



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

## OCRATOXINA A EM VINHOS CULTIVADOS NO VALE DO SÃO FRANCISCO – BRASIL

G. Prado<sup>1</sup>, M. S. Oliveira<sup>1</sup>, R. S. Souza<sup>1</sup>, F. N. Paschoal<sup>1</sup>, R. E. Bickel<sup>1</sup>, D. A. Medeiros<sup>1</sup>, G. C. S. Amâncio<sup>1</sup>, J. E. G. C. Madeira<sup>1</sup>, L. Freire<sup>2</sup>, L. R. Batista<sup>2</sup>, G. E. Pereira<sup>3</sup>

1- Fundação Ezequiel Dias - Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental - Laboratório de Micotoxinas – CEP 30510-010 Belo Horizonte – MG – Brasil, Telefone: 55 (31) 3314-4682 – email: praguilherme@gmail.com;

2- Universidade Federal de Lavras – Departamento de Ciência de Alimentos, Caixa Postal 3037. CEP 37200.000, Lavras/MG. Telefone: 55 (35) 38291407; email: luisrb@dca.ufla.br;

3- Embrapa Semiárido – Uva e Vinho – CEP: 56302970 – Petrolina/Pernambuco. Telefone: 55 (87) 38663711; email: giuliano.pereira@embrapa.br

**RESUMO** – Ocratoxina A (OTA) é a principal micotoxina encontrada em uvas, vinhos e sucos de uva e é considerada um dos contaminantes mais nocivos à saúde humana. Neste estudo, amostras de vinhos de diferentes variedades de uvas cultivadas no Vale do São Francisco (Brasil) foram analisadas para avaliar o teor de OTA por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. De 37 amostras analisadas, apenas uma amostra apresentou OTA superior ao Limite de Tolerância Máxima permitida pela legislação em vigor no Brasil ( $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Os resultados deste estudo indicou um baixo risco de exposição a OTA pelo consumo de vinhos daquela região do Nordeste do Brasil.

**ABSTRACT** – Ochratoxin A (OTA) is the main mycotoxin found in grapes, wines and grape juices and is considered one of the most harmful contaminants to human health. In this study, samples of wines from different grape varieties grown in São Francisco Valley (Brazil) were analyzed for the OTA content by high-performance liquid chromatography. Only one wine sample (n=37) was contaminated with OTA above the maximum tolerable limit ( $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) established by Brazilian legislation. The results of this study indicated a low risk of exposure to OTA for the consumption of wine in that region of Northeast Brazil.

**PALAVRAS-CHAVE:** ocratoxina A; vinhos, contaminação

**KEYWORDS:** ochratoxin A; wines; contamination

### 1. INTRODUÇÃO

O cultivo de uvas viníferas e a elaboração de vinhos finos no Vale do Submédio São Francisco têm sido intensificados nos últimos anos devido ao clima propício da região, obtendo frutos de excelente qualidade, sendo responsável por aproximadamente 15% da produção de vinhos finos no Brasil (Leão e Soares, 2009).

As uvas (*Vitis vinifera* L.) estão sujeitas à contaminação por microrganismos presentes no ambiente da lavoura, colheita e na elaboração dos vinhos. Atualmente, dentre os microrganismos contaminantes, há uma maior preocupação com relação aos fungos produtores de micotoxinas, sendo *Aspergillus* o principal gênero produtor destas toxinas em uvas (*Vitis vinifera* L.) (Rousseaux et al, 2014; Serra et al, 2006). Dentre as micotoxinas, a ocratoxina A (OTA) é a principal contaminante de



uvas e vinhos, sendo considerada uma das mais prejudiciais para a saúde humana (Lombaert et al, 2004; Otteneder e Majerus, 2000; Rosa et al, 2004).

Os países possuem diferentes limites de níveis toleráveis de OTA em diferentes produtos alimentares. A União Européia fixou em  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  o Limite de Tolerância Máxima de OTA em vinhos e sucos de uvas. Este mesmo limite foi fixado no Brasil pela Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (Brasil, 2011).

O objetivo do trabalho foi avaliar a incidência de OTA em vinhos experimentais e comerciais produzidos em vinícolas da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco, localizadas nos municípios de Lagoa Grande e Santa Maria da Boa Vista, em Pernambuco, e Casa Nova na Bahia.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras

Os vinhos experimentais em que foram avaliadas as concentrações de OTA presentes, foram elaborados a partir das variedades de uvas tintas e brancas, em duas safras (julho/agosto/setembro e janeiro/fevereiro/março), nos anos de 2014 e 2015. A quantificação da OTA foi realizada pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência, conforme descrito em EN 14133/2003 (European Committee for Standardization, 2003).

