as películas estão presentes durante a fermentação, levando à transferência da OTA para o mosto. Tanto para o vinho branco como para o rosé as películas estão pouco tempo em contacto com o mosto, logo a possibilidade de transferência da OTA é menor (Mateo *et al.*, 2007).

Alguns processos de produção reduzem parcialmente a OTA presente nos vinhos, como é o caso da fermentação malolática, que pode reduzir os teores de OTA em cerca de 25 a 50%, a clarificação que, pode ser realizada através de agentes específicos, podendo alguns diminuir os níveis de OTA e ainda, quanto maior for o tempo de envelhecimento menor será a concentração de OTA no produto final (Mateo *et al.*, 2007).

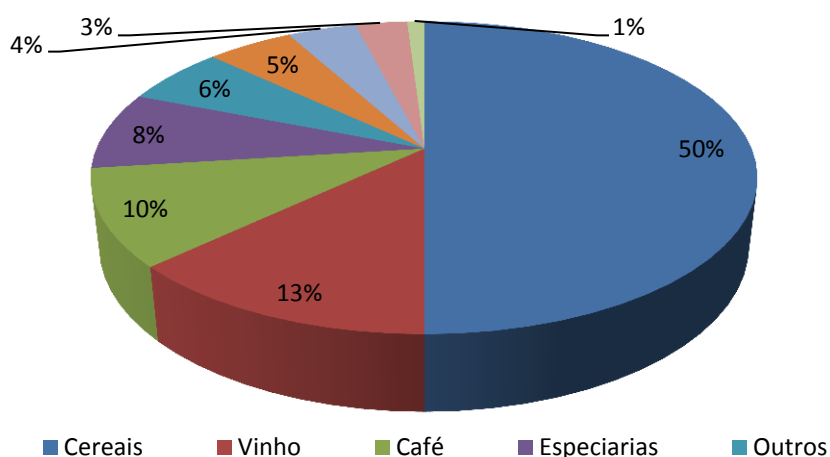
Para evitar o aparecimento desta micotoxina no vinho é essencial a prevenção que resultou na elaboração do código de práticas Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV -



*International Organisation of Vine and Wine*), pela Boas Práticas Agrícolas (GAP - *Good Agriculture Practices*) e Boas Práticas de Fabrico (GMP - *Good Manufacturing Practices*). Este código consiste num conjunto de controlos que são realizados durante todo o processo, desde o controlo pré-vindimas, que avalia as condições do crescimento da videira bem como o controlo de possíveis pestes. É feito ainda um controlo durante a vindima através da seleção das uvas e outro durante a produção do vinho (*International Organisation of Vine and Wine*, [s.d.]). Assim, boas práticas de prevenção de danos mecânicos e ambientais às bagas, utilização de fungicidas e remoção de bagas danificadas antes do esmagamento são alguns dos meios que podem levar a um produto final de melhor qualidade e com níveis de OTA bastante mais reduzidos.

#### 1.4.1. Ocorrência da OTA em vinhos

A ocorrência desta micotoxina em vinhos tem sido cada vez mais estudada, uma vez que esta pode ter efeitos bastante prejudiciais para a saúde. De acordo com um estudo realizado entre Novembro de 1999 e Setembro de 2000, em treze países da União Europeia, inclusive Portugal, verificou-se que quase metade das amostras analisadas estavam contaminadas (Health e Protection, 2002). Na figura 7 é possível observar o gráfico que mostra os géneros alimentícios mais contaminados durante esse período de tempo (Health e Protection, 2002).



**Figura 7** - Percentagem de géneros alimentícios contaminados por OTA adaptado de (Health e Protection, 2002).

O vinho, depois dos cereais, é considerado o alimento mais recorrentemente contaminado com OTA. Geralmente, vinhos tintos e licorosos tendem a apresentar uma concentração superior de OTA relativamente aos rosés, espumantes e brancos (Health e Protection,

2002; Abreu, Ocratoxina e Vinhos, 2013). Assim sendo, na tabela 6 são apresentados alguns estudos de ocorrência de OTA em vinhos.

Num estudo realizado em Portugal, no qual foram analisadas 60 amostras de vinhos tintos e brancos, verificou-se que 9 amostras de vinho tinto e 3 amostras de vinho branco estavam contaminadas. Apenas duas amostras, uma de vinho tinto e uma de vinho branco possuíam teores acima do LOQ, e uma das amostras de vinho branco, com um teor de OTA de 2,4 µg/L, excedeu o limite máximo autorizado de 2,0 µg/L (Pena *et al.*, 2010).

Em Valência (Espanha), a análise de 119 vinhos, 116 amostras de origem da Comunidade Valenciana e 3 caseiros, apresentaram níveis de contaminação que variaram entre <0,01 e 0,76 µg/L. Os vinhos tintos apresentaram os maiores níveis de OTA, seguidos dos rosés e brancos. O teor mais elevado de OTA, de 0,76 µg/L, foi observado num vinho branco caseiro. Este valor pode ser explicado pelo facto destes vinhos muitas vezes serem produzidos sem grande controlo de qualidade (Blesa *et al.*, 2004).

Outro estudo realizado em Espanha avaliou a presença de OTA e outras ocratoxinas em 51 amostras vinhos tintos, e todas as amostras estavam contaminadas. No entanto, estes vinhos apresentavam teores de contaminação muito reduzidos, com um teor máximo de 0,142 µg/L (Remiro *et al.*, 2012).

Na Croácia, a análise de OTA em 14 amostras de vinhos tintos e brancos demonstrou que todos os 7 vinhos tintos possuíam concentrações detetáveis desta micotoxina, sendo a maior concentração de 0,047 µg/L. Mais uma vez é de notar que os vinhos brancos apresentam uma contaminação inferior desta micotoxina relativamente aos vinhos tintos. Dos 7 vinhos brancos analisados, 4 destes apresentavam contaminação, com a maior concentração na ordem dos 0,022 µg/L (Domijan e Peraica, 2005).

Na Morávia, foram analisados 72 vinhos da região e de outros países, de forma a fazer uma comparação dos teores de OTA. Segundo a análise realizada, verificou-se que das 46 amostras da região apenas 5 estavam contaminadas com teores máximos de 0,0712 µg/L. Dos 26 vinhos de outros países analisados 64% estavam contaminados: dos 13 vinhos brancos 8 apresentavam uma contaminação média de 0,0432 µg/L, dos 3 vinhos rosés, 2 apresentavam teores de contaminação de 0,0027 µg/L e 6 dos 10 vinhos tintos foram positivos com um valor médio de contaminação de 0,061 µg/L. Os teores mais elevados de OTA foram detetados nos vinhos provenientes da Grécia (0,109 a 0,227 µg/L) e de Espanha (0,0017 a 0,0759 µg/L) (Mikulíková *et al.*, 2012).

Numa pesquisa de OTA em vinhos Italianos, analisaram-se 82 vinhos: tinto, rosé, branco e licoroso. Verificou-se que 50% dos vinhos tintos estavam contaminados com valores superiores a 0,2 µg/L, e destes, 32% apresentavam uma contaminação superior a 0,5 µg/L (Dall'Asta *et al.*, 2004). Outro estudo realizado em Itália, mas este com 55 amostras biológicas, 40 vinhos tintos e 15 vinhos brancos, foram detetados teores compreendidos entre 0,021 e 0,112 µg/L, para os vinhos brancos e de 0,081 e 0,711 µg/L, para os vinhos tintos (Gentile *et al.*, 2015).

Um outro estudo visou a comparação de vinhos provenientes de Itália e da Hungria, através da análise de 267 amostras de vinho. Os vinhos italianos apresentaram algumas amostras contaminadas, sendo que o teor máximo encontrado foi de 4,00 µg/L, considerado bastante elevado. De acordo com os resultados os vinhos provenientes da Hungria, não apresentam contaminação, uma vez que todas as amostras apresentavam teores de OTA inferiores ao limite de deteção (Brera *et al.*, 2005).

Na Turquia foram analisados 95 vinhos, dos quais 34 das amostras eram de vinho branco, 10 de vinho rosé e 51 de vinhos tintos e a percentagem de contaminação das amostras foi de 86%, o que corresponde a 82 amostras de vinho contaminadas, com teores de OTA entre 0,006 e 0,815 µg/L (Var e Kabak, 2007).

Trinta e cinco amostras de vinhos tintos, brancos, rosés e licorosos foram analisadas na Grécia, destas amostras 22 estavam contaminadas, o que representa uma percentagem de 62,8%. Os teores de contaminação por OTA obtidos estavam compreendidos entre <0,02 e 3,2 µg/L (Soufleros, Tricard e Bouloumpasi, 2003).

Na Eslováquia um estudo procedeu à comparação dos níveis de contaminação de vinhos brancos e tintos, de marcas comerciais e vinhos caseiros. Relativamente aos vinhos brancos, nenhuma amostra de vinho caseiro e 85% das amostras de vinho comercial não apresentavam contaminação. Quanto aos vinhos tintos, a percentagem de não contaminados foi de 33% em comerciais e caseiros, e algumas amostras de vinho tinto comercial apresentaram teores de contaminação acima dos 0,033 µg/L (Belajová e Rauová, 2007).

A análise de vinhos tintos, brancos, rosés e licorosos, na China demonstrou mais uma vez que os vinhos tintos apresentam uma tendência superior aos outros tipos de vinho no que toca à contaminação por OTA. Neste estudo, 44 das 77 amostras de vinho tinto apresentavam contaminação entre o LOD e 5,65 µg/L. dos restantes vinhos apenas uma amostra de cada apresentou contaminação (Zhang *et al.*, 2013). Outro estudo realizado na

China, verificou que nas 28 amostras de vinho tinto analisadas, 13 continham teores entre o LOD e o LOQ e 15 apresentavam uma contaminação superior ao LOQ, os teores encontrados estavam entre 0,0028 e 0,0437 µg/L (Mao *et al.*, 2013).

Um estudo realizado na Austrália envolveu um grande número de amostras de vinhos tintos e brancos, 601, das quais apenas 90 (15%) apresentavam contaminação por OTA e a grande maioria, em média, não excedeu os 0,2 µg/L. sendo que, o teor máximo de contaminação encontrado foi num vinho tinto com 0,62 µg/L (Hocking *et al.*, 2003).

Um estudo realizado com vinhos do Chile e da Argentina revelou que nenhuma das 68 amostras analisadas continha OTA (Ana *et al.*, 2005).

De acordo com um estudo realizado em 41 vinhos, provenientes dos Estados Unidos da América (EUA) verificou-se a contaminação generalizada destes vinhos com OTA, com teores de 8,6 µg/L, considerados bastante elevados (Jesus, De *et al.*, 2018).

Os dados apresentados revelam a importância da realização de mais estudos relativos à ocorrência desta micotoxina em vinhos, uma vez que é o segundo género alimentício mais recorrentemente contaminado pela OTA e é bastante consumido em todo o mundo.

