



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
(PPGCTA)



**Bruna Dachery**

**EFEITO DAS ETAPAS DE ELABORAÇÃO DO VINHO CABERNET SAUVIGNON  
SOBRE OS NÍVEIS DE OCRATOXINA A**

Porto Alegre

2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
(PPGCTA)

**Bruna Dachery**

**EFEITO DAS ETAPAS DE ELABORAÇÃO DO VINHO CABERNET SAUVIGNON  
SOBRE OS NÍVEIS DE OCRATOXINA A**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Manfroi  
Coorientadora: Prof. Dra. Juliane Elisa Welke

Porto Alegre  
2015

### CIP - Catalogação na Publicação

DACHERY, BRUNA

EFEITO DAS ETAPAS DE ELABORAÇÃO DO VINHO CABERNET  
SAUVIGNON SOBRE OS NÍVEIS DE OCRATOXINA A / BRUNA  
DACHERY. -- 2015.

63 f.

Orientador: Vitor Manfroi.

Coorientadora: Juliane Elisa Welke.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. ocratoxina A. 2. vinhos. 3. redução de  
micotoxinas. I. Manfroi, Vitor, orient. II. Welke,  
Juliane Elisa, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Bruna Dachery**

Nutricionista

**DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

**MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:

Pela Banca Examinadora:

Homologada em:

Por:

---

VITOR MANFROI

Orientador – PPGCTA/UFRGS

---

ROSANE RECH

Coordenadora – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA/UFRGS)

---

JULIANE ELISA WELKE

Co-orientadora – PPGCTA/UFRGS

---

PLINHO HERTZ

Banca – PPGCTA/UFRGS

---

PAULA ROSSINI AUGUSTI

Banca – PPGCTA/UFRGS

---

VITOR MANFROI

Diretor – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS)

---

REGINA VANDERLINDE

Banca – UCS/LAREN

*Dedico este trabalho aos meus pais, Volmir e Luciana Dachery que são meus exemplos de luta e persistência. Que sempre estiveram ao meu lado e das minhas irmãs, com todo apoio, dedicação e amor.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Professor Vitor Manfroi pela oportunidade, confiança e contribuição na minha formação e a minha co-orientadora Professora Juliane Elisa Welke pela grande ajuda, conhecimento e paciência.

Ao Flávio Veras Fonseca, pela sua disposição em me ensinar durante esses dois anos e pela paciência que teve.

À minha querida família, meu pai, minha mãe e minhas duas irmãs pela compreensão, pelo apoio e confiança que sempre tiveram em mim, mas principalmente por serem sempre pessoas tão presentes na minha vida.

Ao Rodrigo Gaboardi, meu parceiro de todas as horas, ter você ao meu lado foi um diferencial pra mim. Obrigada por fazer parte dessa conquista e todas as outras que estão por vir.

Aos meus colegas de laboratório: Bruno Camargo Rosa pela dedicação e auxílio durante o desenvolvimento do trabalho. À Emilli Keller Boll e Willian Pagel pela ajuda, sempre que foi necessária.

À minha amiga Sheila Canossa, pelos momentos que passamos juntas nessa jornada e pela amizade de sempre.

Aos meus queridos amigos, pelo incentivo e amizade, que sempre me deram força e coragem para esta conquista.

## RESUMO

A ocratoxina (OTA) é uma micotoxina que possui propriedades nefrotóxicas, hepatotóxicas, teratogênicas e carcinogênicas. No Brasil, o limite máximo permitido de OTA em vinhos foi estabelecido em 2011 e é 2 µg/L. A ocorrência desta toxina em vinhos está relacionada principalmente à presença de fungos do gênero *Aspergillus* nas uvas usadas para a vinificação. Deste modo, o objetivo deste estudo foi verificar a influência das etapas de elaboração de vinho Cabernet Sauvignon sobre os níveis de OTA, através de dois diferentes experimentos: (A) vinho elaborado a partir de uvas inoculadas com fungo ocratoxigênico e (B) vinho elaborado com uvas naturalmente contaminadas com OTA. Para os dois experimentos, amostras das etapas mosto, fermentação/maceração, descuba, pós-fermentação, trasfega e maturação foram coletadas em triplicata, durante um período de 5 meses. A OTA foi detectada através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FL) e o limite de detecção e quantificação foi de 0,06 µg/L e 0,6 µg/L, respectivamente. Durante a vinificação, as etapas que apresentaram maior percentual de redução da toxina foram descuba, pós-fermentação e trasfega. Reduções significativas nos níveis de OTA foram observadas após a conclusão da vinificação. No vinho elaborado com uvas inoculadas com fungo ocratoxigênico observou-se uma redução de 92,6%. Valor similar (92%) foi verificado no vinho produzido com uvas naturalmente contaminadas por OTA. Considerando todo o processo de vinificação, pode-se sugerir que a diminuição dos níveis de OTA foi observada principalmente, devido à adsorção da toxina à parede celular das leveduras. Além disso, a adsorção da toxina aos sólidos em suspensão presentes no vinho durante a elaboração pode ter ocorrido.

Palavras chave: ocratoxina A, vinho, microvinificação, redução de micotoxinas

## ABSTRACT

The ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin with nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic and carcinogenic properties. In Brazil, the permitted maximum limits for the OTA in wines was established in 2011 and is 2 µg/L. The occurrence of this toxin in wines is due mainly for presence of fungi from *Aspergillus* genera in grapes used for winemaking. In this way, the aim of this study was to check the influence of stages of the winemaking process of Cabernet Sauvignon grape on the OTA levels through two different experiments: (A) wine made from grapes inoculated with ochratoxigenic fungi and (B) wine made from grapes naturally contaminated with OTA. For the two experiments, samples of must, fermentation/maceration, drawn-off wine, after fermentation, racking and maturation stages were collected in triplicate, during 5 months. The OTA was detected using high-performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-FL) and the limit of detection and limit of quantitation were 0.06 and 0.6 µg/L, respectively. During the winemaking, the stages that show higher toxin reduction were drawn-off wine, after alcoholic fermentation and racking. Significant reductions in OTA levels were observed when winemaking was finished. A reduction of 92.6% was observed in wine made from grapes inoculated with ochratoxigenic fungi. Similar value (92%) was verified in wine made from grapes naturally contaminated with OTA. Considering all winemaking process, we may suggest that the decreasing of OTA levels was observed mainly due to adsorption of the toxin in cell wall of yeast. Furthermore, the adsorption of the toxin in suspended solids present in wine during the winemaking may be occurred.

Keywords: ochratoxin A, wine, winemaking, mycotoxins reduction



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Flowchart of micro vinification of red wine with indication of two different experiments: (A) Wine made from grapes inoculated with the OTA producer fungus; (B) Wine made from grapes naturally contaminated with OTA.....42

**Figura 2** - Behavior of OTA during different experiments. (A) Wine made from grapes inoculated with the OTA producer fungus; (B) Wine made from grapes naturally contaminated with OTA.....45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Ocorrência de OTA em vinhos elaborados em diferentes países.....	24
<b>Tabela 2</b> - Recovery of OTA in red wine in different concentrations .....	43
<b>Tabela 3</b> - Precision of OTA determination in HPLC.....	44

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
1.1.1 OBJETIVO GERAL.....	15
1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1 PANORAMA DO VINHO NACIONAL.....	16
2.2 CONSUMO DE VINHO E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE.....	17
2.3 MICOTOXINAS.....	19
2.3.1 Ocratoxina A.....	19
2.3.2 Fungos produtores de OTA.....	21
2.3.3 Presença de OTA em vinhos.....	23
2.3.4 Redução dos níveis de OTA em vinho.....	27
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Artigo 1 - Efeito das etapas de elaboração de vinho Cabernet Sauvignon sobre os níveis de ocratoxina A .....</b>	<b>30</b>
<b>4 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>50</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A viticultura brasileira ocupa uma área de 82.881 hectares e obteve uma produção de 1.465.734 toneladas de uvas em 2013 (IBGE, 2013). O país ocupa a 14<sup>o</sup> posição no ranking mundial de produção de vinhos (OIV, 2013). Nos últimos anos, com o avanço no aprimoramento tecnológico e a melhoria das práticas aplicadas na produção dos vinhos, o Brasil têm recebido um reconhecimento nacional e internacional pela qualidade de seus produtos (IBRAVIN, 2014a).

Atualmente, dez estados brasileiros são responsáveis pela produção de uva, suco e vinho no país, incluindo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Espírito Santo, Mato Grosso, Bahia e Pernambuco. O Rio Grande do Sul destaca-se como o maior produtor nacional de uva e derivados, pois responde por cerca 90% da produção brasileira destes produtos (IBRAVIN, 2014b).

A Serra Gaúcha é a maior região vitícola brasileira, cujas coordenadas geográficas são latitude 29°S, longitude 51°W e a altitude entre 200-800 m. Uma variação de clima e solo é verificada dependendo da localização do vinhedo sendo que a temperatura e umidade relativa do ar média é de 17,2°C e 76%, respectivamente. A maior parte das uvas são destinadas para elaboração de vinhos, sucos e derivados, sendo uma parcela muito pequena destinada ao consumo in natura (EMBRAPA, 2014). O clima da região é caracterizado por excesso hídrico em todas as estações do ano. A média de precipitação anual é aproximadamente 1.600 mm, o que favorece a incidência de doenças fúngicas. Este índice alto de chuvas pode comprometer a qualidade dos vinhos e favorecer a produção de compostos tóxicos na uva, que representam um risco

à saúde do consumidor (GIOVANNINI; MANFROI, 2009). Um desses compostos é a ocratoxina A (OTA), uma micotoxina que tem demonstrado, em estudos com animais, efeitos tóxicos relacionados à hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e carcinogenicidade (REMIRO et al., 2013; ROCHA, 2014).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos presentes nos vinhedos durante a maturação da uva, transporte e armazenamento. A produção de OTA na uva é influenciada por diversos fatores, entre eles a umidade relativa do ar, temperatura, composição do substrato, atividade de água, pH e linhagem do fungo contaminante (TANIWAKI; SILVA, 2001). Fungos produtores de OTA já foram identificados em vinhedos de diversos países tradicionalmente produtores de vinhos, como França (DACHOUPAKAN et al., 2009), Espanha (BELLÍ et al., 2006), Itália (LUCCHETTA et al., 2010) e Argentina (PONSONE et al., 2007).

Como consequência da presença de fungos produtores de OTA em uva, os vinhos podem apresentar contaminação pela toxina. Remiro et al. 2013 encontraram OTA em 99% das amostras de vinhos analisadas, provenientes de diferentes países do Mediterrâneo, incluindo Espanha, França, Itália, Croácia, Grécia, Turquia, Israel e o norte da África. Além desses países, a OTA têm sido detectada em vinhos produzidos na Argentina (SHUNDO et al., 2006), Rússia (RUSANOVA et al., 2009), Brasil (WELKE et al., 2010), Portugal (PENA et al., 2010), China (WU et al., 2011), Austrália (QUINTELA et al., 2012), Chile (HOETLZ et al., 2012).

Em virtude da ocorrência de OTA em vinhos e dos possíveis problemas que esta pode ocasionar à saúde humana, desde 2006 a União Europeia apresenta limites máximos permitidos desta toxina em vinhos e derivados

(EUROPEAN COMMISSION, 2006). Em 2011, a legislação brasileira estabeleceu limites máximos para várias micotoxinas em diversos produtos. Em sucos de uva e vinhos, o limite máximo fixado é de 2 µg/L, que é a mesma concentração máxima permitida pela legislação europeia (ANVISA, 2011).

