

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Impacto da aplicação de produtos enológicos na redução
de ocratoxina A em vinhos brancos e tintos**

Dissertação de Mestrado em Enologia

Filipa Alexandra da Silva Carvalho

Orientadores:

Professora Doutora Maria Fernanda Gil Cosme Martins

Professor Doutor António Francisco Henrique Inês



Vila Real, 2019

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Impacto da aplicação de produtos enológicos na redução
de ocratoxina A em vinhos brancos e tintos**

Dissertação de Mestrado em Enologia

Filipa Alexandra da Silva Carvalho

Professora Doutora Maria Fernanda Gil Cosme Martins

Professor Doutor António Francisco Henrique Inês

Composição do júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Jorge de Oliveira Ribeiro, Departamento de Agronomia da UTAD

Vogais: Doutor Luís João Abrunhosa Pereira, Centro de Eng^a Biológica da Universidade do Minho

Prof^a Doutora Maria Fernanda Gil Cosme Martins, Departamento de Biologia e Ambiente da UTAD

“As doutrinas apresentadas no presente trabalho são da exclusiva responsabilidade da autora”

Este trabalho foi expressamente elaborado como dissertação original para o efeito de obtenção do grau de Mestrado em Enologia pela Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Este trabalho está inserido no projeto “Novas bio-estratégias para a detoxificação de micotoxinas utilizando bactérias do ácido láctico” PTDC/AGR-TEC/3900/2012”.

Agradecimentos

Agradeço a todos que ajudaram e contribuíram, quer a nível académico quer a nível pessoal, para a realização desta dissertação de mestrado.

Aos meus orientadores, Professora Doutora Fernanda Cosme e Professor Doutor António Inês, obrigado pela dedicação, pelo apoio, pela motivação e claro pela vossa disponibilidade. Também agradeço todos os conhecimentos científicos transmitidos.

Ao Professor Doutor Fernando Nunes, agradeço pela cedência de material do Centro de Química de Vila Real.

Ao Professor Doutor Luís Abrunhosa, agradeço pelo trabalho efetuado na Universidade do Minho.

À Quinta da Aveleda, obrigada por ter cedido os vinhos para a realização desta dissertação.

Aos meus pais e ao meu irmão, obrigado por todo o apoio, carinho e motivação. Agradeço ainda por todo o esforço que fizeram para que continuasse os meus estudos.

Ao meu namorado, obrigado por todo o carinho, apoio e motivação para que chegasse ao fim desta etapa.

Aos amigos que me acompanharam durante a vida académica, obrigado a todos por todas as palavras de carinho e motivação.

Agradeço a todos que fazem parte da minha vida, familiares e amigos, pois todos me deram forças para concluir este meu mestrado.

Índice Geral

Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	ix
Resumo	x
Abstract	xi
Capítulo I – Introdução.....	1
1.1. A Ocratoxina A em vinhos	1
1.2. Toxicidade da Ocratoxina A.....	4
1.3. Colagem de vinhos	5
1.3.1. Albumina de ovo.....	7
1.3.2. Cola de peixe.....	7
1.3.3. Gelatina	8
1.3.4. Caseína.....	9
1.3.5. Carvão ativado	10
1.3.6. Manoproteínas.....	10
1.3.7. Carboximetilcelulose.....	11
1.3.8. Bentonites.....	11
1.3.9. Polivilpolipirrolidona	13
1.3.10. Quitosana	13
1.4. Remoção da ocratoxina A em vinhos.....	14
1.5. Objetivos	16
Capítulo II – Material e Métodos	17
2.1. Vinho.....	17
2.1.1. Análise dos parâmetros enológicos convencionais	17
2.2. Delineamento experimental.....	17
2.2.1. Ensaio de colagem do vinho	18
2.2.1.1. Produtos enológicos	18
2.2.1.2. Aplicação dos diferentes produtos enológicos ao vinho	19
2.3. Análise da ocratoxina A por HPLC	20
2.3.1. Quantificação dos compostos fenólicos totais, flavonóides e não-flavonóides	21
2.3.2. Perfil dos ácidos fenólicos e flavonóides por HPLC.....	21
2.4. Análises realizadas somente no vinho branco	22
2.4.1. Determinação da cor	22
2.4.2. Determinação do potencial de acastanhamento	22
2.5. Análises realizadas somente no vinho tinto.....	22
2.5.1. Determinação da intensidade e da tonalidade corante	22

2.5.2. Índice de polifenóis totais	22
2.5.3. Antocianinas totais e coradas, pigmentos poliméricos e totais	23
2.6. Tratamento estatístico dos dados.....	23
Capítulo III – Resultados e discussão.....	24
3.1. Vinho Branco	24
3.1.1. Efeito da aplicação dos diferentes produtos enológicos na remoção da ocratoxina A em vinho branco.....	24
3.1.2. Efeito da aplicação dos produtos enológicos no teor em compostos fenólicos totais, não flavonóides e flavonóides do vinho branco	26
3.1.3. Efeito da aplicação dos produtos enológicos no perfil dos ácidos fenólicos e flavonóides do vinho branco.....	27
3.1.4. Efeito da aplicação dos produtos enológicos na cor e no potencial de acastanhamento do vinho branco.....	29
3.2. Vinho Tinto	30
3.2.1. Efeito da aplicação dos diferentes produtos enológicos na remoção da ocratoxina A em vinho tinto	30
3.2.2. Efeito da aplicação dos produtos enológicos no teor em compostos fenólicos totais, não flavonóides e flavonóides do vinho tinto	32
3.2.3. Efeito da aplicação dos produtos enológicos no perfil dos ácidos fenólicos e antocianinas do vinho tinto	33
3.2.4. Efeito da aplicação dos produtos enológicos na intensidade corante, tonalidade corante, antocianinas coradas e totais, pigmentos poliméricos e totais do vinho tinto	38
Capítulo IV - Conclusões	40
Referências Bibliográficas	41
Comunicação em congressos na forma de painel e oral.....	51

Índice de figuras

Figura 1: Estrutura química da Ocratoxina A	1
Figura 2: Representação esquemática dos géneros de fungos associados à produção de OTA – a) Penicillium; b) Aspergillus.	2
Figura 3: Secção da estrutura química da albumina de ovo.	7
Figura 4: Secção da estrutura química da cola de peixe.	8
Figura 5: Secção da estrutura química da gelatina.	8
Figura 6: Secção da estrutura química da caseína.	9
Figura 7: Estrutura química da carboximetilcelulose.	11
Figura 8: Estrutura da polivinilpolipirrolidona.	13
Figura 9: Estrutura da quitosana.	14
Figura 10: Efeitos dos diferentes produtos enológicos na remoção de ocratoxina A..	24
Figura 11: (A) Cromatograma referente ao vinho controlo; (B): Cromatograma referente ao vinho adicionado do produto enológico MIX.	25
Figura 12: Efeitos dos diferentes produtos enológicos na remoção de OTA.	30
Figura 13: (A) Cromatograma referente ao controlo; (B): Cromatograma referente ao MIX; (C) Cromatograma referente ao carvão ativado.	31

Índice de tabelas

Tabela 1: Agentes classificados pelas monografias da IARC em 2014.	4
Tabela 2: Características físico-químicas do vinho branco.	17
Tabela 3: Características físico-químicas do vinho tinto.....	17
Tabela 4: Composição e modo de emprego dos produtos enológicos comerciais utilizados no ensaio de vinho branco.....	18
Tabela 5: Composição e modo de emprego dos produtos enológicos comerciais utilizados no ensaio do vinho tinto.	19
Tabela 6: Código e doses de produtos enológicos aplicados ao vinho branco.....	20
Tabela 7: Código e doses de produtos enológicos aplicados ao vinho tinto.....	20
Tabela 8: Efeito dos diferentes produtos enológicos na composição fenólica do vinho branco.	26
Tabela 9: Efeitos dos diferentes produtos enológicos no perfil fenólico do vinho branco.....	28
Tabela 10: Efeitos dos diferentes produtos enológicos na cor e na capacidade de acastanhamento do vinho branco.....	29
Tabela 11: Efeito dos diferentes produtos enológicos na composição fenólica do vinho tinto.....	33
Tabela 12: Efeito dos diferentes produtos enológicos no perfil fenólico do vinho tinto.....	34
Tabela 13: Efeito dos diferentes produtos enológicos no perfil das antocianinas do vinho tinto.....	36
Tabela 14: Efeito dos diferentes produtos enológicos no perfil das antocianinas do vinho tinto.....	37
Tabela 15: Efeito da aplicação dos produtos enológicos na intensidade corante, tonalidade corante, antocianinas coradas e totais, pigmentos poliméricos e totais do vinho tinto.	39

Resumo

A ocorrência de micotoxinas no vinho é motivo de preocupação para a segurança alimentar. As micotoxinas são metabolitos secundários tóxicos produzidos por certas espécies de fungos, sendo a ocratoxina A (OTA) uma das mais importantes. Assim, este trabalho teve como objetivo conhecer o efeito de diferentes produtos enológicos comerciais na redução de OTA de vinhos, bem como o seu impacto sobre as características físico-químicas do vinho branco e do vinho tinto. Para avaliar a sua eficácia, 11 produtos enológicos comerciais foram testados em vinhos brancos e tintos suplementados artificialmente com OTA. No vinho branco, uma formulação comercial (MIX) que contém gelatina, bentonite e carvão ativado foi a mais eficaz na remoção de OTA (80% de remoção). Reduções entre 10-30% foram obtidas com o caseinato de potássio e proteína de ervilha. Com a aplicação de bentonite, quitosana e polivinilpirrolidona (PVPP) não foi possível remover OTA do vinho. Quanto ao vinho tinto, os produtos enológicos mais eficazes foram o carvão activado (66% de remoção) e a formulação comercial MIX que contém gelatina, bentonite e carvão ativado (55% de remoção). Produtos enológicos menos eficientes foram a albumina de ovo, a proteína de ervilha, a cola peixe, a gelatina, o PVPP e quitosana, uma vez que remove <19% de OTA presente no vinho tinto. Os resultados obtidos proporcionam informação útil para os produtores de vinhos, nomeadamente para a selecção do produto enológico mais adequado para a remoção de OTA, reduzindo a toxicidade do vinho e aumentando simultaneamente a segurança alimentar e a qualidade do vinho.

Palavras-chave: vinho, ocratoxina A, produtos enológicos, compostos fenólicos, qualidade, segurança alimentar.

Abstract

The occurrence of mycotoxins in wine is of concern for food safety. Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by certain species of moulds, being ochratoxin A (OTA) one of the most important. Thus, this work aimed to know the effect of different commercial fining agents on OTA removal, as well as, on their impact on white and red wine physicochemical characteristics. To assess their effectiveness, 11 commercial oenological products were tested in white and red wines artificially supplemented with OTA. In white wine, a commercial formulation (MIX) that contains gelatine, bentonite and activated carbon was the most effective in removing OTA (80% removal). Eliminations between 10-30% were obtained with potassium caseinate and pea protein. With bentonites, chitosan and polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) no considerable OTA was removed. Concerning to red wine, the most effective fining agents were an activated carbon (66% removal) and the MIX formulation (55% removal). Less efficient fining agents were egg albumin, pea protein, isinglass, gelatine, PVPP and chitosan, as they removed <19% of OTA present in red wine. The results obtained provide useful information for winemakers, namely for the selection of the most appropriate oenological product for the removal of OTA, reducing wine toxicity and simultaneously enhancing food safety and wine quality.

Keywords: wine; ochratoxin A, fining agents, phenolic compounds, wine quality, food safety.

Capítulo I – Introdução

1.1. A Ocratoxina A em vinhos

Segundo Scussel (1998), o grupo das ocratoxinas divide-se em Ocratoxina A (OTA), Ocratoxina B e Ocratoxina C. Quimicamente, são compostos que apresentam uma β -fenilalanina ligada a uma isocumarina por ligação amida. A Ocratoxina A (OTA) foi uma das primeiras micotoxinas a ser descoberta. Trata-se de uma dihidro-isocumarina unida a um grupo L-fenilalanina por uma ligação amida, cujo nome químico é (R)-N-[5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirran-7-il]-L-fenilalanina, a sua estrutura química está representada na figura 1. Esta micotoxina é um composto cristalino incolor.

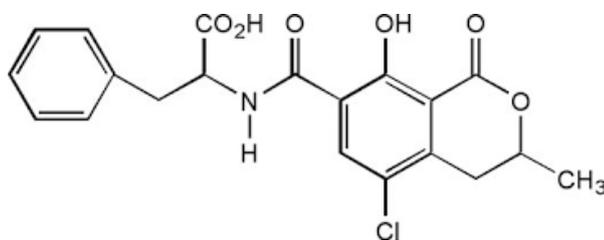


Figura 1: Estrutura química da Ocratoxina A (adaptado de Leitner *et al.*, 2002).

Em 1965, Van Der Merwe e colaboradores descobriram esta micotoxina a partir de uma cultura de *Aspergillus ochraceus*, onde foi isolada e identificada. Nos vinhos só foi detetada pela primeira vez em 1996 por Zimmerli e Dick.

A OTA é produzida como metabolito secundário por certas espécies de *Penicillium* e de *Aspergillus* (figura 2), sendo estes dois fungos saprófitos comuns e podem ser encontrados na vinha. Contudo, o crescimento destes fungos e a sua consequente produção de OTA depende de vários fatores, tais como, da temperatura, do teor de humidade e das condições de armazenamento. Assim, a OTA é essencialmente produzida por fungos do género *Penicillium* em ambientes com temperaturas mais baixas, e por fungos do género *Aspergillus* em zonas mais quentes (Nogueira e Oliveira, 2006). Estudos realizados indicaram que as espécies produtoras mais frequentemente detetadas nas uvas pertencem à secção *Nigri* dos *Aspergillus*, mais precisamente ao agregado *A. niger* e *A. carbonarius* (Serra, 2005).

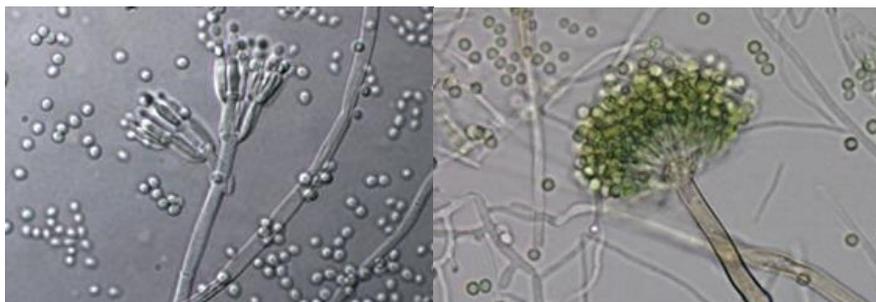


Figura 2: Representação esquemática dos gêneros de fungos associados à produção de OTA – a) *Penicillium*; b) *Aspergillus* (adaptado de www.emlab.com).

Nas uvas a ocratoxina A é produzida quando os bagos ainda estão na videira. Contudo, Battilani (2008) admite que o fungo pode ter dificuldades em entrar no bago nas fases iniciais do seu crescimento o que explica a ausência de crescimento de fungos dentro do bago nas fases iniciais do desenvolvimento do bago e assim o baixo ou inexistente teor de ocratoxina A em bagos de uva na fase inicial de desenvolvimento.

No entanto, a chamada “podridão da uva” originada por *Aspergillus* da secção *Nigri*, que faz com que a uva fique seca e enrugada, quando ocorrem períodos de chuva durante a vindima a colonização destes fungos pode ser favorecida, causando o rompimento do bago. Leong et al. (2004) observaram que em anos chuvosos há o favorecimento de infecção por *Botrytis* e, conseqüentemente, ocorreu uma maior incidência de *Aspergillus* negros nas uvas. Isto porque *Botrytis cinerea* é a espécie que origina a podridão cinzenta das uvas e leva à abertura de golpes na película dos bagos favorecendo assim a infecção por fungos do gênero *Aspergillus*. Contudo, Battilani e Pietri (2002) constataram que *A. carbonarius* é uma espécie muito invasiva e que é capaz de penetrar nos bagos mesmo sem danos na película, verificando ainda que as uvas podem ser suscetíveis à infecção por este fungo, desde a fase inicial de maturação, podendo assim as uvas conter OTA mesmo sem danos visíveis. Com o aumento do grau de maturação das uvas verifica-se um aumento da incidência de fungos ocratoxigênicos, daí a maioria das espécies produtoras de OTA serem essencialmente detetadas nas uvas, na época da vindima (Nogueira et al., 2006).

