

10º SIMPÓSIO DE VITIVINICULTURA DO ALENTEJO

10TH ALENTEJO VINE AND WINE SYMPOSIUM

4-5-6 / 05 / 2016

ÉVORA.PORTUGAL

VOLUME I

LIVRO DE ATAS

10º SIMPÓSIO DE VITIVINICULTURA DO ALENTEJO (1º Volume)

4 – 5 – 6 DE MAIO 2016

Organizado por:

ATEVA – Associação Técnica dos Viticultores do Alentejo

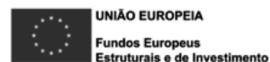
CVRA – Comissão Vitivinícola Regional Alentejana

CCDRA – Comissão de Coordenação e Desenvolvimento da Região Alentejo

DRAPAL – Direção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo

UE – Universidade de Évora

Com o patrocínio de:



Com o apoio de:



EFEITO DA APLICAÇÃO DE PRODUTOS ENOLÓGICOS NA ELIMINAÇÃO DE AFLATOXINAS EM VINHO BRANCO

Ana Beatriz FERREIRA¹; Davide SILVA¹, Cátia ROCHA¹; António INÊS²; Fernando M. NUNES³; Luís FILIPE-RIBEIRO¹; Luís ABRUNHOSA⁴, Fernanda COSME^{2*}

RESUMO

As aflatoxinas, quimicamente definidas como difuranocumarinas, são metabolitos secundários produzidos principalmente pelas espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. O presente trabalho teve como objetivo estudar a ação de diferentes tipos de produtos enológicos na remoção de aflatoxinas (B1 e B2) presentes no vinho. A eficácia desses produtos na remoção das referidas micotoxinas foi avaliada utilizando vinho artificialmente contaminado com AFB1 e AFB2. O produto enológico que mostrou ser mais eficaz na remoção destas micotoxinas foi a bentonite, com percentagem de remoção de 100%. O caseinato de potássio também se mostrou eficaz, com percentagem de remoção na ordem dos 70 a 80%. Adicionalmente também se avaliou o impacto destes produtos enológicos sobre as características físico-químicas dos vinhos. Os resultados obtidos podem fornecer informações úteis para o sector vitivinícola, na seleção do produto enológico mais apropriado na remoção das aflatoxinas, reduzindo a toxicidade e melhorando simultaneamente a qualidade e segurança alimentar do vinho.

Palavras-chave: aflatoxinas, produtos enológicos, vinho, cor, composição fenólica

1. INTRODUÇÃO

As micotoxinas, são metabolitos secundários tóxicos de baixo peso molecular, produzidos por fungos filamentosos, habitualmente, no final da fase exponencial do seu crescimento (GONÇALEZ *et al.*, 2001). As principais micotoxinas conhecidas são

¹ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5001 -801 Vila Real.

² Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Biologia e Ambiente, Edifício de Enologia, Apartado 1013, 5001 -801 Vila Real, Portugal.

³ Centro de Química de Vila Real (CQ-VR), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Química, Vila Real, Portugal.

⁴ CEB-Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal. *Email** fcosme@utad.pt

produzidas por fungos que pertencem aos géneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, destacando-se as aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, patulina, tricotecenos (desoxivalenol, nivalenole toxina T-2) e zearelenona (BATA e LASZTITY, 1999; SERRA *et al.*, 2005).

Estas micotoxinas são encontradas sobretudo em alimentos de origem vegetal, nomeadamente cereais, frutas, sumos de fruta, cacau, café, vinho, frutos secos e especiarias, e com menor frequência em alimentos de origem animal, leite e produtos lácteos, como queijos e iogurtes (COLAK *et al.*, 2006; VAN DE PERRE *et al.*, 2015). Como são compostos muito estáveis, são difíceis de eliminar da cadeia alimentar, provocando perdas elevadas em certas produções agrícolas a nível mundial (VAN DE PERRE *et al.*, 2015). No entanto, o teor de micotoxinas presentes nos diversos alimentos pode ser controlado pela aplicação de medidas de controlo e prevenção adequadas, tais como a implementação de um plano HACCP (SERRA *et al.*, 2005).

