

CENTRO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA

Micotoxinas no vinho: problemas e soluções

Luís Abrunhosa

Micotoxinas mais relevantes

- ❖ Aflatoxinas
- ❖ Tricotecenos (DON, T2-toxina, HT2-toxina)
- ❖ Fumonisininas
- ❖ Ocratoxina A
- ❖ Patulina
- ❖ Zearalenona
- ❖ Alcaloides do ergot
- ❖ Micotoxinas de *Alternaria*

Luís Abrunhosa Maio-2015

Micotoxinas

- ❖ As micotoxinas são metabolitos secundários tóxicos produzidos por certos fungos filamentosos
- ❖ Estes fungos crescem nas culturas agrícolas no campo ou durante o seu armazenamento produzindo micotoxinas que entram na cadeia alimentar

Luís Abrunhosa Maio-2015

Micotoxinas

- ❖ Nos vinhos, é também possível encontrar micotoxinas, nomeadamente:
 - ❖ Ocratoxina A - a sua ocorrência é bem conhecida (LG: 2,0 µg/L)
 - ❖ Aflatoxina B2
 - ❖ Fumonisinina B2
 - ❖ Alternariol e Alternariol monometil éter

Luís Abrunhosa Maio-2015

Micotoxinas

- ❖ As micotoxinas constituem uma ameaça para a saúde pública porque possuem diversas propriedades tóxicas: são e.g. teratogénicas, citotóxicas, neurotóxicas, nefrotóxicas, imunossupressoras, estrogénicas e/ou cancerígenas.
- ❖ As aflatoxinas, a ocratoxina A e as fumonisininas estão classificadas nos grupos 1, 2B e 2B pelo IARC.
- ❖ Conhecem-se mais de 400 micotoxinas, no entanto, apenas cerca de 20 são encontradas em quantidades suficientes nos produtos alimentares para constituírem um verdadeiro risco do ponto de vista de segurança alimentar.

Luís Abrunhosa Maio-2015

Ocratoxina A (OTA)

- ❖ A OTA é detetada com frequência em vinho, sumos de uva e uva passas

	Fungos produtores	Efeitos tóxicos	Efeitos patológicos
Ocratoxina A	<ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>A. carbonarius</i> ✓ <i>A. niger</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Nefrotóxica ✓ Citotóxica ✓ Teratogénica ✓ Hepatotóxica ✓ Carcinogénica (categoria 2B) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Nefropatia endémica dos Balcãs ✓ Nefropatia intersticial crónica no Norte de África ✓ Nefropatia em suína ✓ Tumores renais ✓ Enterite

Luís Abrunhosa Maio-2015

Ocratoxina A (OTA)

- ❖ Tipicamente os níveis de OTA são maiores nos vinhos tintos, diminuem nos rosés e são residuais nos brancos.
- ❖ Os níveis de OTA são também mais elevados nos vinhos com origem em climas mais quentes e secos como por exemplo os da bacia Mediterrânica
- ❖ Certos vinhos doces, apelidados de vinhos de sobremesa (*dessert wines*) são os que apresentam maiores incidências e níveis de OTA
- ❖ Por exemplo, num estudo que abrangeu 290 vinhos deste tipo verificou-se uma incidência total de 97% e [OTA] entre 0,01 e 4,63 µg/L (Burdaspal e Legarda, 2007).

Luis Abrunhosa Maio-2015



Fumonisina B2 (FB2)

- ❖ FB2 foi detetada em 21% dos vinhos analisados, [FB2] entre 0,4 e 25,0 µg/L (Mogensen et al., 2010; Logrieco et al., 2010)
- ❖ 7 vinhos portugueses analisados: FB2 foi encontrada apenas em 1 amostra com [FB2] = 2,8 µg/L (Mogensen et al., 2010)
- ❖ Em Portugal, dados recentes mostram que apenas 29% das estirpes de *A. niger* isoladas de uvas são produtoras de FB2 e que apenas 6% das mesmas podem produzir esta micotoxina em concentrações acima de 1 µg/kg (Abrunhosa et al., 2011).

Luis Abrunhosa Maio-2015



Aflatoxina B2 (AFB2)

- ❖ Detetada em vinho e uvas passas
- ❖ Detetou-se aflatoxina B₂ (AFB₂) em vinho (Pérez-Ortega et al., 2012)
- ❖ [AFB₂] de 1,25 a 25,73 µg/L em 21 das 24 amostras de vinho analisadas

	Fungos produtores	Efeitos tóxicos	Efeitos patológicos
Aflatoxina B2	<ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>A. flavus</i> ✓ <i>A. parasiticus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Citotóxica ✓ Teratogénica ✓ Hepatotóxica ✓ Imunossupressoras ✓ Carcinogénica (categoria 1) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tumores no fígado

Luis Abrunhosa Maio-2015



Alternariol e AME

- ❖ Alternariol (AOH) e alternariol monometil éter (AME) foram detetadas em vinho e sumos de uva