Verifica-se a existência de uma maior quantidade de OTA nos vinhos tintos do que em vinhos brancos e rosés (Lo Curto et al., 2004). Esta diferença está principalmente associada às diferentes técnicas de vinificação dos vinhos, mas também a fatores climáticos, práticas culturais e a condições de armazenamento. A maior incidência de OTA nos vinhos tintos deve-se essencialmente ao seu processo de vinificação, dado que neste tipo de vinhos o mosto e as películas fermentam em conjunto para permitir a extração de compostos fenólicos

nomeadamente antocianinas e taninos, deste modo a passagem de alguma micotoxina das películas para o mosto é maximizada, o que contribui para valores mais elevados de ocratoxina A nestes vinhos. Nos vinhos brancos, pelo contrário, as uvas são esmagadas e o mosto é fermentado sem a presença das películas (Mendonça *et al.*, 2003).

Normalmente é admitido que a presença de OTA em vinhos esteja relacionada com o tipo de vinho, mas também com a sua origem. As diferentes condições climáticas devido à latitude e também a variáveis no tempo local podem afetar a distribuição de fungos produtores de OTA (Battilani *et al.*, 2006; Serra *et al.* 2006b), assim como a concentração final de OTA (López de Cerain *et al.*, 2002). Na zona do Mediterrâneo, os vinhos tintos têm sido descritos como aqueles com maiores níveis de contaminação por OTA (Zimmerli e Dick, 1996; Otteneder e Majerus, 2000; Dubernet, 2002). Zimmerli e Dick (1996) propõem que as diferenças quanto à região dos vinhos poderiam ser devido a duas causas: i) diferentes incidências de fungos produtores de OTA nas uvas; ii) diferentes práticas usadas no cultivo da uva. Lançaram ainda uma terceira hipótese, de que os fungos produtores de OTA poderiam multiplicar-se nas barricas de madeira, cubas ou outros equipamentos, antes de estes estarem em contacto com as uvas, mosto ou vinho.

Num estudo em Portugal com vinhos portugueses, verificou-se que a produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* verificava-se sobretudo em vinhos provenientes do sul de Portugal, onde os verões são quentes e secos, e quase nenhuns *A. carbonarius* foram isolados de vinhos originários do norte de Portugal, onde as temperaturas são moderadas durante o verão (Abrunhosa *et al.*, 2001; Serra *et al.*, 2003). A formação de OTA pode ser explicada pelos parâmetros do clima, mas o solo também pode influenciar, desempenhando um papel importante no desenvolvimento de espécies fúngicas (Bejaoui, 2005).

Uma vez que o vinho é um produto muito consumido, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, e devido à sua alta frequência de contaminação com OTA, pode ser associado a uma das principais fontes de ingestão diária, que segundo as estimativas provisórias da Comissão do Codex Alimentarius corresponde a valores de 15%. Na União Europeia, esta toxina tem um limite máximo de presença em vinhos de 2µg/L, por este motivo a disponibilidade de métodos fiáveis para a determinação de ocratoxina A no vinho é cada vez mais essencial, a fim de proteger a saúde do consumidor contra o risco de exposição à toxina.

1.2. Toxicidade da Ocratoxina A

A ocratoxina contém diferentes propriedades tóxicas. A OTA é primeiramente uma nefrotoxina e tem ação teratogénica e mutagénica, sendo o fígado o seu alvo secundário (Soares, 1997). Em humanos tem sido implicada na nefropatia endémica dos Balcãs, doença degenerativa da função renal, com altos níveis de contaminação por OTA nos alimentos daquela região (Soares, 1997). É ainda caracterizada por progressiva redução das funções renais, sendo também suspeita de causar cancro no trato urinário e danos nos rins em humanos.

A OTA tem ação tóxica comprovada sobre o sistema renal. A sua nefrotoxicidade manifesta-se de diferentes modos, desde a modificação do volume dos rins dos animais, alteração da osmolaridade da urina, aumento do volume de urina, alterações na função renal, necrose do túbulo proximal, diminuição da atividade enzimática do rim e desenvolvimento de adenomas e tumores renais (JECFA, 2001).

Em estudos efetuados em animais, a OTA tem revelado efeitos carcinogénicos (Brown *et al.*, 2007), mutagénicos (Palma *et al.*, 2007), teratogénicos (Balasaheb *et al.*, 2007), imunossupressores (Rossiello *et al.*, 2008), genotóxicos (Tozlovanu *et al.*, 2006) e neurotóxicos (Sava *et al.*, 2006).

Apesar dos estudos feitos até ao momento, não existem conclusões definitivas sobre o envolvimento da OTA nos danos dos rins e do cancro do trato urinário em humanos, contudo, e devido à visível carcinogenicidade em animais, a OTA foi classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC) no grupo 2B como possível cancerígeno para humanos (tabela 1).

Tabela 1: Agentes classificados pelas monografias da IARC em 2014.

Grupo 1	<i>Cancerígeno para os seres humanos</i>	113 agentes
Grupo 2A	<i>Provavelmente cancerígeno para os seres humanos</i>	66 agentes
Grupo 2B	<i>Possivelmente cancerígeno para os seres humanos</i>	285 agentes
Grupo 3	<i>Não classificável quanto à sua carcinogenicidade para os seres humanos</i>	505 agentes
Grupo 4	<i>Provavelmente não carcinogénico para humanos</i>	1 agente

Em 2001, o JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) estabeleceu a ingestão tolerável semanal provisória de 100 ng/Kg de peso corpóreo (IARC, 2014; JECFA, 2001).

A OTA é uma micotoxina facilmente absorvida pelo sistema gastrointestinal e a sua toxicidade pode variar conforme a concentração e o organismo. Quando ingerida e absorvida pelo trato intestinal, esta distribui-se rapidamente pelo organismo para formar adutos com proteínas sanguíneas e posteriormente ligar-se com os tecidos. Esta ligação é reversível e ocorre em sítios que podem competir com alguns fármacos comumente utilizados (Valenta, 1998; Mídio, 2000; Ringot *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2009).

A percentagem de OTA absorvida pelo organismo é diferente entre as espécies, por exemplo, nos porcos é de 66%, em ratos e coelhos de 56% e em galinhas de 40% (Ruhland *et al.*, 1997; Mídio, 2000; Monaci e Palmisano, 2004; Ringot *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2009).

Uma vez que a ocratoxina A atinge o fígado ela é transformada em diversos metabólitos. Estes caminhos de biotransformação e os seus mecanismos ainda não são claros (Ringot *et al.*, 2006). A contribuição da OTA e os seus metabólitos para a toxicidade ainda não foram totalmente elucidados e muitos destes metabólitos ainda estão por caracterizar. No entanto, podem estar associados à morte celular por diversas formas, das quais incluem-se distúrbios na respiração mitocondrial, inibição de enzimas nos processos de formação de proteínas e gliconeogénese, e danos ao DNA e RNA pela formação de adutos (Ringot *et al.*, 2006).

Estudos recentes mostraram que através da ação de algum metabolito da OTA ou pela formação de radicais livres há atividade mutagénica. A exposição à micotoxina parece induzir a lesão e reparação do DNA e aberrações cromossomais em células de mamíferos, quer *in vitro* quer *in vivo* (Dörrehaus *et al.*, 2000).

1.3. Colagem de vinhos

A colagem do vinho é uma prática muito comum em Enologia que, independentemente das características físico-químicas de cada cola, tem sido amplamente estudada por diversos autores no que se refere, sobretudo, ao seu efeito global nas características do vinho (Bravo-Haro *et al.*, 1991; Ricardo-da-Silva *et al.*, 1991; Marchal *et al.*, 1993; Caillet, 1994; Machado-Nunes *et al.*, 1995; Sims *et al.*, 1995; Scotti e Poinsaut, 1997).

A colagem consiste na adição de uma substância, ao vinho mais ou menos turvo, capazes de flocular e sedimentar, ou seja, uma substância mineral, orgânica ou sintética, arrastando as partículas em suspensão, clarificando-o e/ou estabilizando-o (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977). Esta prática visa obter a clarificação do vinho eliminando as partículas responsáveis pela sua

turvação, tornando-o assim mais límpido e simultaneamente obtém-se um efeito positivo na estabilização e nas características sensoriais do vinho.

Entre os produtos enológicos orgânicos, os de origem animal são os produtos mais utilizadas pois possuem excelentes propriedades clarificantes/estabilizantes e baixo custo. Contudo, devido ao aparecimento da epidemia de encefalopatia espongiforme bovina, e a sua possível propagação ao homem via ingestão de produtos de origem animal, houve dúvidas na utilização destes produtos, especialmente de origem bovina. Com isto, no setor enológico houve a necessidade de substituir a gelatina bovina pela gelatina suína e a interdição da albumina de sangue (Arbuger, 2010).

Algumas proteínas de origem animal podem representar um risco para a saúde pública devido às suas características alergénicas. Como resposta, o Parlamento Europeu elaborou o Regulamento (EU) nº1169/2011 de 25 de outubro em que aprovava novas regras de rotulagem dos alimentos, juntando num único diploma legislativo as diretivas sobre a rotulagem. Pela aplicação do referido regulamento e do art. 51º do Regulamento (CE) nº606/2009, os vinhos colocados no mercado a partir do dia 1 de julho de 2012 devem mencionar no rótulo a presença de alergénicos, nomeadamente a referência a leite e derivados e a ovo e derivados.

Com isto, foi importante desenvolver produtos alternativos. Estudou-se assim a utilização de proteínas vegetais na colagem de vinhos uma vez que estas já são utilizadas à muito tempo na indústria alimentar como auxiliares tecnológicos. Existem vários estudos com proteínas vegetais, entre elas, o glúten de trigo (Iturmendi *et al.*, 2010; Maury *et al.*, 2003; Marchal *et al.*, 2001), a proteína de tremçoço (Mira *et al.*, 2006; Maury *et al.*, 2003), glicoproteína da batata (Gambutí *et al.*, 2012; Tschiersch *et al.*, 2010), proteína de ervilha (Mira *et al.*, 2006; Cosme *et al.*, 2012), proteína de milho (Tschiersch *et al.*, 2010) e proteína de soja (Mira *et al.*, 2006).

A colagem é uma das operações mais críticas na produção de vinho e pode ter um grande impacto na sua qualidade. Os ensaios de colagem devem ser realizados sempre com diferentes produtos e níveis de concentração para garantir que o objetivo da colagem seja alcançado usando a menor quantidade possível. Para se obter resultados consistentes, é essencial que as condições (métodos de preparação, temperatura, processo de mistura e tempo) sejam as mesmas entre os ensaios laboratoriais e a aplicação em adegas. Devem ser seguidas as instruções do fornecedor ou fabricante. Os agentes de colagem têm de ser removidos do vinho após a sua atuação. O carvão e o PVPP podem ser filtrados imediatamente após a aplicação, mas a maioria dos agentes de colagem necessitam de atuar durante uma ou duas semanas (Morris e Main, 1995).

1.3.1. Albumina de ovo

A albumina de ovo é formada por várias proteínas que representam 12,5% do peso de uma clara de ovo, onde se destacam a ovalbumina como proteína principal e em menor proporção a ovoglobulina, em que ambas apresentam propriedades clarificantes (Figura 3) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2002; Togores, 2003; Blouin e Peynaud, 2004).

A albumina de ovo pode apresenta-se de várias formas: claras frescas, claras congeladas, em pó ou escamas. A albumina de ovo em pó é uma cola recomendada para os vinhos tintos, pois arrasta consigo uma grande quantidade de polifenóis (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977; Peynaud, 1993; Caillet, 1994; Brugirard, 1997; Úbeda, 2000), sendo a cola mais eficaz para eliminar taninos (Brugirard, 1997). É por isso, indicada para os vinhos ricos em taninos, com eventual adstringência (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Delanöe *et al.*, 2001; Togore, 2003). É um clarificante de alta qualidade para os vinhos tintos, não provocando riscos de sobrecolagem nas doses aconselhadas, pelo contrário, não é recomendada para os vinhos brancos devido aos riscos de sobrecolagem (Peynaud, 1993; Brugirard, 1997).

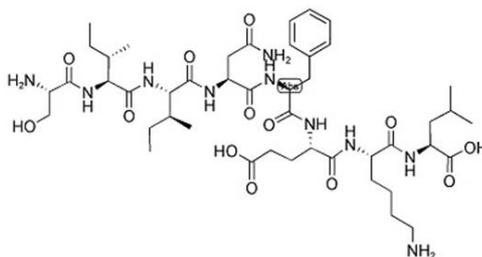


Figura 3: Secção da estrutura química da albumina de ovo.

1.3.2. Cola de peixe

A cola de peixe, ou “ictiocola”, é dos melhores clarificantes proteicos dos vinhos brancos (Figura 4), oferecendo-lhes uma limpidez e brilho (Peynaud, 1993; Brugirard, 1997; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Rankine, 2000; Úbeda, 2000; Delanöe *et al.*, 2001; Togores, 2003; Blouin e Peynaud, 2004). Esta cola é obtida a partir da bexiga-natatória de determinados peixes, como o esturjão (Peynaud, 1993; Brugirard, 1997; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Rankine, 2000; Úbeda, 2000; Delanöe, 2001; Zoecklein *et al.*, 2001; Togores, 2003). É formada por fibras de colagénio de alto peso molecular, sendo pouco sensível à presença de colóides protetores e tendo pouca capacidade de sobrecolagem (Peynaud, 1993; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Úbeda, 2000; Togores, 2003). Comercialmente apresenta-se em forma de lâminas, flocos, pó de cor branca e até mesmo como suspensão líquida (Togores, 2003).

A cola de peixe é obtida a frio, tendo como consequência uma série de propriedades que não possuem aquelas que são obtidas por tratamentos térmicos, como por exemplo as gelatinas. A cola de peixe perde as suas características quando se hidrolisa, especialmente quando é armazenada a temperatura elevada, superior a 40°C, ou durante um armazenamento prolongado, pelo que deve ser conservada no frio (Úbeda, 2000; Delanöe *et al.*, 2001; Togores, 2003).

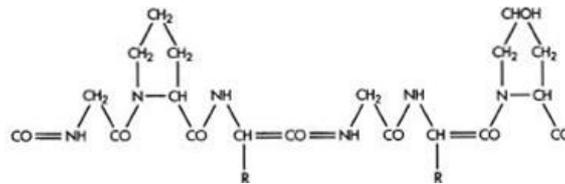


Figura 4: Secção da estrutura química da cola de peixe.

1.3.3. Gelatina

A gelatina (figura 5), é proveniente da hidrólise parcial do colagénio que se obtém a partir das peles, tecidos conjuntivos, cartilagens e tendões de animais (Peynaud, 1993; Boulton *et al.*, 1995; Brugirard, 1997; Navarre, 1997; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Úbeda, 2000; Blouin e Peynaud, 2004). As gelatinas podem apresentar diferentes características em função da natureza da hidrólise química (ácida ou alcalina) (Paetzold *et al.*, 1990; Marchal *et al.*, 1993; Lagune e Glories, 1996; Brugirard, 1997; Scotti *et al.*, 1997; Versari *et al.*, 1998; Sarni-Manchado *et al.*, 1999; Úbeda, 2000; Lefebvre *et al.*, 1999); ou enzimática; ou associação de hidrólise química e enzimática; da duração da hidrólise e da temperatura (Brugirard, 1997), sendo que na gelatina para a colagem de vinhos a hidrólise ácida é a mais usual (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977; Caillet, 1994).

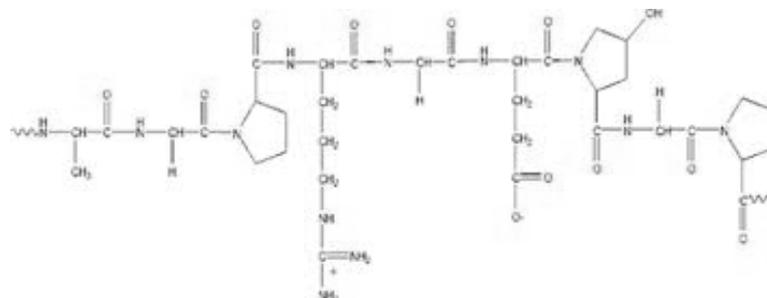


Figura 5: Secção da estrutura química da gelatina.

Segundo o código enológico, as gelatinas estão divididas em três categorias: as gelatinas solúveis a quente, as gelatinas líquidas e as gelatinas solúveis a frio, em que as primeiras podem apresentar-se sob a forma de folhas finas em placas, mais ou menos trituradas, pérolas ou grãos mais finos e sobretudo pó muito fino. No que diz respeito à cor, as sólidas possuem um tom amarelo pálido, as de pó fino são brancas ou amarelas muito claras e as líquidas são esbranquiçadas com concentrações de 30 a 40% (Peynaud, 1993; Brugirard, 1997).

As gelatinas são geralmente qualificadas em função da sua pureza, teor proteico, grau de hidrólise, densidade de carga, ponto isoelétrico, solubilidade, viscosidade e poder gelificante (Lagune *et al.*, 1996; Versari *et al.*, 1998; Sarni-Manchado *et al.*, 1999).