As aflatoxinas são um grupo vasto de compostos que são agrupadas nas séries B, G, M, P e Q tendo em conta algumas diferenças de estrutura química e a disposição dos átomos de carbono. Dentro de cada uma destas séries encontram-se agrupados vários compostos: e.g AFB₁, AFB₂, AFB_{2a}; AFM₁, AFM₂, AFM_{2a}; AFG₁ e AFP₁ (CARVAJAL, 2013). Existem cerca de 20 tipos diferentes de aflatoxinas, mas devido ao seu alto potencial cancerígeno, mutagénico e teratogénicos mais importantes são AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AFM₂ (Figura 1).



Figura 1. Estrutura química das principais aflatoxinas (SORIANO DEL CASTILLO *et al.*, 2007).

O vinho como qualquer outro produto alimentar está suscetível à contaminação por micotoxinas. A deterioração das uvas tem sido tradicionalmente associada ao desenvolvimento de fungos filamentosos em que a produção de micotoxinas pode ocorrer antes da colheita das uvas ou em situações de pós-colheita, quando as uvas estão mais suscetíveis a danos (SERRA *et al.*, 2004). Para a saúde humana, a micotoxina que suscita mais preocupações nos vinhos é a ocratoxina A (HOCKING *et al.*, 2007). No entanto, algumas aflatoxinas, principalmente AFB₁ e AFB₂, têm sido também encontradas em uvas, mostos e vinhos, embora com menor frequência (EL KHOURY *et al.*, 2008).

O Instituto da Vinha e do Vinho estabelece que o teor máximo de ocratoxina A presente nos vinhos tem de ser inferior a 2,0 µg/kg. Em relação à presença de aflatoxinas nos vinhos, o teor máximo admissível não se encontra legislado.

A aplicação de técnicas de redução de aflatoxinas em vinhos está ainda pouco estudada. No entanto, a preocupação que a presença de aflatoxinas suscita leva a que se investiguem estratégias de prevenção de forma a reduzir a sua formação em alimentos, bem como, de eliminação, inativação ou redução da biodisponibilidade destas toxinas nos alimentos contaminados. Um dos métodos de descontaminação/redução passa pela utilização de agentes adsorventes que se podem ligar de forma eficiente e assim remover micotoxinas de uma solução aquosa (VAR *et al.*, 2008). O carvão activado e as bentonites são os adsorventes mais estudados e que possuem maior afinidade para as micotoxinas (HUWIG *et al.*, 2001).

Apesar de haver muitos estudos que incidem na descontaminação de micotoxinas utilizando agentes adsorvente, ainda não existe nenhum trabalho de investigação sobre remoção de aflatoxinas nos vinhos como existe para a ocratoxina A. Assim, foi objectivo deste trabalho estudar a ação de diferentes produtos enológicos na eficiência de remoção de aflatoxina B1 e B2 de um vinho branco artificialmente contaminado. Foi ainda estudada a ação destes produtos enológicos nos parâmetros da cor, compostos fenólicos totais, não-flavonóides e flavonóides de vinho branco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Vinho

Neste trabalho foi utilizado um vinho branco, com as seguintes características: Teor alcoólico 10,0 % (v/v); Massa volúmica a 20°C 0,9915 (g/cm³); pH 3,0; Acidez total 6,7 (g ácido tartárico/L); Acidez volátil 0,14 (g ácido acético/L); Sulfuroso livre 35 (mg/L). As análises dos parâmetros convencionais do vinho foram efetuadas de acordo com os métodos oficiais da OIV (OIV, 2013).

2.2 Ensaio de colagem

No ensaio de colagem utilizaram-se dez produtos enológicos comerciais com características diferentes (mistura de carvão, gelatina e bentonite – CG; carvão – C; proteína de ervilha – PE; manoproteína – BPI; polivinilpolipirrolidona – PVPP; caseinato de potássio – CP; bentonite sódica – BS; carboximetilcelulose – CMC; bentonite cálcica – B; quitosano – Q). Estes produtos enológicos foram aplicados na dose média recomendada pelos fabricantes em provetas de 250 mL, com o objetivo de avaliar a sua capacidade para remover as aflatoxinas utilizando um vinho branco artificialmente contaminado com 10 µg/L de AFB1 e 10 µg/L de AFB2. O ensaio de colagem foi efetuado em duplicado para cada um dos produtos enológicos e para o controlo (vinho sem adição de produto enológico).