Para melhor compreender os mecanismos que levam à ocorrência da OTA em vinhos, faz-se necessário a investigação do comportamento desta micotoxina durante as fases de elaboração do vinho tinto, o que pode contribuir para o estabelecimento de estratégias que possam auxiliar na redução da mesma no produto final. Até o presente momento, nenhum trabalho dedicou-se a comparação do efeito da vinificação nos níveis de OTA presente naturalmente nas uvas e produzida através da inoculação do fungo produtor. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o comportamento da OTA durante as etapas da produção de vinho Cabernet Sauvignon através das seguintes condições: (A) vinho elaborado com uvas inoculadas com o fungo produtor de OTA e (B) vinho elaborado com uvas naturalmente contaminadas com OTA.

## **OBJETIVOS**

### 1.1.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a influência das etapas de elaboração de vinho tinto nos níveis da ocratoxina A.

### 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o comportamento da ocratoxina A durante os estágios de produção de vinho elaborado através das seguintes condições: (A) vinho elaborado através da inoculação de fungo produtor de OTA na uva; e (B) vinho elaborado com uvas naturalmente contaminadas por OTA.

- Determinar a concentração de OTA durante as etapas de elaboração do vinho, que incluem mosto, fermentação/maceração, descuba, pós fermentação, trasfega e maturação, a fim de identificar etapas que podem ser importantes para redução da toxina.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PANORAMA DO VINHO NACIONAL

A vitivinicultura brasileira está difundida desde o Rio Grande do Sul (31°S de latitude) até o Rio Grande do Norte e Ceará (5°S de latitude) (CAMARGO et al., 2011). Desde o início do século XX, período em que se tornou uma atividade comercial, o foco principal foi a produção de videiras americanas. Esse cenário mudou por volta de 1960, quando iniciou-se o cultivo de videiras de origem europeia, o que foi primordial para o avanço da vitivinicultura nacional, pois a produção de vinhos finos alavancou uma série de mudanças no setor, incentivando o produtor a colocar no mercado produtos com qualidade e competitivos com o mercado internacional (IBRAVIN, 2014c).

O Brasil ocupa 14° lugar no ranking mundial de produção de vinhos (OIV, 2013), produzindo atualmente cerca de 310 milhões de litros por ano. São centenas de vinícolas espalhadas pelo país, a maioria instaladas em pequenas propriedades familiares, com cerca de 2 hectares por família (IBRAVIN, 2014a).

O principal estado brasileiro produtor de vinho é o Rio Grande do Sul, responsável por cerca de 90% da produção nacional, no qual em 2013 foram produzidos mais de 600 milhões de kg de uva (IBRAVIN, 2013d). No Rio Grande do Sul situa-se quatro importantes regiões vitícolas: a Serra Gaúcha (29°S), principal região vitícola do país, Campos de Cima da Serra (28°S), Serra do Sudeste e Campanha (29°S e 31°S, respectivamente). Outras duas regiões brasileiras que merecem destaque são o Planalto Catarinense (27°S - Santa Catarina) e o Vale do São Francisco (9°S - Bahia e Pernambuco). Estas



regiões distintas mostram a diversidade do vinho produzido no país e como os avanços tecnológicos e a melhoria das práticas vitícolas e enológicas aplicadas propiciaram o surgimento de produto reconhecido internacionalmente pela sua qualidade (EMBRAPA, 2015).

## 2.2 CONSUMO DE VINHO E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE

A relação entre alimentação e saúde tem desenvolvido grandes pesquisas sobre a presença de compostos bioativos em alimentos, sendo o vinho, uma das bebidas mais ricas nestes compostos (XIANG et al., 2014). O ponto de partida para as pesquisas sobre vinho e saúde foi o “Paradoxo Francês”. Renaud; De Lorgeril, (1992) publicaram um estudo sobre a associação entre morte por doença cardiovascular e ingestão alimentar. Apesar de uma dieta tradicionalmente elevada em gorduras saturadas, as taxas de infarto do miocárdio na França são 40% menor que o resto da Europa. Este resultado foi associado ao grande consumo de vinho pela população deste país, que é superior ao restante dos países europeus.

Vinhos tintos possuem maior efeito protetor à saúde em relação aos vinhos brancos, pois são ricos em compostos polifenólicos, como ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, etc.), estilbenos (trans-veratrol) e flavonóides (catequinas, quercetinas, epicatequina, rutina, etc.). Uma garrafa de vinho tinto contém um total de 1,8 g/L de polifenóis, enquanto uma garrafa de vinho branco contém somente 0,2 a 0,3 g/L de polifenóis (BETERLLI; DA, 2009).

Os efeitos benéficos dos compostos polifenólicos ao organismo estão ligados a ação antioxidante, que previne a formação de radicais livres,

responsáveis por inúmeros prejuízos à saúde humana (PAZOS et al., 2006). Além disso, o consumo destes compostos está associado à redução de incidência de doenças degenerativas relacionadas ao stress oxidativo, como por exemplo, o Alzheimer (SUN et al., 2008), redução do risco de doença cardiovascular (AVELLONE et al., 2006) e retardo da progressão de várias doenças, incluindo o câncer (PLATZ et al., 2004).

No entanto, a presença de constituintes com ação fisiológica prejudicial à saúde tem sido investigada com intuito de identificar e/ou quantificar estes compostos, de modo que possibilite a correta avaliação dos fatores de risco relacionados com a ingestão do produto (ANCÍN-AZPILICUETA et al., 2008; (SCHUMACHER et al., 2012).

Dentre os compostos tóxicos que podem estar presentes no vinho, destacam-se as aminas biogênicas, das quais a histamina é mais importante, causadora de efeitos adversos como dores de cabeça, edemas, problemas de circulação sanguínea, entre outros (MARTUSCELLI et al., 2013), compostos carbonílicos, como cetonas e aldeídos, cuja presença em grande quantidade em bebidas alcoólicas está relacionada com sintomas como náusea, vômito, inquietação, suor, confusão, queda na pressão e dores de cabeça (AZEVEDO et al., 2007) e as micotoxinas, toxinas produzidas por fungos filamentosos presentes na uva. A OTA, que é a toxina abordada neste estudo, é a principal micotoxina encontrada em vinhos e sua ingestão pode levar a efeitos tóxicos como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e carcinogenicidade (REMIRO et al., 2013; ROCHA, 2014).

## 2.3 MICOTOXINAS

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos quando estes tiverem condições básicas para o desenvolvimento, como umidade, temperatura e atividade de água (Aw) (TANIWAKI;SILVA, 2001). Existe um grande número de micotoxinas, no entanto uma pequena parcela tem sido detectada em alimentos e são atualmente consideradas um risco à saúde do consumidor. As mais relevantes de acordo com o Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização Mundial da Saúde (JECFA, do inglês: *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) são: aflatoxinas, OTA, patulina, deoxynivalenol (DON), fumonisinas, nivelanol (NIV), T2-toxina e zearalenona (JECFA, 2015).

A ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas em doses elevadas pode levar desde a manifestação de sintomas agudos até a morte. As micotoxinas quando ingeridas em baixas concentrações e uma exposição prolongada podem resultar no aparecimento de câncer (WU et al., 2014).

### 2.3.1 OCRATOXINA A

A OTA é uma micotoxina descoberta como um metabólito do fungo *Aspergillus ochraceus* em 1965 na África (VAN DER MERWE et al., 1965). Pode ser encontrada em diversos alimentos como trigo (RIBA et al., 2008), arroz (NGUYEN et al., 2007), café (LEONG et al., 2007), cacau (MOUNJOUENPOU et al., 2008), cerveja (KAWASHIMA et al., 2007), figos secos (KARBANCIOLU;HEPERKAN, 2008), queijo (DALL'ASTA et al., 2008), pão (ZINEDINE et al., 2007), uva (LASRAM et al., 2007) e produtos derivados, incluindo suco e vinho (NG et al., 2004; REMIRO et al., 2013). A ingestão de

alimentos contaminados por OTA pode ocasionar efeitos tóxicos como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e carcinogenicidade (ANNINOU et al., 2014).

É um policetídio derivado de uma dihidro-isocumarina unida pelo carbono 7 carboxílico a uma l-β-fenilalanina através de uma ligação amídica. É termorresistente e para sua extração e armazenamento em análises são utilizadas soluções ácidas, a qual a toxina se mantém estável. Sua fórmula química é  $C_{20}H_{18}O_6NCl$ , como mostra a figura 1 e seu peso molecular é 403,82 (VAN DER MERWE et al., 1965).

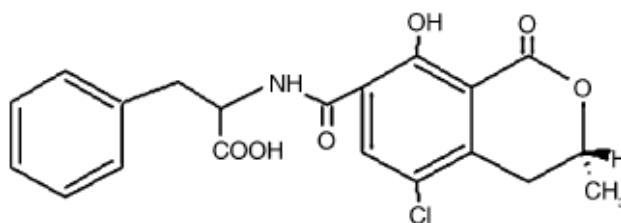


Figura 1: Estrutura química da ocratoxina A

Existem vários mecanismos para a toxicidade da OTA em nível celular. A OTA é um concorrente da fenilalanina-tRNA ligase, inibindo assim a síntese de proteínas. Além desse, outros mecanismos incluem a formação de adutos de DNA/RNA, apoptose e peroxidação de lipídeos (BAYMAN; BAKER, 2006).

Um dos casos mais conhecidos, sobre a toxicidade da OTA em humanos, foi a Nefropatia Endêmica dos Balcãs (NEB), onde foram relatados diversos casos de câncer no trato urinário, que foram associados à ingestão de alimentos contaminados com OTA (VALENTA et al., 1998). Pesquisas realizadas em animais mostram que os órgãos mais afetados pela toxina são os rins e fígado. Além disso, vários estudos em animais confirmaram uma relação entre a exposição à OTA e o surgimento de câncer no trato urinário,

fígado e glândulas mamárias (KUMAR et al., 2012; ANNINO et al., 2014; WU et al., 2014).

### 2.3.2 FUNGOS PRODUTORES DE OTA

O desenvolvimento de fungos em alimentos depende de diversos fatores, tais como, umidade relativa do ar, temperatura, composição do substrato, atividade de água, pH e linhagem do fungo contaminante (TANIWAKI; SILVA, 2001). Os fungos responsáveis pela presença de OTA em alimentos pertencem aos gêneros *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* (CABAÑES et al., 2010). Em regiões frias e temperadas há uma predominância de fungos do gênero *Penicillium*, dentre eles, o mais importante é *P. verrucosum*, principal fungo associado à presença de OTA em cereais (CORONEL et al., 2012). O gênero *Aspergillus* possui uma abundância maior nas regiões de climas tropicais e subtropicais. Espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* podem ser divididas nas seguintes seções: *Flavi*, *Circumdati*, *Nigri*, *Restricti*, *Fumigati*, *Cervini*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Flavipedes*, *Versicolores*, *Usti*, *Terrei*, *Candidi*, *Cremeri*, *Sparsi* e *Wentti*. As espécies mais comumente estudadas como produtoras de micotoxinas pertencem às seções *Circumdati*, *Flavi* e *Nigri* (PITT; HOCKING, 1997; KLICH, 2002)

Os principais fungos responsáveis pela produção de OTA em uvas são *A. carbonarius* e *A. niger*, da secção *Nigri*. Dois aspectos importantes, relacionados a esses fungos, foram constatados por diversos estudos realizados em vinhedos ao redor do mundo. Primeiro, que os fungos pertencentes ao agregado *A. niger* destacam-se pela sua alta ocorrência em vinhedos, enquanto o *A. carbonarius* é o fungo que apresenta maior potencial

toxigênico, com a maioria dos isolados capazes de produzir OTA (CHIOTTA et al., 2009; LUCCHETA et al., 2010; BARBERIS et al., 2014).