1.3.4. Caseína

A caseína é uma proteína do leite (figura 6) de elevada pureza (Schneider, 1998; Brugirard, 1997), estável a um pH de 6,7 no leite. Obtém-se em meio ácido (pH 4,5), após filtração e lavagem. É desidratada para conter uma humidade de 9 a 10% (Brugirard, 1997). A caseína encontra-se sob a forma de pó finamente granulada, de cor amarelo-claro ou branco, e com um odor ligeiramente lácteo e agradável (Schneider, 1988; Navarre, 1997; Úbeda, 2000; Togores, 2003).

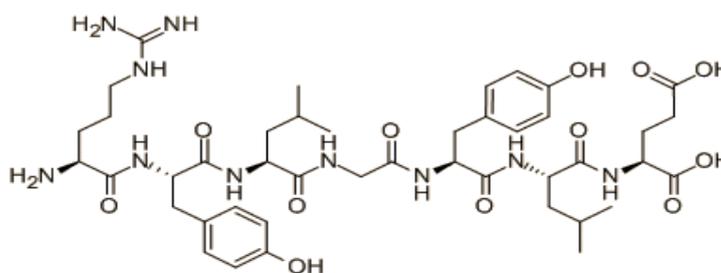


Figura 6: Secção da estrutura química da caseína.

A caseína é uma proteína que floccula em meio ácido, como o do vinho, e é carregada positivamente ao pH do vinho. Quando se adiciona ao vinho, adsorve e remove as partículas em suspensão aquando da sua flocculação. Normalmente, é usada para remover odores indesejáveis, branquear e clarificar vinhos brancos. É aplicada para prevenir a madeirização, arrastando os compostos fenólicos responsáveis pelo acastanhamento (Peynaud, 1993; Delanöe *et al.*, 2001; Blouin e Peynaud, 2004).

Depois da sua aplicação, a coagulação inicia-se de imediato, no entanto no final, o vinho fica um pouco turvo pelo que a sua sedimentação não é completa, sendo recomendado o uso posterior de uma pequena quantidade de bentonite para eliminar pequenas partículas de caseína que não tenham sedimentado (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977; Brugirard, 1997; Úbeda, 2000).

Com a adição da caseína ao vinho não há risco de sobrecolagem, mesmo com doses elevadas, mas em doses altas, retira uma parte dos aromas frutados (Brugirard, 1997; Delanöe *et al.*, 2001).

1.3.5. Carvão ativado

O carvão ativado é um produto industrial constituído principalmente por carbono. Os vários procedimentos para ativação do carvão proporcionaram duas importantes propriedades: a acção descorante e o poder desodorizante (Úbeda, 2000). Este encontra-se sob a forma de um pó preto, pulverulento, sem nenhum odor nem gosto indesejável (Brugirard, 1997).

O carvão é “purificado” e “ativado”. O carvão é de origem vegetal, proveniente da carbonização de materiais vegetais (madeira) (Brugirard, 1997; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Úbeda, 2000; Togores, 2003).

Em enologia, o carvão vegetal, ativado ou não, é usado para diversos tratamentos: como da madeirização, para eliminar maus odores nos vindos de uvas alteradas ou contraídos acidentalmente, para a preparação de pastas de bentonite, e para a filtração em misturas de pequenas proporções com terra de infusórios (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977; Boulton *et al.*, 1995; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Os carvões têm o inconveniente de retirar uma parte dos bons aromas dos vinhos, ficando os vinhos mais neutros (Brugirard, 1997).

1.3.6. Manoproteínas

As manoproteínas foram estudadas como aditivos para inibir as precipitações tartáricas por Lubbers *et al.* (1993). Estas são libertadas de forma natural das paredes celulares das leveduras em autólise (permanência sobre borras), e em maior proporção pelo calor ou enzimas (glucanase). Para além de originarem uma importante melhoria das características sensoriais dos vinhos, e de estabilizarem as proteínas instáveis dos vinhos brancos, podem impedir as precipitações tartáricas mediante um mecanismo de inibição da cristalização muito semelhante

A bentonite é uma argila mineral formada por silicato de alumínio hidratado pertencente ao grupo das montmorilonites (Lipka, 1974). Estruturalmente é composta por duas camadas tetraédricas de sílica e uma camada octaédrica de hidróxido de alumínio, combinadas numa estrutura única, complexada com compostos catiónicos como sódio, cálcio e magnésio. O seu mecanismo de ação ocorre através de uma interação eletrostática, através de um processo de troca catiónica, onde as camadas que compõe a bentonite são carregadas negativamente e assim adsorvem as cargas positivas (Boulton *et al.*, 1995). Ao pH do vinho, a bentonite comporta-se como um colóide eletronegativo que interage, floccula e precipita compostos carregados positivamente como as proteínas. Além destes, a bentonite pode interagir e remover outras espécies carregadas presentes no meio como também compostos que ficam adsorvidos nos precipitados proteicos como por exemplo os compostos fenólicos (Ferreira *et al.*, 2002; Lambri *et al.*, 2010).

As bentonites utilizadas em enologia podem ser sódicas ou cálcicas, podendo ser encontradas na sua forma natural ou ativada (Peynaud, 1993; Poinssaut e Hardy, 1995; Brugirard, 1997). As bentonites sódicas naturais são puras, naturalmente secas, trituradas e acondicionadas, e apresentam uma elevada reatividade. As bentonites sódicas ativadas passam por uma preparação industrial de triagem, purificação, ativação pelo carbonato de sódio ou pela soda; secagem até um máximo de 10% de humidade; trituração e acondicionamento. No que diz respeito às bentonites cálcicas, comparando com as sódicas, são menos puras sendo necessário tratá-las, desidratá-las, triturá-las e colocá-las em sacos. As borras obtidas são pouco aderentes às paredes e depositam-se rapidamente. Quanto às bentonites cálcicas ativadas, estas sofrem o mesmo processo de preparação industrial que as sódicas activadas (Brugirard, 1997).

Existem bentonites de várias cores, são elas cinzento, bege, rosa, verde e branca, onde as brancas são as mais puras (Brugirard, 1997). Podem ainda, comercialmente, apresentarem-se em pó ou em forma granulada, em que as granuladas são mais eficientes (Togores, 2003).

As propriedades enológicas da bentonite são de clarificar, prevenir a casse proteica e adsorver matéria corante coloidal instável (Navarre, 1997; Brugirard, 1997; Togores, 2003). A ação da bentonite é influenciada pelo pH do vinho, pois quanto mais baixo for o pH, mais carregada está a bentonite, logo a sua ação de desproteínização é mais forte. A presença do tanino tende a dificultar a ação da bentonite, por terem a mesma carga tendem-se a repulsar-se (Brugirard, 1997; Úbeda, 2000).

1.3.9. Polivilpolipirrolidona

A PVPP é produzida por polimerização da N-vinil-2-pirrolidona (figura 8) na presença de diversos catalisadores ou na presença de N,N'-divinilimidazolidona (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Oeno 11/2002). Encontra-se sob a forma de pó branco a branco creme, é insolúvel em água, em solventes orgânicos, nos ácidos minerais fortes e alcalinos (Oeno 11/2002).

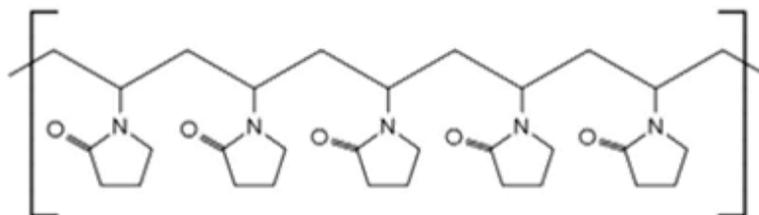


Figura 8: Estrutura da polivinilpolipirrolidona.

A PVPP é utilizada para reduzir o acastanhamento dos vinhos brancos (Chorniak, 2007). As doses necessárias para a prevenção do acastanhamento (20-30g/hL) não têm impacto negativo ao nível sensorial, pelo contrário, a PVPP atenua o amargo de certos vinhos. Utiliza-se, sozinho ou juntamente com carvão vegetal, para eliminar pigmentos indesejáveis (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

1.3.10. Quitosana

A quitosana, cuja estrutura é apresentada na figura 9, é um polissacárideo de origem fúngica. É extraída e purificada a partir de fontes fúngicas alimentares ou biotecnológicas seguras e abundantes como *Agaricus bisporus* ou *Aspergillus niger*. É obtida por hidrólise de um extrato rico em quitina, e composta por unidades de açúcar glucosamina (unidade desacetilada) e por unidades de N-acetil-D-glucosamina (unidade acetilada) (OENO 368-2009). Segundo o Codex Enológico Internacional, a quitosana é utilizada para a estabilização biológica do vinho antes do engarrafamento devido à sua capacidade de eliminar microrganismos não desejados, como por exemplo a *Brettanomyces*. Esta encontra-se sob a forma de pó inodoro, insípido e branco, sendo quase completamente insolúvel em meio aquoso ou orgânico.

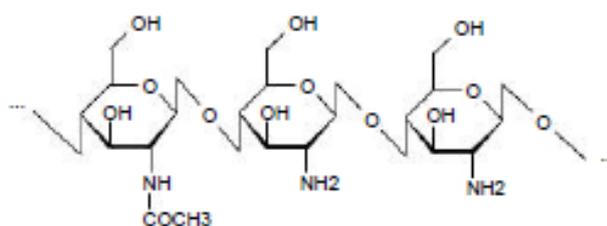


Figura 9: Estrutura da quitosana.

1.4. Remoção da ocratoxina A em vinhos

Existem vários métodos químicos, microbiológicos e físicos com o objetivo de remover OTA de vinhos contaminados (Amézqueta *et al.*, 2009).

O conteúdo de OTA em bagos de uva danificadas é maior do que em bagos de uvas não danificadas, deste modo, a seleção das uvas mostra ser a melhor forma de limitar a ocorrência de OTA nos vinhos (Kozakiewicz *et al.*, 2004).

Abrunhosa *et al.* (2005), verificaram que a OTA inicialmente presente nas uvas, apenas cerca de 31,8% permaneceu no vinho após fermentação alcoólica. Após a trasfega, esse valor baixa para 10,9%, e após fermentação maloláctica para os 8,1%. Além disso, verificou-se que a OTA estava presente em maior quantidade nas borras obtidas após trasfega e na fermentação alcoólica.

Vários estudos avaliam a capacidade de remoção de OTA do vinho pela aplicação de diversos produtos enológicos. Anli *et al.* (2011) concluíram que a utilização de produtos enológicos podia contribuir para a remoção da OTA. No entanto, esta abordagem pode diminuir o valor final do vinho pela remoção de cor, aroma, sabor, ou outras características desejáveis nos vinhos. A albumina de ovo e a gelatina foram referidos como os produtos enológicos mais eficientes nos vinhos tintos para a remoção da OTA (Grazioli *et al.*, 2006). No entanto, no estudo efectuado por Anli *et al.* (2011) a cola de peixe e a albumina de ovo foram os produtos enológicos que mostraram ser mais eficazes na remoção de OTA, em comparação com a gelatina. A cola de peixe e a albumina de ovo decrésceram o teor de OTA em 21,3% e 19,7%, respetivamente. A bentonite, em vinhos brancos, tem sido descrita como um dos produtos enológicos mais eficazes para a remoção de OTA, mostrando uma diminuição de 20,3% (Leong *et al.*, 2006a, Leong *et al.*, 2006b). Nos ensaios efectuados em vinho branco, Anli *et al.* (2011), também verificou que o uso de bentonite foi eficiente na remoção de OTA com uma diminuição

de 20,3%. As aplicações mistas de agentes de colagem como de gelatina-bentonite e de caseína-gelatina-bentonite deram uma remoção de OTA com uma diminuição de 20,3% e 20,9%.

Castelari *et al.* (2001) verificaram que o caseinato de potássio (150 g/hL) e o carvão ativado (10 g/hL) mostraram uma alta capacidade de adsorção de OTA em vinhos tintos. O caseinato de potássio removeu até 82% da ocratoxina A em doses elevadas (150 g/hL), enquanto o carvão ativado mostrou uma maior capacidade de adsorção específica devido à área de superfície elevada por cada unidade de massa e com baixa adsorção dos compostos fenólicos totais do vinho (Castelari *et al.*, 2001).

Para Bornet e Teissedre (2008), a quitina, quitosana e derivados são polímeros biodegradáveis não tóxicos que podem remover metais e contaminantes orgânicos de géneros alimentícios e também são considerados como auxiliares de processamento (clarificação, agentes/filtração, auxiliares/agentes de floculação) para sumos de fruta e néctares. Para os vinhos enriquecidos com OTA, tratamentos com quitina-glucano, quitina, quitina-glucano hidrolisada, ou quitosana foram realizados com doses de 2 a 5 g/L. A OTA foi reduzida em 56,7-83,4% no vinho tinto, em 53,4-64,5% em vinho branco e em 26,1-43,5% em vinho doce. Estes resultados indicaram que a quitosana, quitina, quitina-glucano, ou quitina-glucano hidrolisada a partir de origem fúngica podem também ser auxiliares úteis para a redução dos níveis de micotoxinas (OTA) melhorando assim a segurança alimentar do vinho.

Em 2012, Quintela *et al.* utilizaram seis produtos enológicos (bentonite sódica ativada, PVPP, albumina de ovo, gelatina, quitina e quitosana) nas doses vulgarmente aplicadas, de modo a remover a OTA e melhorar assim a segurança alimentar do vinho tinto. Porém, a remoção quantitativa de OTA, assim como os parâmetros de qualidade do vinho variam com a dosagem e tipo de produto enológico aplicados. Contudo, através deste estudo os autores verificaram que o aumento da dose causava uma maior remoção de OTA, mas isso implicava um maior impacto na qualidade do vinho. Os resultados deste estudo mostraram que a quitina podia remover até 18% de OTA sem influenciar significativamente a qualidade do vinho. A utilização de gelatina e PVPP mostrou uma taxa de remoção de OTA de 39-40%, mas revelou algum impacto nos parâmetros da cor e concentração de compostos fenólicos. O produto enológico que mostrou uma maior remoção de OTA foi a quitosana, com uma remoção de 67%, mas verificou-se que afetou significativamente os parâmetros de qualidade do vinho. A utilização de bentonite mostrou uma remoção de OTA pouco significativa e os parâmetros de qualidade do vinho eram também afetados. Por último, no tratamento com albumina de ovo

verificou-se uma remoção até 16% de OTA, contudo, afetava fortemente o valor de intensidade corante e as características cromáticas do vinho.

1.5. Objetivos

Esta dissertação teve como objetivo estudar a ação de diferentes produtos enológicos na remoção de OTA presente em vinhos. Para alcançar os objetivos propostos foi estudada a eficácia de onze produtos enológicos comerciais com diferentes características (mineral, sintética e orgânicos - proteínas de origem animal e vegetal) na remoção de OTA utilizando vinho branco e vinho tinto artificialmente suplementados com OTA. Além disso, ainda foi estudado o impacto destes produtos enológicos nos parâmetros da cor, compostos fenólicos totais, flavonóides, não-flavonóides e no perfil dos ácidos fenólicos e das antocianinas dos vinhos.

Capítulo II – Material e Métodos

2.1. Vinho

Neste trabalho foi usado um vinho branco de 2013 e um vinho tinto de 2014, cedidos pela Quinta da Aveleda, com as características apresentadas nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Características físico-químicas do vinho branco.

Vinho branco 2013	
Teor alcoólico (% v/v)	10,4
Massa volúmica a 20 °C (g/cm ³)	0,9917
Acidez total (g ác. tartárico /L)	6,8
pH	3,14
Acidez volátil (g ác. acético /L)	0,16

Tabela 3: Características físico-químicas do vinho tinto.

Vinho tinto 2014	
Teor alcoólico (% v/v)	13,4
Massa volúmica a 20 °C (g/cm ³)	0,9914
Acidez total (g ác. tartárico /L)	5,0
pH	3,49
Acidez volátil (g ác. acético /L)	0,35

2.1.1. Análise dos parâmetros enológicos convencionais

O teor alcoólico, a massa volúmica, o pH, a acidez total e volátil foram analisados por FTIR usando um equipamento Bacchus micro.

2.2. Delineamento experimental

Nos ensaios utilizaram-se onze produtos enológicos comerciais com diferentes características, na dose média recomendada pelo fabricante com o intuito de avaliar a sua capacidade de remoção de OTA, utilizando um vinho branco e tinto cuja análise sumária foi

efetuada de acordo com os métodos do OIV (2012). Posteriormente, o vinho foi artificialmente suplementado com OTA (para uma concentração final de 10µg/L). Além disso, ainda foi estudada a ação destes produtos enológicos nos parâmetros da cor, compostos fenólicos totais, flavonóides, não-flavonóides e no perfil dos ácidos fenólicos dos vinhos.

2.2.1. Ensaio de colagem do vinho

2.2.1.1. Produtos enológicos

Tendo em conta o objetivo do trabalho, foram selecionados onze produtos enológicos comerciais para o vinho branco e vinho tinto, cujo modo de aplicação está descrito nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Composição e modo de emprego dos produtos enológicos comerciais utilizados no ensaio de vinho branco (adaptado da ficha técnica do fabricante).