**Tabela 7 - Ocorrência da OTA em diversos vinhos e países.**

<b>País/ cidade</b>	<b>Vinho analisado</b>	<b>Frequência (número de amostras positivas/ total de amostras)</b>	<b>Níveis de contaminação de OTA (µg/L)</b> Mínimo - Máximo	<b>Bibliografia</b>
<b>Portugal</b>	Tinto	9/35	Máx. 1,23	(Pena et al., 2010)
	Branco	3/25	Máx. 2,4	
<b>Espanha</b>	Tinto	21/61	<LOD - 0,76	(Blesa et al., 2004)
	Branco	1/21		
	Rosé	12/21		
	Licoroso	8/13		
	Caseiro	3/3		
	Vinho tinto	51/51	0,00049 – 0,142	(Remiro et al., 2012)
<b>Croácia</b>	Tinto	7/7	0,012 – 0,047	(Domijan e Peraica, 2005)
	Branco	4/7	0,015 – 0,022	
<b>Morávia</b>	Vinhos da Morávia	5/46	0,0012 – 0,0712	(Mikulíková et al., 2012)
	Vinhos estrangeiros (brancos, rosés e tintos)	16/26	0,0016 – 0,227	
<b>Itália</b>	Tinto, branco, rosé e licoroso	-/82	Máx. > 0,5	(Dall'Asta et al., 2004)
	Tintos biológicos	55/55	0,081 - 0,711	(Gentile et al., 2015)
	Brancos biológicos	7/19	0,021 - 0,112	
	Licoroso	25/159	Máx. 1,64	(Brera et al., 2005)
	Tinto	4/9	Máx. 4,00	
Branco	17/21	Máx. 1,04 Máx. 0,21		

**Tabela 7-** Ocorrência da OTA em diversos vinhos e países (continuação).

País/ cidade	Vinho analisado	Frequência (número de amostras positivas/ total de amostras)	Níveis de contaminação de OTA (µg/L)		Bibliografia
			Mínimo	Máximo	
<b>Hungria</b>	Tinto	0/27			(Brera <i>et al.</i> , 2005)
	Rosé	0/2	<LOD		
	Branco	0/30			
<b>Turquia</b>	Branco	29/34	0,006 - 0,618		(Var e Kabak, 2007)
	Rosé	9/10	0,010 - 0,161		
	Tinto	44/51	0,010 - 0,815		
<b>Grécia</b>	Tinto	9/14	Máx. 2,51		(Souferos, Tricard e Bouloumpasi, 2003)
	Branco	7/12	Máx. 0,87		
	Rose	0/1	-		
	Licorosos	6/7	Máx. 3,20		
<b>Eslováquia</b>	Branco	4/27	0,011 - 0,033		(Belajová e Rauová, 2007)
	Tinto	8/12	0,011 - >0,033		
	Branco caseiro	0/5	-		
	Tinto caseiro	4/6	0,011 - 0,033		
<b>China</b>	Tinto	44/77	<LOD - 5,65		(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
	Branco	1/34	<LOD - 0,07		
	Rosé	1/4	<LOD - 0,22		
	Licoroso	1/4	<LOD - 0,10		
	Vinho tinto	15/28	0,0028 - 0,0437		
<b>Austrália</b>	Branco	41/257	0,05 - 0,50		(Hocking <i>et al.</i> , 2003)
	Tinto	49/344	0,05 - 0,62		
<b>Chile e Argentina</b>	Tinto	0/68	-		(Ana <i>et al.</i> , 2005)
	Tinto	26/28	0,3 - 2,1		
<b>USA</b>	Branco	3/3	0,6 - 1,2		(Jesus, De <i>et al.</i> , 2018)
	Licorosos	6/10	0,5 - 8,6		

## **I.4.2. Descontaminação**

A elevada toxicidade da OTA levou a uma crescente pesquisa no que diz respeito a métodos capazes de descontaminar os alimentos da OTA.

Existem algumas etapas da produção de alimentos que levam à redução dos teores de OTA nos mesmos (Amézqueta *et al.*, 2009). No entanto, esta é bastante difícil de eliminar devido à sua grande resistência e estabilidade a processos onde são utilizadas por exemplo elevadas temperaturas. Normalmente as estratégias utilizadas prendem-se com a utilização de métodos químicos, físicos e biológicos (Silva, 2013).

Na produção de pão considera-se que a limpeza dos grãos antes do seu fabrico pode reduzir o teor de OTA até 25%. Na produção de cerveja o esmagamento dos grãos provoca uma diminuição significativa de OTA entre valores de 40 a 89% (Amézqueta *et al.*, 2009).

No caso da moagem, o valor de OTA tende a aumentar, devido à concentração das micotoxinas que se alojam nos moinhos. O processo maceração das uvas também contribui para o aumento dos teores de OTA, no entanto, a fermentação é capaz de eliminar cerca de 20 a 30% desta micotoxina (Lanças e Paulo, 2015; Tao *et al.*, 2018).

Nestas situações é importante recorrer também a medidas profiláticas, como o uso de agentes biocontroladores, fungicidas, antioxidantes e otimização das práticas vitivinícolas. Bem como, perceber quais as causas que favorecem o aparecimento da OTA nomeadamente o ataque de insetos, danos mecânicos e fungos causadores de podridão (Silva, 2013).

Atualmente são conhecidos alguns métodos capazes de eliminar uma percentagem considerável destas micotoxinas, como é o caso de tratamentos com hipoclorito, amonização e a utilização de antioxidantes como o ácido vanílico que impedem o crescimento de fungos. São utilizados ainda métodos que recorrem ao carvão ativado (alta capacidade de adsorção de OTA no entanto altera a qualidade do vinho), silicato de alumínio, cálcio, tratamentos com peróxido de hidrogénio alcalino, bentonite e em alguns casos irradiação gama (Silva, 2013).

Assim, a resistência desta micotoxina ao processamento é comprovada, apenas condições mais extremas a conseguem diminuir em percentagens consideráveis. No caso dos vinhos a biodegradação é uma boa opção de descontaminação, uma vez que as bactérias do ácido láctico degradam grande parte da OTA durante o processo de fermentação malolática (Silva, 2013).

### I.4.3. Legislação relativa à OTA

Perante a exposição humana à OTA e os dados que comprovam a sua estabilidade e toxicidade, foi necessária a criação de legislação adequada e o estabelecimento de limites máximos desta micotoxina em alimentos (Dall'Asta *et al.*, 2004). De acordo com estudos realizados pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA - *European Food Safety Authority*) no que diz respeito aos riscos que a OTA apresenta e tendo em consideração as medidas preventivas para a diminuição da concentração desta micotoxina foi criada a legislação dos teores máximos para diferentes géneros alimentícios (*Regulamento (Ce) N. 466, 2001*). A tabela 7 apresenta os valores máximos estabelecidos pela União Europeia para alguns alimentos. Nomeadamente para o vinho, que em Portugal não pode exceder o limite máximo de 2 µg/L de OTA (CE, 2010).

A EFSA estabeleceu ainda qual o valor de ingestão semanal tolerável desta micotoxina, sendo este valor 120 ng/kg de peso corporal (*Regulamento (Ce) N. 466, 2001*).

**Tabela 8** - Teores máximos de OTA em vários géneros alimentícios.

<b>Alimento</b>	<b>Teores máximos (µg/ Kg)</b>
Cereais e derivados de cereais	5,0
Derivados de cereais, incluindo os produtos à base de cereais e grãos de cereais destinados a consumo humano direto	3,0
Uva passa	10,0
Café torrado, moído e em grão, com exceção do café solúvel	5,0
Café solúvel	10,0
Vinho (tinto, branco e rosé) e outro vinho e/ou bebidas à base de mosto de uvas	2,0
Sumo de uva, ingredientes de sumo de uva noutras bebidas incluindo néctar de uva e concentrado de uva reconstituído	2,0
Mosto de uva e concentrado de mosto reconstituído destinado ao consumo humano direto	2,0
Alimento à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens	0,50
Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos, especificamente destinados a bebés	0,50
Café verde, frutas secas que não uva passa, cerveja, cacau e produtos derivados do cacau, vinhos licorosos, produtos à base de carne, especiarias e alçaçuz	Não definido



## 1.5. Métodos de determinação

Pelo facto das micotoxinas presentes nos alimentos serem encontradas em concentrações bastante reduzidas, é de extrema importância que os métodos de determinação utilizados para estas análises sejam bastante sensíveis e precisos (Bennett e Klich, 2003).

Procedimentos experimentais, como a extração e purificação da amostra, facilitam a deteção e quantificação destas micotoxinas em alimentos. Na tabela 8 são apresentadas algumas metodologias analíticas utilizadas em diversos estudos por forma a determinar OTA em vinhos.

### 1.5.1. Preparação, extração e purificação

Como previamente referido, para que seja possível uma quantificação precisa dos níveis de contaminação de OTA nos vinhos é essencial recorrer a metodologias analíticas sensíveis e seletivas por forma a atingir limites de deteção reduzidos.

O processo de filtração é amplamente utilizado para facilitar a análise das amostras de vinho, sendo essencial em estudos onde se realiza injeção direta, como é o caso de Pena *et al.* (2010) e Dall'Asta *et al.* (2004), como apresentado na tabela 8. Em ambos os estudos, as amostras de vinho foram filtradas com filtros de membrana, com dimensões de poro de 0,45 µm, e diretamente injetadas no cromatógrafo para determinação por cromatografia líquida (LC) com deteção por fluorescência (FD), tornando a utilização deste método bastante fácil, rápida e económica relativamente aos demais.

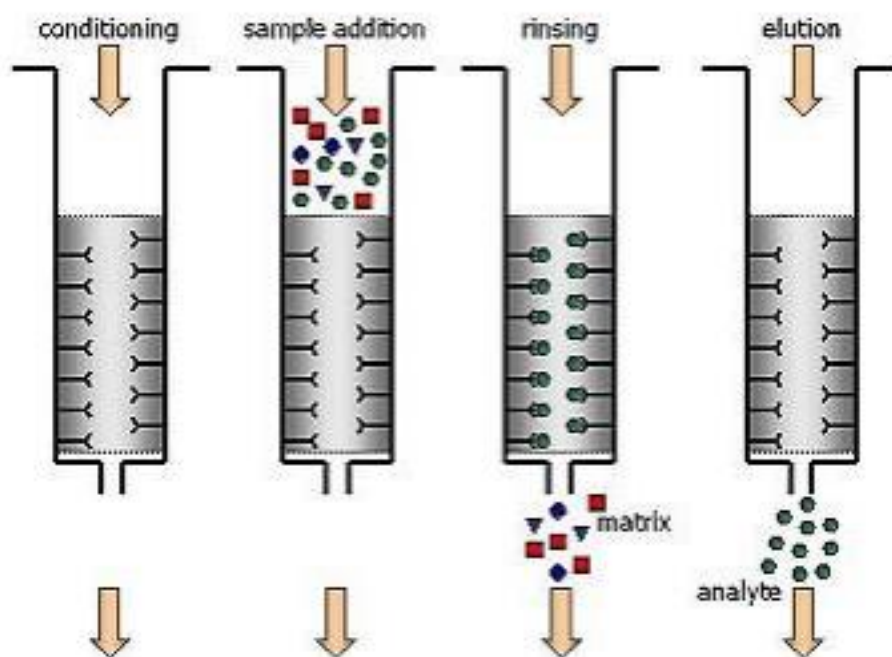
O método de extração em fase sólida (SPE) também é bastante utilizado. Na tabela 8 são apresentados dois estudos que utilizam este tipo de extração. Zhang *et al.* (2013) usaram 10 mL de amostra de vinho que foram diluídos com 10 mL de água Milli-Q. A coluna C<sub>18</sub> SPE foi acondicionada com 5 mL de metanol (CH<sub>3</sub>OH) e 5 mL de água Milli-Q e, posteriormente, foram passados os 20 mL de amostra diluída pela coluna. A coluna foi lavada com 2 mL de água Milli-Q e 2 mL de metanol/ água (60:40), e a OTA eluída com 5 mL de metanol/ ácido acético glacial (99,5:0,5). Por fim, o eluato foi evaporado à secura, sob azoto, a 45°C, e redissolvido com 500 µL de fase móvel.

Na investigação de Hocking *et al.* (2003), a quantidade de amostra utilizada foi superior ao estudo anterior. Um total de 35 mL de vinho foi diluído com 50 mL de cloreto de sódio

(NaCl) aquoso saturado e acidificado com ácido clorídrico (HCl). Foi realizada uma primeira extração com 110 mL de éter dietílico ((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>O) e a fase orgânica resultante foi sujeita a uma segunda extração com 40 mL de bicarbonato de sódio (NaCHO<sub>3</sub>) e o pH ajustado a 2 com ácido clorídrico (10 M). A coluna foi lavada com 10 mL de metanol, seguido de 10 mL de água/ácido acético (1%), e de metanol/ ácido acético (30%). Por fim, a OTA foi eluída com ácido acético/ acetonitrilo (10 mL). O eluato foi evaporado à secura (40°C) e redissolvido em acetonitrilo/água/ácido acético (50:49,5:0,5).