O efeito ocratoxigênico de *A. carbonarius* foi avaliado por Bellí et al. (2007) em uvas danificadas e não danificadas, que foram submetidas à temperaturas entre 20-30°C e três níveis de umidade diferentes (80%, 90% e 100%). Os autores mostraram que quantidades maiores de OTA foram encontradas nos grãos danificados, submetidos a temperaturas (30°C) e umidade elevadas (100%).

Um dos fatores mais importantes para a presença de fungos toxigênicos em uvas é a localização do vinhedo (LASRAM et al., 2012; LUCCHETTA et al., 2010). Lucchetta et al. 2010 avaliaram a presença de fungos produtores de OTA em uvas cultivadas nas regiões norte, central e sul da Itália. *A. carbonarius* foi encontrado principalmente nas uvas produzidas na região sul do país, enquanto na região norte e central o *A. niger* foi predominante. As uvas provenientes da região sul apresentaram maior ocorrência (45%) e maior concentração de OTA, atingindo o valor de 9,2 µg/L. As diferenças observadas em relação a incidência fúngica e níveis de OTA das uvas cultivadas nas diferentes regiões devem-se à fatores climáticos que favorecem ou não o crescimento do fungo e, conseqüentemente, a produção de OTA. Na região sul da Itália, por exemplo, o clima é mais úmido e quente e nestas condições, a concentração de OTA em uvas pode atingir níveis elevados (9,2 µg/L), diferentemente da região norte e central, em que os níveis de OTA encontrados não passaram de 0,02 µg/L.

Em vinhedos, a melhor maneira de reduzir a produção de OTA é controlar a presença de fungos ocratoxigênicos, para isso, é importante ter o

conhecimento de fatores ecológicos, que afetam a ocorrência desses fungos (ESTEBAN et al., 2006). Para isso, é importante também que a videira esteja adaptada às condições climáticas da região, assim como a escolha de um sistema de condução ideal para manter a qualidade do vinhedo. O sistema de condução espaldeira é um dos mais utilizados pelos viticultores nos principais países vitivinícolas do mundo, pois permite uma maior incidência solar sobre as uvas, quando comparado a outros sistemas comumente utilizados, como por exemplo o latada. Assim, com a utilização da espaldeira espera-se níveis reduzidos desta micotoxina. O cuidado com manejo do dossel vegetativo, através da realização das podas aumenta a incidência solar sobre as bagas, o que facilita a passagem de ar entre as folhas, diminuindo a umidade presente entre bagas e, conseqüentemente, a contaminação fúngica e níveis de micotoxinas (RIBEREAU GAYON, 2003).

### 2.3.3 PRESENÇA DE OTA EM VINHOS

O vinho é a segunda maior fonte de exposição à OTA, depois dos cereais, através da alimentação pela população europeia (EU SCOOP, 2002). Desde que foi detectada no vinho pela primeira vez, por Zimmerli & Dick (1995), a OTA tem sido encontrada em vinhos produzidos em diversos países do mundo (Tabela 1).

Tabela 1: Ocorrência de OTA em vinhos elaborados em diferentes países

<b>País</b>	<b>Tipo de Vinho</b>	<b>Incidência (%)</b>	<b>Variação (µg/L)</b>	<b>Referência</b>
Austrália	Tinto	50	0,033 - 0,072	Quintela et al., 2012
Brasil	Tinto	2,95	0,01 - 4,5	Welke et al., 2010
	Tinto	6	0,2 - 0,84	Teixeira et al., 2011
Canadá	Branco	14	<0,008 - 0,393	Ng et al., 2004
	Tinto	23	<0,004 - 0,156	Ng et al., 2004
China	Branco	10	0,09 - 0,53	Wu et al., 2011
	Tinto	29	0,02 - 1,18	Wu et al., 2011
Croácia	Tinto	100	0,00003- 0,0613	Remiro et al., 2013
Espanha	Tinto	100	0,064 - 0,138	Quintela et al., 2012
	Tinto	100	0,001 - 0,104	Remiro et al., 2013
	Tinto	100	0,00049- 0,0949	Remiro et al., 2012
França	Tinto	93	0,010 - 0,237	Quintela et al., 2012
	Tinto	92	0,0051- 0,0883	Remiro et al., 2013
Grécia	Tinto	100	0,0043 - 0,212	Remiro et al., 2013
Israel	Tinto	100	0,0036 - 0,0654	Remiro et al., 2013
Itália	Tinto	100	0,050 - 0,353	Quintela et al., 2012
	Tinto	100	0,0051 - 0,286	Remiro et al., 2013
Norte da África	Tinto	100	0,0844 - 0,455	Remiro et al., 2013
Rússia	Tinto	43	1,8 - 4,4	Rusanova et al., 2009
Turquia	Branco	100	0,25 - 1,80	Altiookka et al., 2009
	Tinto	100	0,0029 - 0,101	Remiro et al., 2013
	Tinto	100	0,39 - 7,96	Altiookka et al., 2009



A ocorrência de OTA é maior em vinhos tintos, seguidos de roses e brancos, isso ocorre por que o vinho tinto passa pelo processo de maceração, onde a casca da uva permanece em contato com o mosto durante algumas horas ou mesmo dias. Este procedimento é importante para a extração da cor e de compostos relacionados ao aroma que são provenientes, por exemplo, da casca das uvas. Além disso, a maceração é responsável pela transferência da OTA da casca para o mosto (CHIODINI et al., 2006; VAR; KABAK, 2007; QUINTELA et al., 2011; ZHANG et al., 2013).

Brera et al. (2008) comprovaram este fato através da análise de 1166 amostras de vinhos produzidos em diferentes regiões da Itália. Os valores máximos encontrados foram de 7,50 µg/L para os tintos, 4,07 µg/L<sup>1</sup> para rosés, 1,95 µg/L para brancos. Além disso, os autores verificaram que os vinhos produzidos na região sul da Itália apresentaram valores mais altos de OTA quando comparados com a região norte.

Sarigiannis et al. (2014) analisaram 60 amostras entre vinhos brancos (n=26), roses (n=8) e tintos (n=21) secos e brancos (n=4) e tintos (n=1) doces, produzidos na Grécia. No total, 47 amostras continham OTA, com valores que variaram 0,01 a 2,52 µg/L. Dos vinhos secos, os maiores valores de contaminação foram encontrados em vinhos roses (2,52 µg/L), seguidos de tintos (0,71 µg/L) e brancos (0,56 µg/L). Estes resultados contrastam com os dados encontrados na literatura, e podem ter ocorrido por influência das técnicas de cultivo e vinificação. Entre os vinhos doces, 100% apresentaram contaminação por OTA, com duas amostras (uma de branco e outra de tinto) com valores acima do permitido pela legislação (2,3 µg/L).

Os vinhos doces ou especiais são mais susceptíveis à contaminação por OTA. As uvas utilizadas para a elaboração desse tipo de vinho podem ser submetidas à diferentes condições para concentrar mais açúcares, incluindo a colheita tardia (quando as uvas apresentam grau de amadurecimento excessivo), a desidratação (secagem das uvas colhidas através da exposição solar ou com o uso de câmaras de ar seco ou fresco), botritização (quando as uvas são atacadas pelo fungo *Botrytis cinerea*, causador da podridão nobre) e congelamento (quando as uvas são colhidas congeladas). Essas técnicas podem aumentar a probabilidade de incidência de fungos e OTA. Uma das alternativas para a produção de vinhos mais doces consiste na interrupção da fermentação através da fortificação do vinho com destilado de uva que é utilizado também para que o grau alcoólico característico desta bebida seja atingido. Nesse último caso, as práticas enológicas também podem influenciar na concentração de OTA, pois a fermentação completa do vinho é um importante ponto para a redução de OTA (BELLI et al., 2004; VALERO et al., 2008).

Valero et al. (2008) analisaram 119 amostras de vinhos doces e especiais produzidos em diferentes zonas da Europa. Os tipos de vinhos analisados foram vinho fortificado no início da fermentação (n=22), vinho fortificado durante o estágio de maturação em barricas (n=37), vinho elaborado com uvas provenientes de colheita tardia (n=8), vinho elaborado com uvas secas ao sol (n=23), vinho elaborado com uvas secas em câmaras de ar quente (n=3), vinho elaborado com uvas secas em câmaras de ar fresco (n=8), vinho elaborado com uvas botritizadas (n=13) e vinho elaborado com uvas congeladas (n=5). A OTA não foi detectada nas amostras de vinho

provenientes de uvas de colheita tardia, nos vinhos elaborados com uvas botritizadas e vinhos elaborados com uvas congeladas. Valores elevados de OTA foram encontrados em vinhos elaborados com uvas secas ao sol (15,62  $\mu\text{g/L}$ ) e em vinhos fortificados no início da fermentação (27,79  $\mu\text{g/L}$ ). Esta situação é observada, pois as uvas secas ao sol são expostas a condições do ambiente por 5 a 15 dias, nesse período a uva pode sofrer danos, e nestas condições o fungo pode crescer e produzir OTA. Os vinhos fortificados no início da elaboração têm o processo fermentativo interrompido, o que dificulta a remoção da toxina, pois a OTA poderia ser removida com esse processo, como mencionado por diversos autores (MECA et al., 2010; SOLFRIZZO et al., 2010; CSUTORÁS et al., 2013; JIANG et al., 2014). Belli et al., (2004) também encontraram valores mais elevados de OTA em vinhos doces especiais. Em 20 amostras analisadas, a OTA foi detectada em 9 (45%), com uma concentração média de 4,47  $\mu\text{g/L}$ , sendo que uma amostra apresentou a concentração de 15,25  $\mu\text{g/L}$ .

#### 2.3.4 REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE OTA EM VINHOS

Métodos físicos, químicos e microbiológicos têm sido testados com a finalidade de reduzir a OTA durante as fases de elaboração do vinho (QUINTELA et al., 2013). O método físico mais efetivo é remoção das bagas ou cachos que apresentam contaminação fúngica visível, antes de serem submetidos a vinificação. Este procedimento pode resultar na redução de até 98% dos níveis de OTA. No entanto, este processo pode não ser economicamente viável para a indústria do vinho (ROSSEAU, 2004). Muitos estudos observaram que após a fermentação alcoólica, boa parte da OTA fica

retida nas borras provenientes da fermentação, sendo assim, a remoção das borras leva à redução da concentração de OTA do vinho (ESTI et al., 2012; CSUTORÁS et al., 2013).

Outra abordagem para remoção de OTA em vinho envolve a utilização de agentes adsorventes, com capacidade de imobilizar a toxina, como carvão ativado (VAR et al., 2008), bentonita (KURTBAY et al., 2008), albumina (QUINTELA et al., 2012) e outros insumos enológicos. A eficácia dos clarificantes enológicos na remoção da OTA vai depender da quantidade de toxina, da dosagem e do tipo de clarificante utilizado (QUINTELA et al., 2013). Dentre os clarificantes utilizados, o carvão ativado apresenta maior habilidade de remoção da toxina, porém, doses elevadas comprometem a qualidade do vinho (VAR et al., 2008).