2.3 Análise de AFB1 e AFB2

O sobrenadante do vinho adicionado com os diferentes produtos enológicos 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). A separação cromatográfica foi realizada a 35 °C numa coluna analítica C18 de fase reversa YMC-Pack ODS-AQ (250 x 4,6 mm, 5 µm) equipada com uma pré-coluna com a mesma fase estacionária. As amostras foram eluídas a um caudal de 1 mL/min durante 30 min com uma fase móvel composta por H₂O/acetonitrilo/metanol (3:1:1, v/v/v). O volume de injeção foi de 30 µL e os parâmetros de detecção: $\lambda_{exc}=365$ nm, $\lambda_{em}=435$ nm e gain=1000 (SOARES *et al.*, 2010). O tempo de retenção da AFB1 e AFB2 foi aproximadamente de 26 e 21 min, respetivamente. A concentração de AFB1 e de AFB2 nas amostras foi determinada por comparação das áreas dos picos com uma curva de calibração efetuada com padrões de AFB1 e AFB2 (Sigma-Aldrich). Todas as análises foram efectuadas em duplicado.

2.4 Análise de alguns parâmetros físico-químicos do vinho

A cor foi determinada pela medição da absorvância a 420 nm, utilizando uma célula de 1 cm de percurso ótico, num espectrofotómetro, de acordo com o método descrito pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2013). Determinação dos compostos fenólicos totais dos vinhos foi efectuada de acordo com o método descrito por RIBÉREAU-GAYON *et al.* (1982). Os compostos fenólicos não-flavonóides foram determinados de acordo com o procedimento descrito por KRAMLING e SINGLETON (1969). Por diferença com os compostos fenólicos totais obtivemos os compostos fenólicos flavonóides. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico, através de uma curva de calibração elaborada com o ácido gálico. Todas as análises foram efectuadas em duplicado.

2.5 Tratamento estatístico dos dados

Para o tratamento estatístico dos dados 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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da aplicação dos diferentes produtos enológicos na remoção da concentração das aflatoxinas B₁ e B₂ no vinho branco

Os produtos enológicos mais eficazes na redução da concentração da aflatoxina B1 (AFB1) foram as duas bentonites, sódica (BS) e cálcica natural (B) com remoções

de 100% desta micotoxina. O carvão ativado (C), o caseinato de potássio (CP) e a mistura de carvão, bentonite e gelatina (CG) também obtiveram uma redução significativa da concentração desta toxina (Figura 2). Relativamente à eficácia dos produtos enológicos sobre a remoção da aflatoxina (AFB2), apenas a bentonite cálcica natural (B) obteve um resultado igual ao observado na remoção da AFB1, reduzindo na totalidade a concentração desta toxina. A bentonite sódica (BS), caseinato de potássio (CP), carvão (C) e mistura de carvão, bentonite e gelatina (CG), também podem ser uma boa alternativa na remoção de AFB2. Os restantes produtos enológicos testados não revelaram bons resultados na remoção das duas aflatoxinas (AFB1 e AFB2).

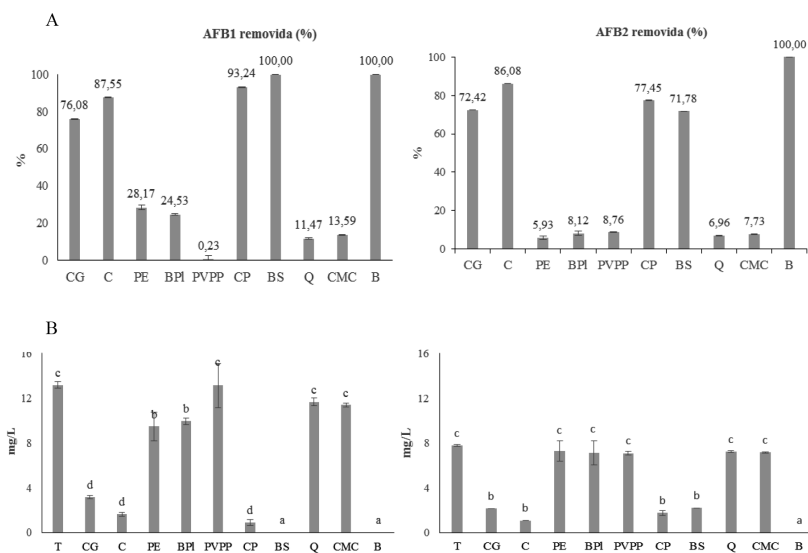


Figura 2. Percentagem de remoção (A) e de concentração detetada (B) da AFB1 e AFB2 após a ação dos produtos enológicos aplicados no vinho branco. Ensaio com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (teste de Tuckey a 5% de significância).