### 2.2 Preparo das Amostras e Purificação em Coluna de Imunoafinidade

Inicialmente, as amostras foram resfriadas a  $4^\circ\text{C}$  por 12 horas. De cada amostra, 40 mL foram adicionados a 40 mL da solução de diluição (10 g de Polietilenoglicol 8000 e 50 g de bicarbonato de sódio em 1000 mL de água purificada (q.s.p.)) e homogeneizados sob agitação mecânica em shaker, em velocidade média, por 30 minutos. Esta solução foi submetida à filtração a vácuo ( $2 \text{ mL min}^{-1}$ ) em membrana de microfibras de vidro grau GF/A (Whatman – GE Healthcare) e 40 mL do filtrado foi passado por uma coluna de imunoafinidade (Ochraprep, R- Biopharm Rhône Ltd) adaptada ao sistema Visiprep™ SPE Vacuum Manifold (Sigma-Aldrich). A coluna foi lavada com 10 mL da solução de lavagem (25 g de cloreto de sódio e 5 g de bicarbonato de sódio em 1000 mL de água purificada) e, em seguida, com 10 mL de água purificada para remoção dos resíduos não específicos. Posteriormente, foi adicionado 2 mL de metanol à coluna para liberação da OTA ligada ao anticorpo, com repetição do procedimento por três vezes. O eluato obtido foi evaporado com aquecimento ( $\pm 50^\circ\text{C}$ ) sob atmosfera de nitrogênio. Este extrato seco foi reconstituído em 250  $\mu\text{L}$  de fase móvel (acetona:metanol:ácido acético aquoso (35:35:30, v/v/v)). Injetou-se então 50  $\mu\text{L}$  das soluções padrão de OTA e dos extratos das amostras no Cromatógrafo Líquido. A solução estoque de OTA (SIGMA) foi preparada em tolueno:ácido acético (99:1, v/v). A concentração foi determinada de acordo com Trucksess (2010), sendo verificada em Espectrofotômetro UV a 333nm, com  $\epsilon = 5440 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

### 2.3 Quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A quantificação foi conduzida em um sistema de cromatografia líquida Shimadzu com detector de fluorescência (Modelo LC-10AD) em comprimentos de onda de 333 e 476 nm para excitação e emissão, respectivamente. Utilizou-se a coluna Shim-pack CLC-ODS RP-18 ( $5 \mu\text{m}$ ;  $4,6 \times 250 \text{ mm}$ ), precedida da pré-coluna Shim-pack G-ODS ( $5 \mu\text{m}$ ;  $4,6 \times 25 \text{ mm}$ ), sendo o fluxo de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ . A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ( $y = 6935,3x + 913,169$ , em que y: área do pico e x: concentração de OTA), correlacionando a área do pico *versus* a concentração da respectiva solução



padrão, sendo que o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido foi de 0,99. Sob estas condições, o tempo de retenção foi cerca de 10 minutos. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, sendo calculados pelas respectivas relações matemáticas:  $LD = 3DP/m$  e  $LQ = 10DP/m$  (em que, DP = estimativa do desvio padrão da linha de regressão e m = coeficiente angular da linha de calibração). O LD foi de  $0,001087 \mu\text{g L}^{-1}$ , e o LQ foi de  $0,006254 \mu\text{g L}^{-1}$ . Todas as amostras foram analisadas em duplicata, enquanto as soluções padrão de OTA foram injetadas em triplicata. Para avaliar o desempenho da metodologia analítica utilizada, testes de recuperação foram realizados pela adição de OTA em amostras de vinhos não contaminadas ( $<0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ). A amostra de vinho foi contaminada em cinco repetições, com duas concentrações de OTA:  $0,22 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $0,44 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios de recuperação utilizando  $0,22 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $0,44 \mu\text{g L}^{-1}$  de OTA foi de 71 e 74%, respectivamente, mostrando a eficiência do método empregado. Os níveis de OTA obtidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Incidência de Ocratoxina A (OTA) em vinhos brancos e tintos comerciais e experimentais

Produto	Número de amostras	Amostras com OTA $<LD^a$	Amostras com OTA $<LQ^b$	Amostras com OTA $\geq LQ^b$	Concentração média <sup>c</sup> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Faixa de concentração <sup>c</sup> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
<b>Vinho Branco</b>						
Comercial	6	0	0	6	0,123	0,016 - 0,542
Experimental	6	1	2	3	0,033	0,015 - 0,059
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>0,093</b>	<b>0,015 - 0,542</b>
<b>Vinho Tinto</b>						
Comercial	7	0	1	6	0,289	0,082 - 0,778
Experimental	18	0	6	12	0,378	0,040 - 2,720
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>18</b>	<b>0,349</b>	<b>0,040 - 2,720</b>

<sup>a</sup> - Limite de Detecção:  $0,00109 \mu\text{g kg}^{-1}$ . <sup>b</sup> - Limite de Quantificação:  $0,00625 \mu\text{g kg}^{-1}$ . <sup>c</sup> - Concentração média e faixa de concentração das amostras com teores superiores ao LQ.