Diferentes micro-organismos tem sido testados a fim de avaliar a sua capacidade de remoção e biodegradação da OTA em vinho, principalmente através do uso de espécies de leveduras *Saccharomyces* (CARIDI et al., 2006; CECCHINI et al., 2006; MECA et al., 2010; PETRUZZI et al., 2012; PIOTROWSKA et al., 2013) e bactérias lácticas, utilizadas para a fermentação malolática (FUNCHS et al., 2008; AMBRUNHOSA et al., 2014). Nestes casos, a OTA pode ficar aderida à parede celular do micro-organismo utilizado no processo fermentativo, que posteriormente é eliminado nas etapas de filtração do vinho, carregando consigo a toxina (PONSONE et al., 2009; MECA et al., 2010). Outro fato que pode ocorrer é a biodegradação através da hidrólise da ligação amida que une a ocratoxina  $\alpha$  (O $\alpha$ ) à molécula de fenilalanina, transformando-a em um composto não tóxico (AMBRUNHOSA et al., 2014).

### **3 RESULTADOS**

Os resultados do presente estudo estão apresentados na forma de artigo científico a ser submetido ao Periódico *Food Control*.

#### **3.1 Artigo 1 - Efeito das etapas de elaboração de vinho Cabernet Sauvignon sobre os níveis de ocratoxina A**

## **Effect of stages of winemaking Cabernet Sauvignon on ochratoxin A levels**

Bruna Dachery<sup>1</sup>, Bruno Camargo<sup>1</sup>, Flávio Fonseca Veras<sup>2</sup>, Juliane Elisa Welke<sup>2</sup>, Vitor Manfroi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Beverages and Enology Laboratory, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves 9500, Campus Valley, Agronomy, CEP: 91501-970, Porto Alegre / RS, Brazil.

<sup>2</sup> Food Toxicology Laboratory, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil.

\* Corresponding author: Vitor Manfroi – E-mail: [manfroi@ufgrs.br](mailto:manfroi@ufgrs.br) - (55 51) 3308-6681

## ABSTRACT

The ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin with nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic and carcinogenic properties. In Brazil, the permitted maximum limits for the OTA in wines was established in 2011 and is 2 µg/L. The occurrence of this toxin in wines is due mainly for presence of fungi from *Aspergillus* genera in grapes used for winemaking. In this way, the aim of this study was to check the influence of stages of the winemaking process of Cabernet Sauvignon grape on the OTA levels through two different experiments: (A) wine made from grapes inoculated with ochratoxigenic fungi and (B) wine made from grapes naturally contaminated with OTA. For the two experiments, samples of must, fermentation/maceration, drawn-off wine, after fermentation, racking and maturation stages were collected in triplicate, during 5 months. The OTA was detected using high-performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-FL) and the limit of detection and limit of quantitation were 0.06 and 0.6 µg/L, respectively. During the winemaking, the stages that show higher toxin reduction were drawn-off wine, after alcoholic fermentation and racking. Significant reductions in OTA levels were observed when winemaking was finished. A reduction of 92.6% was observed in wine made from grapes inoculated with ochratoxigenic fungi. Similar value (92%) was verified in wine made from grapes naturally contaminated with OTA. Considering all winemaking process, we may suggest that the decreasing of OTA levels was observed mainly due to adsorption of the toxin in cell wall of yeast. Furthermore, the adsorption of the toxin in suspended solids present in wine during the winemaking may be occurred.

Keywords: ochratoxin A, wine, winemaking, mycotoxins reduction

## 1. Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced mainly by *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus ochraceus* fungi. The toxicological effects of this toxin are related to nephrotoxicity, teratogenicity, hepatotoxicity and carcinogenicity (Anninou, Chatzaki, Papachristou, Pitiakoudis, & Simopoulos, 2014). The International Agency for Research on Cancer (IARC) classified OTA as group 2B, considered potentially carcinogenic for humans (IARC, 1993). In 2001, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) has established a provisional tolerable weekly intake of 100 ng / kg in body weight (FAO/WHO, 2001). In the European population, wine is the second largest source of exposure to OTA, after cereal. For this reason it has received a lot more attention, because it imposes risk to human health (SCOOP, 2002). The occurrence of OTA in wines was reported for the first time in Switzerland by Zimmerli & Dick (1995), and since then, its presence has been detected in grapes, musts and wines in many countries of the Mediterranean region such as: France, Portugal, Spain, North Africa and Italy (Remiro, Irigoyen, González-Penas, Lizarraga, & López de Cerain, 2013). In Europe, the limit of OTA for wines (2 µg/L) was established in 2006 (Europe Commission, 2006). In Brazil, the same limit was settled in 2011 (ANVISA, 2011).

Since wine containing OTA can represent risk to the consumer's health, a lot of researches have been done aiming to evaluate the behavior of the toxin during winemaking in order to identify mechanisms that can help reducing the presence of the toxin (Grazioli, Fumi, & Silva, 2006; Fernandes, Ratola, Cerdeira, Alves, & Venâncio, 2007; Ponsone, Chiotta, Combina, Dalcerro, & Chulze, 2009; Anh, Vural, & Bayman, 2011; Esti, Benucci, Liburdi, & Acciaro, 2012; Csutorás, Rácz, Rácz, Futo, & Kiss, 2013). In the major part of this researches, added samples of standard solution of this mycotoxin have been studied (Ponsone et al., 2009; Esti et al., 2012; Csutorás et al., 2013). Csutorás et al. (2013) evaluated the fermentation effects of red wine over the levels of OTA, added in the form of standard solution in the concentration of 4 µg/L and observed a reduction of 90% in the OTA's levels after 90 days of fermentation.



Esti et al. (2012) verified a decrease of 79% in the OTA's levels after 11 days in red wine fermentation, that was elaborated with grape must containing OTA with concentration of 15 µg/L. Ponsone et al. (2009) verified the behavior of OTA during the elaboration of red wine, samples were taken from the following steps: must, fermentation/maceration, after fermentation, malolactic fermentation, after malolactic fermentation and maturation. In this study, Tempranillo and Bonarda grapes received an addition of standard solution of OTA with respectively concentrations of 6 and 0.3 µg/L, to evaluate the behavior of different concentrations of OTA during the winemaking. After 30 days of fermentation, the authors observed a reduction of 86% and 100% of the toxin, on the Tampranillo and Bonarda grapes, respectively.

The behavior of OTA, obtained through the inoculation of the fungus *A. carbonarius* during the elaboration of the red wine was evaluated by Fernandes et al. (2007) and Jiang, Shi, Cheng & Liu (2014). Fernandes et al. (2007) verified a reduction of 75% in the levels of OTA after the main steps of the winemaking (must, alcoholic fermentation/maceration, drawn-off wine, malolactic fermentation and clarification). Jiang et al. (2014) contaminated the grape must with a spore suspension at a concentration of  $1 \times 10^6$  spores/g of *A. carbonarius*, and observed a reduction of up to 92%, in the OTA levels produced by the fungus, after 216 hours of fermentation.

Studies about monitoring OTA levels during the steps of winemaking with grapes naturally contaminated with this toxin are scarce (Grazioli et al., 2006; Anh et al., 2011). Anh et al. (2011) monitored the OTA levels, naturally present in grapes, during the steps of must elaboration, drawn-off wine, end of alcoholic fermentation, end of malolactic fermentation, racking, filtration and after bottling. At the end of the process they could observe a reduction of 53,7% of the toxin (initial concentration: 1.04 µg/L). Grazioli et al. (2006), after evaluating the OTA levels in the steps of must preparation, maceration, drawn-off wine, end of alcoholic fermentation, racking, malolactic fermentation and after bottling, identified a reduction of up to 76% of the toxin (initial concentration: 0.42 µg/L).

Until now, there is no research dedicated to the comparison of the winemaking effects in the OTA levels naturally present in grapes, and produced through the inoculation of the producing fungus. Thus, the aim of this study was to evaluate the OTA's behavior during the steps of Cabernet Sauvignon

winemaking through the following conditions: (A) wine elaborated with grapes inoculated with OTA's producing fungus and (B) wine elaborated with grapes naturally contaminated with OTA.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Grapes**

For each experiment were utilized 1.5 kg of grape wine Cabernet Sauvignon (sugars: 17°Brix) no visible damage and rot. The grape was collected from vineyards in Serra Gaúcha region (latitude 29°S, longitude 51°W), Rio Grande do Sul, Brazil.

### **2.2 Fungal isolation of grapes**

The grapes utilized in the experiments were submitted the mycotoxicological analysis. Ten berries from each bunch were selected randomly e the surface was disinfected with 0.4% sodium hypochlorite for 1 minute and inoculated directly into the surface of Dichloram Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar (5 g/L enzymatic digestion of plant tissues, 10 g/L glucose, 1 g/L monopotassium phosphate, 0.5 g/L magnesium sulfate, 2.0 mg/L de dicloran, 25 mg/L rose Bengal e 15 g/L agar) (Bellí, Bau, Abarca, Ramos, & Bragulat, 2006). Plates were incubated at 25°C for 7 days at darkness and after incubation, all colonies were isolated to Czapek Yeast Extract (CYA) Agar (30 g/L saccharose, 5 g/L yeast extract, 3 g/L de NaNO<sub>3</sub>, 0.5 g/L KCL, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.01 g/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 20 g/L agar) and incubated at 25°C for 7 days (Pitt & Hocking, 1997).

### **2.3 Potential test of toxigenic fungi isolated from grapes**

The ability of OTA production was tested in all isolates fungus. The quatitative analisys was done using Thin Layer Chromatography (TLC) with Charged Coupled Device (CCD) according to the method proposed by Welke, Hoeltz, Dottori, & Noll (2010). In this technique, the isolates were grown in CYA plates for 10 days at 30°C. For each isolate, agar plugs were removed from central and border areas of the colony and extracted with 1 ml of chloroform. The organic extract was colected with support of capilar and aplicated in TLC.

The spots were applied to 1 cm of basis and 1 cm of side of the glass plates coated with silica gel 10 × 10 cm (Macherey-Nagel Pre-coated TLC-plates Sil G-25 HR, Düren, Alemanha). The spots were dried, and the plates developed in solvent system toluene:ethylacetate:formic acid (60:30:10, v/v/v).

#### 2.4 OTA solution Standard

A stock standard solution of OTA, used to identification for TLC and quantification in High-performance Liquid Chromatography (HPLC), was prepared by dissolving 5 mg of pure crystalline OTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) in toluene-acetic acid (99:1, v/v) at a concentration of 50.000 µg/L. The standard solution was kept frozen (-18 °C). The concentration of the OTA stock solution was determined by measuring the UV absorbance at 366 nm and calculated by using the molar extinction coefficient  $\epsilon$  of 544 m<sup>2</sup>/mol. The concentration of working standard solution in toluene-acetic acid (99:1, v/v) was 22.49 µg/mL. The standard solution of OTA used for calibration curve in HPLC, was prepared by dissolving 5 mg of OTA in 100 mL mobile phase user for this technique (acetonitrile:water:acetic acid, 99:99:2, v/v/v ).

#### 2.5 Micro- vinification

The micro-vinification occurred employing the steps commonly used in wineries, to elaborate red wine. The steps for winemaking include: must, fermentation/maceration (reassembly were performed twice daily during the maceration), drawn-off wine, after fermentation, racking and maturation. The sampling was performed according the days described in Figure 1.