Um, outro estudo reporta a extração líquido-líquido (LLE), que consistiu na adição a uma pequena quantidade de amostra de vinho (500 µL) 1 mL de clorofórmio e de 100 µL de padrão, num tubo Eppendorf de 1,5 mL. Após a rejeição da camada aquosa superior, a camada de clorofórmio foi seca ao ar, e o resíduo foi reconstituído com 200 µL de fase móvel (Jesus, De *et al.*, 2018).

A filtração das amostras, bem como diferentes metodologias por SPE e LLE são bastante utilizadas, no entanto para realizar a determinação de OTA em vinho, o método mais recorrente é a purificação com colunas de imunoafinidade (IAC) (Zhang *et al.*, 2013). As IACs possuem anticorpos que apenas se ligam a determinadas micotoxinas, e ao passar a amostra pela coluna este anticorpo irá reter os analitos de interesse, depois é realizada a lavagem da coluna que elimina as impurezas, seguida da eluição onde são libertados os analitos de interesse (Lanças e Paulo, 2015), tal como ilustrado na figura 8.



**Figura 8** - Princípio do funcionamento de uma coluna de imunoafinidade.

Domijan e Peraica (2005), Blesa *et al.* (2004), Mikulíková *et al.* (2012), Brera *et al.* (2005), Gentile *et al.* (2015) e NOBA *et al.* (2008) utilizaram nos seus estudos as IACs para uma melhor extração e purificação das amostras de vinho, como apresentado na tabela 8. Outros autores também defendem a utilização destas colunas, como é o caso Ana *et al.* (2005), Mao *et al.* (2013), Belajová e Rauová (2007), Soufleros, Tricard e Bouloumpasi (2003), Var e Kabak (2007), entre outros.

Para a purificação, as colunas utilizadas nestes estudos são colunas OchraTest (Domijan e Peraica, 2005; NOBA *et al.*, 2008), colunas Ochraprep (Blesa *et al.*, 2004; Mikulíková *et al.*, 2012; Brera *et al.*, 2005) e colunas OTA-CLEAN™ (Gentile *et al.*, 2015).

Domijan e Peraica (2005), utilizaram 10 mL de amostra de vinho que foi diluído com 10 mL de tampão fosfato-salino (PBS) e o pH foi ajustado com hidróxido de sódio (NaOH) (10 M) para valores compreendidos entre 7,0 e 7,5 e filtrado com filtro de microfibras. Na IAC – OchraTest foram colocados 10 mL de extrato e de seguida a coluna foi lavada com 10 mL de tampão PBS e 10 mL de água. A OTA foi eluída utilizando 4 mL de metanol/ ácido acético (98:2) e o eluato foi evaporado à secura com azoto e dissolvido em 200 µl de metanol/ água/ ácido acético glacial (70:30:2).

NOBA *et al.* (2008) diluiu 20 mL de amostra com 20 mL de água com polietilenoglicol (1%) e hidrogenocarbonato de sódio (5%) e filtrou a amostra, que seguidamente foi colocada na

IAC (OchraTest) e lavada com 6 mL de solução aquosa de cloreto de sódio (2,5%) e hidrogenocarboneto de sódio (0,5%). A coluna foi novamente lavada com 6 mL de solução aquosa de acetato de amónio (10 mM) e seca ao ar. Por fim a OTA foi eluída com 3 mL de metanol/ácido acético (98:2), o eluído foi evaporado até à secura sob azoto 40°C e redissolvido com 1 mL de água/ acetonitrilo/ ácido acético glacial (70:30:1).

Relativamente às amostras que foram concentradas e purificadas por colunas Ochraprep. Blesa *et al.* (2004) utilizou 10 mL de amostra de vinho que adicionou a 10 ml de tampão PBS e agitou durante 5 minutos. A IAC foi acondicionada com 4 mL de PBS e seguidamente foi feita passar a amostra diluída pela coluna a um fluxo de 1 a 2 gotas por segundo. A coluna foi lavada com 9 ml de PBS e 8 ml de água e secou ao ar. A eluição da OTA foi feita com 2 mL de metanol e o eluato evaporado até 1 mL com corrente suave de azoto. Mikulíková *et al.* (2012) adicionou hidróxido de sódio (2 M) a 50 mL de amostra e ajustou o pH a 7,2. A amostra foi passada pela IAC seguida de lavagem com 20 mL de tampão fosfato, a OTA foi eluída com 1,5 mL de metanol/ ácido acético (98:2). O eluído obtido foi concentrado no evaporador rotativo sob vácuo e o resíduo obtido foi reconstituído em 1 mL de metanol/ água (50:50), e filtrado por um microfiltro nylon 0,22 µm. Brera *et al.* (2005) utilizou 5 mL de amostra de vinho que foi diluído com 60 mL de PBS, agitado e filtrado com um filtro de microfibras de vidro. A IAC foi acondicionada com 4 mL de PBS e de seguida foi aplicada a amostra, que posteriormente foi lavada com 9 mL de PBS e 8 mL de água e seca ao ar. A OTA foi eluída com 1,5 mL de metanol e o eluato foi diluído com 0,5 mL de água.

Gentile *et al.* (2015) optou pela coluna OTA-CLEAN™ em que 10 mL de vinho foram adicionados a 10 mL de uma solução de água destilada com polietileno glicol (PEG) ultrapuro (1%) e bicarbonato de sódio (5%). A mistura foi agitada e filtrada através de um filtro de microfibras de vidro, para posteriormente ser adicionada à coluna, que foi lavada com 5 mL de cloreto de sódio (2,5%) e bicarbonato de sódio (0,5%) e depois com 5 mL água purificada. O metanol (2 mL) foi usado para eluir a OTA da coluna, tendo o eluato sido evaporado sob fluxo de azoto à temperatura ambiente e o extrato seco redissolvido em 250 µL de fase móvel, e filtrado através de um filtro de membrana de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,2 µm.

### 1.5.2. Detecção e quantificação

Os métodos analíticos mais utilizados para a deteção e quantificação de OTA recorrem essencialmente a técnicas cromatográficas. A cromatografia líquida (LC) é a mais utilizada para a determinação de OTA em alimentos devido à elevada sensibilidade e precisão, permitindo ainda alcançar um limite de deteção reduzido (Lanças e Paulo, 2015).

Na tabela 8 são apresentados os métodos utilizados por alguns autores, bem como algumas características usadas por cada um durante todo o processo.

No que diz respeito às colunas analíticas e às suas dimensões, observa-se uma grande disparidade, foram eleitas as colunas C18 Nucleosil 120KS (30 x 4 mm) e ACT Ace C18 (250 mm x 4,6 mm) (Pena *et al.*, 2010), a coluna X-Terra TM C18 Waters (250 mm x 4,6 mm) (Dall'Asta *et al.*, 2004), a coluna em fase reversa Phenomenex Prodigy ODS3 (250 mm x 4,6 mm) (Zhang *et al.*, 2013), a coluna Ultracarb C18 (4,6 x 250 mm) (Hocking *et al.*, 2003), a coluna analítica Sonoma C18 (250 mm x 4,6 mm) (Jesus, De *et al.*, 2018), a coluna analítica (125 x 4 mm) acoplada a uma coluna de guarda LiChrospher RP-18 (4 x 4mm) (Domijan e Peraica, 2005), a coluna Kromasil SC – 18 (150 mm x 4,6 mm) (Blesa *et al.*, 2004), a coluna Waters Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm) (Mikulíková *et al.*, 2012), a coluna Kromasil KR 100 (150 mm x 4,6 mm) (Brera *et al.*, 2005), a coluna Acquity UPLC® Waters BEH C18 (2,1 x 50 mm) (Gentile *et al.*, 2015), a coluna XBridge C18 (100 x 2,1 mm) e a coluna de guarda XBridge C18 (10 x 2,1 mm) (NOBA *et al.*, 2008).

O tamanho da partícula da fase estacionária também apresenta alguma variabilidade. A escolha recai principalmente para colunas com 5 µm de tamanho da partícula (Pena *et al.*, 2010; Dall'Asta *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013; Hocking *et al.*, 2003; Blesa *et al.*, 2004; Brera *et al.*, 2005), outros dão preferência a 1,7 µm (Mikulíková *et al.*, 2012; Gentile *et al.*, 2015) e ainda 3,5 µm (NOBA *et al.*, 2008). O volume a injetar no sistema cromatográfico também depende de investigador para investigador, dos estudos presentes na tabela 8, os volumes variam de 5 µl (Dall'Asta *et al.*, 2004), 10 µl (Zhang *et al.*, 2013; Mikulíková *et al.*, 2012; Gentile *et al.*, 2015), 20 µl (Jesus, De *et al.*, 2018), 50 µl (Brera *et al.*, 2005) e 150 µl (Blesa *et al.*, 2004). Um volume de injeção mais elevado proporciona um valor de LOD mais baixo.

Quanto à fase móvel, os solventes mais utilizados são o acetonitrilo, a água e o ácido acético, conjugados a diferentes concentrações. Em algumas situações é necessário um ajuste de pH. No que concerne aos fluxos, estes variam de 0,2 mL/min a 1,5 mL/min no entanto o

mais recorrente é de 1 mL/min (Pena *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Jesus, De *et al.*, 2018; Blesa *et al.*, 2004; Brera *et al.*, 2005; NOBA *et al.*, 2008).

Tratando-se de uma molécula que apresenta fluorescência nativa, a detecção por fluorescência (FD) é a mais utilizada. No que diz respeito aos comprimentos de onda de excitação e emissão, os mais recorrentemente adotados pelos autores são 333 nm e 460 nm, respetivamente (Dall'Asta *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013; Jesus, De *et al.*, 2018; Gentile *et al.*, 2015). Blesa *et al.* (2004) e Brera *et al.* (2005) apresentam também um comprimento de onda de excitação de 333 nm, no entanto o comprimento de onda de emissão é 470 nm. Pena *et al.* (2010), Hocking *et al.* (2003), Domijan e Peraica (2005) e Mikulíková *et al.* (2012) procederam à detecção nos comprimentos de onda de excitação de 383, 385, 336 e 335 nm e de emissão, 440, 437, 464 e 440 nm, respetivamente.

Domijan e Peraica (2005) além da determinação de OTA por LC-FD compararam esta técnica com ELISA. Os kits de teste ELISA apresentam algumas vantagens, nomeadamente o facto de ser um método rápido e de o volume necessário de amostra ser reduzido, sendo sobretudo usado para fazer *screening* das amostras. Este método baseia-se na reação de antígeno-anticorpo e apesar de ser considerado um método confiável e rápido para determinação de OTA em diferentes produtos é dispendioso e não deteta concentrações muito baixas de OTA, além de que se não estiver associada a um método de purificação eficaz os resultados podem ser errados devido aos interferentes da amostra.

Na tabela 8 é apresentado ainda um método que consiste detecção e quantificação por cromatografia líquida com detecção por massa em *tandem* (LC-MS/MS).