A bentonite foi de todos os produtos utilizados o que revelou resultados mais satisfatórios. Este produto enológico já foi testado na remoção de outras aflatoxinas, nomeadamente da AFM1, frequentemente presente no leite, tendo-se obtido uma percentagem de remoção de 80% (DI NATALE *et al.*, 2009). O carvão também demonstrou elevada eficiência na remoção (93%) da AFM1 e na remoção da ocratoxina A em vinho branco (VAR *et al.*, 2008).

3.2 Efeito da aplicação dos produtos enológicos na cor do vinho branco

Na Figura 3 pode-se observar que todos os produtos enológicos que demonstraram capacidade para remover a AFB1 e AFB2 no vinho branco, ou seja, a mistura de carvão, gelatina e bentonite (CG), o carvão (C), o caseinato de potássio (CP) e as duas bentonites (B, BS), diminuíram a cor do vinho significativamente, quando comparado com a testemunha. O quitosano (Q), o CMC e a manoproteína (BP1), foram os produtos que não alteraram a cor do vinho, mas também não demonstraram capacidade para remover as aflatoxinas.

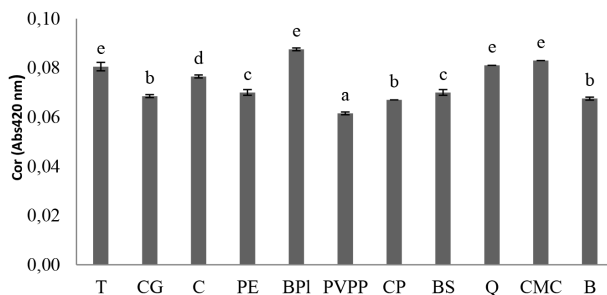


Figura 3. Efeitos dos diferentes produtos enológicos na cor do vinho branco. Ensaios com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (teste de Tuckey a 5% de significância).

3.3 Efeito da aplicação dos produtos enológicos no teor de compostos fenólicos totais, não flavonóides e flavonóides do vinho branco

Como se pode observar na Figura 4, houve reduções significativas nos compostos fenólicos totais, flavonóides e não flavonóides, pela ação dos produtos enológicos. Em relação aos compostos fenólicos totais, a mistura de carvão, gelatina e bentonite (CG) e a bentonite sódica (BS) não demonstrou alterações significativas, o mesmo não ocorreu com o caseinato de potássio (CP) e com o carvão (C) onde se verificaram reduções significativas. Nos flavonóides e não flavonóides também se verificaram reduções significativas com a exceção da bentonite cálcica (B) que não alterou o teor de compostos fenólicos não flavonóides. Por outro lado, o quitosano (Q) e o CMC não provocaram redução no teor dos compostos fenólicos totais, não flavonóides e flavonóides.

O caseinato de potássio (CP) quando aplicado em vinhos brancos tem tendência a diminuir a concentração dos compostos fenólicos totais, flavonóides e não flavonóides (COSMEet *al.*, 2012), confirmando-se esse fato com a exceção dos compostos não flavonóides.

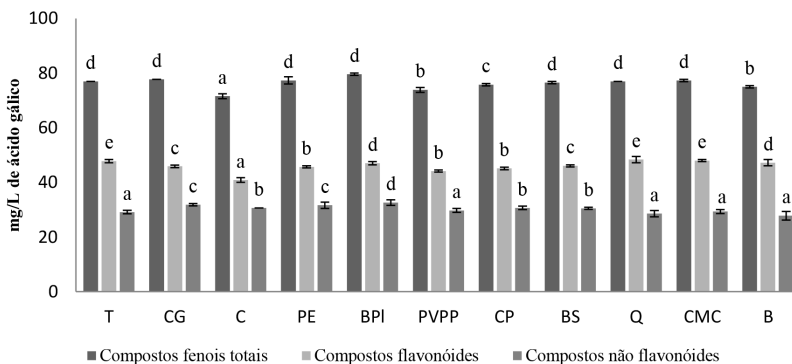


Figura 4. Efeitos dos diferentes produtos enológicos na composição fenólica do vinho branco. Ensaio com a mesma letra não apresentam diferenças significativas para o parâmetro avaliado (teste de Tuckey a 5% de significância).