	Fungos produtores	Efeitos tóxicos	Efeitos patológicos
AOH e AME	<ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>A. alternata</i> ✓ Várias espécies do género <i>Alternaria</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Genotóxicos ✓ Menos tóxica que outras micotoxinas ✓ Pouco estudados 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pouco estudados

Luis Abrunhosa Maio-2015



Fumonisina B2 (FB2)

- ❖ Detetada em vinho e uvas passas

	Fungos produtores	Efeitos tóxicos	Efeitos patológicos
Fumonisina B2	<ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>A. niger</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Citotóxica ✓ Teratogénica ✓ Hepatotóxica ✓ Imunossupressoras ✓ Carcinogénica (categoria 2B) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Leucoencefalomalacia em cavalos ✓ Edema pulmonar em suínos ✓ Tumores no esófago

Luis Abrunhosa Maio-2015



Alternariol e AME

- ❖ AOH foi detetado em 20 vinhos tintos (83%) em concentrações entre 0,03 a 19,4 µg/L e
- ❖ AME foi detetado em 19 das amostras (79%) em concentrações de 0,01 a 0,23 µg/L (Scott et al., 2006).
- ❖ AOH em 33 vinhos (61%) em concentrações que variaram entre 0,6 e 13,2 µg/L e
- ❖ AME em 8 (14,8%) das amostras em concentrações de 0,2 a 0,53 µg/L (Scussel et al., 2013).

Luis Abrunhosa Maio-2015



Controlo das micotoxinas

- ❖ Estratégias preventivas que procuram evitar a contaminação
 - ❖ **No campo**, controlo de bolores através da correta aplicação de fungicidas
 - ❖ **Na adega**, separação e rejeição de uvas com sinais visíveis de podridão
- ❖ Estratégias de remediação que procuram minimizar o impacto
 - ❖ Métodos físicos (adsorventes)
 - ❖ Métodos químicos
 - ❖ Métodos biológicos (microrganismos ou enzimas)

Luís Abrunhosa Maio-2015



Controlo das micotoxinas

- ❖ Remoção de AFB2 em vinhos por diferentes adsorventes

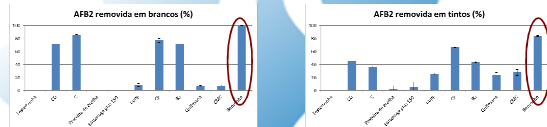


Figura 3. Percentagem (%) de AFB2 removida depois de aplicadas as colas em vinho: (A) Branco e (B) Tinto

- ❖ A bentonite remove muito bem a AFB2

Luís Abrunhosa Maio-2015



Controlo das micotoxinas

- ❖ Remoção de OTA em vinhos por diferentes adsorventes

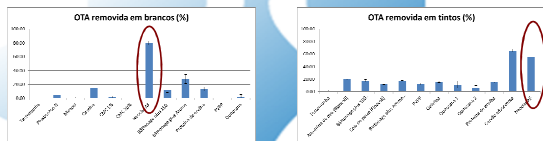


Figura 1. Percentagem (%) de OTA removida depois de aplicadas as colas em vinho: (A) Branco e (B) Tinto

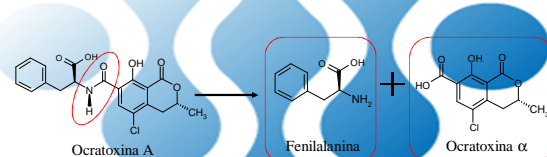
- ❖ Produtos que contêm carvão ativado são os mais eficientes

Luís Abrunhosa Maio-2015



Controlo das micotoxinas

- ❖ No caso da OTA a sua biodegradação permite destoxificar esta micotoxina



Luís Abrunhosa Maio-2015



Controlo das micotoxinas

- ❖ Remoção de OTA em vinhos por diferentes carvões ativados

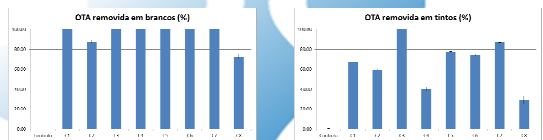


Figura 2. Percentagem (%) de OTA removida depois de aplicados carvões em vinho: (A) Branco e (B) Tinto

- ❖ Diferentes tipos de carvão ativado têm efeitos diferentes
- ❖ Nos vinhos tintos os efeitos são menores

Luís Abrunhosa Maio-2015



Controlo das micotoxinas

- ❖ Diferentes microrganismos podem atuar sobre a OTA

Microrganismos com capacidades adsorventes

- Paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* e as suas glucomannanas
- *Lactobacillus acidophilus*

Microrganismos com capacidade biodegradativa

- *Bacillus licheniformis*, *Phaffia rhodozyma*, *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Acinetobacter calcoaceticus*