**Tabela 9 - Metodologias analíticas para determinação de OTA em vinhos.**

Metodologia analítica	Extração / Purificação	Deteção e Quantificação	LOD	LOQ	Bibliografia
LC-FD Injeção direta	- Amostras filtradas através de filtros de membrana 0,45 µm	- Colunas: C <sub>18</sub> Nucleosil 120KS (30 x 4 mm; 5 µm) e ACT Ace C <sub>18</sub> (250 mm x 4,6 mm) - Fase móvel: ACN/NH <sub>4</sub> Cl/NH <sub>4</sub> OH (15:85) a pH 9,6 - Fluxo= 1 mL/min - λ <sub>Excitação</sub> = 383 nm e λ <sub>Emissão</sub> = 440 nm	-	1 µg/L	(Pena et al., 2010)
	- Amostras filtradas através de filtros de membrana 0,45 µm	- Coluna X-Terra TM C18 Waters (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) - Fase móvel: CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> /NH <sub>3</sub> (15:85) a pH 9,8 - Volume de injeção= 5 µl - λ <sub>exc</sub> = 333 nm e λ <sub>em</sub> =460 nm (fase móvel ácida) e λ <sub>exc</sub> = 380 nm e λ <sub>em</sub> =440 nm (fase móvel alcalina)	0,05 µg/L	-	(Dall'Asta et al., 2004)
LC-FD SPE	- Diluição de 10 mL de amostra de vinho em 10 mL de H <sub>2</sub> O Milli-Q - Lavagem da coluna C18 SPE com 5 mL CH <sub>3</sub> COH e 5 mL de H <sub>2</sub> O Milli-Q - Passar os 20 mL de vinho diluído pela coluna (1 gota/segundo) - Lavar a coluna com 2 mL de H <sub>2</sub> O Milli-Q e 2 mL de CH <sub>3</sub> COH/ H <sub>2</sub> O (60:40) - OTA eluída com 5 mL de CH <sub>3</sub> COH/CH <sub>3</sub> COOH (99,5:0,5) - O eluato é evaporado até à secura sob azoto (45°C) e redissolvido com 500 µl de fase móvel A:B (57:43)	- Coluna em fase reversa Phenomenex Prodigy ODS3 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) - Fase móvel: A – CH <sub>3</sub> COOH/H <sub>2</sub> O (1:99) B – CH <sub>3</sub> COOH/ACN (1:99) - Fluxo= 1 mL/min - Volume de injeção= 10µl - λ <sub>Ex</sub> = 333 nm e λ <sub>Em</sub> = 460 nm	0,03 µg/L	0,10 µg/L	(Zhang et al., 2013)

**Tabela 9** - Metodologias analíticas para determinação de OTA em vinhos (continuação).

Metodologia analítica	Extração / Purificação	Deteção e Quantificação	LOD	LOQ	Bibliografia
SPE LC-FD	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 35 mL de amostra de vinho foi diluída com 50 mL de NaCl aquoso saturado e acidificado com HCl (10M, 5 gotas)</li> <li>- Realizou-se uma extração por 2 minutos com 110 mL de éter dietílico e a fase orgânica resultante foi novamente sujeita a extração por 1 minuto com 40 mL de NaHCO<sub>3</sub> e o pH ajustado para 2 com HCl (10M)</li> <li>- Lavagem da coluna C<sub>18</sub> SPE com 10 mL de metanol, seguidamente com 10 mL de H<sub>2</sub>O/ CH<sub>3</sub>COOH (1%), depois CH<sub>3</sub>COH/ CH<sub>3</sub>COOH (30%) por fim a OTA é eluída com CH<sub>3</sub>COOH/ ACN (10 mL)</li> <li>- O eluato é evaporado à secura (40°C) e redissolvido em ACN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (50:49,5:0,5)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna Ultracarb C<sub>18</sub> (4,6 x 250 mm, 5 µm)</li> <li>- Fase móvel: ACN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH</li> <li>- Fluxo= 1,5 mL/min</li> <li>- <math>\lambda_{Ex}</math> = 385 nm e <math>\lambda_{Em}</math> = 437 nm</li> </ul>	0,02 µg/L	0,05 µg/L	(Hocking et al., 2003)
LLE LC-FD	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Num tubo Eppendorf de 1,5 mL foram adicionados 500 µl de amostra de vinho, 100 µl de padrão e 1 mL de clorofórmio (misturada e deixada a estabilizar)</li> <li>- É pipetada a camada aquosa superior e a camada de clorofórmio é evaporada ao ar</li> <li>- O resíduo é reconstituído com 200 µl de fase móvel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna analítica Sonoma C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)</li> <li>- Fase móvel: H<sub>2</sub>O/ACN/CH<sub>3</sub>COOH (49,5:49,5:1)</li> <li>- Fluxo= 1 mL/min</li> <li>- Volume de injeção: 20 µL</li> <li>- <math>\lambda_{Ex}</math> = 333 nm e <math>\lambda_{Em}</math> = 460 nm</li> </ul>	0,1 µg/L	0,3 µg/L	(Jesus, De et al., 2018)
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 mL de HCl (1M) e 5 mL de CHCl<sub>3</sub> foram adicionados a 5 mL de amostra e agitados durante 20 minutos</li> <li>- Depois de centrifugada a camada orgânica foi recolhida e lavada com 2 mL de bicarbonato (0,1M)</li> <li>- Foram acidificadas com CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e extraídas duas vezes com CHCl<sub>3</sub> (2 ml) depois evaporadas sob corrente de azoto</li> <li>- O resíduo foi redissolvido em 200 µl de bicarbonato (0,1M).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aplicado imediatamente após a dissolução na placa de ELISA</li> </ul>	-	-	(Domijan e Peraica, 2005)



**Tabela 9-** Metodologias analíticas para determinação de OTA em vinhos (continuação).

Metodologia analítica	Extração / Purificação	Deteção e Quantificação	LOD	LOQ	Bibliografia
LC- FD IAC	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 mL de vinho foram diluídos com 10 ml de tampão PBS e o pH foi ajustado com NaOH (10M) para 7,0-7,5 e filtrado com filtro de microfibras</li> <li>- 10 mL da preparação foi colocada na IAC – OchraTest, que foi lavada com 10 mL de tampão PBS e 10 mL H<sub>2</sub>O</li> <li>- A OTA foi eluída da coluna utilizando 4 mL de CH<sub>3</sub>COH/CH<sub>3</sub>COOH (98:2)</li> <li>- O eluato é evaporado à secura com azoto e dissolvido em 200 µl de fase móvel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna analítica (125 x 4 mm) acoplada a uma coluna de guarda (4 x 4 mm) LiChrospher RP-18</li> <li>- Fluxo= 0,5 mL/min</li> <li>- Fase móvel: CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (70:30:2)</li> <li>- λ<sub>EX</sub>= 336 nm e λ<sub>EM</sub>= 464 nm</li> </ul>	0,005 µg/L	-	(Domijan e Peraica, 2005)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 mL de vinho foram diluídos com 10 mL de PBS e agitadas durante 5 minutos</li> <li>- A IAC foi acondicionada com 4 mL de PBS</li> <li>- A amostra diluída foi aplicada à IAC - Ochraprep (1/2 gotas por segundo)</li> <li>- Lavagem com 9 ml de PBS e 8 ml de H<sub>2</sub>O e evaporou ao ar</li> <li>- Eluição da OTA com 2 mL de CH<sub>3</sub>COH, eluato evaporado até 1 mL com corrente suave de azoto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna Kromasil SC-18 (150 mm x 4,6 mm, 5µm)</li> <li>- Fase móvel: ACN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (50:49:1)</li> <li>- Volume de injeção: 150 µL</li> <li>- Fluxo= 1 mL/min</li> <li>- λ<sub>EX</sub>= 333 nm e λ<sub>EM</sub>= 470 nm</li> </ul>	0,01 µg/L	0,05 µg/L	(Blesa <i>et al.</i> , 2004)
LC- FD IAC	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adicionou-se NaOH (2M) a 50 mL de amostra e ajustou-se o pH a 7,2</li> <li>- A amostra foi colocada na IAC (Ochraprep) e lavada com 20 mL de tampão fosfato</li> <li>- A OTA foi eluída com 1,5 mL de CH<sub>3</sub>COH/CH<sub>3</sub>COOH (98:2)</li> <li>- O eluído obtido foi concentrado no vaporizador rotativo a vácuo</li> <li>- O resíduo obtido foi transferido para 1 mL de CH<sub>3</sub>COH/H<sub>2</sub>O (50:50)</li> <li>- A amostra preparada foi filtrada por um microfiltro nylon 0,22 µm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna Waters Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)</li> <li>- Fase móvel: H<sub>2</sub>O com pH ajustado para 2 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>- Fluxo= 0,3 mL/min</li> <li>- Volume de injeção: 10 µL</li> <li>- λ<sub>EX</sub>= 335 nm e λ<sub>EM</sub>= 440 nm</li> </ul>	0,0003 µg/L	0,001 µg/L	(Mikulíková <i>et al.</i> , 2012)

**Tabela 9** - Metodologias analíticas para determinação de OTA em vinhos (continuação).

Metodologia analítica	Extração / Purificação	Deteção e Quantificação	LOD	LOQ	Bibliografia
IAC LC-FD	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 mL de vinho foram diluídos com 60 mL de PBS agitada e filtrada com um filtro de microfibras de vidro</li> <li>- A IAC (Ochraprep) foi acondicionada com 4 mL de PBS</li> <li>- Amostra diluída é aplicada à IAC (20 mL) (1 a 2 gotas por segundo)</li> <li>- Lavagem com 9 mL de PBS e 8 mL de H<sub>2</sub>O e foi seco ao ar</li> <li>- Eluição da OTA com 1,5 mL de CH<sub>3</sub>COH</li> <li>- Eluato foi diluído com 0,5 mL de H<sub>2</sub>O</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna Kromasil KR 100 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm)</li> <li>- Fase móvel: ACN/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (50:49:1)</li> <li>- Fluxo= 1 mL/min</li> <li>- Volume de injeção: 50 μL</li> <li>- λ<sub>Ex</sub>= 333 nm e λ<sub>Em</sub>= 470 nm</li> </ul>	0,01 μg/L	-	(Brera et al., 2005)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 mL de vinho foram adicionados a 10 mL de uma solução em H<sub>2</sub>O destilada com polietileno glicol (PEG) ultrapuro (1%) e NaHCO<sub>3</sub> (5%), foi agitada e filtrada através de um filtro de microfibras de vidro</li> <li>- 10 mL de filtrado foram adicionados à coluna de imunoafinidade OTA-CLEAN™ e eluído a uma taxa de fluxo de cerca de 1 gota/s</li> <li>- A coluna foi lavada com 5 mL de solução de lavagem [NaCl (2,5%) e NaHCO<sub>3</sub> (0,5%) em H<sub>2</sub>O destilada ultrapura] e depois com 5 mL H<sub>2</sub>O purificada a uma taxa de fluxo de 1/2 gotas/s</li> <li>- A coluna foi seca sob uma corrente de azoto</li> <li>- O CH<sub>3</sub>COH (2 mL) foi adicionado para eluir OTA da coluna a uma taxa de fluxo 1/2 gotas/s</li> <li>- O eluato foi evaporado sob fluxo de azoto à temperatura ambiente e o extrato seco foi redissolvido em 250 mL de fase móvel, filtrada através de um filtro de membrana de PTFE de 0,2 μm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna Acquity UPLC® Waters BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7 μm)</li> <li>- Fase móvel: H<sub>2</sub>O/ACN/CH<sub>3</sub>COOH (49:49:2)</li> <li>- Fluxo= 0,6 mL/min</li> <li>- Volume de injeção: 10 μL</li> <li>- λ<sub>Ex</sub>= 333 nm e λ<sub>Em</sub>= 460 nm</li> </ul>	0,01 μg/L	0,04 μg/L	(Gentile et al., 2015)

**Tabela 9** - Metodologias analíticas para determinação de OTA em vinhos (continuação).

Metodologia analítica	Extração / Purificação	Deteção e Quantificação	LOD	LOQ	Bibliografia
IAC LC-MS/MS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diluição de 20 mL de amostra com 20 mL de H<sub>2</sub>O com polietilenoglicol (1%) e hidrogenocarboneto de sódio (5%) e filtração</li> <li>- A amostra foi colocada na IAC (OchraTest) e lavada com 6 mL de solução aquosa com cloreto de sódio (2,5%) e hidrogenocarboneto de sódio (0,5%)</li> <li>- Lavagem da coluna com 6 mL de solução aquosa de acetato de amónio (10mM) e seca ao ar</li> <li>- A OTA foi eluída com 3 mL de CH<sub>3</sub>COH/CH<sub>3</sub>COOH (98:2), o eluído foi evaporado até à secura sob azoto 40 °C e dissolvido com 1 mL de H<sub>2</sub>O/ACN/CH<sub>3</sub>COOH (70:30:1)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna XBridge C18 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm) e Coluna de guarda XBridge C18 (10 x 2,1 mm, 3,5 µm)</li> <li>- Fluxo= 0,2 mL/min</li> <li>- Volume de injeção: 10 µL</li> </ul>	0.0003 µg/L	0.001 µg/L	(NOBA et al., 2008)

## **PARTE II – PARTE EXPERIMENTAL**



## **2.1. Materiais e métodos**

### **2.1.1. Objetivo**

A elaboração deste estudo, que decorreu na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra teve como principal objetivo a pesquisa da micotoxina, OTA em diferentes amostras de vinhos (vinhos tintos, brancos, rosés, espumantes e verdes). Mas também a avaliação da exposição humana a esta, de forma a perceber se existe risco aquando do consumo desta bebida.