##### 2.5.1 Experiment A: Wine made from grapes inoculated with the OTA producer fungus

*Aspergillus carbonarius* (ITAL293, collection belonging to the Food Toxicology Laboratory, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil) that showed high OTA production in vitro, was used as the OTA producer in the study. A spore suspension of 10<sup>6</sup> conídios/mL concentration, was prepared by a colony previously grown for 7 days in CYA. The spore suspension concentration was determined by counting in a Neubauer chamber. The grape berries were stemmed, without causing physical damage. A 30 µL solution spores (10<sup>6</sup>

conídios/mL), were injected randomly on the surface of 1.5 kg grape berries. The incubation was performed at 25°C for 7 days. Subsequently, the berries were used to microvinification, as shown in Figure 1.

#### 2.5.2 Experiment B: Wine made from grapes naturally contaminated with OTA

This experiment was conducted with must sample that showed natural contamination by OTA. The micro-vinification was performed according Figure 1.

### 2.6 Extraction and determination of OTA by HPLC

The determination of OTA during the steps of wine making, was performed by HPLC, with fluorescence detection (FL), according with official method 2001.01 AOAC (*Association of Analytical Communities*). A 10 ml volume of wine sample was diluted with 10 ml solution containing PEG (1%) and NaHCO<sub>3</sub> (5%). After homogenised, 10 ml volume of diluted extract was cleaned up through an Ochratest TM (VICAM, Milford, EUA) immunoaffinity column. The column was washed with 5 ml solution containing NaCl (2.5%) and NaHCO<sub>3</sub> (0.5%), followed by 5 ml distilled water. OTA was eluted with 2 ml methanol. The eluted extract was evaporated under nitrogen stream and reconstituted with 250 µL of the HPLC mobile phase (acetonitrile:water:acetic acid, 99:99:2, v/v/v). A 20 µL volume of reconstituted extract was injected into the chromatographic apparatus Waters e2695 with fluorescence detection (FL) 2475 ( $\lambda_{\text{ex}}=333$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=460$  nm) containing the chromatographic column Waters Xbridge tm Shield RP 18 5µm (4.6x150mm). The organic extracts from samples were automatically and isocratically injected using HPLC mobile phase, eluted at a flow 1.0 mL/min. The OTA identification was performed by measuring peak areas at OTA retention time and comparing them with the relevant calibration curve. The measurement was taken through external calibration method, using a calibration curve of the 7 points (concentration 0.5 - 6 µg/L) of OTA,  $r=0.997$  and a calibration curve of the 5 points (concentration 0.1 – 0.5 µg/L) of OTA,  $r=0.995$ .

### 2.7 Method Validation

Validation of the analytical method was based on the following parameters: recovery percentage, precision, limit of detection (LOD) and limit of

quantification (LOQ). The sensitivity of the HPLC technique was evaluated by determining LOD for OTA, which was obtained from the smallest detectable signal toxin. The LOQ was determined to being the value 10 times higher than that found for the LOD (ICH, 1996). Recovery was determined by analyzing of wine samples spiked with 1.5; 2.0 e 3.5 µg/L were of OTA. This procedure was done in triplicate. The accuracy was assessed by the repeatability and intermediate precision. For repeatability, 5 repetitions of standard OTA solution read levels of 1.5; 2.0; 2.5; 3.0 and 4.0 µg/L, were performed on the same day. The intermediate precision was determined by one read for day, of standard OTA solution, in the same levels used to avaliate repeatability, in three differents days. Then, the accuracy was calculated by the coefficient of variation (CV) for the determination of the intra-day and inter-day.

## 2.8 Statistical analysis

To determine the significance of the reduction between the OTA wine production stages in each experiment, analysis of variance (ANOVA;  $p < 0.001$ ) was applied, followed by a Tukey test.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Method Validation

Table 2 presents a percentage of recovery calculated for three different concentrations of OTA in red wines. The recovery varied from 87 to 90%. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) was 0.06 and 0.6 µg/L, respectively.

The results obtained are represented on table 3. This table shows the coefficients of variation (CV) for repeatability (determined repetitions of OTA made in the same day), where the values of CV oscillated from 3.1% to 7.9%, and the intermediary precision (OTA determination accomplished in different days), where the variation checked was from 2.2% to 7.3%.

### 3.2 Isolated Fungi from grapes destined for winemaking

Fungi were isolated from grapes utilized for these experiments, and evaluated for its potential toxigenic. A total of eight fungal isolates were

obtained through incubation of grapes using CYA growth medium. Among those one species has shown to be a producer of OTA, belonging to *Aspergillus* genus. Serra, Mendonça & Venâncio, (2005) analyzed the fungal microbiota of healthy grapes, in other words, grapes without damage or visible rot; those fruits were utilized to produce wine in Portugal. The authors identified two OTA producing species, and these belong to the genus *Aspergillus*. *Aspergillus* representatives are mainly responsible for the presence of OTA in wine. Among the ochratoxigenic species present in grapes, *A. niger* and *A. carbonarius* are those with higher incidence and greater ability to produce OTA (Cabañes, Accensia, Abarca, Castelláa, Minguetz, et al. 2002; Bellí et al., 2006). Several researches report the presence of fungi that produce OTA in vineyards of traditional winemaker countries (Bellí et al., 2006; Leong, Hocking, & Scott, 2006; Lucchetta, Bazzo, Dal Cortivo, Stringher, & Bellotto, 2010; Covarelli, Beccari, Marini & Tosi, 2012; Barberis, Merlera, Reynoso, Chulze, & Torres, 2014).

### 3.3 Evaluation of winemaking steps related to OTA levels

This is the first research that evaluates the effects of OTA levels over the Cabernet Sauvignon winemaking steps, one of the most scattered variety in the world, and the most grown *Vitis vinifera* in Brazil. The results showing the behavior of OTA during the red winemaking steps for each experiment are described in Figure 2.

In experiment A ( $p=0.0295$ ), grapes were contaminated with *A. carbonarius* spores and it is observed that during the winemaking steps the bigger quantity of OTA was found in grape must. The higher quantity of OTA found in the must is justified by the utilization of grapes inoculated with an isolate of *A. carbonarius*, which showed a high potential to produce OTA. Fernandes et al. (2007) evaluating the behavior of OTA during the red winemaking, by inoculating *A. carbonarius* directly in the grapes, also found higher concentration of the toxin in the must, if compared to the next step, the maceration/fermentation.

The presence of OTA in the must utilized for experiment B ( $p=0.0120$ ), which did not receive an inoculation by the fungi, is justified by the natural presence of ochratoxin fungi in grapes utilized for the research. This fact is

consistent with the results found by Jiang et al. (2014), that evaluated the effect of different concentrations of *A. carbonarius* spores during the winemaking and the contamination by OTA. The authors detected the presence of *A. carbonarius* and the presence of OTA (0.12 µg/L) in the must that did not receive inoculation by fungus. In this experiment, the highest quantity of OTA was identified in the fermentation/maceration, in comparison to must. During maceration, a lot of compounds are extracted from the marc (peel and seeds), including the OTA. A similar result was observed by Jiang et al. (2014), during the winemaking of a wine naturally contaminated by the toxin, where the lowest levels of OTA were found in the must (0.12 µg/L) and higher values in the maceration (0.35 µg/L). Higher OTA concentrations in the maceration step, in comparison to other steps of the process, were also found by Grazioli et al. (2006) and Anh et al. (2001).

Drawn-off wine is an oenological practice very important for the control of OTA levels during the production of red wine. At this stage, there is a liquid fraction (wine) separation, from the solid fraction (marc). This processing phase was relevant in reducing the presence of the toxin in the experiments, if compared to step 2 (fermentation / maceration). The reduction in this step was equal to 73 and 70% for Experiments A and B respectively. According to Solfrizzo, Avantaggiato, Panzarini & Visconti (2010) there is an average reduction, between 50 - 65% of OTA, which is retained in the grape marc after the drawn-off, during microvinification assays. Grazioli et al. (2006) found a 30% decrease (concentration of 0.81 µg/L) after the drawn-off of the Negroamaro grape wine in Italy. Lower values were found by Anh et al. (2011), a decrease of 17% (concentration: 1.04 µg/L) and 21.9% (concentration: 1.38 µg/L) in two vinifications of Cabernet Sauvignon produced in different regions of Turkey. Ponsone et al. (2009), in Argentina, observed a reduction of 62 and 46%, after the drawn-off, by adding standard OTA solution in the must from Tempranillo grape (concentration: 6 µg/L) and Bonarda grape (concentration: 0.3 µg/L).

Fermentation is the most important step in the development of a wine, so, many authors evaluated the effect of this step on OTA levels, whether added as standard solution to the must, naturally present in grapes or obtained by inoculation of the producer fungus (Ponsone et al., 2009; Esti et al., 2012; Csutorás et al., 2013; Jiang et al., 2014). The decrease of OTA, verified in this

research, after completion of step 4 (after fermentation) was of 81 and 70% for experiments A and B, respectively, where the drawn-off, which occurred during fermentation, was the main driver of this reduction. Thus, to evaluate the behavior of OTA during fermentation of red wine, the stages of maceration and drawn-off wine be considered, which as mentioned earlier, affect toxin behavior.

Racking is a cleaning operation, where the wine, when ready, is transferred from a container to another, to separate the sediments (sludge). Significant reduction values were also observed in this step, when compared to the previous stage: after fermentation. In this research, the largest reduction observed was 66% in experiment B, in relation to the previous step. Grazioli et al. (2006) observed a reduction of 30% in OTA (concentration of 0.81  $\mu\text{g/L}$ ) after this step, in naturally contaminated samples. At the end of this racking step, very low amounts of OTA reduction were observed.

After the conclusion of maturation, significant amounts of total reduction of OTA have been observed in both experiments. In the experiment A (wine made from grapes inoculated with OTA producer fungus), there was a reduction of 92% in OTA (concentration: 2.34  $\mu\text{g/L}$ ). Fernandes et al. (2007) detected a reduction of up to 80% of OTA (concentration: 4.12  $\mu\text{g/L}$ ) after the main stages of red wine production produced from grapes infected with *A. carbonarius*.

In experiment B, with must naturally contaminated with OTA, the reduction was 92.6% (concentration: 1.34  $\mu\text{g/L}$ ). Grazioli et al. (2006) identified a reduction of up to 76% in OTA (concentration: 0.81  $\mu\text{g/L}$ ) after the conclusion of the Negroamaro red wine winemaking. Anh et al. (2011) observed a reduction of 53.7% of OTA (concentration: 1.04  $\mu\text{g/L}$ ) after the conclusion of the main steps involved in the preparation of red wine.

The decrease in OTA, observed during the winemaking, can occur in two ways: (i) the biodegradation related to hydrolysis of the amide bond that unites ochratoxin  $\alpha$  ( $\text{Ota}$ ) to phenylalanine molecule, turning it into a non-toxic compound (Bejaoui, Matheiu, Taillandier, & Lebrihi, 2006; Fuchs, Sontag, Stidl, Ehrlich, Kundi, & Knasmuller, 2008; Ambrunhosa, Inês, Rodrigues, Guimarães & Pereira, 2014); and / or (ii) the adsorption process by which the toxin present in wine is adhered to the suspended solids, such as yeasts, peels and seeds, which are then eliminated in steps of drawn-off, racking, and also with the clarification / filtration step in which is capable of carrying the toxin with it (Meca,



Blaiotta & Ritieni, 2010; Quintela, Villarán, López de Armentia, & Elejalde, 2012; Petruzzi, Sinigaglia, Corbo, Beneduce & Bevilacqua, 2012; Piotrowska, Nowak & Czyzowska, 2013). In this research, the reduction in toxin levels could be observed especially in the steps where there was the separation of solid and liquid parts, including drawn-off and racking, which suggests that the reduction took place by adsorption of the OTA solids removed during the winemaking.