Enzimas

- Carboxypeptidase A, CPY and peptidase from *Aspergillus niger*

Luís Abrunhosa Maio-2015



Bactérias lácticas

LAB species	strain	OTA ($\mu\text{M/L}$)	OT α ($\mu\text{M/L}$)	OTA eliminated (%)
Controls/no bacteria	-	1.173 \pm 0.033	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 748 ^T	1.013 \pm 0.004	0	14 \pm 0.4
<i>Denococcus oeni</i>	CECT 217 ^T	0.936 \pm 0.034	0	20 \pm 2.9
<i>Pediococcus parvulus</i>	CECT 7350 ^T	0.986 \pm 0.028	0	16 \pm 2.4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	UTAD 346	1.051 \pm 0.007	0	10 \pm 0.6
	UTAD 350	1.023 \pm 0.006	0	13 \pm 0.5
	UTAD 460	1.059 \pm 0.004	0	10 \pm 0.4
	UTAD 461	1.041 \pm 0.007	0	11 \pm 0.5
<i>Denococcus oeni</i>	UTAD 224	0.988 \pm 0.004	0	16 \pm 0.3
	UTAD 228	0.997 \pm 0.003	0	15 \pm 0.3
	UTAD 244	0.997 \pm 0.006	0	15 \pm 0.5
	UTAD 279	1.008 \pm 0.009	0	14 \pm 0.7
	UTAD 295	0.990 \pm 0.009	0	16 \pm 0.8
	UTAD 296	0.999 \pm 0.005	0	15 \pm 0.4
	UTAD 474	0.993 \pm 0.005	0	15 \pm 0.4
	UTAD 602	1.008 \pm 0.006	0	14 \pm 0.5
	UTAD 653	1.008 \pm 0.010	0	14 \pm 0.9
<i>Pediococcus parvulus</i>	UTAD 111B	0.328 \pm 0.139	0.635 \pm 0.117	72 \pm 11.8
	UTAD 168*	0.133 \pm 0.072	0.810 \pm 0.051	89 \pm 6.2
	UTAD 333	0.037 \pm 0.007	0.949 \pm 0.001	97 \pm 0.6
	UTAD 334*	0.070 \pm 0.059	0.863 \pm 0.036	94 \pm 5.1
	UTAD 335	0.025 \pm 0.001	0.957 \pm 0.007	98 \pm 0.1
	UTAD 473*	0	0.922 \pm 0.034	100 \pm 0

Luis Abrunhosa - Maio-2015



Bactérias lácticas

- Ensaio realizado em unidades de 25 L com mosto tinto (não se detetou OT α)

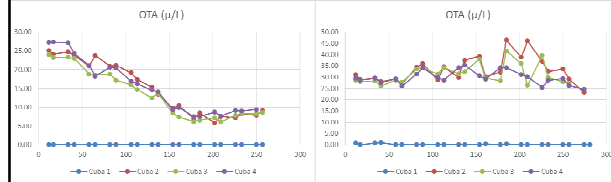
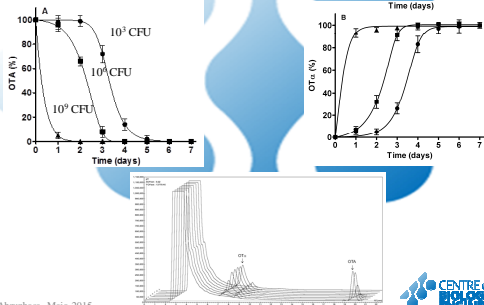


Fig. 5. Concentração de OTA detetada ao longo do tempo durante a fermentação de mosto. A) células centrifugadas e separadas da fração líquida (B) Células e fração líquida extraídas em conjunto. O mosto foi suplementado com 25.0 μg de OTA/L e inoculado com (vermelho) *S. cerevisiae* LALVIN QA23, (verde) *P. parvulus* UTAD 473 + *S. cerevisiae* LALVIN QA23, (roxo) *P. parvulus* UTAD 473 (durante um dia) + *S. cerevisiae* LALVIN QA23.



Bactérias lácticas

- Exemplo da biodegradação da OTA por *Pediococcus parvulus*



Luis Abrunhosa - Maio-2015



Agradecimentos

- Este trabalho foi financiado pelo FEDER através do COMPETE e da FCT
- Ref. FCOMP-01-0124-FEDER-028029 e PTDC/AGR-TEC/3900/2012, respetivamente
- Luis Abrunhosa foi financiado por
 - Post-doc bolsa FCT nº SFRH/BPD/43922/2008
 - Post-doc bolsa Incentivo/EQB/LA0023/2014 from ON.2 – O Novo Norte.



Bactérias lácticas

- Testes em Vinho sintético e Mosto de Uvas

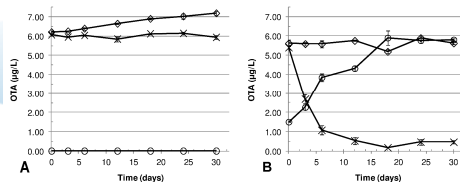


Fig. 4. OTA e OT α detetados ao longo do tempo em (A) vinho sintético and (B) mosto contaminado com 7.0 μg de OTA/L e inoculado com *P. parvulus* UTAD 473. (o) OTA nos controlos, (x) OTA no vinho ou mosto, e (v) OT α no vinho ou mosto.

Luis Abrunhosa - Maio-2015



Muito obrigado