### **2.1.2. Amostragem**

Foram analisadas 100 amostras de vinhos diferentes, que incluíam vinhos brancos, tintos, espumantes, verdes e rosés, destes alguns eram comerciais e outros caseiros (Anexo 1). Das 100 amostras de vinho recolhidas 30 eram de vinhos brancos (20 comerciais e 10 caseiros), 59 de vinhos tintos (41 de marcas comerciais e 18 caseiros), 3 rosés (2 de marcas comerciais e 1 caseiro), 6 vinhos espumantes (5 comerciais e 1 caseiro) e 2 vinhos verdes (comerciais).

A colheita das amostras foi realizada em Portugal continental, abrangendo um grande número de regiões. Na região de Setúbal foram colhidas 8 amostras (6 vinhos tintos e 2 brancos comerciais), em Viana do Castelo 11 amostras (2 de vinhos brancos caseiros, 8 brancos e 1 vinho verde comercial), da Bairrada foram analisados 8 vinhos (4 tintos, 1 branco, 2 rosés e 1 espumante comerciais), na região de Santarém 2 vinhos (1 tinto e 1 branco comercial), 12 vinhos alentejanos (9 tintos e 3 brancos comerciais), a grande maioria das amostras recolhidas é da zona centro, com 23 amostras (12 tintos e 5 brancos caseiros, 3 tintos e 1 branco comercial e 2 espumantes um caseiro e outro de marca comercial), 8 amostras provenientes do Douro (5 tintos, 2 brancos e 1 espumante comerciais), de Lamego 11 amostras (6 tintos, 3 brancos e 1 rosé caseiros e 1 tinto comercial), da região do Dão 6 amostras (tinto comercial), 2 de Lisboa (tinto comercial) e 1 de Penafiel (verde comercial). Foram ainda analisados 4 vinhos provenientes de Espanha (2 tintos, 1 branco e 1 espumante comercial) e 4 vinhos italianos (2 tintos, 1 branco e 1 espumante comercial).

Quanto aos anos de produção dos vinhos, os tintos caseiros eram de 2016 e 2017, já os comerciais foram produzidos entre 2003 e 2016, com exceção de 2, com produção em 1984

e 1994. Os vinhos brancos, verdes, rosés e espumantes caseiros analisados resultaram de produções de 2015 a 2017. Vinhos brancos comerciais de 2012 a 2017 e os verdes, rosés e espumantes em 2016.

A colheita de amostras e a análise das mesmas ocorreram entre setembro de 2017 e janeiro de 2018. No decorrer deste processo as amostras foram devidamente identificadas, com o nome do vinho, proveniência e também com o ano de produção. Ao chegarem ao laboratório as amostras conservaram-se no frio até ao momento da análise.

### **2.1.3. Reagentes e materiais**

Na realização deste estudo foi utilizado o padrão de OTA, os reagentes foram o acetonitrilo obtido a partir da Sigma Aldrich (Rehovot, Israel), o ácido acético glacial da marca Fisher Chemical e o metanol (grau de pureza  $\geq 99,9\%$ , Chromasolv, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). A água bidestilada foi obtida a partir do sistema de filtração Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

A filtração das amostras de vinho foi realizada com o auxílio de filtros de membrana de poro 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius Polyamid) e 0,22  $\mu\text{m}$  (Tracer – membrane filters), relativamente à filtração dos solventes da fase móvel foi utilizado papel de filtro de nitrato de celulose 0,45  $\mu\text{m}$ , (Sartorius biolab Products).

Foi utilizada uma bomba de vácuo (modelo Vacuum pump v-700) e um banho ultra-sons Bandelin Sonorex.

### **2.1.4. Soluções**

A fase móvel consistiu numa solução de ACN:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (49,5:49,5:1, v:v) filtrada a vácuo e degaseificação no banho de ultra-sons.

A solução stock do padrão de OTA foi preparada a 250  $\mu\text{g/mL}$ , por diluição com tolueno/ácido acético (49,5:0,5, v:v).

A solução intermédia foi preparada por diluição da solução padrão a 10  $\mu\text{g/mL}$  com fase móvel. As soluções de trabalho foram preparadas entre 0,24 e 4  $\text{ng/mL}$  em fase móvel, por diluição da solução intermédia.

As soluções padrão para a curva de calibração em fase móvel foram preparados entre 0,24 e 4 ng/mL (0.24, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 ng/mL).

A curva de calibração em matriz, vinho branco, foi preparada entre 0,24 e 4 µg/L (0.24, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 e 4.0 µg/L). Relativamente à curva de calibração em matriz vinho tinto as concentrações estudadas variaram de 0,24 a 6 µg/L (0.24, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 e 6.0 µg/L).

### **2.1.5. Equipamentos**

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FD) constituído por uma bomba Gilson, um injetor com loop de 50 µL da Gilson (Villiers le Bel, France), um detetor de fluorescência Jasco FP-2020 plus inteligente (Villiers le Bel, France), utilizado a um comprimento de onda de excitação de 336 nm e de emissão de 440 nm, e pelo *software* para aquisição e tratamento de dados. O equipamento estava ainda munido com uma coluna cromatográfica C18 Nucleosil 5 µm (4,6 x 250 mm).

## **2.2. Procedimento experimental**

### **2.2.1. Preparação da amostra**

Numa grande quantidade de estudos são utilizados vários métodos no que diz respeito à purificação e concentração das amostras, como as colunas de imunoafinidade que têm sido cada vez mais frequentemente descritas, como apresentado na tabela 8. No entanto, tal como Pena *et al.* (2010) e Dall'Asta *et al.* (2004) neste estudo o processo de extração foi bastante simplificado tendo como objetivo a utilização de métodos rápidos e menos dispendiosos. Assim sendo, para a preparação das amostras apenas se recorreu a processos de filtração através de filtros de poro 0,45 µm (Sartolon Polyamid) e 0,22 µm (Tracer – membrane filters), por forma a eliminar interferentes. Assim, depois de filtrada a amostra foi diretamente injetada no sistema cromatográfico, com um volume de injeção de 50 µl.



### **2.2.2. Detecção e quantificação**

O método utilizado para deteção e quantificação de OTA foi HPLC-FD, este é considerado um dos métodos mais utilizados e precisos. No que diz respeito aos comprimentos de onda de excitação e emissão foi utilizado 333 e 460 nm, respetivamente, tal como na grande maioria dos estudos referidos na tabela 8 (Dall'Asta *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013; Jesus, De *et al.*, 2018; Gentile *et al.*, 2015).

A fase móvel eleita, ACN:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (49.5:49.5:1, v:v:v), filtrada através de um papel de filtro de nitrato de celulose 0,45 µm (Sartorius biolab Products) e desgaseificada, foi mantida a um fluxo de 1 mL/min tal como a nos estudos apresentados por Pena *et al.* (2010), Zhang *et al.* (2013), Jesus, De *et al.* (2018), Blesa *et al.* (2004) e Brera *et al.* (2005).

A OTA foi quantificada pelo método de padrão externo, apresentando um tempo de retenção médio de 12 minutos ± 0,1.

### **2.2.3. Validação da metodologia analítica**

Para a implementação de qualquer método analítico é essencial a sua validação, pois é através desta que se pode assegurar a aplicabilidade e fiabilidade do mesmo. Para a validação deste método avaliou-se a linearidade, limite de deteção e limite de quantificação, exatidão e precisão.

#### **2.2.3.1. Linearidade**

A linearidade evidencia a proporcionalidade entre os resultados obtidos nos cromatogramas (áreas) e as concentrações de substância em análise nas amostras. A curva de calibração foi obtida usando um processo de regressão linear dos mínimos quadrados da área do pico em função da concentração.

Neste estudo a linearidade foi avaliada em solvente (fase móvel) e em matriz. Em solvente, o intervalo avaliado variou entre 0,24 ng/mL e 4,0 ng/mL. Em matriz os intervalos avaliados variaram entre 0,24 µg/L e 4,0 µg/L e entre 0,24 µg/L e 6,0 µg/L em vinho branco e em vinho, respetivamente.

### **2.2.3.2. Ensaios de fortificação**

Neste método a exatidão foi verificada com recurso a ensaios de recuperação de OTA. Assim, foi necessária uma amostra livre de OTA para que fosse possível adicionar uma quantidade conhecida deste composto e perceber qual a quantidade que era recuperada. Esta avaliação foi feita através das percentagens de recuperação para os diferentes níveis de fortificação escolhidos. Os níveis de fortificação utilizados para o vinho branco foram 0,5, 1 e 2 µg/L e para o vinho tinto 1, 2 e 3 µg/L.

A precisão do método analítico é avaliada através da repetibilidade intra e inter-dia. A repetibilidade intra-dia consistiu na avaliação de uma amostra fortificada a três níveis distintos, em triplicado, num mesmo dia. A repetibilidade inter-dia foi avaliada repetindo o mesmo procedimento em 3 dias diferentes.

### **2.2.3.3. Limites de deteção e de quantificação**

O valor da menor concentração da substância que se pode detetar é denominado limite de deteção (LOD). O limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração de analito que se pode quantificar na amostra com um nível de exatidão e precisão aceitáveis. O LOQ e o LOD foram calculados, para o vinho branco e para o vinho tinto, através das curvas de calibração em matriz com  $|3,3S_{y/x}|/b$  e  $|10S_{y/x}|/b$ , respetivamente, onde  $b$  corresponde ao declive e  $S_{y/x}$  corresponde ao desvio padrão residual da função linear.

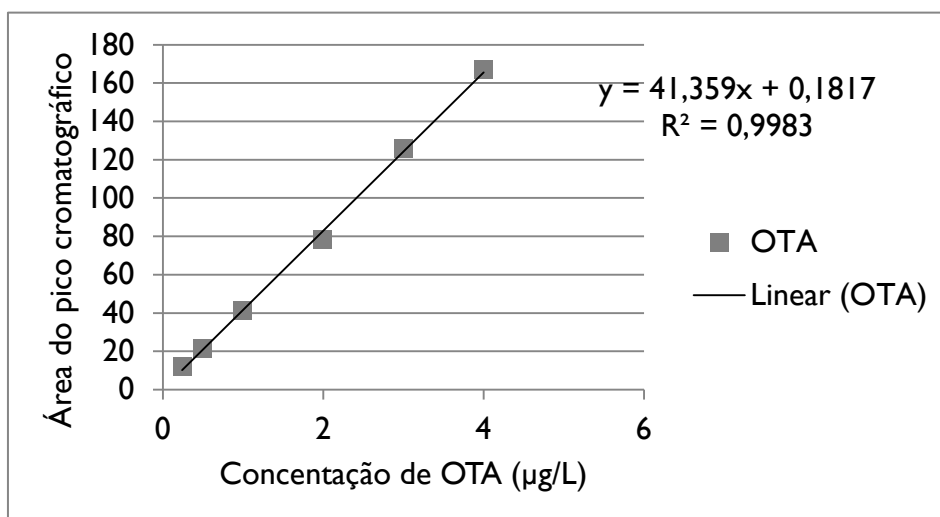
### **2.2.3.4. Confirmação**

Para a confirmação dos resultados das amostras procedeu-se ao método de adição de padrão, que consiste na adição de uma quantidade conhecida de padrão ao extrato da amostra e posterior análise cromatográfica.

