

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

FUNGOS OCRATOXIGÊNICOS EM SOLO DE CULTIVO DE UVAS VINÍFERAS NO NORDESTE BRASILEIRO

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

RESUMO

Ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário de origem fúngica que tem recebido atenção crescente devido ao potencial perigo para os seres humanos e animais. Este estudo teve como objetivo avaliar a incidência de fungos ocratoxigênicos do gênero *Aspergillus* em solos de cultivo de uvas viníferas no nordeste brasileiro. Foram coletadas amostras de solo de cultivo de três variedades de uvas viníferas, Cabernet Sauvignon, Grenache e Petit Verdot de uma região vitivinícola do nordeste brasileiro. Para o isolamento de fungos 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 amostras de solo foram isoladas e identificadas as seguintes espécies *A. foetidus*, *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* e *A. ibericus*. Dos vinte e quatro isolados fúngicos obtidos quatro foram ocratoxigênicos (*A. niger* (1), *A. tubingensis* (1) e *A. carbonarius* (2)), o que evidencia 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 viníferas, *Aspergillus*, Ocratoxina A, Solo

INTRODUÇÃO

A ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário de origem fúngica que tem recebido atenção crescente devido ao potencial perigo para os seres humanos e animais. A ocorrência da OTA é relatada em uma grande variedade de alimentos, entre eles o vinho e derivados da uva, que são considerados uma das principais fontes de OTA para os seres humanos devido à elevada incidência desta micotoxina nestes produtos (Cast, 2003). Em estudos com animais, a OTA tem demonstrado efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, imunossupressores, genotóxicos e neurotóxicos (Balasaheb et al., 2007). É classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) no grupo 2B, ou seja, como possivelmente carcinogênica para humanos (IARC, 1993).

As principais espécies de fungos ocratoxigênicos contaminantes de uvas pertencem ao gênero *Aspergillus*, que são fungos de solo capazes de produzir OTA 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 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

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@cnpuv.embrapa.br

contaminação deste produto com OTA (Serra et al., 2006). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a incidência de fungos ocratoxigênicos do gênero *Aspergillus* em solos de cultivo de uvas viníferas no nordeste brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Para este estudo foram coletadas amostras de solo de cultivo de três variedades de uvas Cabernet Sauvignon, Grenache e Petit Verdot, utilizadas para a elaboração de vinho tinto 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.

Foram coletadas amostras de solo representativas por parcela correspondente a cada variedade de uva vinífera analisada. Com o auxílio de um trado, foram retiradas três subamostras de solo em cada parcela, na profundidade de 0-20 cm, resultando num total aproximado de 300 g de solo para cada amostra a ser analisada. Devido ao tratamento homogêneo do solo em cada parcela da vinha, a amostragem foi realizada de forma aleatória. As subamostras foram homogeneizadas em sacos plásticos estéreis e mantidas em caixa térmica até o transporte para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, onde foram realizadas as análises microbiológicas.

Isolamento e identificação de fungos filamentosos

Para o isolamento de fungos das amostras de solo utilizou-se a técnica de espalhamento superficial a partir de diluições seriadas. Para isto, 10g de cada amostra 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 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). Avaliou-se as características macroscópicas das colônias com o auxílio do microscópio estereoscópio e as microscópicas através de lâminas para observação da morfologia das estruturas reprodutivas.

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

Da amostra de solo de cultivo da variedade Cabernet Sauvignon, nove isolados do gênero *Aspergillus* foram obtidos, sendo identificadas seis espécies: *A. foetidus* (33,33%), *A. aculeatus* (22,22%), *A. niger* (11,11%), *A. tubingensis* (11,11%), *A. carbonarius* (11,11%) e *A. ibericus* (11,11%). Conforme mostra a Tabela 1, apenas o isolado de *A. carbonarius* foi produtor de OTA. Do

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

solo da variedade Grenache foram obtidos oito isolados, sendo identificadas as espécies *A. aculeatus* (37,5%), *A. niger* (25,0%), *A. foetidus* (25,0%) e *A. tubingensis* (12,5%). Destes isolados dois foram ocratoxigênicos, sendo um de *A. niger* e outro de *A. tubingensis* (Tabela 1). A partir da análise do solo da variedade Petit Verdot, dos sete isolados obtidos foram identificadas as espécies *A. tubingensis* (57,14%), *A. aculeatus* (14,28%), *A. foetidus* (14,28%) e *A. carbonarius* (14,28%). Destes fungos o único isolado produtor de OTA foi da espécie *A. carbonarius*, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Resultado do teste de avaliação do potencial ocratoxigênico das espécies de *Aspergillus* identificadas nas amostras de solo de cultivo das variedades de uva Cabernet Sauvignon, Grenache e Petit Verdot

Espécies de <i>Aspergillus</i>	Número de isolados	Isolados produtores de OTA
Cabernet Sauvignon		
<i>A. foetidus</i>	03	-
<i>A. aculeatus</i>	02	-
<i>A. Níger</i>	01	-
<i>A. tubingensis</i>	01	-
<i>A. carbonarius</i>	01	01
<i>A. ibericus</i>	01	-
Grenache		
<i>A. aculeatus</i>	03	-
<i>A. niger</i>	02	01
<i>A. foetidus</i>	02	-
<i>A. tubingensis</i>	01	01
Petit Verdot		
<i>A. tubingensis</i>	04	-
<i>A. aculeatus</i>	01	-
<i>A. foetidus</i>	01	-
<i>A. carbonarius</i>	01	01
TOTAL	24	04

De acordo com a Tabela acima é possível observar que as espécies de *Aspergillus* isoladas das amostras de solo foram semelhantes entre as três variedades de uva, o que pode ser devido à proximidade entre as parcelas de cultivo destas uvas na vinícola, resultando nas mesmas condições climáticas e características físico-químicas do solo. Estes fatores influenciam o desenvolvimento de espécies deste gênero e também a produção de OTA. Os dois 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; Oliveri et al., 2008). Apenas um isolado de *A. niger* foi produtor de OTA e de acordo com estudos embora isolados desta espécie sejam mais abundantes em uvas, apresentam uma menor proporção e estirpes toxigênicas do que *A. carbonarius* (Khoury et al., 2008).

A presença de isolados ocratoxigênicos no solo de cultivo destas variedades de uva potencializa o risco de contaminação das uvas e conseqüentemente dos vinhos com OTA, visto que durante a colheita ou na pré-colheita as uvas podem entrar em contato com o solo e sofrerem infecção fúngica comprometendo o produto final ao serem utilizadas no processamento.

CONCLUSÃO

Das amostras de solo de cultivo das variedades de uva estudadas foram isoladas e identificadas as seguintes espécies *A. foetidus*, *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* e *A. ibericus*. Dos isolados fúngicos obtidos quatro foram ocratoxigênicos, sendo pertencentes às espécies *A. carbonarius* (2), *A. niger* (1) e *A. tubingensis* (1). Nas três amostras de solo foram detectados fungos produtores de OTA. A detecção de fungos ocratoxigênicos em solo de vinhedo

evidência 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.

REFERÊNCIAL 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.

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.

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.

IARC (1993): Ochratoxin A. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans**, v. 56, p. 489-521.

KHOURY, A.; RIZK, T.; LTEIF, R.; AZOURI, H.; DELIA, M. L.; LEBRIHI, A. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine grapes and musts. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.46, n.6, p.2244-2250, 2008.

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

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.

SERRA, R.; MENDONÇA, 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.