

**ASPERGILLUS OCRATOXIGÊNICOS EM UVAS E NO SOLO DE CULTIVO DA
VARIEDADE SAUVIGNON BLANC DO NORDESTE BRASILEIRO**

MICHELLE FERREIRA TERRA¹, THAÍS HEGENBERG OTERO², LUÍS ROBERTO BATISTA³,
GUILHERME PRADO⁴, GIULIANO PEREIRA⁵

RESUMO

A ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário de fungos freqüentemente encontrado como contaminante de uvas, vinhos e suco de uva, sendo considerada uma das micotoxinas mais prejudiciais para a saúde humana. Este estudo teve como objetivo avaliar a incidência de *Aspergillus* ocratoxigênicos em uvas e no solo de cultivo da variedade Sauvignon Blanc utilizada para produção de vinho no nordeste brasileiro. As amostras de uva e de solo foram coletadas em uma região vitivinícola do Submédio São Francisco (Casa Nova, Bahia). Para o isolamento de fungos das uvas e sementes utilizou-se a Técnica de Plaqueamento Direto em meio de cultura DRBC (Dicloran Rosa Bengal Cloranfenicol); para a amostra de solo foi utilizada a técnica de espalhamento superficial, em DG 18 (Dichloran 18% Glycerol Agar), a partir de diluições seriadas. Selecionou-se para obtenção de culturas puras apenas os fungos do gênero *Aspergillus* que foram identificados por características morfológicas e avaliados, quanto à produção de OTA, pelo Método Plug Agar. Das uvas foram isoladas e identificadas as seguintes espécies *A. foetidus*, *A. tubingensis* e *A. sp.*. Destes isolados nenhum foi ocratoxigênico. Dos vinte e nove isolados obtidos do solo, quatro foram ocratoxigênicos (*A. niger* agregado (1), *A. carbonarius* agregado (2) e *A. carbonarius* (1)), o que realça a importância de evitar durante a colheita o contato das uvas com o solo, visto que este pode representar uma fonte de contaminação com esta micotoxina para as uvas e vinhos.

Palavras-chaves: Fungos ocratoxigênicos, Uvas, *Aspergillus*, Ocratoxina A, Solo, Sauvignon Blanc

INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos podem causar a deterioração de uvas e/ou contaminá-las com metabólitos secundários tóxicos, denominados de micotoxinas (Bennett & Klich, 2003). Dentre elas, a OTA é hoje a principal micotoxina encontrada como contaminante de vinhos, sendo considerada uma das mais prejudiciais para a saúde humana (Cast, 2003). Em estudos com animais, a OTA tem demonstrado efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, imunossupressores, genotóxicos e neurotóxicos (Balasaheb et al., 2007).

Em países de clima tropical, as principais espécies produtoras de OTA em alimentos pertencem ao gênero *Aspergillus*, que são fungos de solo capazes de produzir esta micotoxina em uma ampla faixa de temperatura. As espécies *A. brasiliensis*, *A. ibericus* e *A. foetidus* são ocasionalmente encontradas em uvas, e as mais frequentes são: *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. japonicus* e *A. carbonarius* (Oliver et al., 2008). A ocorrência de OTA nas uvas e posteriormente nos mostos, vinhos e sucos de uva deve-se principalmente as condições fitossanitárias da lavoura, uma vez que esta micotoxina é produzida principalmente por espécies de *Aspergillus* que aumentam sua incidência de colonização quando os frutos apresentam algum rompimento da sua película, e durante a maturação (Leong et al., 2006).

¹ Mestranda em Microbiologia Agrícola; DBI/UFLA; terramichelle@bol.com.br

² Graduanda em Engenharia de Alimentos; DCA/UFLA; thais.otero@hotmail.com

³ Professor, DCA/UFLA, luisrb@dca.ufla.br

⁴ Analista de Saúde e Tecnologia; Funed/MG; gui@funed.mg.gov.br

⁵ Pesquisador, Embrapa Semi Árido/PE; gpereira@cnpv.embrapa.br

A contaminação de uvas com OTA pode ocorrer em campo, enquanto as uvas ainda estão na vinha (Serra et al., 2004). Portanto, torna-se importante verificar a incidência de fungos ocratoxigênicos nas uvas e no solo de cultivo das videiras, além de outras etapas da cadeia produtiva do vinho a fim de definir os pontos críticos de controle para adoção de medidas preventivas contra a contaminação deste produto com OTA (Serra et al., 2006). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a incidência de *Aspergillus* ocratoxigênicos em uvas e no solo de cultivo da variedade Sauvignon Blanc utilizada para produção de vinho no nordeste brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Para este estudo foram coletadas amostras de uva e solo de cultivo da variedade Sauvignon Blanc utilizada para a elaboração de vinho fino branco em uma região vitivinícola do Submédio São Francisco, localizada no município de Casa Nova, Bahia. O Vale do Submédio São Francisco está situado em áreas dos Estados da Bahia e Pernambuco no nordeste brasileiro. Nessa região, a altitude varia de 200 a 800 m e o clima é caracterizado como tropical semi-árido. A precipitação média anual é de 350 mm e a temperatura média anual é de 27 °C.