## 2.3. Resultados e discussão

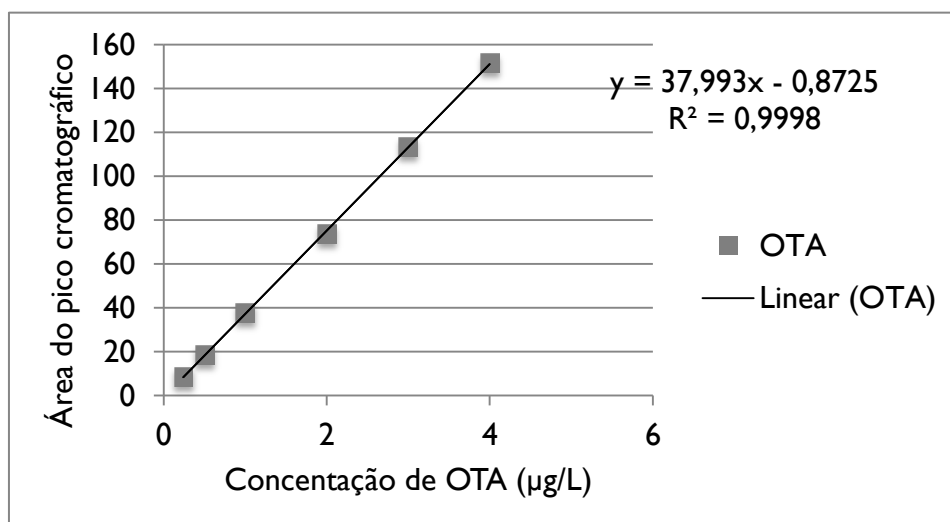
### 2.3.1. Validação da metodologia analítica

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido foi 0,9983, assim sendo, o método apresenta linearidade adequada uma vez que este valor está próximo da unidade (Figura 9).

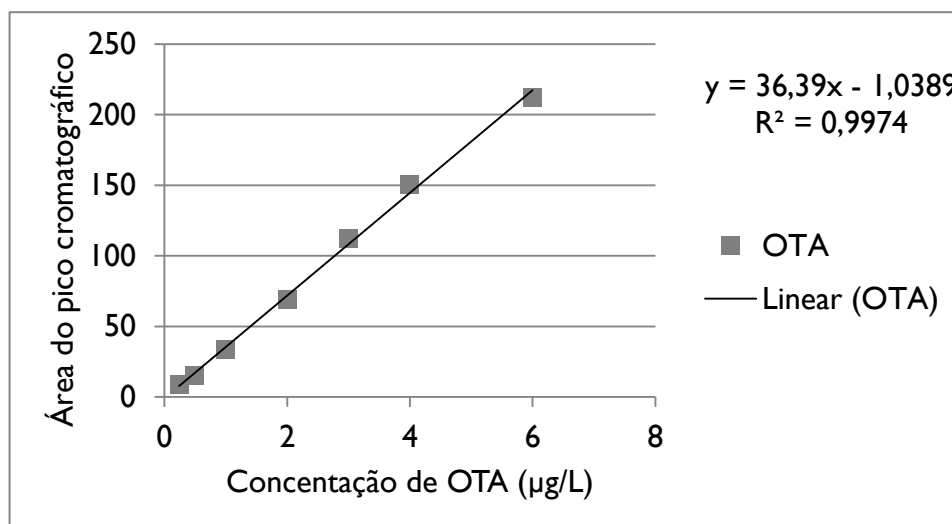


**Figura 9** - Curva de calibração da OTA em fase móvel.

Quanto às curvas de calibração em matriz, foram elaboradas duas, uma através em vinho branco e outra em vinho tinto. As concentrações em vinho branco estavam compreendidas entre 0,24 e 4 µg/L e em vinho tinto entre 0,24 e 6 µg/L, como representado nas figuras 10 e 11, respetivamente.



**Figura 10** - Curva de calibração em vinho branco.



**Figura 11** - Curva de calibração em vinho tinto.

Os valores obtidos pelo coeficiente de correlação ( $R^2$ ) mostram que ambas as curvas de calibração em matriz apresentam um resultado de linearidade adequado, sendo este coeficiente para a matriz branca e tinta, 0,9998 e 0,9974, respectivamente.

No que diz respeito aos limites de detecção e quantificação, estes foram calculados com o auxílio da curva de calibração na matriz como anteriormente referido.

O LOD para a matriz de vinho branco apresentou um valor de 0,0757 µg/L e o LOQ obtido foi de 0,2293 µg/L. Relativamente à matriz de vinho tinto o LOD e LOQ obtidos foram 0,3884 e 1,1769 µg/L, respectivamente. Os valores encontrados para ambos os limites são considerados satisfatórios tendo em conta a matriz em análise, uma vez que os valores encontrados em outros estudos são da mesma ordem de grandeza.

A razão entre a quantidade de substância adicionada em função da quantidade de substância recuperadas dá-nos o valor da recuperação, expressa em percentagem, que nos permite avaliar a exatidão do método. Esta exatidão foi avaliada a partir da análise de OTA numa amostra de vinho branco e tinto fortificados a três níveis de recuperação diferentes e com três replicados cada. Para o vinho branco os níveis de fortificação utilizados foram 0,5, 1 e 2 µg/L e as percentagens de recuperação médias obtidas foram respectivamente, 93,77, 94,24 e 99,62%. Para o vinho tinto as fortificações utilizadas foram 1, 2 e 3 µg/L com as seguintes percentagens de recuperação 92,66, 98,57 e 91,93%.

A precisão foi avaliada através da repetibilidade intra-dia e inter-dia. Os valores da repetibilidade intra-dia para a matriz vinho branco correspondem a 2,06, 1,20 e 0,70%. Já Os

valores obtidos na repetibilidade inter-dia foram 6,956, 1,533 e 2,270% para 0,5, 1 e 2 µg/L, respetivamente.

Para a matriz de vinho tinto os valores de repetibilidade intra-dia foram 0,542, 1,367 e 0,634%, que correspondem respetivamente às fortificações de 1, 2 e 3 µg/L. Para a repetibilidade inter-dia 5,286% corresponde à fortificação a 1 µg/L, 3,675% a uma fortificação de 2 µg/L e 2,512% a 3 µg/L, como se pode observar na tabela 9.

De acordo com a diretiva CE 401/2006 (Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro, 2006) os valores encontrados para a exatidão e para a precisão foram adequados.

**Tabela 10** - Exatidão e precisão da metodologia analítica para a determinação de OTA em vinhos.

<b>Vinho branco</b>			
<b>Fortificação (µg/L)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>Repetibilidade intra-dia (% RSD)</b>	<b>Repetibilidade inter-dia (% RSD)</b>
<b>0,5</b>	93,77	2,06	6,956
<b>1,0</b>	94,24	1,20	1,533
<b>2,0</b>	99,62	0,70	2,270
<b>Vinho tinto</b>			
<b>Fortificação (µg/L)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>Repetibilidade intra-dia (% RSD)</b>	<b>Repetibilidade inter-dia (% RSD)</b>
<b>1,0</b>	92,66	0,542	5,286
<b>2,0</b>	98,57	1,367	3,675
<b>3,0</b>	91,93	0,634	2,512

### **2.3.2. Ocorrência de OTA em vinhos**

No presente estudo, diversas amostras de vinho recolhidas em Portugal foram analisadas por forma a detetar e quantificar OTA nas mesmas. Foram analisadas 100 amostras de vinhos consoante as condições descritas anteriormente. No entanto nenhuma destas amostras apresentava contaminação por OTA. Apenas em 5 das 100 amostras foi possível detetar esta micotoxina, mas não foi possível quantificar este valor.

Das 5 amostras onde se detetou a presença de OTA 4 destas eram de vinho tinto, duas delas resultantes de produção caseira ambas produzidas na região centro (Coimbra), uma delas do ano de 2016 (amostras n° 53 e 63 – Anexo I). As outras duas de marcas comerciais

uma delas produzida na região de Roccella Jonica, no sul de Itália no ano de 2015 (amostra nº 22 – Anexo I) e o outro foi produzido em Lisboa em 2016 (amostra nº 31 – Anexo I). A amostra de vinho branco onde se detetou OTA também pertencia à região de Roccella Jonica, produzido em 2016 (amostra nº 5 – Anexo I).

**Tabela II** - Frequência de OTA nas amostras de vinho.

Tipos de vinhos		Número de amostras	Frequência de deteção	Teor de contaminação (µg/L)
Vinho tinto	Caseiro	18	2/18	<LOQ
	Comercial	41	2/41	<LOQ
Vinho branco	Caseiro	10	0/10	ND
	Comercial	20	1/20	<LOQ
Vinho Verde, Rosé, Espumante	Caseiro	2	0/2	ND
	Comercial	9	0/9	ND
Total		100	5	

LOD, limite de deteção (vinho branco - 0,0757 µg/L e vinho tinto - 0,3884 µg/L).

LOQ, limite de quantificação (vinho branco - 0,2293 µg/L e vinho tinto - 1,1769 µg/L).

De acordo com os resultados, de entre os estudos apresentados anteriormente na tabela 6, os teores de contaminação mais elevados pertencem, como seria de prever, aos vinhos tintos (Blesa *et al.*, 2004; Remiro *et al.*, 2012; Domijan e Peraica, 2005; Gentile *et al.*, 2015; Brera *et al.*, 2005; Var e Kabak, 2007; Soufleros, Tricard e Bouloumpasi, 2003; Zhang *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2013).

A pesquisa de OTA em vinhos tem sido cada vez mais relatada, dentro e fora de Portugal. Comparando os resultados do presente estudo com os obtidos por Pena *et al.*, (2010), os resultados são bastantes diferentes. De acordo com Pena *et al.*, (2010), que usou uma metodologia de análise semelhante, 12 das 60 amostras analisadas estavam contaminadas e uma delas com valores superiores ao limite legal. Também no nosso país, Abrunhosa *et al.* (2016) analisou 612 vinhos e apenas 20% apresentavam contaminação por OTA com teores compreendido entre 0,002 e 2,4 µg/L, onde apenas duas amostras ultrapassaram os 2,0 µg/L permitidos por lei.

Comparando com estudos realizados noutros países, Brera *et al.* (2005) analisou vinhos provenientes da Hungria e de Itália e constatou que nenhum dos vinhos húngaros estava

contaminado, no entanto dos vinhos italianos a frequência de contaminação foi superior a 25% e o teor máximo de OTA encontrado foi de 4 µg/L.

Na Grécia, foram encontrados vinhos com teores de 2,51 µg/L (Soufleros, Tricard e Bouloumpasi, 2003), nos USA o limite máximo encontrado foi de 2,1 µg/L (Jesus, De et al., 2018) e o maior teor encontrado foi de 5,65 µg/L na China (Zhang et al., 2013).

### **2.3.3. Avaliação da exposição**

A ingestão diária de OTA pelo consumo de vinho foi calculada pela seguinte fórmula:

$$EDI = (\sum cxC) / (N \times D \times K)$$

Os valores foram usados com base nas contaminações encontradas no presente estudo, no consumo de vinho pela população portuguesa (50,9 L/habitante), no número de amostras contaminadas, no número de dias do ano e ainda no peso corporal dos adultos em Portugal (69 kg). Relativamente à contaminação das amostras considerou-se, para este efeito, metade do valor do LOQ. Deste modo, os valores obtidos para o vinho tinto e para o vinho branco foram de 0,0119 e 0,0023 ng/Kg p.c./dia.

Para a avaliação do risco foi utilizado o valor mais recente estabelecido pela EFSA, em 2006, para uma ingestão semanal tolerável (TWI) de 120 ng/kg p.c./semana. A percentagem de ingestão semanal estimada (EWI) face à TWI foi de 0,014% para o vinho branco e 0,069% para o vinho tinto, pelo que se observa que a ingestão de OTA através do consumo de vinho não apresenta risco para os consumidores.

## CONCLUSÃO

A importância dada aos fungos e à produção de micotoxinas tem sido cada vez maior, nomeadamente no que toca à OTA em vinhos, uma vez que é um dos alimentos mais contaminados por esta micotoxina. Assim, os estudos realizados neste sentido têm crescido exponencialmente em todo o mundo.