#### **4. Conclusion**

The winemaking process decreased the concentration of OTA, regardless the initial concentration in both experiments, being drawn-off and racking the most effective ways for reducing the presence of the toxin. The adsorption of the toxin to the solids in suspension, present in wine during the elaboration, proved to be the main mechanism of reducing it. In both experiments, similar percentage values, (higher than 90%), have been observed in the reduction of OTA. In the future, practices as adding exogenous tannins and the utilization of oak chips during the production of red wine could be evaluated, to verify its influence over OTA levels.

#### **Acknowledgments**

This research was supported by Coordination for the Improvement of Higher Level, National Counsel of Technological and Scientific Development and Research Foundation of Amparo to the Rio Grande do Sul State.

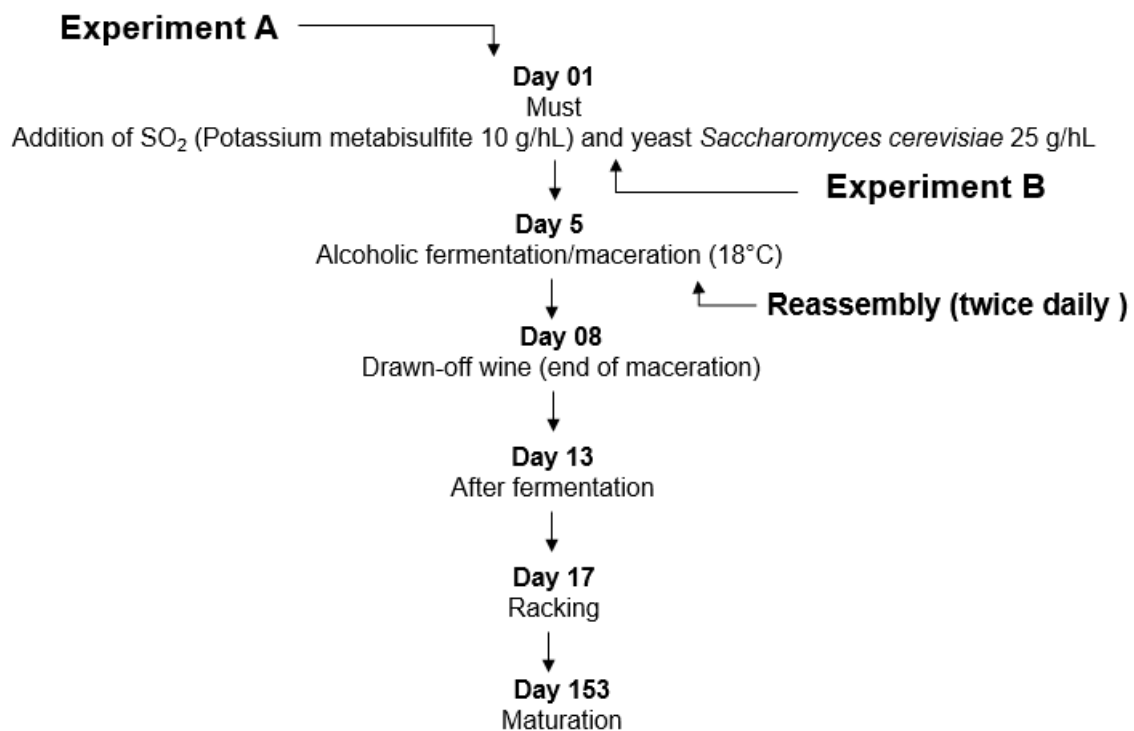


Figure 1. Flowchart of micro vinification of red wine with indication of two different experiments: (A) Wine made from grapes inoculated with the OTA producer fungus; (B) Wine made from grapes naturally contaminated with OTA.

Table 2 - Recovery of OTA in red wine in different concentrations

OTA $\mu\text{g/L}$	Recovery / ( $\mu\text{g/L}$ )	Recovery / (%)	CV/ (%) <sup>a</sup>
1.5	1.4	87	7.2
2	1.8	90	12.2
3.5	3.1	89	7.3

<sup>a</sup> Coefficient of variation

Table 3 - Precision of OTA determination in HPLC.

OTA $\mu\text{g/L}$	Intra-day (n=25) <sup>a</sup> CV <sup>b</sup> (%)	Inter-day (n=15) <sup>a</sup> CV <sup>b</sup> (%)
1.5	7.9	2.2
2	6.2	7.3
2.5	3.3	3.6
3	3.5	3.5
4	3.1	4

<sup>a</sup> number of injections performed in HPLC

<sup>b</sup> coefficient of variation

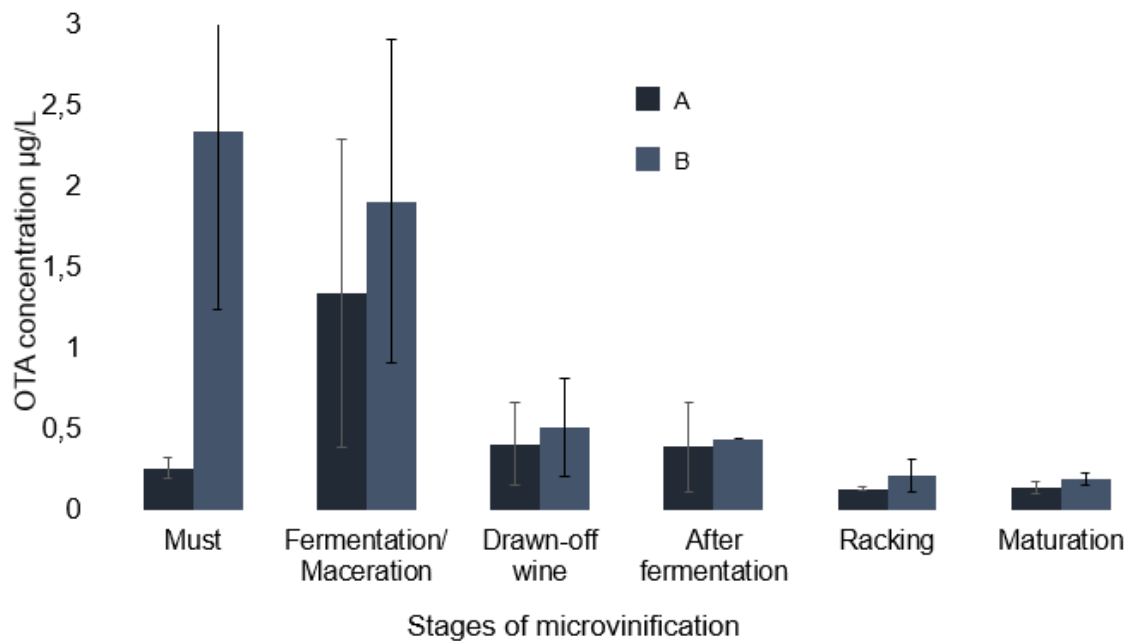


Figure 2. Behavior of OTA during different experiments. (A) Wine made from grapes inoculated with the OTA producer fungus; (B) Wine made from grapes naturally contaminated with OTA.

## REFERENCES

- BRASIL. (2011) *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 07 de janeiro de 2011. Regulamento Técnico sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos*. Poder Executivo, Brasília, DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- Ambrunhosa, L., Inês, A., Rodrigues, A. I., Guimarães, A., Pereira, A. L., Parpot, P., Mendes Faia, A., & Venâncio A. (2014). Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 45–52.
- Anh, R. E., Vural. N., & Bayman, M. (2011). Removal of Ochratoxin A (OTA) from Naturally Contaminated Wines During the Vinification Process. *Journal of the Institute Of Brewing*, 0628-1011.
- Anninou, N., Chatzaki, E., Papachristou, F., Pitiakoudis, M., & Simopoulos, C. (2014). Mycotoxins' Activity at Toxic and Sub-Toxic Concentrations: Differential Cytotoxic and Genotoxic Effects of Single and Combined Administration of Sterigmatocystin, Ochratoxin A and Citrinin on the Hepatocellular Cancer Cell Line Hep3B. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 11, 1855-1872.
- Barberis, M. G., Merlera, G. G., Reynoso, M. M., Chulze, S. N., & Torres, A. M. (2014). Factors affecting distribution and abundance of *Aspergillus* section *Nigri* in vineyard soils from grapevine growing regions of Argentina. *Journal Science Food Agriculture*, 94, 3001-3007.
- Bejaoui, H., Matheiu, F., Taillandier, P., & Lebrihi, A. (2006). Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *F. E. Microbiological Societies*, 255, 203–208.
- Bellí, N., Bau, M., Abarca, M.L., Ramos, A.J. & Bragulat, M.R. (2006). Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S40–S45.
- Blateyron, L., Bontemps, E., Granès, D., & Rosseau, J., (2006). Conhecimentos recentes sobre a OTA. *Revista de Viticultura e Enologia*.
- Cabañes, F. J., Accensia, F., Bragulata, M. R., Abarca, M. L., Castelláa, G., Minguetz, S., et al. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*, 3(79), 213-215.
- Chiotta, M. L., Ponsone, M.L., Combina, M., Torres, A.M., & Chulze, S. N. (2009). *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 137- 141.

- Covarelli, L., Beccari, G., Marini A., & Tosi L. (2012). A review on the occurrence and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A in dehydrated grapes, non-fortified dessert wines and dried vine fruit in the Mediterranean area. *Food Control*, 26, 347-356.
- Csutorás, C., Rácz, L., Rácz, K., Futo, P., & Kiss, A. (2013). Monitoring of ochratoxin A during the fermentation of different wines by applying high toxin concentrations. *Microchemical Journal*, 107, 182–184.
- Esti, M., Benucci, I., Liburdi, K., & Acciaro, G. (2012). Monitoring of ochratoxin A fate during alcoholic fermentation of wine-must. *Food Control*, 27, 53-56.
- European Commission. (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L, 364, 5-24.
- Fernandes, A. Ratola, N., Cerdeira. A., Alves, A., & Venâncio, A. (2007). Changes in Ochratoxin A Concentration during Winemaking. *American Society for Enology and Viticulture*, 58, 92-96.
- Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO). *Ochratoxin A. In Safety evaluations of specific mycotoxins*. Prepared by the 56th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, Geneva, 2001.
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M., & Knasmuller, S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1398–1407.
- 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, S93–S96.
- International Conference on Harmonization, ICH (1996). Guidance for Industry. Q2B validation of analytical procedures: Methodology.
- International Agency for Research on Cancer, IARC. (1993). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Summary of data reported and evaluation. *IARC Science Publications*, 56, 489-521.
- Jiang, C., Shi, J., Cheng, Y., & Liu, Y. (2014). Effect of *Aspergillus carbonarius* amounts on winemaking and ochratoxin A contamination. *Food Control*, 40, 85-92.
- Klich, M. A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species.
- Leong, S. L., Hocking, A. D., & Scott, E. S. (2006). Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian

- Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology*, 110(3), 209-216.
- Lucchetta, G., Bazzo, I., Dal Cortivo, G., Stringher, L., Bellotto, D., Borgo, M., & Angelini, E. (2010). Occurrence of Black Aspergilli and Ochratoxin A on Grapes in Italy. *Toxins*, 2, 840-855.
- Meca, G., Blaiotta, G., & Ritieni, A. (2010). Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control*, 21(4), 579-583.
- Petruzzi, L., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., Beneduce, L., & Bevilacqua, A. (2012). Ochratoxin A removal by *Saccharomyces cerevisiae* strains: effect of wine-related physicochemical factors. *Society of Chemical Industry*, 93, 2110–2115.
- Piotrowska, M., Nowak, A., & Czyzowska, A. (2013). Removal of ochratoxin A by wine *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Eur. Food Res. Technol.*, 236 441–447.
- Pitt J. I. & Hocking A.D. (1997). *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic & Professional, London.
- Ponsone, M., Chiotta, M., Combina, M., Dalcero, A., & Chulze, S. (2009). Fate of ochratoxin A content in Argentinean red wine during a pilot scale vinification. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(4), 245-250.
- Quintela, S., Villarán, M.C., Armentia, I.L., Elejalde, E. (2013). Ochratoxin A removal in wine: A review. *Food Control*, 30, 439-445.
- Remiro, R., Irigoyen, A., González-Penas, E., Lizarraga, E., & López de Cerain, A. (2013). Levels of ochratoxins in Mediterranean red wines. *Food Control*, 32, 63-68.
- Scientific Cooperation, SCOOP. Assessment of Dietary Intake of Ochratoxin A by The Population of EU Member States. *Reports on tasks for scientific cooperation*, January, 2002.
- Serra, R., Mendonça, C., & Venâncio, A. (2005). Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. *Society for Applied Microbiology*, 42, 42–47.
- Solfrizzo, M., Avantaggiato, G., Panzarini, G., & Visconti, A. (2010). Removal of ochratoxin A from contaminated red wines by repassage over grape pomaces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 317-323.
- Visconti, A. (2008). Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Additives and Contaminants*, 25 (02), 193-202.
- Welke, J. E., Hoeltz, M., Dottori, H. A., & Noll, I. B. (2010). Determination of Ochratoxin A in Wine by High-Performance Thin-Layer Chromatography



using Charged Coupled Device. *Journal Braziliam Chem. Society*, 21, 441-446.

Zimmerli, B., & Dick, R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 666(1), 85-99.

#### 4 DISCUSSÃO GERAL

Desde 2011, a legislação brasileira prevê limites toleráveis de OTA em vinhos e sucos de uva. Este limite está fixado em 2 µg/L (ANVISA, 2011). Vinhos brasileiros já foram avaliados quanto a presença de OTA (ROSA et al., 2004; SHUNDO et al., 2006; WELKE et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011; HOETLZ et al., 2012), e valores acima do estabelecido pela legislação foram encontrados por Welke et al. (2010), na concentração de 4,5 µg/L .

A primeira precaução a ser tomada, para evitar contaminação por OTA em vinhos, é somente utilizar uvas sadias na vinificação. Rousseau, (2004) afirma que pode-se reduzir 98% da contaminação selecionando as uvas que vão ser utilizadas, removendo os grãos ou cachos que apresentam danos físicos ou alguma contaminação aparente. No entanto, apesar de parecer uma alternativa simples, muitas vezes é inviável para vinícolas que trabalham com grandes quantidades de uva. Por conta disso, pesquisas se concentram em encontrar meios de reduzir a OTA durante o processo de elaboração do vinho (BEJAOUI et al., 2006; LEONG et al., 2006; PONSONE et al., 2009; ANH et al., 2011; ESTI et al., 2012; QUINTELA et al., 2012; CSUTORÁS et a., 2013; AMBRUNHOSA et al., 2014). Verificar a influência do processo de elaboração de vinho, sobre os níveis da toxina, é uma importante ferramenta para determinar ponto críticos de controle, em que esse perigo químico pode ser minimizado ou eliminado.

A maceração é uma etapa fundamental na elaboração do vinho tinto, que pode levar horas, ou até mesmo dias para ser concluída (GIOVANINNI; MANFROI, 2009). Esta etapa também é muito importante para a transferência da OTA das uvas para o mosto. No experimento B, em que as uvas estavam

naturalmente contaminadas por OTA após o esmagamento e extração do mosto, a toxina foi detectada (0,26 µg/L), no entanto, após 5 dias em contato com a casca, níveis mais elevados de OTA foram encontrados (1,34 µg/L).

Não há na literatura estudos sobre a avaliação da influência do tempo de maceração sobre níveis de OTA, no entanto, sabe-se que a passagem de OTA ao mosto, ocorre nas primeiras horas da vinificação, por duas vias diferentes (BLAYTERON et al., 2006; JIANG et al., 2014). A OTA pode estar naturalmente presente na casca da uva e ser extraída juntamente com os compostos fenólicos e aromáticos durante a maceração (BLAYTERON et al., 2006), ou ser produzida por fungos ocratoxigênicos presentes no mosto, quando condições favoráveis forem observadas, como o teor alcoólico abaixo de 4% e consequentemente teores mais elevados de açúcar (JIANG et al., 2014; JIANG et al., 2015).

Vinhos brancos apresentam valores de contaminação por OTA mais baixos, quando comparados aos vinhos tintos (BRERA et al., 2008). Tradicionalmente, na vinificação em branco, a eliminação da casca é a primeira etapa de elaboração, ou seja, as uvas não são maceradas, e após ocorre uma etapa de clarificação do mosto. Estas duas operações auxiliam na prevenção da contaminação por OTA, o que pode explicar por que vinhos brancos são menos contaminados que os tintos (ROSSEAU, 2004; BLAYTERON et al., 2006; MECA et al., 2010).

A etapa de descuba é utilizada para retirar do processo as cascas e sementes, após concluída a maceração, e é também uma importante etapa para reduzir os níveis de OTA presente no vinho. No experimento em que a uva recebeu inoculação do fungo produtor, A, observou-se uma redução de

73% da concentração inicial de OTA (2,34 µg/L). Segundo Solfrizzo et al. (2010), esta redução ocorre em função da OTA ficar retida nas cascas e sementes eliminadas nesta etapa.

A fermentação alcoólica é a etapa em que níveis de OTA podem ser minimizados. A redução da toxina observada após fermentação foi de 81 e 70% para os experimentos A e B, respectivamente. Reduções significativas da OTA também foram encontradas por diversos autores, após concluída esta etapa (PONSONE et al., 2009; ESTI et al., 2012; CSUTORÁS et al., 2013; JIANG et al., 2014). Um dos fatores que contribuem para a diminuição da OTA durante a fermentação do vinho tinto é a biodegradação da toxina provocada pelo metabolismo da levedura ou adsorção da OTA à parede celular da levedura. Além disso, a descuba é normalmente realizada antes do término da fermentação alcoólica. Neste procedimento o bagaço (parte sólida composta por sementes e cascas) é separado da parte líquida (mosto/vinho), arrastando consigo a OTA, que pode ficar retida nesses compostos sólidos.

Muitos autores estudam métodos de otimizar a redução de OTA durante a fermentação alcoólica do mosto de diferentes cultivares (CARIDI et al., 2006; CECHINI et al., 2006; MECA et al., 2010; AMBRUNHOSA et al., 2014; FIORI et al., 2014; JIANG et al., 2015). Meca et al. (2010) testaram a habilidade de 16 isolados de *S. cerevisiae* atuarem na remoção da OTA durante a fermentação do mosto da uva Moscato, por meio da adsorção à parede celular da levedura, procurando identificar em qual espécie a adsorção é maior (AMBRUNHOSA et al., 2014). Ambrunhosa et al. (2014) avaliaram a capacidade da bactéria láctica *Pediococcus parvulus*, isolada de vinhos do Douro, Portugal, biodegradar a OTA presente no mosto extraído da uva Red Globe. Após 6 dias de incubação,

sem a presença de álcool, observou-se uma redução de 80% da toxina e um aumento na presença ocratoxina  $\alpha$  (Ota). Além disso, os autores sugerem que a inoculação de bactérias lácticas durante a fermentação alcoólica (co-inoculação), podem contribuir para a redução da contaminação por OTA, através da biodegradação da toxina em Ota.

Considerando que a fermentação é uma etapa importante para a redução e OTA, pode-se sugerir que o suco de uva é mais vulnerável à contaminação pela toxina, por não passar por este processo. Fiori et al. (2014) testaram a capacidade de 4 espécies de leveduras não fermentativas e de baixa capacidade de fermentação, reduzirem a OTA presente no suco de uva. Os autores concluíram que o uso desses micro-organismos pode ser considerado um eficiente auxiliar tecnológico na produção de suco de uva, atuando como bioadsorventes da OTA.

Outra etapa fundamental, em que pode ser observada redução de OTA, foi a trasfega. Esta etapa pode ser empregada em diversos momentos durante a vinificação (GIOVANINNI; MANFROI, 2009). A trasfega realizada após a fermentação alcoólica separa as borras finas formadas na fermentação, do líquido. No experimento B, em que a OTA estava naturalmente presente, obteve-se uma redução de 66,6% da OTA nesta etapa. Valor elevado de redução também foi observado no experimento B, em que as uvas receberam inoculação do fungo produtor, com 52,6% de redução. Grazioli et al. (2006) avaliou a influência desta etapa, em vinho contaminado naturalmente por OTA, e verificou uma redução de 30%.

Ao final da vinificação, os percentuais de redução encontrados nos experimentos realizados foram de 92% para o experimento A, em que as uvas

foram contaminadas com fungo e 92,6% no experimento B, cujo vinho foi produzido com uvas naturalmente contaminadas. Nos dois experimentos realizados foram observados percentuais mais elevados de redução quando comparado a outros autores, que também avaliaram o comportamento da OTA durante as etapas de elaboração do vinho, e identificaram uma redução máxima de 80% (GRAZIOLI et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; ANH et al., 2011).

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permite concluir que o processo de elaboração do vinho diminuiu a concentração de OTA, independente da concentração inicial, sendo as etapas de descuba, pós fermentação e trasfega, as mais eficientes nesta redução. A adsorção da toxina aos sólidos em suspensão presentes no vinho durante a elaboração, mostrou ser a principal mecanismo de redução da mesma. Nos dois experimentos realizados, foram verificados valores percentuais de redução de OTA muito similares, superiores a 90%. Futuramente, práticas como a adição de taninos exógenos e o uso de chips de carvalho, durante a elaboração do vinho tinto, poderiam ser avaliados quanto a influência dos mesmos, sobre os níveis de OTA.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Regulamento Técnico sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, Resolução RDC Nº 7, fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, n. 37, 2011.
- ALTIOKKA, G. et al. Determination of Ochratoxin A in Turkish wines. **Journal of Food and Drug Analysis**. v. 17, n. 6, p 467-473, 2009.
- AMBRUNHOSA L. et al. Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. **International Journal of Food Microbiology**. v. 188, p. 45–52, 2014.
- ANCÍN-AZPILICUETA, C. et al. Current knowledge about the presence of amines in wine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 48, p. 257-275, 2008.
- ANH, R. E., et al. Removal of Ochratoxin A (OTA) from Naturally Contaminated Wines During the Vinification Process. **Journal of the Institute Of Brewing**, p. 0628-1011, 2011.
- ANNINO N. et al. Mycotoxins' Activity at Toxic and Sub-Toxic Concentrations: Differential Cytotoxic and Genotoxic Effects of Single and Combined Administration of Sterigmatocystin, Ochratoxin A and Citrinin on the Hepatocellular Cancer Cell Line Hep3B. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. v. 11, p. 1855-1872, 2014.
- AVELLONE, G. et al. Effects of moderate Sicilian red wine consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 60, p. 41–47, 2006.
- AZEVEDO L. C. et al. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. **Química Nova**. v. 30, p. 1968-1975, 2007.
- BARBERIS M. G. et al. Factors affecting distribution and abundance of *Aspergillus section Nigri* in vineyard soils from grapevine growing regions of Argentina. **J. Sci. Food Agric**. v.94, p. 3001-3007, 2014.
- BATTILANI, P. et al. Critical control points for ochratoxin A control in the grape-wine chain. **Journal of Plant Pathology**. v. 85, p. 285, 2003.
- BATTILANI, P. et al. Mapping of *Aspergillus section Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. **International J. Food Microbiology**, v.111, p.S72–S82, 2006.
- BAYMAN P.; JAKER J. L. Ochratoxins: A global perspective. **Mycopathologia**. v. 162, p. 215–223, 2006.