Das 37 amostras analisadas, 27 apresentaram contaminação com OTA em níveis superiores ao Limite de Quantificação da metodologia utilizada. Foi observado nos vinhos tintos uma maior contaminação com OTA quando comparado aos vinhos brancos. Para vinhos tintos a média de OTA foi de  $0,349 \mu\text{g kg}^{-1}$  e uma faixa de concentração de  $0,040-2,720 \mu\text{g kg}^{-1}$  e para vinhos brancos média de  $0,093 \mu\text{g kg}^{-1}$  e faixa de  $0,015-0,542 \mu\text{g kg}^{-1}$ . O vinho tinto tem sido relatado com maiores concentrações de OTA que os vinhos brancos (Grazioli et al, 2006). Isto pode estar relacionado com o processo de vinificação (Lasram et al, 2008), já que na elaboração do vinho branco as cascas separam-se do mosto logo após o esmagamento, havendo pouco contato entre eles. No vinho tinto, as cascas fermentam junto ao mosto, para potencializar a extração da cor, ocorrendo também uma maior extração da micotoxina, caso esteja presente nas uvas. Apenas uma amostra de vinho apresentou contaminação com OTA ( $2,72 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) acima do Limite de Tolerância Máxima estabelecida pela legislação em vigor no Brasil de  $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ , revelando uma baixa contaminação com OTA nos vinhos daquela região produtora.



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

## 4. CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo revelaram uma baixa contaminação com OTA nos vinhos cultivados no Vale São Francisco, nordeste do Brasil. Entretanto, novas pesquisas devem ser feitas para uma melhor avaliação da qualidade dos vinhos produzidos naquela região do Brasil.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo auxílio financeiro.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2011). *Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos*. (Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 07, de 18 de fevereiro de 2011). Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0007\\_18\\_02\\_2011.pdf/1c21241c-471d-4d10-8a24-da92c96604b8](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0007_18_02_2011.pdf/1c21241c-471d-4d10-8a24-da92c96604b8)

European Committee for Standardization. (2003). *EN 14133: foodstuffs: determination of ochratoxin A in wine and beer, HPLC method with immunoaffinity column clean-up*. Brussels, 2003. 16 p.

Grazioli, B., Fumi, M. D., & Silva, A. (2006). The role of processing on ochratoxin A content in Italian must and wine: A study on naturally contaminated grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 93-96.

Lasram, S., Mani, A., Zaied, C., Chebil, S., Abid, S., Bacha, H., & Ghorbel, A. (2008). Evolution of ochratoxin A content during red and rose vinification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(10), 1696-1703.

Leão, P. C. S. & Soares, J. M. (2009). Implantação do vinhedo. In: J. M. Soares & P. C. S. LEÃO, (Ed.). *A vitivinicultura no semiárido brasileiro*. (Ed. 1, Cap. 7, pp. 255-293). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Petrolina: Embrapa Semiárido.

Lombaert, G. A., Pellaers, P., Neumann, G., Kitchen, D., Huzel, V., Trelka, R., Kotello S & Scott, P. M. (2004). Ochratoxin A in dried vine fruits on the Canadian retail market. *Food Additives and Contaminants*, 21(6), 578-585.

Otteneder, H., & Majerus, P. (2000). Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants*, 17(9), 793-798.

Rosa, C. A. R., Magnoli, C. E., Fraga, M. E., Dalcero, A. M., & Santana, D. M. N. (2004). Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 21(4), 358-364.



Rousseaux, S., Diguta, C. F., Radoi-Matei, F., Alexandre, H., & Guilloux-Bénatier, M. (2014). Non-Botrytis grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins. *Food Microbiology*, 38, 104-121.

Serra, R., Lourenco, A., Alipio, P., & Venâncio, A. (2006). Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological Research*, 110(8), 971-978.

Trucksess, M. W. (Ed.). (2010). Natural toxins. In Horwitz W. & Latimer Jr, G. W. (Eds.). *Official methods of analysis of AOAC International* (Rev. 3), (Chap. 49.6, pp. 63-75). Gaythersburg: AOAC International.