Aditivo	Constituição	Modo de emprego
B1	Bentonite sódica natural	Dissolver previamente a dose adequada em água, seguidamente adicionar à amostra de vinho e homogeneizar.
B2	Bentonite cálcica natural	Dissolver previamente a dose adequada em água, seguidamente adicionar à amostra de vinho e homogeneizar.
C	Proteína láctica de elevada pureza que se extrai do soro do leite.	Dissolver previamente a dose adequada em água, seguidamente adicionar à amostra de vinho e homogeneizar.
CMC1	Solução de CMC (5%), anidrido sulfuroso (0,3%) e água desmineralizada.	Adicionar a dose de aditivo a cerca de 10% do volume total de vinho a tratar, dissolver bem, para evitar a eventual formação de grumos. Aplicar ao restante volume de vinho e homogeneizar.
CMC2	Solução de CMC (20%), anidrido sulfuroso (3%) e água desmineralizada.	Adicionar a dose de aditivo a cerca de 10% do volume total de vinho a tratar, dissolver bem, para evitar a eventual formação de grumos. Aplicar ao restante volume de vinho e homogeneizar.
Q	Obtida por hidrólise de um extrato rico em quitina.	Adicionar diretamente ao vinho.
PVPP	Obtida da polimerização da vinilpirrolidona e o produto obtido é formado por macromoléculas organizadas em rede.	Dissolver previamente a dose adequada em água, seguidamente adicionar à amostra de vinho e homogeneizar.
PE	Proteína vegetal pura, sem glúten.	Dissolver previamente a dose adequada em água, seguidamente adicionar à amostra de vinho e homogeneizar.
MP1	Polissacarídeos extraídos de paredes celulares de leveduras, altamente purificados.	Dissolver previamente a dose adequada em água, seguidamente adicionar à amostra de vinho e homogeneizar.
MP2	Polissacarídeos extraídos da parede celular das leveduras.	Dissolver previamente a dose adequada em água, seguidamente adicionar à amostra de vinho e homogeneizar.
MIX	Mistura de carvão, gelatina e bentonite.	Dissolver o produto em água fria (1:100), agitando vigorosamente durante alguns minutos; adicionar de seguida, ao volume total, garantindo uma boa homogeneização.

Tabela 5: Composição e modo de emprego dos produtos enológicos comerciais utilizados no ensaio do vinho tinto (adaptado da ficha técnica do fabricante).

Aditivo	Constituição	Modo de emprego
MP 1	Polissacarídeos extraídos de paredes celulares de leveduras, altamente purificados.	Dissolver previamente a dose adequada em água, seguidamente adicionar à amostra de vinho e homogeneizar.
MP 2	Polissacarídeos extraídos da parede celular das leveduras.	Dissolver previamente a dose adequada em água, seguidamente adicionar à amostra de vinho e homogeneizar.
MIX	Mistura de carvão, gelatina e bentonite.	Dissolver o produto em água fria (1:10), agitando vigorosamente durante alguns minutos; adicionar de seguida, ao volume total, garantindo uma boa homogeneização.
PVPP	Obtida da polimerização da vinilpirrolidona e o produto obtido é formado por macromoléculas organizadas em rede.	Dissolver previamente a dose adequada em água, seguidamente adicionar à amostra de vinho e homogeneizar.
PE	Proteína vegetal pura, sem glúten.	Dissolver previamente a dose adequada em água, seguidamente adicionar à amostra de vinho e homogeneizar.
G	Proveniente do colagénio das peles e ossos de animais.	Adicionar diretamente ao vinho.
I	Obtida a partir da bexiga-natatória de certos peixes.	Dissolver o produto em água fria (1:10), agitando vigorosamente durante alguns minutos; adicionar de seguida, ao volume total, garantindo uma boa homogeneização.
A	Provém da clara de ovo.	Dissolver previamente a dose adequada em água, seguidamente adicionar à amostra de vinho e homogeneizar.
Q 1	Obtida por hidrólise de um extrato rico em quitina.	Adicionar diretamente ao vinho.
Q 2	Obtida por hidrólise de um extrato rico em quitina	Adicionar diretamente ao vinho.
CA	Carvão ativado de origem vegetal puro.	Dissolver previamente a dose adequada em água, seguidamente adicionar à amostra de vinho e homogeneizar.

2.2.1.2. Aplicação dos diferentes produtos enológicos ao vinho

O ensaio de colagem dos vinhos foi efetuado em provetas de 250mL. Uma continha o controlo (vinho sem tratamento), as outras continham os diferentes produtos enológicos utilizados. A dose de produto enológico a aplicar foi de acordo com as prescrições dos fabricantes (Tabela 6 e 7). O ensaio de colagem foi efetuado em duplicado para cada um dos produtos enológicos. Ao fim de 8 dias, os vinhos foram centrifugados e analisados quanto à capacidade de remoção de OTA, compostos fenólicos totais, flavonóides, não flavonóides, cor, capacidade de acastanhamento, antocianinas totais, o perfil dos ácidos fenólicos e perfil das antocianinas.

Tabela 6: Código e doses de produtos enológicos aplicados ao vinho branco.

Aditivo	Código	Concentração
Bentonite sódica	B 1	40 g/hL
Bentonite cálcica	B 2	80 g/hL
Caseinato de potássio	C	40 g/hL
Solução de CMC a 5%	CMC 1	150 mL/hL
Solução de CMC a 20%	CMC 2	37,5 mL/hL
Quitosana	Q	5 g/hL
PVPP	PVPP	25 g/hL
Proteína de ervilha	PE	20 g/hL
Manoproteína	MP 1	80 g/hL
Manoproteína	MP 2	15 g/hL
Mistura de carvão, gelatina e bentonite	MIX	45 g/hL

Tabela 7: Código e doses de produtos enológicos aplicados ao vinho tinto.

Aditivo	Código	Concentração
Quitosana	Q1	5g/hL
Quitosana	Q2	7g/hL
PVPP	PVPP	27,5g/hL
Proteína de ervilha	PE	20g/hL
Manoproteína	MP1	40g/hL
Manoproteína	MP2	40g/hL
Mistura de carvão, gelatina e bentonite	MIX	100g/hL
Gelatina	G	30mL/hL
Cola de peixe	I	3,5g/hL
Albumina de ovo	A	7,5g/hL
Carvão ativado	CA	80g/hL

2.3. Análise da ocratoxina A por HPLC

O sobrenadante do vinho depois de clarificado foi centrifugado a 4000 rpm durante 15 min. De seguida, recolheram-se 2 mL de sobrenadante e adicionou-se igual volume de acetonitrilo/metanol/ácido acético (78:20:2, v/v/v). Após 12 horas, os extratos foram filtrados por um filtro de seringa com 0,45 µm de porosidade e guardados a 4 °C até serem analisados por HPLC com deteção por fluorescência.

A separação cromatográfica foi realizada a 35 °C numa coluna analítica C₁₈ de fase reversa YMC-Pack ODS-AQ (250 x 4,6mm, 5µm) equipada com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária. As amostras foram eluídas a um caudal de 1 mL/min durante 20 min com uma fase móvel composta por água/acetonitrilo/ácido acético (99:99:2, v/v/v). O volume de injeção foi de 50 µL e os parâmetros de deteção: λ_{exc}=333 nm, λ_{em}=460 nm e gain=1000. O

tempo de retenção da OTA foi de aproximadamente de 16 min. A concentração de OTA nas amostras foi determinada por comparação das áreas dos picos com uma curva de calibração efetuada com padrões de OTA (Sigma-Aldrich). Todas as análises foram realizadas em duplicado.

2.3.1. Quantificação dos compostos fenólicos totais, flavonóides e não-flavonóides

O conteúdo em compostos fenólicos dos vinhos foi determinado pela absorvância a 280 nm antes e depois da precipitação dos flavonóides, através da reação com o formaldeído, de acordo com o método descrito por Kramling e Singleton (1969).

Usando este método, foi possível quantificar os compostos fenólicos flavonóides, não-flavonóides e compostos fenólicos totais do vinho. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico, por meio de uma curva de calibração construída com ácido gálico como padrão (Sigma). Todas as análises foram realizadas em duplicado.

2.3.2. Perfil dos ácidos fenólicos e flavonóides por HPLC

A determinação dos ácidos fenólicos e dos flavonóides foi realizada por HPLC com um detetor de díodos. A coluna era de fase reversa C18 (25cm, 4,5mm de diâmetro, 5µm de partículas). O eluente era constituído por 5% de ácido fórmico aquoso (solvente A) e metanol (solvente B). O programa de eluição foi o seguinte: 5% de B a partir de zero a 5min, seguido de um gradiente linear até 65% de B até 65min e de 65 a 67min até 5% de B (Guise *et al.* 2014). O caudal foi de 1 mL/min. A deteção foi realizada 200-650nm com um volume de injeção de 25 µL. A identificação foi feita considerando-se os tempos de retenção e espectros de UV. Os cromatogramas foram registados a 280 e 325 nm para os ácidos fenólicos e catequina nos vinhos brancos e tintos, e a 520 nm para as antocianinas monoméricas nos vinhos tintos. Todas as análises foram realizadas em duplicado.

2.4. Análises realizadas somente no vinho branco

2.4.1. Determinação da cor

A cor foi determinada pela medição da absorvância a 420nm (célula 10mm) usando um espectrofotómetro, de acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2006). Todas as análises foram realizadas em duplicado.

2.4.2. Determinação do potencial de acastanhamento

A capacidade de acastanhamento foi determinada de acordo com o método descrito por Singleton e Kramling (1976). Em cada tubo de ensaio foram colocados 10 mL de cada amostra de vinho, o controlo e as amostras foram aspergidas com azoto e oxigénio, respetivamente. Todos os tubos foram selados hermeticamente e mantidos a 55 °C durante 5 dias. Ao fim desse tempo foi determinada a diferença da absorvância A_{420nm} . Todas as análises foram realizadas em duplicado.

2.5. Análises realizadas somente no vinho tinto

2.5.1. Determinação da intensidade e da tonalidade corante

A intensidade corante foi determinada pela medição da absorvância a 420, 520 e 620 nm e a tonalidade corante por medição da absorvância a 420 e 520 nm (célula 1 mm) usando um espectrofotómetro, de acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2006). Todas as análises foram realizadas em duplicado.

2.5.2. Índice de polifenóis totais

O índice de polifenóis totais foi determinado por absorvância de 280 nm e expresso em $IPT = Abs_{280} * FD$ (fator diluição) (Curvelo-Garcia 1988). Todas as análises foram realizadas em duplicado.

2.5.3. Antocianinas totais e coradas, pigmentos poliméricos e totais

As antocianinas totais e coradas, pigmentos poliméricos e totais foram analisadas de acordo com Somers e Evans (1977). Todas as análises foram realizadas em duplicado.

2.6. Tratamento estatístico dos dados

Para o tratamento estatístico dos dados das análises físico-químicas aplicou-se a análise de variância ANOVA (fator único), seguido de um teste de comparação de média teste de Tuckey utilizando o programa Statistica versão 7.

Capítulo III – Resultados e discussão

3.1. Vinho Branco

3.1.1. Efeito da aplicação dos diferentes produtos enológicos na remoção da ocratoxina A em vinho branco

Como pode ser observado na figura 10, o produto enológico mais eficaz, com $\cong 80\%$ na remoção da ocratoxina A foi uma mistura comercial, que é composta por carvão ativado, um conhecido adsorvente de micotoxinas, gelatina e bentonite. Foram também obtidas reduções de 10 a 30% desta micotoxina nas amostras tratadas com caseína e proteína de ervilha.

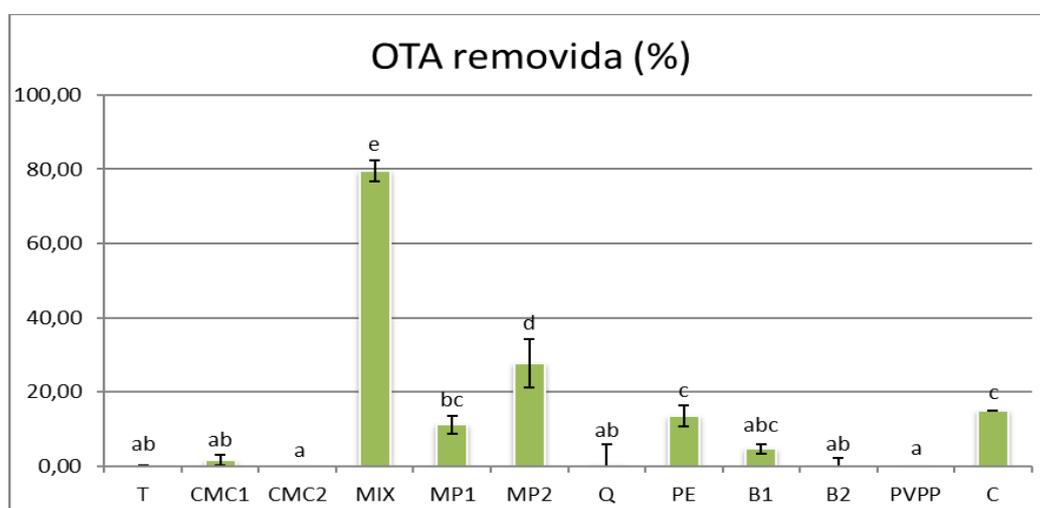


Figura 10: Efeitos dos diferentes produtos enológicos na remoção de ocratoxina A. (T – Controlo; CMC1 – Solução de CMC a 5%; CMC2 – Solução de CMC a 20%; MIX – Mistura de carvão, gelatina e bentonite; MP1 e MP2 – Manoproteína; Q – Quitosana; PE – Proteína de ervilha; B1 – Bentonite sódica; B2 – Bentonite cálcica; PVPP – PVPP; C – Caseína). Letras diferentes em cada barra indicam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey, $p < 0,05$).

Em relação às bentonites, à polivinilpirrolidona e à quitosana não foi apresentada remoção consideravelmente à OTA no vinho. A remoção da OTA dos vinhos utilizando produtos enológicos tem sido estudado por alguns autores (Dumeau e Trioné, 2000; Castellari *et al.*, 2001). No entanto, estes estudos mostram que a maioria dos produtos enológicos tem pouco efeito na remoção da OTA. A mistura comercial, com presença de carvão ativado, gelatina e bentonite, como pode ser observar na figura 10 e através dos cromatogramas que mostram a remoção da OTA pela comparação do pico cromatográfico da OTA do vinho onde foi aplicado o MIX e o pico cromatográfico da OTA do vinho controlo (figura 11). O MIX é o produto enológico mais eficaz, embora possa ter como consequência a diminuição da qualidade dos vinhos. Anli *et al.* (2011), no seu estudo, com o uso de bentonite sódica, verificaram que a

bentonite seria o agente clarificante mais eficaz para a remoção de OTA, com uma remoção de 20,3%. Utilizaram ainda aplicações mistas com bentonite, como gelatina-bentonite, e caseína-gelatina-bentonite que representaram uma remoção de OTA de 20,3% e 20,9%, respectivamente. Bornet e Teissedre (2008), estudaram a utilização de quitosana, quitina, quitina-glucano e quitina-glucano hidrolisado na remoção de OTA, obtendo uma remoção de OTA em cerca de 53,4% com o uso de quitosana.

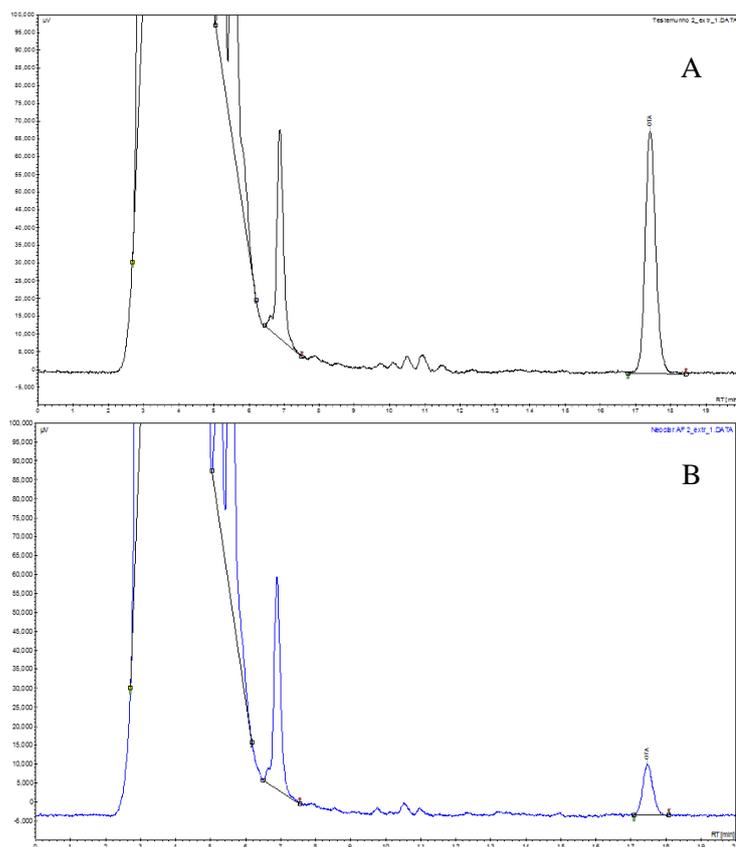


Figura 11: (A) Cromatograma referente ao vinho controle; (B): Cromatograma referente ao vinho adicionado do produto enológico MIX.

