



**LUÍSA FREIRE**

**INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM VINHOS  
E A CORRELAÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO  
*Aspergillus* E *Penicillium* COM AS  
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE  
UVAS VINÍFERAS DA REGIÃO TROPICAL  
SEMIÁRIDA DO BRASIL**

**LAVRAS - MG**

**2016**

**LUÍSA FREIRE**

**INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM VINHOS E A CORRELAÇÃO  
DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* E *Penicillium* COM AS  
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE UVAS VINÍFERAS DA  
REGIÃO TROPICAL SEMIÁRIDA DO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luís Roberto Batista

Coorientadores

Dr. Giuliano Elias Pereira

Dr. Guilherme Prado

**LAVRAS – MG**

**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Freire, Luisa .

Incidência de ocratoxina A em vinhos e a correlação de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* com as características físico-químicas de uvas viníferas da região tropical semiárida do Brasil / Luisa Freire. – Lavras : UFLA, 2016.

154 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Micotoxinas. 2. Vitivinicultura. 3. Safra. 4. Compostos fenólicos. 5. Variedades. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**LUÍSA FREIRE**

**INCIDÊNCIA DE OCRATOXINA A EM VINHOS E A CORRELAÇÃO  
DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus* E *Penicillium* COM AS  
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE UVAS VINÍFERAS DA  
REGIÃO TROPICAL SEMIÁRIDA DO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 04 de fevereiro de 2016.

Dra. Carolina Valeriano Carvalho      UFLA

Dr. Giuliano Elias Pereira              EMBRAPA

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza    EPAMIG

Dr. Luís Roberto Batista

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2016**

Aos meus pais, irmãos,  
minha vizinha e ao Heraldo,  
pelo apoio incondicional, suporte e estímulo  
para que fosse possível a concretização deste trabalho.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Ciência dos Alimentos, à Embrapa Semiárido e à Funed, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Luís Roberto e a pesquisadora Fabiana Passamani, pela orientação, credibilidade, disponibilidade, ensinamentos e amizade.

Às amigas do Laboratório de Micologia e Micotoxina de Alimentos, pela ajuda e amizade, em especial, Dani, Elaine e Vanessa, sem vocês seria impossível.

Aos colegas do Laboratório de Pós-colheita, em especial, Ariela e Rita, pela ajuda com as análises de caracterização físico-química.

Aos colegas do Laboratório de Micotoxinas da Funed, em especial, Daiane, Raquel, Rafael e Fabiano, pela ajuda com as análises de OTA nos vinhos.

Aos meus coorientadores Giuliano e Guilherme, pela disponibilidade e apoio.

Às amigas, Gabi e Thay, pela amizade, ótimas histórias vividas, confiança, risadas e ajuda na hora do desespero.

À amiga Laís, por todo auxílio com a estatística.

Agradecimento especial aos meus pais, minha vizinha, meus irmãos e ao Heraldo, pelos conselhos, apoio e incentivo nas minhas escolhas, conquistas e caminhos seguidos.

A todas as pessoas do meu convívio que acreditaram e contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

As uvas (*Vitis vinifera* L.) estão sujeitas à contaminação por fungos filamentosos presentes na lavoura, colheita e na elaboração dos vinhos, sendo *Aspergillus* o principal gênero produtor de ocratoxina A (OTA) em uvas. A incidência de fungos e os níveis de toxina variam em função da variedade das uvas, da região vitivinícola, das práticas agrícolas adotadas, das condições climáticas, da safra e do processo de elaboração dos vinhos. Neste sentido, o objetivo neste estudo foi avaliar a diversidade de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* isolados das uvas e do solo de cultivo na região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco, bem como avaliar a presença de OTA nos vinhos experimentais e ainda, se existe uma correlação entre a ocorrência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e as características físico-químicas das uvas viníferas cultivadas na região. As amostras de uvas e solos de videiras foram coletadas na safra de 2014/2 e 2015/1. Para o isolamento de fungos filamentosos das bagas foi utilizada a técnica de plaqueamento direto em meio de cultura DRBC. Para as amostras de solo utilizou-se a técnica de plaqueamento em superfície em meio DG-18. As espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram identificadas através de características morfológicas. A presença de OTA nos vinhos experimentais foi detectada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Também se realizou a caracterização físico-química das uvas. A contaminação dos solos dos vinhedos variou de  $2,34 \times 10^3$  UFC/g a  $4,35 \times 10^4$  UFC/g. As espécies encontradas nas uvas viníferas foram *Aspergillus niger*, *A. carbonarius*, *A. aculeatus*, *A. niger* s, *A. flavus*, *A. sojae*, *Penicillium sclerotiorum*, *P. citrinum*, *P. glabrum*, *P. decumbens*, *P. implicatum* e *P. solitum*. Todos os isolados de *A. carbonarius*, 18,18% de *A. niger*, 14,29% de *A. niger* Agregado e 60% de *A. ochraceus* foram produtores de OTA. Todos os *A. parasiticus* foram produtores de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, enquanto que apenas 14% de *A. flavus* foram produtores de aflatoxina B1, B2. Todos os *P. citrinum* foram produtores de citrinina. A maior concentração de OTA foi encontrada em vinho tinto ( $0,29 \mu\text{g/L}$ ) e variou em vinhos brancos de 0,02 a  $0,04 \mu\text{g/L}$ . Todas as espécies identificadas neste estudo apresentaram uma correlação positiva com pelo menos um parâmetro físico-químico avaliado, destacando-se os teores de pectina, açúcares totais, acidez total e compostos fenólicos. Foi possível observar que a incidência de fungos e os níveis de OTA variam em função da variedade das uvas, da forma de cultivo, das condições climáticas e da safra.