A amostra de uva foi coletada na vinha na mesma época da colheita local para elaboração do vinho, sendo composta por 3 kg de cachos de uva. Foram colhidos cachos para análise sem podridão aparente, representativos do estado observado na vinha. A colheita foi realizada de forma a tocar o mínimo possível nas bagas. Foi coletada amostra de solo representativa da parcela correspondente a variedade de uva vinífera analisada. Com o auxílio de um trado, retirou-se três subamostras de solo na profundidade de 0-20 cm, resultando num total aproximado de 300 g de solo. Devido ao tratamento homogêneo do solo na parcela, a amostragem foi realizada de forma aleatória. As subamostras foram homogeneizadas em sacos plásticos estéreis e mantidas sob refrigeração durante o transporte para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas da Universidade Federal de Lavras, onde foram realizadas as análises microbiológicas.

Isolamento e identificação de fungos filamentosos

Para o isolamento de fungos das uvas utilizou-se a Técnica de Plaqueamento Direto em meio de cultura Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), conforme descrito por Samson et al. (2000). Foram selecionadas 100 bagas ao acaso e as demais foram utilizadas para extração de sementes. As bagas e sementes foram submetidas ao procedimento de desinfecção superficial, de acordo com o descrito por Samson et al. (2000). Um total de 100 bagas e 100 sementes foram plaqueadas e incubadas no escuro por 5 a 7 dias à 25°C

Para a amostra de solo utilizou-se a técnica de espalhamento superficial a partir de diluições seriadas. Para isto, 10g de solo foi homogeneizada com 90 mL de água peptonada 0,1% estéril, seguindo-se da agitação em shaker a 130 rpm por 30 minutos. Pelo método de semeadura em superfície transferiu-se, em triplicata, 0,1 mL da suspensão de cada uma das diluições utilizadas (1:10, 1:100, 1:1000) por placa de Petri estéril contendo o meio de cultura Agar Dicloran Glicerol a 18% (DG18). As placas foram incubadas no escuro por 5-7 dias a 25°C.

Dentre os fungos filamentosos que cresceram sobre as bagas e sementes e nas placas com as diluições do solo, foram selecionados para obtenção das culturas puras apenas os fungos do gênero *Aspergillus* pertencentes a Seção Nigri, conforme aspectos morfológicos característicos das colônias. Para a purificação das colônias fúngicas utilizou-se o meio de cultura Agar Malt a 2% (MA). Os fungos em cultura pura foram incubados em meios e temperaturas padronizados e identificados de acordo com Klich (2002).

Deteção da produção de OTA pelas linhagens fúngicas

Todos os fungos identificados foram testados quanto à produção de OTA pelo método Plug Agar (Bragulat et al., 2001). Para isto, os isolados foram inoculados no meio de cultura Czapek Yeast Agar (CYA), sendo incubados por 7 dias a 25°C, conforme descrito por Filtenborg & Frisvad (1980). Posteriormente, 1 disco da colônia pura de cada isolado foi colocado, em pontos equidistantes, na Placa de Cromatografia de Camada Delgada. Para cada teste utilizou-se 10 µL de solução padrão de

ocratoxina A (Sigma-Aldrich) e uma fase móvel composta por Tolueno, Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (50:40:10). Após a eluição, as placas foram secas em capela de fluxo laminar. A confirmação quanto à produção de OTA foi efetuada sob luz ultravioleta de λ 366 nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de OTA apresentaram um RF (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão da micotoxina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das uvas analisadas um isolado foi obtido a partir das bagas, sendo identificado em *A. foetidus* e quinze isolados foram obtidos das sementes que foram identificados nas seguintes espécies *A. foetidus* (60,0%), *A. tubingensis* (20,0%) e 20,0% foram considerados como *A. sp.* por não ser possível identificá-los em nível de espécie através das características morfológicas avaliadas. Destes isolados obtidos nenhum foi considerado como potencialmente ocratoxigênico (Tabela 1), o que era esperado visto que na literatura estas espécies não são relatadas como produtoras de OTA. A ocorrência de apenas um isolado de *Aspergillus* nas bagas pode estar relacionado com a ausência de danos na superfície destas, o que está de acordo com estudos de Leong et al. (2006) que afirmam sobre a maior incidência de colonização das uvas por *Aspergillus* quando estas apresentam algum rompimento em sua película. Além disso, Zimmerli & Dick (1996) sugerem outros fatores que podem influenciar na incidência de fungos nas uvas, como diferentes práticas usadas no cultivo de uvas, como, por exemplo, uso de praguicidas, os tipos de variedades cultivadas, além das condições climáticas da região vitivinícola.

Da amostra de solo foram obtidos vinte e nove isolados, sendo identificadas as espécies *A. tubingensis* (34,48%), *A. niger* agregado (31,03%), *A. aculeatus* (13,79%), *A. niger* (10,34%), *A. carbonarius* agregado (6,90%) e *A. carbonarius* (3,45%). Conforme mostra a Tabela 1, um isolado de *A. niger* agregado, dois de *A. carbonarius* agregado e um de *A. carbonarius* foram ocratoxigênicos.