BEJAOUI, H. et al. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. **F. E. Microbiological Societies**, v. 255, p. 203–208, 2006.

BELLI N. et al. Skin damage, high temperature and relative humidity as detrimental factors for *Aspergillus carbonarius* infection and ochratoxin A production in grapes. **Food Control**. v. 18, p. 1343-1349, 2007.

BELLÍ N. et al. Bragulat. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**. v. 111, p. S40–S45, 2006.

BELLI, N. et al. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, n.6, p.591-594, 2004.

BERTELLI, A. A. A.; DAS, D. K. Grapes, wines, resveratrol, and heart health. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 54, p. 468–476, 2009.

BLAYTERON L. et al. **Conhecimentos recentes sobre OTA**. Revista internet de viticultura e enologia, 2006. Revisão de publicações. Online. Disponível em: [www.infowine.com](http://www.infowine.com). Acesso em: 5 mar 2015.

BRERA, C. et al. Ochratoxin A contamination in Italian wine samples and evaluation of the exposure in the Italian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p.10611-10618, 2008.

CABAÑES, F.J. et al. Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. **Toxins**, v. 2, p. 1111-1120, 2010.

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

CARIDI A. et al. Ochratoxin A removal during winemaking. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 122–126, 2006.

CECHINNI F. et al. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. **Food Microbiology**. v. 23, p. 411–417, 2006.

CHIODINI A. M. et al. Ochratoxin A Contents in Wine: Comparison 1 of Organically and Conventionally Produced Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7399-7404, 2006.

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

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (EC). No 1881/2006 of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L 364, 5–24, 2006.

CORONEL M. B. et al. Exposure assessment to ochratoxin A in Catalonia (Spain) based on the consumption of cereals, nuts, coffee, wine, and beer. **Food Additives and Contaminants**. v. 29, p. 979–993, 2012.

CSUTORÁS C. et al. Monitoring of ochratoxin A during the fermentation of different wines by applying high toxin concentrations. **Microchemical Journal**. v. 107, p. 182–184, 2013.

DACHOUPAKAN C. et al. Study of the phenotypic and genotypic biodiversity 1 of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 14–23, 2009.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas, 2014. Disponível em: <http://www.cnpv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/>. Acesso em: 5 mar, 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). O Brasil vitivinícola: regiões produtoras, 2015. Disponível em: <http://www.cnpv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/>. Acesso em: 5 mar, 2015.

ESTEBAN A. et al. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **Food Microbiology**. v. 23, p. 634-640, 2006.

ESTI M. et al. Monitoring of ochratoxin A fate during alcoholic fermentation of wine-must. **Food Control**, v. 27, p. 53-56, 2012.

FERNANDES A. et al. Changes in Ochratoxin A Concentration during Winemaking. **American Society for Enology and Viticulture**, v. 58, p. 92-96, 2011.

FIORI S. et al. Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. **International Journal of Food Microbiology**, v.189, p. 45-50, 2014.

FRISVAD, J. C. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**. v. 50, p. 23-43, 2004.

FUCHS S. et al. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 1398–1407, 2008

GIOVANNINI E.; MANFROI V. Viticultura e Enologia. Elaboração de grandes vinhos nos *terroirs* brasileiros. Bento Gonçalves, IFRS, p:344, 2009.

HOELTZ M. et al. Ocratoxina A: análise da qualidade de vinhos brasileiros e importados. **Braz. J. Food Technol.**, p. 58-63, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA) Agosto 2013**. Disponível em: <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>. Acesso em: 4 mar 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO<sup>a</sup> (IBRAVIN). **Brasil Vitivinícola. Panorama Geral 2014**. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php>. Acesso em: 5 dez 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO<sup>b</sup> (IBRAVIN). **Brasil Vitivinícola. Regiões produtoras, 2014**. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php>. Acesso em: 5 dez 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO<sup>c</sup> (IBRAVIN). **Brasil Vitivinícola. História do vinho no Brasil**. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php>. Acesso em: 5 dez 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO<sup>d</sup> (IBRAVIN). **Brasil Vitivinícola. Dados estatísticos, 2013**. Disponível em: <http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php>. Acesso em: 5 dez 2014.

INTERNATIONAL ORGANISATION OF WINE AND VINE (OIV). **Statistical publications**. Disponível em: <http://www.oiv.int/oiv/info/enpublicationsstatistiques>. Acesso em: 8 fev., 2015.

JIANG C. et al. Effect of *Aspergillus carbonarius* amounts on winemaking and ochratoxin A contamination. **Food Control**. v. 40, p. 85-92, 2014.

JIANG C. et al. Effect of sulfur dioxide and ethanol concentration on fungal profile and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* during wine making. **Food Control**, v. 47, p. 656-663, 2015.

KARBANCIOLU-GULER, F.; HEPERKAN, D. Natural occurrence of ochratoxin A in dried figs. **Analytica Chimica Acta**, in press, 2008.

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

KLICH M. A. Identificatin of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands, 2002.

KUMAR M. et al. Apoptosis and lipid peroxidation in ochratoxin A- and citrinin-induced nephrotoxicity in rabbits. **Toxicology and Industrial Health**. v.20, p. 90-98, 2014.

KURTBAY A.M. et al. Reduction of Ochratoxin A Levels in Red Wine by Bentonite, Modified Bentonites, and Chitosan. **J. Agric. Food Chem.** v. 56, p. 2541–2545, 2008.

LASRAM S. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic black Aspergillus species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Control**, v. 25, p. 75-80, 2012.

LEONG S. L. et al. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian Aspergillus carbonarius and A. niger isolates on a simulated grape juice medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 209-216, 2006.

LUCCHETTA et al. Occurrence of Black Aspergilli and Ochratoxin A on Grapes in Italy. **Toxins**, v. 2, p. 840-855, 2010.

MARTUSCELLI M. et al. Biogenic amines content as a measure of the quality of wines of Abruzzo (Italy). **Food Chemistry**. v. 140, p. 590–597, 2013.

MECA G. et al. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. **Food Control**. v. 21, p. 579–583, 2010.

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

NG, W. et al. Ochratoxin A in wine and grape juice sold in Canadá. **Food Additives and Contaminants**, v.21, p.971-981, 2004.

NGUYEN, M.T. et al. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. **Food Chemistry**, v.105, n.1, p.42-47, 2007.

OTTENEDER, H.; MAJERUS, P. Occurrence of Ochratoxin A in wines and its geographical origin. **Food Additives and contaminants**, v. 17, p. 793-798, 2000.

PAZOS, M. et al. Physicochemical properties of natural phenolics from grapes and olive oil by products and their antioxidant activity in frozen horse mackerel fillets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 366–373, 2006.

PENA A. et al. Ochratoxin A survey in Portuguese wine by LC–FD with direct injection. **Talanta**. v. 82, p. 1556–1561, 2010.

PITT J. I.; HOCKING A.D. Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic & Professional, London, 1997.

PLATZ, E. A. et al. Alcohol intake, drinking patterns, and risk of prostate cancer in a large prospective cohort study. **American Journal of Epidemiology**. v. 159, p. 444–453, 2004.

PONSONE M.L. et al. Fate of ochratoxin A content in Argentinean red wine during a pilot scale vinification. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 41, p. 245-250, 2009.

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

QUINTELA, S. et al. Ochratoxin A in Spanish exportation wine market. **Food Control**, v. 25, p. 501- 504, 2012.

QUINTELA S. et al. Ochratoxin A removal in wine: A review. **Food Control**. v. 30, p. 439-445, 2013.

REMIRO R. et al. Quantification of ochratoxin A and five analogs in Navarra red wines. **Food Control**, v. 27, p. 139-145, 2012.

REMIRO R. et al. Levels of ochratoxins in Mediterranean red wines. **Food Control**, v. 32, p. 63-68, 2013.

RENAUD, S.;DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**. v. 339, p. 1523–1526, 1992.

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

RIBEREAU-GAYON P. et al. The microbiology of wine and vinification. In P. Ribereau-Gayon (Ed.). *Handbook of enology* (2nd ed.) (Vol. 1). Chichester, England: Wiley, 2006.

ROCHA E. B. et al. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**. v. 36, p. 159-165, 2014.

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

ROSSEAU J. Ocratoxina A nos vinhos: estado do conhecimento. **Revista Técnica do Vinho**, 2004.

RUSANOVA, T. Y. et al. Non-instrumental immunochemical tests for rapid ochratoxin A detection in red wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 653, p.97- 102, 2009.

SARIGIANNIS Y. et al. Ochratoxin A levels in Greek retail wines. **Food Control**, v. 42, p.139-143, 2014.

Scientific Cooperation, SCOOP. Assessment of Dietary Intake of Ochratoxin A by The Population of EU Member States. **Reports on tasks for scientific cooperation**, January, 2002.

SERRA R. et al. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. **The British Mycological Society**. v. 110, p. 71–78, 2006.

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

SOLFRIZZO M. et al. Removal of Ochratoxin A from Contaminated Red Wines by Repassage over Grape Pomaces. **J. Agric. Food Chem.** v. 58, p. 317–323, 2010.

SUN G. et al. Botanical phenolics and brain health. **Neuromolecular Medicine**. v. 10, p. 259–274, 2008.

TANIWAKI,M.H.: SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia do ITAL, 82p, 2001.

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

VALERO A, et al. Survey: ochratoxin A in European special wines. **Food Chemistry**, v. 108, p. 593–599, 2008.

VAR, I.; KABAK, B. Occurrence of ochratoxin A in Turkish wines. **Microchemical Journal**, v.86, p. 241-247, 2008.

VINHOS DO BRASIL. Brasil vitivinícola. Disponível em: <http://www.vinhosdobrasil.com.br/Conteudo.aspx?id=1>. Acesso em: 5 dez, 2014.

VISCONTI, A. et al. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 864, p. 89-101, 1999.

WELKE, J. E. et al. Determination of Ochratoxin A in Wine by High-Performance Thin-Layer Chromatography using Charged Coupled Device. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 21, p. 441-446, 2010.

WU F. et al. Public Health Impacts of Foodborne Mycotoxins. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.** v. 5, p. 351–372, 2014.

WU J. et al. Occurrence of Ochratoxin A in wine and beer samples from China. **Food Additives and Contaminants**, v.4, p.52-56, 2011.

XIANG et al. Health benefits of wine: Don't expect resveratrol too much. **Food Chemistry**. v. 156, p. 258–263, 2014.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. **Journal of Chromatography B**, v.666, p.85–99, 1995.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape juice. Occurrence and risk assessment. **Food Additives and contaminants**. v. 13, p. 655-668, 1995.

ZINEDINE, A. et al. Occurrence of ochratoxin A in bread consumed in Morocco. **Microchemical Journal**, v.87, p.154–158, 2007.