Neste estudo foi utilizada a filtração de forma a limpar a amostra de possíveis interferentes sendo de seguida diretamente injetada no sistema de cromatografia, e para detetar e quantificar a OTA presente nas amostras recorreu-se a um sistema HPLC com deteção por fluorescência, uma vez que a OTA apresenta fluorescência nativa.

Das 100 amostras recolhidas de vinhos tintos, brancos, verdes, rosés e espumantes, umas eram de marcas comerciais e outras resultaram de produções caseiras. Nenhuma apresentou contaminação, no entanto, em 5 amostras foi possível detetar esta micotoxina. Uma amostra era de vinho branco e as restantes 4 de vinho tinto, como seria de esperar, uma vez que na produção de vinho tinto as películas estão mais tempo em contacto com o mosto-vinho é mais provável a transferência da OTA nestes.

Relativamente à avaliação da exposição humana à OTA através da ingestão de vinho foi possível concluir que este não apresenta risco para quem o consome, uma vez que a ingestão semanal estimada (EWI) é bastante reduzida em comparação com o limite semanal tolerável estabelecido.

Em conclusão, o método utilizado é bastante vantajoso uma vez que é bastante rápido, económico, eficiente e seguro. Apesar de neste estudo os resultados terem sido negativos em muitos estudos descritos esta micotoxina é encontrada no vinho, então é essencial para a segurança alimentar e dos consumidores a continuidade desta investigação.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Priscilla Silva D. E.; OCRATOXINA, Incidência D. E.; VINHOS, A. E. M. - E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DOS. 2013).

ABRUNHOSA, Luís *et al.* - A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. .ISSN 15497852. 56:2 (2016) 249–265. doi: 10.1080/10408398.2012.720619.

AMÉZQUETA, Susana *et al.* - Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control*. ISSN 09567135. 20:4 (2009) 326–333. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.05.017.

ANA, P. *et al.* - Occurrence of ochratoxin A in wines in the Argentinian and Chilean markets. *Arkivoc*. ISSN 14246376. 2005:xii (2005) 214–223.

Andrade, I., Guilherme, R., Páscoa, J., Leme, J., Malheiro, P., Alves, F., *et al.* (2006). *A Vinha e o Vinho em Portugal*. Syngenta CropnProtection, LDA.

ANLI, Ertan; BAYRAM, Mustafa - Ochratoxin A in Wines. *Food Reviews International*. ISSN 87559129. 25:3 (2009) 214–232. doi: 10.1080/87559120902956182.

BAKKER, M. *et al.* - Risk Assessment of Ochratoxin A in the Netherlands. RIVM report 388802025/2002. 2002) 1–24.

BATUMAN, V. - Fifty years of Balkan endemic nephropathy: Daunting questions, elusive answers. *Kidney International*. ISSN 00852538. 69:4 (2006) 644–646. doi: 10.1038/sj.ki.5000231.

BAYMAN, Paul; BAKER, James L. - Ochratoxins: A global perspective. *Mycopathologia*. . ISSN 0301486X. 162:3 (2006) 215–223. doi: 10.1007/s11046-006-0055-4.

BELAJOVÁ, Elena; RAUOVÁ, Drahomíra - Determination of ochratoxin A and Its occurrence in wines of Slovakian retail. *Journal of Food and Nutrition Research*. .ISSN 13368672. 46:2 (2007) 68–74.

BELLVER SOTO, Julia *et al.* - Presence of ochratoxin a (OTA) mycotoxin in alcoholic drinks from southern european countries: Wine and beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. . ISSN 15205118. 62:31 (2014) 7643–7651. doi: 10.1021/jf501737h.

BENITES, Ana Júlia *et al.* - Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples

commercialized in Portugal. *Food Control*. . ISSN 09567135. 73:2017) 1223–1228. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.10.037.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. - Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*. . ISSN 0893-8512. 16:3 (2003) 497–516. doi: 10.1128/CMR.16.3.497.

BLESA, J. *et al.* - Concentration of ochratoxin a in wines from supermarkets and stores of Valencian Community (Spain). *Journal of Chromatography A*. . ISSN 00219673. 1054:1–2 (2004) 397–401. doi: 10.1016/j.chroma.2004.04.058.

BRERA, C. *et al.* - Exposure assessment to ochratoxin A from the consumption of Italian and Hungarian wines. *Microchemical Journal*. . ISSN 0026265X. 79:1–2 (2005) 109–113. doi: 10.1016/j.microc.2004.10.004.

CABAÑES, F. J. *et al.* - What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*. . ISSN 01681605. 79:3 (2002) 213–215. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00087-9.

CARDEIRA, Rui Filipe Ferreira - *Factores Críticos de Sucesso no Mercado do Vinho em Portugal e a Sustentabilidade do Sector Vitivinícola*. 2009).

CE, Comissão Europeia - Regulamento (UE) N.º 105/2010 da Comissão, de 5 de fevereiro de 2010. 2010:10 (2010) 5–6.

Chemical Composition - [Em linha], atual. 2018. [Consult. 23 fev. 2018]. Disponível em <http://www.wineskills.co.uk/winemaking/winemaking-knowledge-base/chemical-composition>

Chemical Properties - [Em linha], atual. 2015. [Consult. 31 jan. 2018]. Disponível em [https://tools.niehs.nih.gov/cebs3/ntpviews/index.cfm?action=testarticle.properties&cas\\_number=303-47-9](https://tools.niehs.nih.gov/cebs3/ntpviews/index.cfm?action=testarticle.properties&cas_number=303-47-9)

DALL’ASTA, C. *et al.* - Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine. *Journal of Chromatography A*. . ISSN 00219673. 1024:1–2 (2004) 275–279. doi: 10.1016/j.chroma.2003.10.025.

DOHNAL, Vlastimil; PAVLÍKOVÁ, Lucie; KUČA, Kamil - The pH and mobile phase composition effects ochratoxin a fluorescence at liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. . ISSN 00219665. 48:9 (2010) 766–770. doi: 10.1093/chromsci/48.9.766.

DOMIJAN, Ana-Marija; PERAICA, Maja - Ochratoxin A in wine. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. . ISSN 00041254. 56:1 (2005) 17–20.

DUARTE, S. C. *et al.* - Ochratoxin A exposure assessment of the inhabitants of Lisbon during winter 2007/2008 through bread and urine analysis. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. . ISSN 19440049. 26:10 (2009) 1411–1420. doi: 10.1080/02652030903107914.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. - Ochratoxin A non-conventional exposure sources - A review. *Microchemical Journal*. . ISSN 0026265X. 93:2 (2009) 115–120. doi: 10.1016/j.microc.2009.06.002.

EFSA - Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain related to ochratoxin A in food. *EFSA Journal*. . ISSN 18314732. 4:6 (2006) 365. doi: 10.2903/j.efsa.2006.365.

ESCRIVÁ, Laura *et al.* - Studies on the presence of mycotoxins in biological samples: An overview. *Toxins*. . ISSN 20726651. 9:8 (2017). doi: 10.3390/toxins9080251.

FAO - Fao Food and Nutrition Paper Management and. ISBN 9251004897.

FIA, Giovanna *et al.* - A Naturally Occurring Antioxidant Complex from Unripe Grapes: The Case of Sangiovese (*v. Vitis vinifera*). *Antioxidants*. . ISSN 2076-3921. 7:2 (2018) 27. doi: 10.3390/antiox7020027.

GENTILE, Fausto *et al.* - Organic wine safety: UPLC-FLD determination of Ochratoxin A in Southern Italy wines from organic farming and winemaking. *Food Control*. . ISSN 09567135. 59:2015) 20–26. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.05.006.

GOVERNMENT OF HONG KONG - Ochratoxin A in Food. *Risk Assessment Studies*, Report No. 23. 23 (2006) 1–36.

GUILFORD, Jacquelyn M.; PEZZUTO, John M. - Wine and health: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*. . ISSN 00029254. 62:4 (2011) 471–486. doi: 10.5344/ajev.2011.11013.

HEALTH, Directorate-general; PROTECTION, Consumer - Reports on tasks for scientific cooperation Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States. January (2002) 1–153.

HOCKING, Ailsa D. *et al.* - Occurrence of ochratoxin A in Australian wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. . ISSN 13227130. 9:1 (2003) 72–78. doi: 10.1111/j.1755-0238.2003.tb00234.x.

International Organisation of Vine and Wine - [Em linha] [Consult. 3 abr. 2018]. Disponível em: <http://www.oiv.int/en/>

IVV // A Vinha e o Vinho em Portugal - [Em linha], atual. 2016. [Consult. 7 fev. 2018]. Disponível em: <http://www.ivv.gov.pt/np4/47/>

JESUS, Christopher Lawrence DE *et al.* - High incidence and levels of ochratoxin A in wines sourced from the United States. *Toxins*. . ISSN 20726651. 10:1 (2018) 1–12. doi: 10.3390/toxins10010001.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. - Safety evaluation of certain mycotoxins in food. *FAO food and nutrition paper*. ISSN 0300-0923. 74(2001) 700 p.

JULIA, Frederic - *Agribusiness Handbook: Wine Sector*. 2007) 37.

KHOURY, André E. EL; ATOUI, Ali - Ochratoxin a: General overview and actual molecular status. *Toxins*. . ISSN 20726651. 2:4 (2010) 461–493. doi: 10.3390/toxins2040461.

LANÇAS, Fernando M.; PAULO, Universidade De São - Estado-da-arte na análise cromatográfica de Ocratoxina A em amostras de alimentos. *Scientia Chromatographica*. . ISSN 19844433. 7:1 (2015) 31–52. doi: 10.4322/sc.2015.015.

MANIQUE, CE *et al.* - Ochratoxin A in the morning and afternoon portions of urine from Coimbra and Valencian populations. *Toxicon*. . ISSN 00410101. 51:7 (2008) 1281–1287. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.02.014.

MAO, Jianfei *et al.* - Quantification of ochratoxin A in red wines by conventional HPLC-FLD using a column packed with core-shell particles. *Food Control*. . ISSN 09567135. 32:2 (2013) 505–511. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.01.016.

MARIN, Daniela Eliza; TABUC, Cristina; BURGEHELEA, Monica - Ochratoxin: nature , origin , metabolism and toxic effects in pigs. 2009) 5–17.

MATEO, Rufino *et al.* - An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*. . ISSN 01681605. 119:1–2 (2007) 79–83. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.029.

MENDES, Maria Manuel *et al.* - Riscos e Alimentos Alimentação e Gravidez. Riscos e Alimentos. 10:2015).

MIKULÍKOVÁ, Renata *et al.* - Study of ochratoxin A content in South Moravian and foreign wines by the UPLC method with fluorescence detection. Food Chemistry. . ISSN 03088146. 133:1 (2012) 55–59. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.12.061.

MORAES, V. De; LOCATELLI, C. - Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. Evidência. . ISSN 2236-6059. 10:2010) 57–68.

MURPHY, Patricia A. *et al.* - Food mycotoxins: An update. Journal of Food Science. . ISSN 00221147. 71:5 (2006). doi: 10.1111/j.1750-3841.2006.00052.x.

N., Magan; M., Olsen - Mycotoxins in food. England : Woodhead Publishing in food Science and Technology, 2004. ISBN 0849325579.

NOBA, SHIGEKUNI *et al.* - Determination of Ochratoxin A in Wine by Immunoaffinity Cleanup and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Journal of Food Protection. . ISSN 0362-028X. 71:5 (2008) 1038–1042. doi: 10.4315/0362-028X-71.5.1038.

NOGUEIRA, Sofia; OLIVEIRA, M. B. P. P. - Ochratoxin A prevalence in food and consequent food safety problems (in Portuguese). Revista da Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação. 12:2 (2006) 69–75.

OLIVARES-MARÍN, M. *et al.* - The development of an activated carbon from cherry stones and its use in the removal of ochratoxin A from red wine. Food Control. . ISSN 09567135. 20:3 (2009) 298–303. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.05.008.

PENA, A. *et al.* - Ochratoxin A survey in Portuguese wine by LC-FD with direct injection. Talanta. . ISSN 00399140. 82:4 (2010) 1556–1561. doi: 10.1016/j.talanta.2010.07.041.