Tabela 1 - Resultado do teste de avaliação do potencial ocratoxigênico das espécies de *Aspergillus* isoladas e identificadas das bagas, sementes e do solo de cultivo da variedade vinífera Sauvignon Blanc

| Espécies de <i>Aspergillus</i> | Número de isolados | Isolados produtores de OTA |
|--------------------------------|--------------------|----------------------------|
| Bagas | | |
| <i>A. foetidus</i> | 01 | - |
| Sementes | | |
| <i>A. foetidus</i> | 09 | - |
| <i>A. tubingensis</i> | 03 | - |
| <i>A. sp.</i> | 03 | - |
| Solo | | |
| <i>A. tubingensis</i> | 10 | - |
| <i>A. niger</i> agregado | 09 | 01 |
| <i>A. aculeatus</i> | 04 | - |
| <i>A. niger</i> | 03 | - |
| <i>A. carbonarius</i> agregado | 02 | 02 |
| <i>A. carbonarius</i> | 01 | 01 |
| TOTAL | 45 | 04 |

De acordo com a Tabela acima é possível observar que todas as espécies obtidas a partir das amostras da variedade Sauvignon Blanc são encontradas como contaminantes de uvas, conforme relata a literatura (Oliver et al., 2008). Além disso, os isolados considerados como potencialmente produtores de OTA são espécies de *Aspergillus* relatadas como as maiores fontes de OTA em vinho, uva e derivados da uva (Frisvad et al., 2007). Os três isolados da espécie *A. carbonarius* obtidos foram potencialmente ocratoxigênicos, o que está de acordo com a literatura que considera esta espécie de *Aspergillus* como uma das mais relevantes em termos de produção de OTA, principalmente nas uvas (Tabela 1) (Bellí et al., 2004; Oliver et al., 2008).

A presença de isolados ocratoxigênicos apenas no solo de cultivo desta variedade não indica que as uvas utilizadas para elaboração do vinho estarão livres desta micotoxina, pois se não forem tomados os cuidados para evitar o contato das uvas com o solo durante a colheita, estas podem ser contaminadas por fungos ocratoxigênicos presentes no solo, comprometendo o produto final.

CONCLUSÃO

Das uvas da variedade Sauvignon Blanc foram isoladas e identificadas as seguintes espécies *A. foetidus*, *A. tubingensis* e *A. sp.*. Destes isolados nenhum foi considerado ocratoxigênico. A partir do solo vinte e nove isolados foram obtidos, sendo identificadas as espécies *A. tubingensis*, *A. niger* agregado, *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. carbonarius* agregado e *A. carbonarius*. Os isolados potencialmente toxigênicos foram *A. niger* agregado (1), *A. carbonarius* agregado (2) e *A. carbonarius* (1), sendo espécies de *Aspergillus* relatadas como as maiores fontes de OTA em vinho, uva e derivados da uva. A detecção de fungos ocratoxigênicos em solo de vinhedo realça a importância de evitar durante a colheita o contato das uvas com o solo, visto que este pode representar uma fonte de contaminação com esta micotoxina para as uvas e vinhos.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

BALASAHEB, W.P.; SINHA, N.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A. K.. Teratogenic effects of ochratoxin A and aflatoxin B1 alone and in combination on postimplantation rat embryos in culture. **Journal of the Turkish German Gynecology Association**, Ártemis, v.8, n.4, p. 357- 364, 2007.

BELLÍ, N.; PARDO, E.; MARÍN, S.; FARRÉ, G.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.84, p.541-546, 2004.

BENNETT, J.W.; KLICH, M.A. Mycotoxins. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.16, p.497–516, 2003.

BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **Int. J. Food Microbiol.**, 71:139-144, 2001.

CAST - Council for agricultural science and technology. **Mycotoxins: risks in plants, animal and human systems**, Report No. 139, CAST, Ames, 2003.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O.; VRINES, R.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; CABAÑES, F. J.; EHRICH, K.; SAMSON, R. A. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 31-37, 2007.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 13, p. 128-130, 1980.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelculture, 2002.

LEONG, S.L; HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; KAZI, B. A.; EMMETT, R. W.; SCOFF, E. S. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.111, n.S1, p.S10-S17, 2006.

OLIVER, C.; TORTA, L.; CATARA, V. A polyphasic approach to the identification of ochratoxin A-producing black *Aspergillus* isolates from vineyards in Sicily. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, p. 147-154, 2008.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4. ed. Centraalbureau: Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000.

SERRA, R.; MENDONCA, C.; ABRUNHOSA, L.; PIETRI, A.; VENÂNCIO, A. Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation. **Anal. Chim. Acta**, v. 513, p. 41–47, 2004.

SERRA, R.; MENDONÇA, C.; VENÂNCIO, A. Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 42 – 47, 2006.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 655-68, 1996.