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho o objetivo principal foi encontrar um ou mais produtos enológicos com capacidade de remoção da aflatoxina B1 e B2 por meio da adsorção, mas que simultaneamente fossem capazes de preservar as características físico-químicas do vinho tratado. Os resultados obtidos fornecem informações úteis para o sector vitivinícola, que podem assim selecionar o produto enológico mais apropriado para a remoção das aflatoxinas, reduzindo a toxicidade e melhorando simultaneamente a qualidade e segurança alimentar do vinho.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por fundos do FEDER através do COMPETE e por fundos nacionais através da FCT -01-0124-FEDER-028029 e PTDC/AGR-TEC/3900/2012, respetivamente. Este trabalho foi também financiado pelo IBB/CGB-UTAD e Centro de Química Vila Real (CQ-VR). Agradecimentos adicionais também às empresas SAI Lda., AEB Bioquímica Portuguesa, S. A. e Enartis pelo fornecimento dos produtos enológicos. LuísAbrunhosa recebeu apoio através da bolsa UMINHO/BPD/51/2015 do projeto UID/BIO/04469/2013 financiado por FCT/MEC (OE).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATA A., LASZTITY R. (1999). Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends Food Sci Technol.* 10, 223-228.
- CARVAJAL M. (2013). Transformación de la Aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano. *Aducto AFB1-ADN. D.R. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 16(2), 109-120.
- COLAK H., BINGOL E.B., HAMPIKYAN H., NAZLI B. (2006). Determination of aflatoxin contamination in red-scaled, red and black pepper by ELISA and HPLC. *J. Food Drug Anal.* 14, 292-296.
- COSME F., CAPÃO I., FILIPE-RIBEIRO L., MENDES-FAIA A. (2012). Evaluating potential alternatives to potassium caseinate for white wine fining: Effects on physico chemical and sensory characteristics. *LWT-Food Sci Technol.* 46, 382-387.
- DI NATALE F., GALLO M., NIGRO R. (2009). Adsorbents selection for aflatoxins removal in bovine milks. *J. Food Eng.* 95, 186-191
- EL KHOURY A., RIZH T., LTEIF R., AZOURI H., DELIA M., LEBRIHI A. (2008). Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine - grapes and musts. *Food Chem Toxicol.* 46, 2244-2250.
- SOARES C., RODRIGUES P., FREITAS-SILVA O., ABRUNHOSA L., VENÂNCIO A. (2010). Rapid HPLC method for simultaneous detection of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *World Mycotoxin Journal.* 3(3), 225-231.
- GONÇALEZ E., PINTO M.M., FELICIO J.D. (2001). Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. *Biológico.* 63(1/2), 15-9.
- HOCKING A.D., LEONG L.S., KAZI A.B., EMMETT R.W., SCOTTE.S. (2007). Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 8488.
- HUWIG A., FREIMUND S., KAPPELI O., DUTLER H. (2001). Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett.* 122, 179-188.
- KRAMLING T.E., SINGLETON V.L. (1969). An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *Am. J.Enol.Viticult.* 20, 86-92.
- OIV - Organisation International de la Vigne et du Vin (2013). *Récueil de Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Moûts.* Edition Officielle, Paris.
- RIBÉREAU-GAYON P., PEYNAUD E., SUDRAUD P. (1982). *Science et Techniques du Vin.* Tome 4. Dunod: Paris.
- SERRA R., BRAGA A., VENÂNCIO A. (2005). Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Res Microbiol.* 156, 515-521.
- SERRA R., MENDONÇA C., ABRUNHOSA L., PIETRI A., VENÂNCIO A. (2004). Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation. *Anal Chim Acta* 513, 41-47.
- SORIANO DEL CASTILLO J.M. (2007). *Micotoxinas en alimentos España: Ediciones Díaz de Santos.* VAN DE PERRE E., JACXSSENS L., LACHAT C., EL TAHAN F. (2015). Impact of maximum levels in European legislation on exposure of mycotoxins in dried products: Case of aflatoxin B1 and ochratoxin A in nuts and dried fruits. *Food Chem Toxicol.* 75, 112-117.
- VAR I., KABAK B., ERGINKAYA E. (2008). Reduction in ochratoxin A levels in White wine, following treatment with activated carbón and sodium bentonite. *Food Control.* 19, 592-598.