No caso da bentonite, apenas quando misturada com a gelatina e o carvão ativado mostrou resultados na remoção da OTA, o que não mostra coincidir com os resultados obtidos por Anli *et al.* (2011), isto pode dever-se às doses utilizadas pelos autores (50g/hL) ser superior à utilizada neste trabalho (40 g/hL) apesar da diferença entre as doses não ser grande pode fazer a diferença nos resultados. No caso da quitosana, os resultados também não coincidem com os obtidos neste trabalho, isto pode dever-se ao tipo de quitosana utilizada não ser igual em cada um dos trabalhos, às características dos vinhos e às concentrações iniciais de OTA nos vinhos, porque neste caso as doses utilizadas foram as mesmas (5g/hL).

Contudo, para o consumidor um vinho seguro não é suficiente, para além de seguro, o vinho tem de ter qualidade. Assim, para além da análise da remoção da OTA, fez-se também análises a outros parâmetros do vinho, como da cor, compostos fenólicos totais, flavonóides, não-flavonóides e ao perfil dos ácidos fenólicos e flavonóides dos vinhos.

3.1.2. Efeito da aplicação dos produtos enológicos no teor em compostos fenólicos totais, não flavonóides e flavonóides do vinho branco

Como se pode observar na tabela 8, não houve alterações significativas no que diz respeito ao teor de compostos fenólicos flavonóides e não flavonóides, quanto aos compostos fenólicos totais apresentam algumas alterações significativas. Face a este resultado foi efetuada uma análise mais detalhada dos diferentes compostos fenólicos, nomeadamente dos ácidos fenólicos e dos flavonóides que são os principais compostos fenólicos dos vinhos brancos, por HPLC.

Tabela 8: Efeito dos diferentes produtos enológicos na composição fenólica do vinho branco.

	Compostos fenólicos totais (mg/Lácido gálico)	Compostos fenólicos não flavonóides (mg/Lácido gálico)	Compostos fenólicos flavonóides (mg/Lácido gálico)
T	170±0 ^a	86±1 ^a	84±1 ^a
CMC1	172±1 ^a	83±1 ^{ab}	88±1 ^{ab}
CMC2	171±1 ^{ab}	85±1 ^a	86±2 ^{ab}
MIX	166±1 ^c	81±1 ^b	85±1 ^{ab}
MP1	170±1 ^{ab}	85±3 ^a	85±2 ^{ab}
MP2	172±0 ^a	85±2 ^{ab}	87±2 ^{ab}
Q	171±1 ^a	83±1 ^{ab}	88±1 ^{ab}
PE	172±1 ^a	83±1 ^{ab}	89±2 ^b
B1	170±0 ^{ab}	84±1 ^{ab}	86±1 ^{ab}
B2	169±1 ^{bc}	85±2 ^{ab}	84±2 ^{ab}
PVPP	169±3 ^{bc}	85±3 ^{ab}	84±3 ^{ab}
C	168±1 ^{bc}	85±1 ^{ab}	84±2 ^{ab}

(T – Controlo; CMC1 – Solução de CMC a 5%; CMC2 – Solução de CMC a 20%; MIX – Mistura de carvão, gelatina e bentonite; MP1 e MP2 – Manoproteína; Q – Quitosana; PE – Proteína de ervilha; B1 – Bentonite sódica; B2 – Bentonite cálcica; PVPP – PVPP; C – Caseína). Letras diferentes em cada uma das colunas indicam diferenças significativas entre tratamentos teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.1.3. Efeito da aplicação dos produtos enológicos no perfil dos ácidos fenólicos e flavonóides do vinho branco

Na tabela 9 estão apresentados os ácidos fenólicos e os flavonóides que foram detetados e identificados no vinho branco antes e após o tratamento com os diferentes produtos enológicos. A área absoluta do ácido 2-S-glutationilcafetárico e do ácido coutárico não foram significativamente influenciadas pelos tratamentos efetuados aos vinhos com o intuito de remover a OTA.

Relativamente à área absoluta do ácido gálico verifica-se uma maior diferença significativa após o tratamento do vinho com CMC1, B1, B2, PVPP e C. Na catequina verificou-se uma diferença mais significativa das áreas nos tratamentos com MP2, PE e PVPP, no ácido *trans*-cafetárico esta diferença verifica-se apenas no CMC2 e no MIX, no ácido 2-S-glutationilcafetárico as diferenças mais significativas das áreas encontram-se nos tratamentos com B1, B2, PVPP e C. No isómero do ácido coutárico, verificou-se que todos os tratamentos, com exceção do CMC1, mostraram diferenças significativas nas suas áreas comparando com a testemunha. Relativamente ao ácido hidroxicinâmico observou-se uma diminuição mais significativa das áreas nos tratamentos com CMC2, MIX e PVPP, no ácido ferúlico verificou-se um decréscimo significativo da sua área após aplicação do CMC1, CMC2, MIX, B1 e do PVPP. Já no ácido cafeíco, no etil éster do ácido cafeico e no etil éster do ácido cumárico apenas no tratamento com o MIX de carvão, bentonite e gelatina se verificou um decréscimo mais acentuado nas áreas quando comparado com o vinho controlo.

Analisando os produtos enológicos utilizados na remoção da OTA pode observar-se que o PVPP e o MIX de carvão, bentonite e gelatina são os produtos que mais influenciam o perfil fenólico do vinho branco.

Tabela 9: Efeitos dos diferentes produtos enológicos no perfil fenólico do vinho branco (área).

	Ácido gálico	Catequina	Ácido <i>trans</i> -cafetárico	Ácido 2-S-glutationilcafetárico	Isómero ácido coutárico	Ácido coutárico	Ácido cafeíco	Ácido hidroxicinâmico	Ácido ferúlico	Etil éster do ácido cafeíco	Etil éster do ácido cumárico
T	36,10±4,33 ^a	4,80±0,36 ^a	373,44±10,02 ^a	5,96±1,17 ^{ab}	1,47±0,34 ^a	115,40±13,90 ^a	54,06±1,84 ^a	15,36±1,91 ^a	14,08±1,79 ^a	7,86±0,98 ^a	2,92±0,38 ^a
CMC1	31,39±4,26 ^b	5,03±0,50 ^a	343,39±25,71 ^{ab}	6,30±1,41 ^a	1,73±0,11 ^a	102,27±6,57 ^a	51,75±3,46 ^{ab}	14,08±1,16 ^{ab}	12,00±0,87 ^c	6,95±0,50 ^{ab}	2,56±0,18 ^{ab}
CMC2	36,17±4,04 ^{ab}	4,45±0,52 ^{ab}	333,16±28,00 ^b	7,11±2,26 ^a	1,19±0,29 ^b	105,59±14,62 ^a	50,61±3,13 ^{ab}	13,48±1,11 ^b	11,86±0,77 ^c	7,18±1,03 ^{ab}	2,68±0,40 ^a
MIX	34,02±2,87 ^{ab}	4,31±0,67 ^{ab}	319,90±32,83 ^b	5,14±1,19 ^{ab}	0,24±0,05 ^{cd}	100,81±14,96 ^a	48,65±4,99 ^b	12,66±1,86 ^b	11,58±1,81 ^c	6,41±0,92 ^b	2,16±0,34 ^b
MP1	33,65±4,37 ^{ab}	4,33±0,67 ^{ab}	371,22±8,79 ^a	6,29±1,09 ^a	0,18±0,04 ^d	111,82±5,04 ^a	51,52±4,07 ^{ab}	14,65±0,79 ^a	13,53±0,67 ^{ab}	7,88±0,52 ^a	2,91±0,12 ^a
MP2	34,12±4,38 ^{ab}	4,09±0,44 ^b	370,12±3,69 ^a	6,66±1,27 ^a	0,29±0,13 ^{cd}	107,37±1,59 ^a	54,44±0,68 ^a	14,24±0,42 ^{ab}	13,22±0,22 ^{ab}	7,68±0,21 ^a	2,83±0,06 ^a
Q	35,55±1,90 ^{ab}	4,52±0,62 ^{ab}	372,31±20,31 ^a	6,17±1,36 ^{ab}	0,29±0,06 ^{cd}	110,73±5,86 ^a	53,91±1,14 ^a	14,15±0,90 ^{ab}	13,19±0,88 ^{ab}	7,59±0,48 ^a	2,90±0,19 ^a
PE	33,47±1,19 ^{ab}	4,03±0,12 ^b	370,71±8,78 ^a	4,90±1,10 ^{ab}	0,19±0,02 ^d	106,22±3,68 ^a	52,89±1,81 ^{ab}	14,29±0,53 ^{ab}	13,13±0,40 ^{ab}	7,88±0,35 ^a	2,82±0,16 ^a
B1	30,25±2,20 ^b	4,46±0,55 ^{ab}	366,70±36,41 ^a	3,36±0,73 ^b	0,35±0,09 ^{cd}	107,78±9,19 ^a	53,66±3,54 ^a	14,30±0,55 ^{ab}	12,45±0,98 ^b	7,93±0,72 ^a	2,84±0,13 ^a
B2	30,36±2,36 ^b	4,72±0,56 ^{ab}	375,24±14,67 ^a	3,38±0,18 ^b	0,48±0,16 ^c	112,44±8,57 ^a	54,46±4,01 ^a	14,66±0,97 ^a	13,13±1,23 ^{ab}	7,72±0,24 ^a	2,84±0,23 ^a
PVPP	31,32±1,27 ^b	4,21±0,96 ^b	357,28±39,84 ^a	3,48±0,50 ^b	0,28±0,23 ^{cd}	112,43±1,08 ^a	52,29±4,16 ^{ab}	13,13±2,07 ^b	11,85±1,27 ^c	7,36±1,80 ^{ab}	2,60±0,61 ^a
C	30,53±2,66 ^b	4,41±0,23 ^{ab}	347,54±9,52 ^{ab}	3,37±0,11 ^b	0,44±0,02 ^c	107,45±2,98 ^a	54,25±1,69 ^a	14,45±0,42 ^a	13,27±0,46 ^{ab}	7,93±0,43 ^a	2,87±0,07 ^a

(T – Controlo; CMC1 – Solução de CMC a 5%; CMC2 – Solução de CMC a 20%; MIX – Mistura de carvão, gelatina e bentonite; MP1 e MP2 – Manoproteína; Q – Quitosana; PE – Proteína de ervilha; B1 – Bentonite sódica; B2 – Bentonite cálcica; PVPP – PVPP; C – Caseína). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos. Teste de (Tukey, $p < 0,05$).

3.1.4. Efeito da aplicação dos produtos enológicos na cor e no potencial de acastanhamento do vinho branco

Como se pode observar na Tabela 10, e tendo em consideração os produtos enológicos com capacidade de remoção da OTA no vinho branco, verificou-se que a cor do vinho não foi alterada pela aplicação do CMC1, CMC2, MP1, Q, B1 e B2.

Relativamente ao potencial de acastanhamento (Tabela 10), a mistura comercial de carvão não se mostrou eficaz na redução da capacidade de acastanhamento, enquanto que o CMC1, CMC2 e a B2 mostraram ser eficazes.

Tabela 10: Efeitos dos diferentes produtos enológicos na cor e na capacidade de acastanhamento do vinho branco. (Diferença do acréscimo da absorvância a A420 entre o vinho com e sem azoto após 5 dias a 55°C.)

	Cor A _{420 nm}	Capacidade de acastanhamento
T	0,065±0,003 ^a	0,010±0,000 ^a
CMC1	0,063±0,004 ^a	0,006±0,000 ^a
CMC2	0,065±0,005 ^a	0,008±0,000 ^a
MIX	0,059±0,003 ^{bc}	0,011±0,001 ^d
MP1	0,067±0,002 ^a	0,002±0,000 ^{bc}
MP2	0,092±0,002 ^d	0,002±0,000 ^{ab}
Q	0,065±0,002 ^a	0,002±0,000 ^{bc}
PE	0,063±0,003 ^{ab}	0,010±0,001 ^c
B1	0,064±0,002 ^a	0,009±0,002 ^b
B2	0,066±0,004 ^a	0,010±0,002 ^a
PVPP	0,055±0,002 ^c	0,007±0,001 ^d
C	0,061±0,005 ^b	0,009±0,001 ^d

(T – Controlo; CMC1 – Solução de CMC a 5%; CMC2 – Solução de CMC a 20%; MIX – Mistura de carvão, gelatina e bentonite; MP1 e MP2 – Manoproteína; Q – Quitosana; PE – Proteína de ervilha; B1 – Bentonite sódica; B2 – Bentonite cálcica; PVPP – PVPP; C – Caseína). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre tratamentos. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Observando a tabela 10, pode-se ver que houve outros produtos enológicos eficazes para a cor, como por exemplo as carboximetilceluloses, as bentonites e a quitosana, mas estes produtos não se mostraram eficazes para a remoção da OTA. Na redução do potencial de acastanhamento aconteceu o mesmo, pois as carboximetilceluloses e a bentonite cálcica mostraram-se eficientes, mas não apresentaram eficácia na remoção da OTA.

3.2. Vinho Tinto

3.2.1. Efeito da aplicação dos diferentes produtos enológicos na remoção da ocratoxina A em vinho tinto

Como se pode observar na figura 12, o produto mais eficaz ($\cong 65\%$) na remoção da ocratoxina A foi o carvão ativado. O carvão ativado é de origem vegetal puro, constituído principalmente por carbono. Pode ver-se ainda uma redução de OTA significativa com o MIX de carvão, bentonite e gelatina ($\cong 55\%$). Obteve-se ainda uma redução de 10 a 20% com os restantes produtos enológicos, à exceção da quitosana 2 ($\cong 5\%$) que não apresentou diferenças significativas.

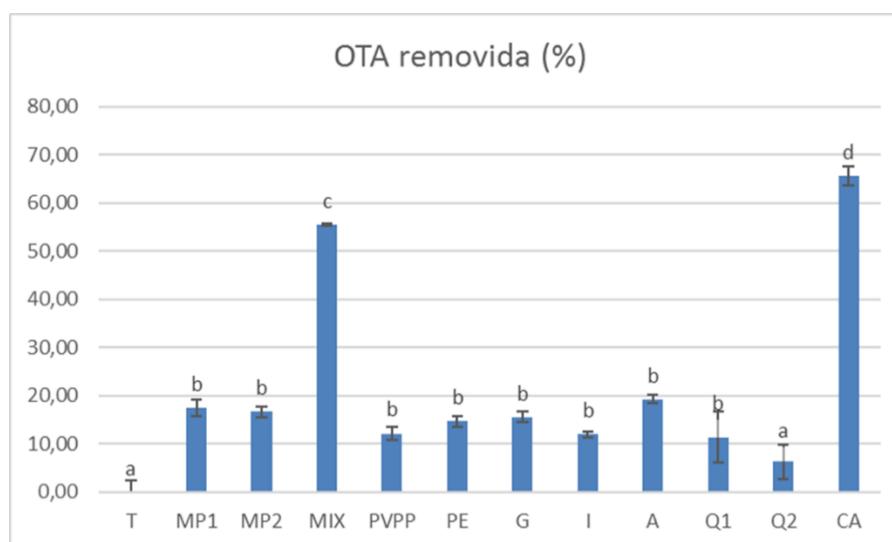


Figura 12: Efeitos dos diferentes produtos enológicos na remoção de OTA. (T – Controlo; MP1 e MP2 – Manoproteína; MIX – Mistura de carvão, gelatina e bentonite; PVPP; PE – Proteína de ervilha; G – Gelatina; I – Cola de peixe; A – Albumina de ovo; Q1 e Q2 – Quitosana; CA – Carvão ativado). Letras diferentes nas barras indicam diferenças significativas entre tratamentos. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

As diferentes formas de remoção de OTA dos vinhos têm vindo a ser cada vez mais estudadas por diferentes autores (Dumeau e Trioné, 2000; Castellari *et al.*, 2001). No entanto, até aos dias de hoje ainda não se conseguiu encontrar um produto enológico capaz de remover a OTA para valores legais e ao mesmo tempo não altere a qualidade do vinho. Vários autores referem o carvão ativado como o produto mais eficaz na remoção de OTA, o que se pode ser confirmado neste trabalho, em contrapartida pode ter como efeito a diminuição da qualidade do vinho. O carvão ativado e o MIX de carvão, gelatina e bentonite foram os produtos mais eficazes na remoção de OTA como se pode ver na figura 12 ou nos cromatogramas de remoção de OTA (figura 13) em comparação com o controlo, mas podem ter efeitos consideráveis na

qualidade do vinho. Quintela *et al.* (2012), verificaram que a quitosana removeu cerca de 67% de OTA, mas afetou fortemente os parâmetros de qualidade do vinho. Dos resultados obtidos neste trabalho, a quitina, apesar de só ter removido cerca de 18% de OTA, seria o melhor produto pois não afetou significativamente a qualidade do vinho.