**Palavras-chave:** Compostos Fenólicos. Micotoxinas. Safra. Variedades. Vitivinicultura.

## ABSTRACT

Grapes (*Vitis vinifera* L.) are subject to contamination by filamentous fungi present in crops, during harvest and winemaking, *Aspergillus* being the main producing genus of ochratoxin A (OTA) in grapes. The incidence of fungi and toxin levels vary depending on the variety of grapes, the winemaking region, agricultural practices, weather conditions, harvest and the winemaking process. Thus, this study aimed to evaluate the diversity of *Aspergillus* and *Penicillium* fungi isolated from the grapes and the cultivation soil in the São Francisco Submiddle Valley winegrowing region, the presence of OTA in experimental wines, as well as if there is a correlation between the occurrence of *Aspergillus* and *Penicillium* fungi and the physicochemical characteristics of the wine grapes grown in the region. Samples of grapes and soil from the vineyards were collected from the 2/2014 and 1/2015 crops. For the isolation of filamentous fungi from the grape berries, the direct plating technique in DRBC culture medium was used. For soil samples the surface-spreading technique in DG-18 medium was used. The *Aspergillus* and *Penicillium* species were identified by morphological characteristics and the presence of OTA in experimental wines was detected by HPLC. The physicochemical characterization of the grapes was also performed. Contamination of vineyard soil ranged from  $2.34 \times 10^3$ CFU/g to  $4.35 \times 10^4$ CFU/g. The species found in the wine grapes were *Aspergillus niger*, *A. carbonarius*, *A. aculeatus*, *A. niger* Aggregate, *A. flavus*, *A. sojae*, *Penicillium sclerotiorum*, *P. citrinum*, *P. glabrum*, *P. decumbens*, *P. implicatum* and *P. solitum*. All of *A. carbonarius* isolates, 18.18% of *A. niger*, 14.29% of *A. niger* Aggregate and 60% of *A. ochraceus* were OTA-producing fungi. All *A. parasiticus* were producers of B1, B2, G1 and G2 aflatoxins, whereas only 14% of *A. flavus* were producers of B1, B2 aflatoxin. All *P. citrinum* were citrinin producers. The highest OTA concentration was found in red wine ( $0.29 \mu\text{g} / \text{L}$ ) and in white wines it ranged from 0.02 to  $0.04 \mu\text{g} / \text{L}$ . All identified species in this study showed a positive correlation with at least one evaluated physicochemical parameter, highlighting the pectin content, total sugar, total acidity and phenolic compounds. It was observed that the fungi incidence and OTA levels vary according to the variety of grapes, cultivation methods, weather conditions and crop.

**Keywords:** Phenolic compounds. Mycotoxins. Viticulture. Crop. Varieties.

Esta pesquisa faz parte do projeto “Desenvolvimento de tecnologias e uso da agricultura de precisão para colaborar com a certificação dos vinhos e com a sustentabilidade do setor vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco” do CNPq Nº 403438/2013-6.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 Regiões potenciais para obtenção de Indicações Geográficas no Brasil.....21
- Figura 2 Estrutura química da ocratoxina A .....36

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 Região Vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco em que foram coletadas as amostras de uvas (*Vitis vinifera L.*) e solos de videira .....57
- Figura 2 Transecto diagonal traçado ao longo do vinhedo para coleta das amostras de uvas e solos (A); Amostragem do solo em cada ponto(B).....59

### CAPÍTULO 3

- Figura 1 Região Vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco em que foram coletadas as amostras de uvas (*Vitis vinifera L.*).....108
- Figura 2 Transecto diagonal traçado ao longo do vinhedo para coleta das amostras de uvas viníferas .....110