PETRICA, Ana Lúcia De Andrade Patrício; DUARTE, Dr.José Carlos Miguéis Nunes; LIMA, Dr.Miguel Luís Mendes Saraiva - Ataxia em poldros derivada da ingestão de Paspalum. 2010).

PFOHL-LESZKOWICZ, Annie - Ochratoxin A and Aristolochic Acid Involvement in Nephropathies and Associated Urothelial Tract Tumours. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. . ISSN 0004-1254. 60:4 (2009) 465–483. doi: 10.2478/10004-1254-60-2009-2000.

PFOHL-LESZKOWICZ, Annie; MANDERVILLE, Richard A. - Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. Molecular Nutrition and Food Research. .

ISSN 16134125. 51:1 (2007) 61–99. doi: 10.1002/mnfr.200600137.

Portal do Instituto Nacional de Estatística - [Em linha], atual. 2018. [Consult. 25 mai. 2018]. Disponível em: [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0000177&contexto=bd&selTab=tab2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000177&contexto=bd&selTab=tab2)

RAMOS, André; FERREIRA, Cristel; LOPES, Daniela - História - Ocratoxina A [Em linha], atual. 2010. [Consult. 10 jan. 2018]. Disponível em <https://sites.google.com/site/ocratoxinaa/historia>

Regulamento (Ce) N. 466 - 42:2001).

REGULAMENTO (CE) Nº 401/2006 DA COMISSÃO DE 23 DE FEVEREIRO - Métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia. L70:2006) 12–34.

REMIRO, Rebeca *et al.* - Quantification of ochratoxin A and five analogs in Navarra red wines. Food Control. . ISSN 09567135. 27:1 (2012) 139–145. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.03.006.

RINGOT, Diana *et al.* - Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. Chemico-Biological Interactions. . ISSN 00092797. 159:1 (2006) 18–46. doi: 10.1016/j.cbi.2005.10.106.

SILVA, Daiani Maria Da - Fungos Filamentosos E Micotoxinas Regiões Sudeste E Nordeste Do Brasil Lavras – Mg. Tese. 2013).

SIMÕES, Orlando - Enoturismo em Portugal : as Rotas de Vinho. Pasos, Revista de Turismo y Patrimonio Cultural. . ISSN 1695-7121. 6:Special Issue (2008) 269–279. doi: 10.25145/j.pasos.2008.06.020.

SOGRAPE-VINHOS DE PORTUGAL - Vinificação de Brancos - Guia do Vinho - Enciclopédia Vinhas & Vinhos - Sogrape Vinhos [Em linha], atual. 2018. [Consult. 30 mai. 2018]. Disponível em [https://www.sograpevinhos.com/enciclopedia/guia\\_vinho/vinificacao/brancos](https://www.sograpevinhos.com/enciclopedia/guia_vinho/vinificacao/brancos)

SOUFLEROS, Evangelos H.; TRICARD, Christian; BOULOUMPASI, Elisavet C. - Occurrence of ochratoxin A in Greek wines. Journal of the Science of Food and Agriculture. . ISSN 00225142. 83:3 (2003) 173–179. doi: 10.1002/jsfa.1300.

TAO, Yanfei *et al.* - Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*. . ISSN 18736351. 112:January (2018) 320–331. doi: 10.1016/j.fct.2018.01.002.

TOXNET - [Em linha], atual. 2017. [Consult. 28 fev. 2018]. Disponível em <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+303-47-9>

VAR, I.; KABAK, B. - Occurrence of ochratoxin A in Turkish wines. *Microchemical Journal*. . ISSN 0026265X. 86:2 (2007) 241–247. doi: 10.1016/j.microc.2007.04.002.

VARGA, János; KOZAKIEWICZ, Zofia - Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science and Technology*. . ISSN 09242244. 17:2 (2006) 72–81. doi: 10.1016/j.tifs.2005.10.007.

Vinho Verde - [Em linha], atual. 2018. [Consult. 21 fev. 2018]. Disponível em <http://www.vinhoverde.pt/pt/sobre-o-vinho-verde>

WINES OF PORTUGAL - Wines of Portugal | A world of difference [Em linha], atual. 2010. [Consult. 22 fev. 2018]. Disponível em: <http://www.winesofportugal.info/pagina.php?codNode=18094>

ZHANG, Xiaoxu *et al.* - Occurrence of Ochratoxin A in Chinese wines: Influence of local meteorological parameters. *European Food Research and Technology*. . ISSN 14382377. 236:2 (2013) 277–283. doi: 10.1007/s00217-012-1886-5.





**ANEXO**



**Anexo I - Amostras de vinho analisadas.**

<b>Número da amostra</b>	<b>Nome do vinho</b>	<b>Ano do vinho</b>	<b>Região</b>
<b>Vinho branco comercial</b>			
1	Fernão Pó – Adega Cabernete	2016	Setúbal
2	Alvarinho – Vinha Alvaredo	2016	Viana do castelo
3	Quinta do Encontro	2014	Bairrada
4	Muralhas de Monção	2016	Viana do castelo
5	Anfisy Cantine Lavorata – Vinho Italiano	2016	Itália
6	Alvarinho Tilá	2016	Viana do castelo
7	Solar Serra do Alvarinho	2015	Viana do castelo
10	Quinta Alorna Arinto - Chardonnay	2016	Santarém
11	Gazela Mare Loureiro - Alvarinho	n.d.	Viana do castelo
12	Solar Serra do Alvarinho - Reserva	2015	Viana do castelo
13	Pias – BAG	n.d.	Alentejo
15	Casa de Vila Verde – Alvarinho	2015	Viana do castelo
16	Aldeias de Juromenha - Alentejo	2015	Alentejo
37	Eira Velha - Lamas	n.d.	Zona Centro
42	Don Garcia	n.d.	Espanha
44	Vila Régia - Douro (DOC)	2016	Douro
47	Vila Régia - Douro (DOC)	2014	Douro
48	JP Azeitão - Bacalhoa	2012	Setúbal
57	Guarda Rios - CVRA - Alentejo	2015	Alentejo
51	Alvarinho Casa do Canhoto - Escolha	2016	Viana do castelo
8	Alvarinho	2016	Viana do castelo
9	Lamas	2016	Zona Centro
14	Alvarinho – Monção Melgaço	2016	Viana do castelo
54	Lobazes - Coimbra	2015	Zona Centro
60	Pai branco caseiro 2017	2017	Zona Centro
61	José Manuel branco caseiro 2017	2017	Zona Centro
72	Lamego (a)	2017	Lamego
73	Lamego (b)	2017	Lamego

**Anexo I - Amostras de vinho analisadas (continuação).**

<b>Número da amostra</b>	<b>Nome do vinho</b>	<b>Ano do vinho</b>	<b>Região</b>
<b>Vinho branco caseiro</b>			
<b>74</b>	Lamego (c)	2017	Lamego
<b>91</b>	Semide - Coimbra	2016	Zona Centro
<b>Vinho tinto comercial</b>			
<b>18</b>	Xisto Preto - Reserva	2014	Douro
<b>19</b>	Pacheca Superior	2014	Douro
<b>20</b>	Adega Cooperativa Silgueiros - BAG	n.d.	Lamego
<b>21</b>	Quinta do Côa – Douro	2014	Douro
<b>22</b>	Anfisy Cantine Lavorata – Vinho Italiano	2015	Itália
<b>23</b>	Água pé Alburitel	n.d.	Zona Centro
<b>24</b>	Buen Amor	2013	Bairrada
<b>25</b>	Bolota Alentejana - Reserva	2012	Alentejo
<b>26</b>	Encostas de Alcube - BAG	n.d.	Setúbal
<b>27</b>	Casa de Santar - Vintage	2014	Dão
<b>28</b>	Água-pé tomar	n.d.	Santarém
<b>29</b>	Pias - BAG	n.d.	Alentejo
<b>30</b>	Aliás - Bairrada	2016	Bairrada
<b>31</b>	Adega Cabernete	2016	Setúbal
<b>38</b>	Eira Velha - Lamas	n.d.	Zona Centro
<b>45</b>	Sangiovese – Vinho Italiano	2012	Itália
<b>40</b>	JP Azeitão - Bacalhoa	2012	Setúbal
<b>41</b>	Real Lavrador - Alentejo	2016	Alentejo
<b>43</b>	Don Garcia	n.d.	Espanha
<b>49</b>	Torre de Ferro - Dão (DOC)	2008	Dão
<b>50</b>	Pias - BAG	n.d.	Setúbal
<b>56</b>	Quinta do Sobral de Santar - Dão	2015	Dão
<b>58</b>	Aliás Elegância de Outrora - Bairrada (DOC)	2013	Bairrada
<b>59</b>	Continente	n.d.	Espanha
<b>68</b>	Vinha Maria	2015	Dão

**Anexo I - Amostras de vinho analisadas (continuação).**

<b>Número da amostra</b>	<b>Nome do vinho</b>	<b>Ano do vinho</b>	<b>Região</b>
69	Rosário - Reserva Casa Ermelinda de Freitas	2009	Setúbal
70	Herdade dos Grous	2014	Alentejo
77	Esporão - Reserva	2014	Alentejo
64	Serra da Lua	n.d.	Lisboa
66	Porta dos Cavaleiros - Dão	1984	Dão
67	Piteira - Premium (DOC) Alentejo	2015	Alentejo
80	Pegos Claros V.Q.P.R.D	1994	Setúbal
81	Vila Real Reserva - Douro	2013	Douro
82	Merino Alentejo	2014	Alentejo
83	Sidónio de Sousa	2012	Bairrada
84	Esteva Douro Casa Ferreirinha	2014	Douro
88	Quinta de Pancas - Premium	2003	Lisboa
89	Quinta Sobral Santar - Reserva	2014	Dão
85	Quinta da Terrugem - Alentejo	2008	Alentejo
93	Terra Solidaria – ADFP	2016	Zona Centro
86	Cozinha Velha Reserva - Alentejo	2014	Alentejo
<b>Vinho tinto caseiro</b>			
17	Murtede	n.d.	Zona Centro
52	Coimbra	2017	Zona Centro
53	Coimbra	2016	Zona Centro
55	Lobazes - Coimbra	2016	Zona Centro
62	Lobazes - Coimbra	2017	Zona Centro
63	Vila Nova de Poiares	n.d.	Zona Centro
65	Lobazes - Coimbra	2017	Zona Centro
76	Lamego	2017	Lamego
78	Água-pé morangueiro - Coimbra	2017	Zona Centro
87	Coimbra	n.d.	Zona Centro
94	Semide – Coimbra	2017	Zona Centro
95	Semide - Coimbra	2017	Zona Centro

**Anexo I - Amostras de vinho analisadas (continuação).**

<b>Número da amostra</b>	<b>Nome do vinho</b>	<b>Ano do vinho</b>	<b>Região</b>
96	Lobazes - Coimbra	2017	Zona Centro
97	Lamego	2017	Lamego
98	Lamego	2017	Lamego
99	Lamego	2017	Lamego
100	Lamego	2017	Lamego
79	Lamego	2016	Lamego
<b>Vinho Verde, Rosé, Espumante comercial</b>			
32	Monte Baixo Frisante - Rosé	n.d.	Bairrada
33	Montarro Frisante - Rosé	n.d.	Bairrada
34	Jaume Serra Cava - Espumante Bruto	n.d.	Espanha
35	Terras do Demo – Távora Espumante	n.d.	Zona Centro
36	Casal Garcia - Verde	n.d.	Penafiel
46	Proseco Espumante Branco – Vinho Italiano	n.d.	Itália
39	Nuvens Douradas Espumante Branco	n.d.	Douro
92	São Domingos Espumante Reserva Bruto	n.d.	Bairrada
71	Borralhais - Verde Rosé	2016	Viana do castelo
<b>Vinho Verde, Rosé, Espumante caseiro</b>			
75	Rosé Lamego	2017	Lamego
90	Espumante Branco – Lobazes. Coimbra	2015	Zona Centro

n.d. – Não definido