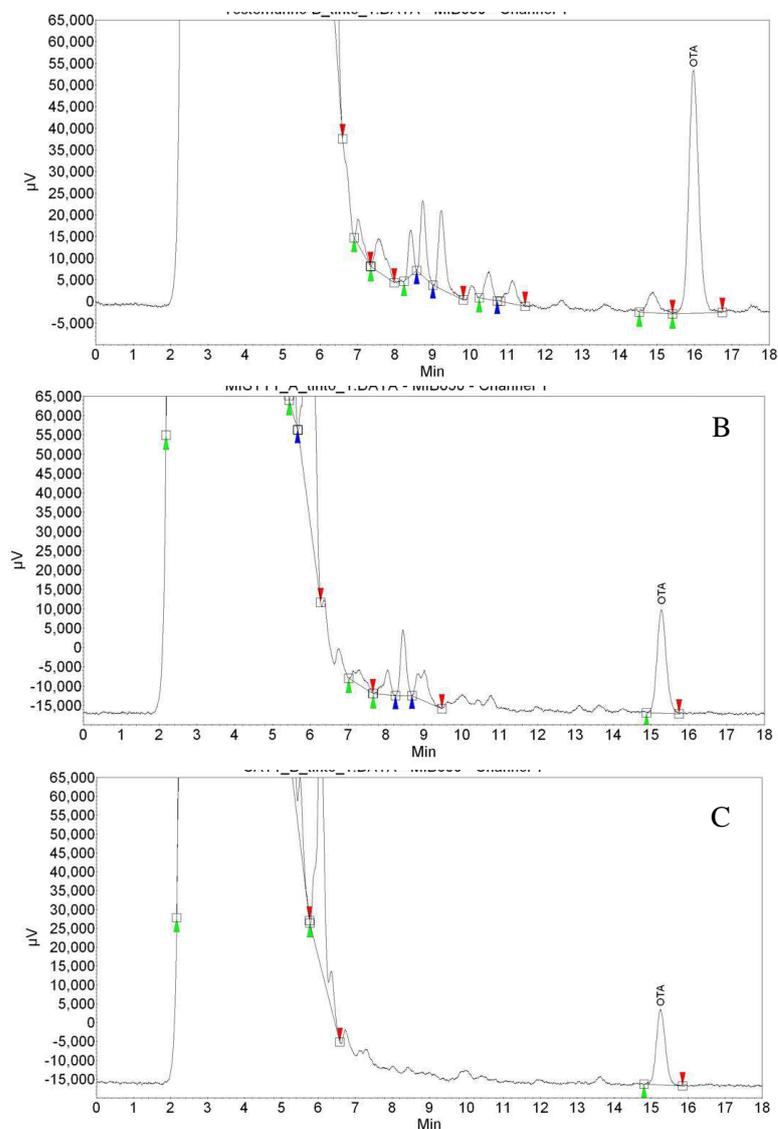


Figura 13: (A) Cromatograma referente ao controle; (B): Cromatograma referente ao MIX; (C) Cromatograma referente ao carvão ativado.

Castellari *et al.* (2001), Dumeau e Trioné (2000) e Var *et al.* (2008) também estudaram a utilização de produtos enológicos para a remoção de OTA no vinho, assim como a sua capacidade de alteração da qualidade do vinho, e verificaram que o carvão ativado e a caseína foram os produtos mais eficazes na remoção de OTA. No caso da caseína observaram uma remoção de OTA de 82% em doses elevadas (150 g/hL), enquanto que o carvão ativado mostrou

uma capacidade de adsorção máxima específica, no entanto, ambos podem modificar a composição fenólica do vinho. Verificaram ainda que a quitosana e a quitina podem ser auxiliares úteis para a prevenção de limpidez do vinho e redução de ocratoxina A, melhorando assim a segurança do vinho.

Em comparação com o estudo de Quintela *et al.* (2012), Castellari *et al.* (2001), Dumeau e Trioné (2000) e Var *et al.* (2008), neste trabalho não se verifica uma remoção de OTA significativa com a quitosana, isto pode dever-se ao facto de o autor ter usado uma dose muito superior (200 g/hL), enquanto que neste trabalho usou-se a dose média recomendada pelo fabricante (5 e 7 g/hL).

No entanto, um vinho considerado seguro e com qualidade é o que interessa aos consumidores. Desta forma, para além da remoção da OTA este trabalho também serviu para analisar outros parâmetros do vinho, como a cor, compostos fenólicos totais, flavonóides, não-flavonóides, antocianinas e o perfil dos ácidos fenólicos e antocianinas do vinho.

3.2.2. Efeito da aplicação dos produtos enológicos no teor em compostos fenólicos totais, não flavonóides e flavonóides do vinho tinto

Como se pode observar na tabela 11, no que diz respeito aos compostos fenólicos totais e aos compostos fenólicos flavonóides houve diferenças significativas com a utilização dos diferentes produtos em comparação com o controlo. No caso dos compostos fenólicos não flavonóides não se verificaram diferenças significativas, com exceção do carvão ativado. Face a estes resultados efetuou-se uma análise mais detalhada do perfil dos diferentes compostos fenólicos, nomeadamente dos ácidos fenólicos e dos flavonóides, por HPLC.

Tabela 11: Efeito dos diferentes produtos enológicos na composição fenólica do vinho tinto.

	Compostos fenólicos totais (mg/Lácido gálico)	Compostos fenólicos flavonóides (mg/Lácido gálico)	Compostos fenólicos não flavonóides (mg/Lácido gálico)
T	672±5 ^a	533±5 ^a	139±1 ^a
MP1	619±1 ^c	485±4 ^c	134±5 ^a
MP2	617±2 ^c	480±3 ^{cd}	138±3 ^a
MIX	612±1 ^d	477±4 ^{cd}	135±4 ^a
PVPP	613±1 ^d	478±2 ^{cd}	135±1 ^a
PE	617±2 ^c	480±4 ^{cd}	137±2 ^a
G	606±1 ^e	470±10 ^d	136±10 ^a
I	619±3 ^c	485±4 ^c	134±2 ^a
A	626±2 ^b	492±4 ^b	134±3 ^a
Q1	617±1 ^{cd}	483±1 ^c	134±1 ^a
Q2	622±1 ^b	485±1 ^c	137±1 ^a
CA	615±1 ^{cd}	496±2 ^b	119±2 ^b

(T – Controlo; MP1 e MP2 – Manoproteína; MIX – Mistura de carvão, gelatina e bentonite; PVPP; PE – Proteína de ervilha; G – Gelatina; I – Cola de peixe; A – Albumina de ovo; Q1 e Q2 – Quitosana; CA – Carvão ativado). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre tratamentos. Teste de Tukey ($p < 0,05$)

3.2.3. Efeito da aplicação dos produtos enológicos no perfil dos ácidos fenólicos e antocianinas do vinho tinto

Os ácidos fenólicos e os flavonóides que foram detetados e identificados no vinho tinto antes e após tratamento com os diferentes produtos enológicos estão apresentados na tabela 12. Na área absoluta do ácido 2-S-glutationilcafetárico não se verificaram diferenças significativas, quando comparado com o controlo, pelos tratamentos efetuados ao vinho com o objetivo de remover a OTA.

Em relação à área absoluta dos ácidos fenólicos não se verifica diferenças muito significativas com a utilização dos diferentes produtos enológicos quando comparado com o controlo, com exceção do ácido gálico, do ácido cafeico, ácido ferúlico e do etil éster do ácido cumárico. O produto que mostra ter mais influência na remoção de ácidos fenólicos é o carvão ativado, pois verifica-se diferenças significativas em todos os ácidos fenólicos, com exceção do ácido gálico, ácido 2-S- glutationilcafetárico e ácido ferúlico.

Tabela 12: Efeito dos diferentes produtos enológicos no perfil fenólico do vinho tinto (área).

	Ácido gálico	Catequina	Ácido <i>trans</i> -cafetárico	Ácido 2- <i>S</i> -glutathionilcafetárico	Isómero ácido coutárico	Ácido coutárico	Ácido cafeíco	Ácido hidroxicinâmico	Ácido ferúlico	Etil éster do ácido cafeíco	Etil éster do ácido cumárico
T	24,64±0,35 ^a	9,11±0,08 ^a	145,95±1,82 ^{ab}	2,15±0,77 ^a	1,57±0,04 ^{abc}	57,62±0,36 ^a	20,85±0,41 ^a	14,59±0,11 ^{ab}	6,63±0,02 ^a	1,77±0,21 ^{ab}	3,28±0,02 ^a
MP1	21,17±0,47 ^b	7,80±0,28 ^b	142,28±4,20 ^b	1,54±0,72 ^a	1,37±0,09 ^c	56,30±1,40 ^{ab}	19,76±0,45 ^b	14,53±0,51 ^{ab}	6,18±0,35 ^c	1,89±0,04 ^a	3,07±0,08 ^b
MP2	20,81±0,47 ^b	7,93±0,51 ^{ab}	142,05±0,88 ^{bc}	2,32±0,20 ^a	1,45±0,04 ^{bc}	55,54±0,42 ^b	19,49±0,74 ^b	13,91±0,53 ^b	6,26±0,12 ^{bc}	1,45±0,26 ^{bc}	3,01±0,09 ^b
MIX	17,90±0,76 ^c	8,50±0,48 ^{ab}	143,67±2,92 ^{ab}	2,27±0,21 ^a	1,66±0,31 ^{ab}	56,13±1,15 ^{ab}	19,13±0,31 ^{bc}	13,92±0,27 ^b	5,45±0,34 ^d	1,76±0,35 ^{ab}	2,61±0,04 ^d
PVPP	16,94±0,42 ^c	7,92±0,50 ^b	142,77±1,62 ^{ab}	1,89±0,77 ^a	1,64±0,37 ^{ab}	56,13±0,36 ^{ab}	18,41±0,14 ^c	14,00±0,53 ^b	6,10±0,08 ^c	1,81±0,19 ^{ab}	2,85±0,02 ^c
PE	17,86±1,27 ^c	8,57±0,43 ^{ab}	142,04±4,02 ^{bc}	2,28±0,13 ^a	1,77±0,09 ^a	55,52±1,63 ^b	19,48±0,61 ^b	14,62±0,46 ^{ab}	6,56±0,09 ^a	1,76±0,55 ^{ab}	3,00±0,13 ^b
G	24,36±3,90 ^a	8,03±1,01 ^{ab}	146,87±1,68 ^a	2,55±0,14 ^a	1,58±0,04 ^{abc}	57,26±0,94 ^a	20,39±0,39 ^a	14,70±0,12 ^{ab}	6,48±0,09 ^{ab}	1,79±0,25 ^{ab}	3,20±0,02 ^{ab}
I	23,89±0,98 ^a	8,53±1,59 ^{ab}	144,39±6,05 ^{ab}	2,27±0,28 ^a	1,53±0,30 ^{abc}	56,37±2,57 ^{ab}	19,48±0,99 ^b	14,18±0,96 ^b	6,57±0,31 ^a	1,29±0,06 ^c	3,11±0,17 ^b
A	25,07±1,87 ^a	8,12±1,18 ^{ab}	146,67±3,44 ^a	1,74±0,76 ^a	1,37±0,18 ^c	57,28±1,22 ^a	19,77±0,63 ^b	14,80±0,40 ^{ab}	6,66±0,23 ^a	1,82±0,62 ^{ab}	3,17±0,06 ^{ab}
Q1	24,65±1,70 ^a	8,13±1,31 ^{ab}	146,09±1,38 ^{ab}	2,56±0,12 ^a	1,56±0,02 ^{abc}	57,51±0,47 ^a	20,21±0,49 ^a	14,56±0,17 ^{ab}	6,62±0,10 ^a	1,87±0,04 ^{ab}	3,20±0,04 ^{ab}
Q2	24,62±1,34 ^a	8,51±0,44 ^{ab}	144,43±2,09 ^{ab}	2,55±0,07 ^a	1,58±0,05 ^{abc}	56,70±0,72 ^{ab}	20,16±0,52 ^a	15,12±0,23 ^a	6,48±0,10 ^{ab}	1,64±0,27 ^{abc}	3,18±0,04 ^{ab}
CA	23,79±1,82 ^{ab}	5,93±0,68 ^c	137,82±2,05 ^c	1,87±0,97 ^a	1,38±0,04 ^c	52,52±1,05 ^c	7,50±0,82 ^d	3,95±0,26 ^c	6,51±0,06 ^{ab}	0,41±0,04 ^d	0,53±0,14 ^e

(T – Controlo; MP1 e MP2 – Manoproteína; MIX – Mistura de carvão, gelatina e bentonite; PVPP; PE – Proteína de ervilha; G – Gelatina; I – Cola de peixe; A – Albumina de ovo; Q1 e Q2 – Quitosana; CA – Carvão ativado). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos Teste de Tukey ($p < 0,05$).

As diferentes antocianinas individuais que foram detetados e identificados no vinho tinto antes e após tratamento com os diferentes produtos enológicos estão apresentados na tabela 13 e 14. Em relação ao perfil das antocianinas monoglucósidas verifica-se que não existem diferenças significativas da delfinidina. Nas restantes pode observa-se que alguns produtos influenciam o perfil de antocianinas, como é o caso do MIX de carvão, bentonite e gelatina e da PVPP principalmente, pois existem diferenças significativas com estes produtos em todas as antocianinas monoglucósidas. Nas antocianinas acetiladas também não se verificam diferenças significativas na delfinidina e na cianidina, nas restantes existem alterações com os diferentes produtos, principalmente com a utilização do MIX de carvão, bentonite e gelatina. Relativamente às antocianinas cumariladas, assim como aconteceu nas anteriores, também não apresentou diferenças significativas na delfinidina.

Tabela 13: Efeito dos diferentes produtos enológicos no perfil das antocianinas do vinho tinto (área).

	Delfinidina-3-monoglucósido	Cianidina-3-monoglucósido	Petunidina-3-monoglucósido	Peonidina-3-monoglucósido	Malvidina-3-monoglucósido
T	1,47±0,01 ^{ab}	9,64±0,31 ^a	10,94±0,28 ^a	5,55±0,64 ^{ab}	67,37±0,88 ^a
MP1	1,40±0,05 ^{ab}	8,85±0,40 ^{bcd}	9,82±0,43 ^{bc}	5,53±0,16 ^{ab}	62,07±2,90 ^{bc}
MP2	1,42±0,02 ^{ab}	8,79±0,27 ^{cd}	10,21±0,31 ^{abc}	5,63±0,09 ^{ab}	64,08±0,85 ^{abc}
MIX	1,38±0,11 ^b	7,36±0,47 ^e	8,46±0,50 ^d	4,92±0,17 ^c	53,36±2,93 ^d
PVPP	1,39±0,09 ^b	8,29±0,28 ^d	9,77±0,35 ^c	5,47±0,14 ^{bc}	60,78±1,63 ^c
PE	1,45±0,04 ^{ab}	9,04±0,24 ^{abcd}	10,63±0,29 ^{ab}	5,81±0,21 ^{ab}	65,12±1,92 ^{abc}
G	1,49±0,01 ^{ab}	9,41±0,26 ^{abc}	10,86±0,32 ^a	6,00±0,11 ^{ab}	67,41±1,05 ^a
I	1,45±0,05 ^{ab}	9,08±0,34 ^{abc}	10,46±0,38 ^{abc}	5,78±0,25 ^{ab}	65,10±2,84 ^{abc}
A	1,55±0,11 ^a	9,59±0,27 ^{ab}	10,88±0,26 ^a	6,08±0,16 ^a	67,98±1,32 ^a
Q1	1,47±0,02 ^{ab}	9,28±0,18 ^{abc}	10,77±0,15 ^a	6,05±0,16 ^{ab}	68,32±1,05 ^a
Q2	1,46±0,04 ^{ab}	9,50±0,18 ^{abc}	10,61±0,16 ^{ab}	5,99±0,14 ^{ab}	66,47±1,13 ^{ab}
CA	1,52±0,04 ^{ab}	9,18±0,36 ^{abc}	10,64±0,41 ^{ab}	5,89±0,18 ^{ab}	67,51±2,35 ^a

(T – Controlo; MP1 e MP2 – Manoproteína; MIX – Mistura de carvão, gelatina e bentonite; PVPP; PE – Proteína de ervilha; G – Gelatina; I – Cola de peixe; A – Albumina de ovo; Q1 e Q2 – Quitosana; CA – Carvão ativado). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 14: Efeito dos diferentes produtos enológicos no perfil das antocianinas do vinho tinto (área) (continuação).

	Delfinidina-3-acetilglucósido	Cianidina-3-acetilglucósido	Petunidina-3-acetilglucósido	Peonidina-3-acetilglucósido	Malvidina-3-acetilglucósido	Delfinidina-3-p-cumarilglucósido	Petunidina-3-p-cumarilglucósido	Peonidina-3-p-cumarilglucósido	Malvidina-3-p-cumarilglucósido
T	4,80±0,11 ^a	0,70±0,04 ^a	0,85±0,42 ^a	1,03±0,15 ^{ab}	9,94±0,11 ^a	0,14±0,02 ^a	0,42±0,01 ^a	0,80±0,03 ^a	7,68±0,12 ^a
MP1	5,38±1,17 ^a	0,76±0,13 ^a	0,22±0,02 ^{abc}	1,01±0,05 ^{ab}	9,10±0,44 ^{bc}	0,14±0,01 ^a	0,33±0,02 ^{abc}	0,66±0,05 ^c	6,64±0,48 ^c
MP2	4,18±0,96 ^a	0,65±0,04 ^a	0,22±0,02 ^{abc}	1,01±0,04 ^{ab}	9,36±0,18 ^{abc}	0,10±0,07 ^a	0,33±0,01 ^{abc}	0,70±0,01 ^{bc}	7,01±0,11 ^{bc}
MIX	3,85±0,96 ^a	0,58±0,07 ^a	0,17±0,02 ^c	0,83±0,02 ^c	7,48±0,47 ^d	nd	0,22±0,02 ^c	0,42±0,05 ^e	4,61±0,34 ^e
PVPP	4,58±1,18 ^a	0,69±0,07 ^a	0,31±0,18 ^{abc}	0,92±0,01 ^{bc}	8,84±0,15 ^c	0,07±0,08 ^a	0,30±0,10 ^{bc}	0,56±0,02 ^d	6,02±0,19 ^d
PE	4,72±1,22 ^a	0,67±0,08 ^a	0,14±0,10 ^c	1,02±0,07 ^{ab}	9,66±0,39 ^{ab}	0,04±0,07 ^a	0,38±0,11 ^{ab}	0,69±0,03 ^{bc}	7,08±0,22 ^{abc}
G	4,36±1,10 ^a	0,68±0,06 ^a	0,40±0,24 ^{abc}	1,06±0,08 ^{ab}	9,80±0,16 ^{ab}	0,13±0,02 ^a	0,37±0,01 ^{ab}	0,74±0,03 ^{ab}	7,19±0,14 ^{abc}
I	4,85±1,31 ^a	0,71±0,12 ^a	0,18±0,14 ^{bc}	0,99±0,06 ^{ab}	9,77±0,57 ^{ab}	0,08±0,09 ^a	0,33±0,02 ^{abc}	0,71±0,03 ^{bc}	7,15±0,29 ^{abc}
A	4,92±0,95 ^a	0,64±0,07 ^a	0,20±0,04 ^{abc}	1,06±0,06 ^a	9,80±0,26 ^{ab}	0,06±0,07 ^a	0,37±0,01 ^{ab}	0,75±0,01 ^{ab}	7,47±0,14 ^{ab}
Q1	3,89±0,04 ^a	0,68±0,01 ^a	0,47±0,21 ^{abc}	1,06±0,04 ^{ab}	9,89±0,20 ^a	0,08±0,10 ^a	0,38±0,01 ^{ab}	0,72±0,02 ^{abc}	7,59±0,24 ^{ab}
Q2	5,93±0,32 ^a	0,68±0,11 ^a	0,84±0,72 ^{ab}	1,05±0,02 ^{ab}	9,74±0,10 ^{ab}	0,10±0,07 ^a	0,38±0,01 ^{ab}	0,73±0,02 ^{abc}	7,37±0,10 ^{ab}
CA	3,84±0,10 ^a	0,62±0,03 ^a	0,18±0,04 ^c	1,04±0,03 ^{ab}	9,71±0,33 ^{ab}	0,10±0,06 ^a	0,38±0,01 ^{ab}	0,73±0,04 ^{abc}	7,25±0,29 ^{abc}

(T – Controlo; MP1 e MP2 – Manoproteína; MIX – Mistura de carvão, gelatina e bentonite; PVPP; PE – Proteína de ervilha; G – Gelatina; I – Cola de peixe; A – Albumina de ovo; Q1 e Q2 – Quitosana; CA – Carvão ativado). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos teste deTukey ($p < 0,05$)

3.2.4. Efeito da aplicação dos produtos enológicos na intensidade corante, tonalidade corante, antocianinas coradas e totais, pigmentos poliméricos e totais do vinho tinto

Na tabela 15 pode observar-se os efeitos dos diferentes produtos enológicos na intensidade e tonalidade corante, antocianinas coradas e totais, pigmentos poliméricos e totais do vinho tinto. Tendo em consideração os produtos enológicos com capacidade de remoção de OTA verifica-se que no caso do MIX de carvão, bentonite e gelatina apenas os pigmentos poliméricos não sofreram alterações significativas com a adição deste produto. Em relação ao carvão ativado verifica-se que apenas houve alterações significativas na intensidade corante, antocianinas totais. De todos os produtos usados o melhor seria a MP2 pois não altera significativamente nenhum dos pontos analisados, no entanto no que diz respeito à remoção de OTA apenas removeu cerca de 18%.

Tabela 15: Efeito da aplicação dos produtos enológicos na intensidade corante, tonalidade corante, antocianinas coradas e totais, pigmentos poliméricos e totais do vinho tinto.

	Intensidade corante (u.a.)	Tonalidade corante	Antocianinas coradas (u.a.)	Antocianinas totais (mg/L)	Pigmentos poliméricos (u.a.)	Pigmentos totais (u.a.)
T	12,73±0,19 ^a	0,66±0,01 ^a	3,46±0,16 ^a	303,84±6,04 ^a	3,28±0,12 ^a	18,13±0,64 ^a
MP1	12,08±0,17 ^{bc}	0,66±0,01 ^a	3,15±0,08 ^{ab}	187,25±20,85 ^c	3,20±0,02 ^a	16,16±0,43 ^b
MP2	12,47±0,06 ^a	0,67±0,01 ^a	3,09±0,06 ^{ab}	280,88±4,68 ^a	3,46±0,06 ^{ab}	17,25±0,73 ^a
MIX	11,48±0,19 ^d	0,71±0,02 ^b	2,77±0,35 ^{bc}	158,81±10,61 ^c	3,11±0,41 ^a	16,08±0,39 ^b
PVPP	11,72±0,02 ^{cd}	0,66±0,00 ^a	2,29±0,16 ^c	175,22±11,10 ^c	3,89±0,15 ^b	16,34±0,38 ^b
PE	12,26±0,10 ^b	0,66±0,00 ^a	2,88±0,04 ^b	241,28±38,73 ^b	3,60±0,04 ^{ab}	16,08±0,60 ^b
G	12,55±0,04 ^a	0,66±0,00 ^a	2,81±0,09 ^{bc}	277,59±22,28 ^a	3,84±0,10 ^b	18,15±0,52 ^a
I	12,26±0,05 ^b	0,66±0,00 ^a	3,21±0,05 ^{ab}	240,41±8,70 ^b	3,28±0,06 ^a	17,93±0,53 ^a
A	12,64±0,33 ^a	0,70±0,02 ^b	3,00±0,56 ^{ab}	305,59±21,43 ^a	3,50±0,49 ^{ab}	18,43±0,19 ^a
Q1	12,69±0,04 ^a	0,66±0,00 ^a	2,93±0,18 ^{ab}	287,44±11,38 ^a	3,76±0,16 ^b	15,18±0,72 ^b
Q2	12,77±0,06 ^a	0,66±0,00 ^a	3,13±0,12 ^{ab}	263,16±13,69 ^b	3,60±0,14 ^{ab}	17,17±0,95 ^a
CA	12,31±0,21 ^b	0,67±0,01 ^a	3,00±0,11 ^{ab}	257,03±14,30 ^b	3,45±0,04 ^{ab}	17,98±0,65 ^a

(T – Controlo; MP1 e MP2 – Manoproteína; MIX – Mistura de carvão, gelatina e bentonite; PVPP; PE – Proteína de ervilha; G – Gelatina; I – Cola de peixe; A – Albumina de ovo; Q1 e Q2 – Quitosana; CA – Carvão ativado).u.a. – unidades de absorvância. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Capítulo IV - Conclusões

Tendo em consideração que a presença de Ocratoxina A (OTA) nos vinhos é um problema de segurança alimentar e de que o limite máximo permitido no vinho é 2 µg/L, o principal objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de diferentes produtos enológicos na redução da OTA em vinho branco e tinto. Os resultados mostram que a mistura comercial composta por carvão, bentonite e gelatina foi o produto enológico mais eficaz na remoção da ocratoxina A do vinho branco, atingindo uma eficiência de remoção próxima dos 80 %. Contudo, apesar da boa performance deste produto enológico na remoção da OTA, foi também objetivo do presente trabalho avaliar a influência da aplicação dos mesmos produtos nas características fenólicas, cor e capacidade de acastanhamento. Pelos resultados obtidos, verificou-se que a cor do vinho foi alterada por aplicação da mistura comercial de carvão, bentonite e gelatina e também não foi eficaz na redução do potencial de acastanhamento do vinho. A proteína de ervilha também mostrou eficácia na remoção da OTA, mesmo que em menor percentagem (10 a 30%), apresentando a vantagem de não alteraram a cor do vinho. Tendo em consideração a cor, a capacidade de acastanhamento e as características fenólicas, o melhor produto seria o CMC1, contudo na redução de OTA no vinho este não se mostrou eficaz.

No caso do vinho tinto, os resultados obtidos indicam que alguns produtos enológicos podem diminuir o teor de OTA. O carvão ativado apresentou os melhores resultados na remoção de OTA, pois removeu 65% da OTA. O MIX, composto por gelatina, bentonita e carvão ativado também mostrou um bom resultado removendo 55% da OTA. No entanto, estes produtos reduziram as antocianinas totais (CA-15,4% e MIX-47,3%) e conseqüentemente a intensidade de cor (CA-3,3% e MIX-9,8%). A manoproteína 2 (MP2) mostrou alguma eficácia na remoção da OTA (\cong 18%), apresentando a vantagem de não reduzir significativamente a intensidade e tonalidade corante, as antocianinas coradas e totais, e os pigmentos poliméricos e totais.

Observou-se também que os produtos enológicos sem carvão ativado na sua composição têm pouco efeito na remoção de OTA tanto no vinho branco como no vinho tinto.

Estes resultados fornecem informações úteis para os vinicultores, nomeadamente para a seleção do produto enológico mais adequado para a remoção de OTA dos vinhos, melhorando a segurança alimentar e a qualidade do vinho. No entanto seria necessário efetuar mais estudos para se conseguir um produto que remova a OTA do vinho, mas que mantenha as suas características e a sua qualidade.

Referências Bibliográficas

- Abrunhosa, L.; Paterson, R. R. M.; Kozakiewicz, Z.; Lima, N.; Venâncio, A. 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 240-242.
- Abrunhosa, L., Fernandes, A., Venâncio, A. 2005. Ochratoxin A removal during the main steps of Wine Making. 7º Encontro de Química dos Alimentos, Viseu, Portugal, 13-16 de Abril.
- Amézqueta, S.; González-Peñas, E.; Murillo-Arbizu, M.; Cerain, A. L. 2009. Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control*, 20, 326-333.
- Anli, R. E., Vural N., and Bayram, M. 2011. Removal of Ochratoxin A (OTA) from Naturally Contaminated Wines During the Vinification Process. *Journal of the Institute of Brewing*, 117, 3, 456-461.
- Arbuger, E. 2010. Influência da aplicação de clarificantes protéicos nas características físico químicas e sensoriais do vinho Merlot da Serra Gaúcha Instituto Federal Rio Grande do Sul – Campus Bento Gonçalves.
- Balasaheb, W. P., Sinha, N., Dwivedi, P., Sharma, A. K. 2007. Teratogenic effects of ochratoxin A and aflatoxin B1 alone and in combination on post implantation rat embryos in culture. *Journal of the Turkish German Gynecology Association, Ártemis*, 8, 4, 357-364.
- Battilani, P. (2008). Prevention of Ochratoxin A in Grapes and Wine. Em: *Mycotoxins - Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*, J. F. Leslie, R. Bandyopadhyay e A. Visconti (ed.), CAB International, Oxfordshire, p. 245-255.
- Battilani, P., Pietri, A. 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 639-643.
- Battilani, P., Barbano, C., Marín, S., Sanchis, V., Kozakiewicz, Z., Magan, N. 2006. Mapping of *Aspergillus section Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. *International Journal of Microbiology*, 111, S72-S82.
- Bejaoui, H. 2005. Champignons ochratoxinogènes et ochratoxine A (OTA) dans des vignobles Français et procédés biologiques de décontamination de l'OTA dans les moûts de raisin. Institut National Polytechnique de Toulouse, Ecole Nationale Supérieure Agronomique.
- Blouin, J., Peynaud, E., 2004. *Enología Práctica: conocimiento y elaboración del vino*. 4ª edición, Mundi – prensa, Madrid, 353p.
- Bornet, A.; Teissedre, P. L. 2008. Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (irons, leads, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines. *European Food Research and Technology*, 226(4), 681-689.

- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. 1995. Principles and practices of winemaking. Springer, New York, NY.
- Bowyer, P., Gouty, C., Moine, V., March, R., Battaglione, T. 2010. CMC: A new potassium bitartrate stabilisation tool. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, 558, 65–68.
- Bravo-Haro, S., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C. 1991. Nota. Influencia de distintos clarificantes sobre las fracciones polifenólicas y el color en un vino tinto envejecido. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 31, 4, 584-590.
- Brown, A. L., Odell, E. W., Mantle, P. G. 2007. DNA ploidy distribution in renal tumors induced in male rats by dietary ochratoxin. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59, 2, 85-95.
- Brugirard, A. 1997. Aspects pratiques du collage des moûtes et des vins. Collection Avenir Oenologie.
- Caillet, M. M. 1994. Stabilisation et clarification des vins par le collage. *Revue des Oenologues*, 74, 15-18.
- Castellari, M., Versari, A., Fabiani, A., Parpinello, G. P., and Galassi, S. 2001. Removal of Ochratoxin A in Red Wines by Means of Adsorption Treatments with Commercial Fining Agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 8, 3917-3921.
- Castellucci, F., 2010. Determination of carboxymethyl cellulose (cellulose gum, CMC) in white wines. Resolution OIV/OENO 404/ 2010.
- Chorniak, J. 2007. A Clearer Understanding of Fining Agents. *WineMaker magazine*; Oct/Nov 2007.
- Cosme, F., Capão, I., Filipe-Ribeiro, L., Bennett, R. N., Mendes-Faia, A. 2012. Evaluating potential alternatives to potassium caseinate for white wine fining: Effects on physicochemical and sensory characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 382-387.
- Curvelo-Garcia. 1988. *Controlo de Qualidade dos Vinhos - Química Enológica - Métodos Analíticos*, Instituto da Vinha e do Vinho, Lisboa, 420.
- Delanöe, D., Maillard, C., Maisondieu, D. 2001. *Le vin – De l'Analyse à l'Elaboration*. Coleção Euroagro. Publicações Europa-América, 228, 93-168.
- Diretiva 2007/68/EC que altera o anexo III A da Diretiva 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho no que respeita a determinados ingredientes alimentares.

- Dörrehaus, A., Flieger, A., Golka, K., Schulez, H., Albrecht, M., Degen, G., Follman, W. 2000. Induction of unscheduled DNA synthesis in primary human urothelial cells, *Toxicological Sciences*, 53, 271-277.
- Dubernet, M. 2002. Note de synthèse sur l'Ochratoxine A dans les vins. OIV FV 1161.
- Dumeau, F., Trioné, D. 2000. Influence de différents traitements sur la concentration en ochratoxine A des vins rouges. *Revue des Œnologues* 95, 37-38.
- Ferreira, R. B., Piçarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R. 2002. The wine proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 230-239.
- Gambutì, A., Rinaldi, A., Moio, L. 2012. Use of patatin, a protein extracted from potato, as alternative to animal proteins in fining of red wine *European Food Research and Technology*, 235 (4), 753–765.
- 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*, 11, 93-96.
- Guisse, R., Filipe-Ribeiro, L., Nascimento, D., Bessa, O., Nunes, F. M., Cosme, F. 2014. Comparison between different types of carboxymethylcellulose and other oenological additives used for white wine tartaric stabilization. *Food Chemistry*; 156, 250-7.
- Gómez-Alonzo, S., Hermosín-Gutiérrez, I., Garcíaromero, E. 2007. Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 608-613.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 2014. Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.
- Iturmendi, N., Duran, D., Marín-Arroyo, M.R. 2010. Fining of red wines with gluten or yeast extract protein. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 200–207.
- Jackson, R. S. 2008. *Wine Science - Principles and Applications*. Academic Press.
- JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Monographs & evaluation (JECFA 47 2001), Disponível em www.inchem.org.
- Kozakiewicz, Z.; Battilani, P.; Cabañes, F. J.; Venâncio, Armando; Logrieco, A.; Tjamos, E.; Lichter, A.; Magan, N.; Sanchis, V.; Lebrìhi, A.; Zinzani, G.; Minguéz, S. 2004 Making wine safer: the case of Ochratoxin A. In D. Barug, H. van Egmond, R. Lopez-Garcia, T. Van Osenbruggen, A. Visconti, *Meeting the Mycotoxin Menace*, Wageningen: Wageningen Academic Publishers. ISBN: 978-90-8686-523-9, 133-142.

- Kramling, T. E., Singleton, V. L. 1969. Na estimate of the non flavonoide phenols in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 20, 86-92.
- Lagune, L., Glories, Y. 1996. Les gelatins oenologiques: caracteristiques, proprietes. *Revue Francaise d'Oenologie*, 158, 19-25.
- Lambri, M., Dordoni, R., Silva, A., De Faveri, D. M. 2010. Effect of Bentonite Fining on Odor-Active Compounds in Two Different White Wine Styles. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61, 225-233.
- Lefebvre, S., Maury, C., Poinssaut, P., Gerland, C., Gazzola, M., Sacillotto, R. 1999, Le collage des vins: influence du poids moléculaire des gélatines et premiers essais de colles d'origine végétale *Revue des Enologues*, 94, 37-40.
- Leitner, A., Zöllner, P., Paolillo, A., Stroka, J., Papadopoulou-Bouraoui, A., Jaborek, S., Anklam, E., Lindner, W. 2002. Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine. *Analytica Chimica Acta*, 453, 33-41.
- Leong, S. L., Hocking, A. D., Pitt, J. I. 2004. Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, 83-88.
- Leong, S. L., Hocking, A. D., Pitt, J. I., Kazi, B. A., Emmett, R. W., Scott, E. S. 2006a. *Black Aspergillus* species in Australian vineyards: from soil to ochratoxin A in wine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 571, 153-171.
- Leong, S. L., Hocking, A. D., Pitt, J. I., Kazi, B. A., Emmett, R. W., Scott, E. S. 2006b Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 10-17.
- Lipka, Z. 1974. Qualité des bentonites utilisées pour le traitement des moûts et des vins. *Revue suisse de viticulture*, VI, 147-155.
- López de Cerain, A., González-Peñas, E., Jiménez, A. M., Bello, J. 2002. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food Additives and Contaminants*, 19, 1058-1064.
- Lo Curto, R., Pellicanò, T., Vilasi, F., Munafò, P., Dugo, G. 2004. Ochratoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatments on grapes. *Food Chemistry*, 84, 71-75.
- Lubbers S., Léger B., Charpentier C., Feuillat M. 1993. Effet colloïde-protecteur d'extraits de parois de levure sur la stabilité tartrique d'une solution hydro alcoolique modèle. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 27, 13-22, 65-66.

- Machado-Nunes, M., Laureano, O., Ricardo-da-Silva, J. M. 1995. Influência do tipo de cola e metodologia de aplicação nas características físico-químicas e sensoriais do vinho. In : Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, 3, 99-115.
- Marchal, R., Sinet, C., Maujean, A. 1993. Étude des gelatines oenologiques et du collage des vins de base champenois. Bulletin de l'OIV, 751/752, 691-725.
- Marchal, R., Marchal-Delahaut, L., Lallement, A., Jeandet, P. 2001 Wheat gluten used as a clarifying agent of red wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (1), 177–184.
- Mauzy, C., Sarni-Manchado, P., Lefebvre, S., Cheynier, V., Moutounet, M. 2003 Influence of fining with plant proteins on proanthocyanidin composition of red wines. American Journal of Enology and Viticulture, 54 (2), 105–111.
- Mendonça, C., Abrunhosa L., Serra, V., Venâncio, A., 2003 Contaminação fúngica das uvas e ocratoxina A em vinhos. Comunicação apresentada na Conferência Impacto da contaminação fúngica sobre a competitividade de vinhos: ocratoxina A, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- Mídio, A. F. 2000. Toxicologia de Alimentos. Edição Vareta, São Paulo – Brasil, 1ª Edição, 295.
- Mira, H., Leite, P., Ricardo-da-Silva, J., Curvelo-Garcia, A.S. 2006. Plant Proteins in wine fining: Influence on chemical and sensory characteristics. Bulletin de l'OIV, 79, (904-906) 277-296.
- Monaci, L.; Palmisano, F. 2004. Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378, 96-103.
- Morris, J., R. e Main, G., L. (1995). Fining Agents for Wine. Em *Proceedings of 14th NM Congress*
- Navarre, C. 1997. Enologia: Técnicas de produção do vinho. Coleção Euroagro. Publicações Europa-América, Lda.
- Nogueira S., Oliveira, M. B. P. P. 2006. Prevalência de Ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação, 12, 2, 69-75.
- OIV (Organisation International de la Vigne et du Vin) 2006a. Récueil de Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Moûts. Paris: Edition Officielle.
- OIV. 2012. Codex Oenologique International. OIV, Edition, Paris.
- Otteneder, H., Majerus, P. 2000. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. Food Additives and Contaminants, 17, 793-798.

- Paetzold, M., Dulau, L., Dubourdieu, D. 1990. Fractionnement et caractérisation des glycoprotéines dans les moûts de raisins blancs. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 24, 13-28.
- Palma, N., Cinelli, S., Sapora, O., Wilson, S. H., Dogliotti, E. 2007. Ochratoxin A - induced mutagenesis in mammalian cells is consistent with the production of oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 20, 7, 1031-1037.
- Pereira, I. M., Moretti, R. H. 1997. Caracterização física, química e sensorial do vinho branco seco Sauvignon Blanc tratado com Polivinilpirrolidona (PVPP). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 17(2), 192-195.
- Peynaud, E. 1993. *Conhecer e trabalhar o vinho*. Litexa Editora 1993.
- Poinsaut, P., Hardy, G. 1995. Utilisation des bentonites en Oenologie (3ème partie). *Revue des Oenologues*, 77, 29-33
- Quintela, S., Villarán, M. C., López De Armentia, I., Elejalde, E. 2012. Ochratoxin A removal from red wine by several oenological fining agents: bentonite, egg albumin, allergen-free adsorbents, chitin and chitosan. *Food Additives and Contaminants*, 29, 7, 1168-1174.
- Rankine, B. 2000. *Manual Práctico de Enología*. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Regulamento (CEE) Nº. 123/2005. Teores máximos de ocratoxina A presente nos géneros alimentícios, *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Regulamento (EU) Nº1169/2011 - Aprova as novas regras de rotulagem dos alimentos.
- Regulamento (CEE) Nº. 606/2009. Categorias de produtos vitivinícolas, as práticas enológicas e as restrições que lhe são aplicáveis. Comissão, *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P. 1977. *Traité d'Oenologie. Sciences et techniques du vin. Tome IV*. Dunod (ed.), Paris.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. 1998. *Traité d'œnologie 2. Chimie du vin. Stabilisation et traitements*. Dunod, Paris.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. 2002. *Tratado de enología: química del vino, estabilización y tratamientos*. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 385-394.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., e Dubourdieu, D. 2006a. *Handbook of Enology, Vol. 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2nd Edition*.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. 2006b. The Use of Sulfur Dioxide in Must and Wine Treatment. *Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications*, 1, 193-221.

- Ricardo-da-Silva, J. M., Veronique, C., Jean Marc, S., Michel, M. 1991. Interaction of grapes seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 7, 111-125.
- Ricardo-Da-Silva, J. M., Cosme, F., Laureano, O. 2007. Protein fining agents: characterization and red wine fining assays. *Italian journal of Food Science*, 19 (1), 39–56.
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J., Larondelle, Y. 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, na update. *Chemico-Biological Interactions*, 159, 18-46.
- Rossiello, M. R., Rotunno, C., Coluccia, A., Carratù, M. R., Di Santo, A., Evangelista, V., Semeraro, N., Colucci, Mario. 2008. Ochratoxin A inhibits the production of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 by human blood mononuclear cells: Another potential mechanism of immune-suppression. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 229, 227-231.
- Ruhland, M., Engelhardt, G., Wallnöfer, P. R. 1997. Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in artificially contaminated vegetables and cereals. *Mycotoxin Research*, 13, 54-60.
- Sarni-Manchado, P., Deleris, A., Avallone, S., Cheynier, V., Moutounet, M. 1999. Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by proteins used fining agent in enology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 1, 81-86.
- Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Harbison, R., Sánchez-Ramos, J. 2006. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *Neurotoxicology*, 27, 1, 82-92.
- Schneider, V. 1988. A caseína – uma cola pouco conhecida. *Enologia*, 11, 57–62.
- Schneider, V. 1998. Must Hyperoxidation: A review. *American Society for Enology and Viticulture*, 49, 1.
- Scotti, B., Poinsaut, P. 1997. Le collage á la gélatine: entre science et traditions. *Revue des Oenologie*, 85, 41-47.
- Scotti, B., Gomes, D., Santos, J., 2010. Carboximetilcelulose: contributos para a sua melhor utilização. Enartis, Portugal.
- Scussel, V. M. 1998 *Micotoxinas em alimentos*. Florianópolis: Insular, 144.
- Serra, R. M. A. 2005. *Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A*. Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Braga.
- Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., Venâncio A. 2003. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 63-68.

- Serra, R., Mendonça, C., Venâncio, A. 2006a. Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S35-S39.
- Serra, R., Lourenço, A., Alípio, P., Venâncio, A. 2006b. Influence of the region of origin on the mycobiota of rapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological Research*, 110, 971-978.
- Sims, C. A., Eastridge, J. S., Bates, R. P. 1995. Changes in phenols, color, and sensory characteristics of Muscadine wines by pre-fermentation and post-fermentation additions of PVPP, casein, and gelatin. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 155-158.
- Singleton, V. L., Kramling, T. E. 1976. Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity. *American Journal of enology and Viticulture*, 157-160.
- Soares, L. M. V. 1997. Ocorrência de micotoxinas em alimentos: situação em São Paulo. *Ciência de alimentos: avanços e perspectivas*, 2, 94-95.
- Somers, T. C., Evans, M. E. 1977. Spectral evaluation of young red wine, anthocyanin equilibrium, total phenolic, free and molecular SO₂. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 279-287.
- Togores, J. 2003. *Tratado de Enologia*. Tomo II, Mundi-prensa, Madrid.
- Tozlovanu, M., Faucet-Marquis, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A. 2006. Genotoxicity of the hydroquinone metabolite of ochratoxin A: Structure-activity relationships for covalent DNA adduction. *Chemical Research in Toxicology*, 10/2006.
- Tschiersch, C., Nikfardjam, M.P., Schmidt, O., Schwack, W. 2010. Degree of hydrolysis of some vegetable proteins used as fining agents and its influence on polyphenol removal from red wine. *European Food Research and Technology*, 231, 65-74.
- Turner, N. W., Subrahmanyamb, S., Piletskyb, S. A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632, 168-180.
- Úbeda, R. M. 2000. *Teoría de la clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas*. Mundi Prensa
- Valenta, H. 1998. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography A*, 815, 75-92.
- Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205, 1112-1113.

- Var, I., Kabak, B., Erginkaya, Z. 2008. Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. *Food Control*, 2008, 19, 592-598.
- Versari, A., Barbanti, D., Potentini, G., Mannazzu, I., Salvucci, A., Galassi, S. 1998. Physicochemical characteristics of some oenological gelatins and their action on selected red wine components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78, 245-250.
- Zimmerli, B., Dick, R. 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, 13, 655-668.
- Zoecklein, B, Fugelsang, K, Gump, B, Nury, F. 2001. *Análisis y Producción de Vino*. Editorial Acribia S. A. Zaragoza. España.

Sites Citados:

<http://www.enartis.com.pt/?mode=prodotti&id=27>

http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFAC/ccfac31/FA99_14S.pdf

**Divulgação dos resultados no âmbito desta
dissertação**

Comunicação em congressos na forma de painel e oral

Filipa Carvalho, António Inês, Fernando Milheiro Nunes, Luís Filipe-Ribeiro, Ana Guimarães, Luís Abrunhosa, Fernanda Cosme. 2014. Redução do teor de ocratoxina A em vinho branco: Aplicação de produtos enológicos de diferentes origens. 4th Infowine.forum, 4-5 de junho, Vila Real, Portugal (Poster)

Filipa Carvalho, António Inês, Fernando Milheiro Nunes, Luís Filipe-Ribeiro, Ana Guimarães, Luís Abrunhosa, Fernanda Cosme. 2014. Redução do teor de ocratoxina A em vinho branco: Aplicação de produtos enológicos de diferentes origens. 4th Infowine.forum, 4-5 de junho, Vila Real, Portugal (Resumo p.35).

Filipa Carvalho, António Inês, Fernando M. Nunes, Luís Filipe-Ribeiro, Luís Abrunhosa, Fernanda Cosme, 2014. Influence of several oenological fining agents on ochratoxin A removal. 12º Encontro de Química dos Alimentos, 10, 11 e 12 de setembro, Lisboa, Portugal (artigo em proceeding).

Filipa Carvalho, António Inês, Fernando M. Nunes, Luís Filipe-Ribeiro, Ana Guimarães, Luís Abrunhosa, Fernanda Cosme, 2014. Influence of several oenological fining agents on ochratoxin A removal. 12º Encontro de Química dos Alimentos, 10, 11 e 12 de setembro, Lisboa, Portugal (Poster).

Filipa Carvalho, António Inês, Fernando M. Nunes, Luís Filipe-Ribeiro, Luís Abrunhosa, Fernanda Cosme. 2014. Analytical evaluation of fining treatments for white wines contaminated by Ochratoxin A. XX Encontro Luso-Galego de Química Filipa 26 a 28 de novembro (Poster).

Filipa Carvalho, António Inês, Fernando M. Nunes, Luís Filipe-Ribeiro, Luís Abrunhosa, Fernanda Cosme. 2014. Analytical evaluation of fining treatments for white wines contaminated by Ochratoxin A. XX Encontro Luso-Galego de Química, Porto, 26 a 28 de novembro (Resumo).

Filipa Carvalho, António Inês, Fernando M. Nunes, Luís Filipe-Ribeiro, Luís Abrunhosa, Fernanda Cosme. 2015. Avaliação da eficiência de diferentes produtos enológicos na remoção de ocratoxina A de vinho. Jornadas de Bioquímica 15 e 16 de abril, UTAD, Vila Real (Poster).

Filipa Carvalho, António Inês, Fernando M. Nunes, Luís Filipe-Ribeiro, Luís Abrunhosa, Fernanda Cosme. 2015. Avaliação da eficiência de diferentes produtos enológicos na remoção de ocratoxina A de vinho. Jornadas de Bioquímica 15 e 16 de abril, UTAD, Vila Real (Resumo)

António Inês, Davide Silva, Filipa Carvalho, Luís Filipe-Ribeiro, Fernando M. Nunes, Luís Abrunhosa, Fernanda Cosme. 2015. Food Safety in Wine: Removal of Ochratoxin A in Contaminated White Wine using Commercial Fining Agents. code 15CH071053, ICNFS 2015: 17th International Conference on Nutrition and Food Sciences, Zurich, Switzerland, July, 29-30, 2015. pp.2878-2878 (resume).

António Inês, Davide Silva, Filipa Carvalho, Luís Filipe-Ribeiro, Fernando M. Nunes, Luís Abrunhosa, Fernanda Cosme. 2015. Food safety in wine: removal of ochratoxin a in contaminated white wine using commercial fining agents. ICNFS 2015: 17th International Conference on Nutrition and Food Sciences. Zurich, Switzerland, July 29 30, 2015 (comunicação oral).

Fernanda Cosme, Filipa Carvalho, Davide Silva, Luís Filipe-Ribeiro, Fernando M. Nunes, Luís Abrunhosa, António Inês. 2016. Contribution for food safety in wine: the application of oenological fining agents to remove ochratoxin A from contaminated white and red wines. 39º World Congress of Vine and Wine, OIV, 23 – 28 outubro, Bento Gonçalves, Brasil. (comunicação oral).

Fernanda Cosme, Filipa Carvalho, Davide Silva, Luís Filipe-Ribeiro, Fernando M. Nunes, Luís Abrunhosa, António Inês. 2016. Contribution for food safety in wine: the application of oenological fining agents to remove ochratoxin A from contaminated white and red wines. 39º World Congress of Vine and Wine, OIV, 23 – 28 outubro, Bento Gonçalves, Brasil, pp 5 (ata de congresso).