## LISTA DE GRÁFICOS

### CAPÍTULO 2

- Gráfico 1 Percentual de contaminação de uvas viníferas por fungos do gênero *Aspergillus* e as respectivas proporções médias de colonização. Letras diferentes mostram diferença estatística significativa a  $p < 0,05$  ..... 68
- Gráfico 2 Percentual de contaminação de uvas viníferas por fungos do gênero *Penicillium* e as respectivas proporções médias de colonização. Letras diferentes mostram diferença estatística significativa a  $p < 0,05$  ..... 69
- Gráfico 3 Incidência de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* nas amostras de solo de cultivo das variedades estudadas. Letras diferentes mostram diferença estatística significativa a  $p < 0,05$  ..... 73
- Gráfico 4 Frequência de ocorrência de espécies do gênero *Aspergillus* nas variedades de uvas viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco ..... 77
- Gráfico 5 Frequência de ocorrência de espécies do gênero *Penicillium* nas variedades de uvas viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco ..... 79
- Gráfico 6 Frequência de ocorrência de espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* nos solos de cultivo das variedades de uvas viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco ..... 82

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1	Presença de Ocratoxina A em uvas e vinhos de diversas regiões.....	37
----------	--	----

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Amostras coletadas e coordenadas geográficas da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco (continua).....	59
Tabela 2	Amostras coletadas e dados meteorológicos da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco .....	61
Tabela 3	Contaminação das uvas por fungos dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> nas safras 2014/2 e 2015/1 .....	72
Tabela 4	Incidência de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> nas safras 2014/2 e 2015/1 .....	80
Tabela 5	Espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> isolados de uvas viníferas e solo de cultivo potencialmente toxigênicas.....	85
Tabela 6	Espécies toxigênicas isoladas de uvas viníferas e presença de ocratoxina A em vinhos experimentais.....	91

### CAPÍTULO 3

Tabela 1	Amostras coletadas e coordenadas geográficas da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco (continua).....	109
Tabela 2	Equações das curvas de calibração, coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ), limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os compostos fenólicos .....	120
Tabela 3	Incidência de espécies do gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> nas variedades de uvas viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco.....	122
Tabela 4	Características físico-químicas avaliadas nas variedades de uvas viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco .....	124
Tabela 5	Análise de correlação de Pearson, correlacionando as características físico-químicas e a presença de espécies do gênero <i>Aspergillus</i> nas uvas ( <i>Vitis vinifera</i> L.).....	126
Tabela 6	Análise de correlação de Pearson, correlacionando as características físico-químicas e a presença de espécies do gênero <i>Penicillium</i> nas uvas ( <i>Vitis vinifera</i> L.).....	127
Tabela 7	Concentração de compostos fenólicos presentes nas variedades de uvas viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco .....	129

Tabela 8	Análise de correlação de Pearson, correlacionando os compostos fenólicos e a presença de espécies do gênero <i>Aspergillus</i> nas uvas ( <i>Vitis vinifera L.</i> ) .....	133
Tabela 9	Análise de correlação de Pearson, correlacionando os compostos fenólicos e a presença de espécies do gênero <i>Penicillium</i> nas uvas ( <i>Vitis vinifera L.</i> ) .....	134

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	16
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
<b>2.1</b>	<b>Região tropical semiárida do Brasil produtora de uvas viníferas</b> .....	18
<b>2.2</b>	<b>Indicações geográficas de vinhos elaborados no Vale do Submédio São Francisco</b> .....	20
<b>2.3</b>	<b>Uvas (<i>Vitis vinifera L.</i>) cultivadas na região do Vale do Submédio São Francisco</b> .....	21
<b>2.3.1</b>	<b>Barbera</b> .....	23
<b>2.3.2</b>	<b>Ruby Cabernet</b> .....	23
<b>2.3.3</b>	<b>Syrah</b> .....	24
<b>2.3.4</b>	<b>Tempranillo</b> .....	24
<b>2.3.5</b>	<b>Touriga Nacional</b> .....	25
<b>2.3.6</b>	<b>Chenin Blanc</b> .....	25
<b>2.3.7</b>	<b>Moscato Canelli</b> .....	25
<b>2.3.8</b>	<b>Moscato Itália</b> .....	26
<b>2.3.9</b>	<b>Composição física e química das uvas (<i>Vitis vinifera L.</i>)</b> .....	26
<b>2.4</b>	<b>Micobiota das uvas</b> .....	28
<b>2.5</b>	<b>Fungos filamentosos produtores de ocratoxina A em uvas e vinhos</b> .....	32
<b>2.6</b>	<b>Ocratoxina A em uvas (<i>Vitis vinifera L.</i>) e vinhos</b> .....	35
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	39
	<b>CAPÍTULO 2 Fungos dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> em uvas viníferas e solos de videiras e ocratoxina A em vinhos do Vale do Submédio São Francisco</b> .....	54
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	55
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	57
<b>2.1</b>	<b>Área de estudo</b> .....	57
<b>2.2</b>	<b>Amostragem das uvas (<i>Vitis vinifera L.</i>)</b> .....	58
<b>2.3</b>	<b>Amostragem dos solos de cultivo de uvas (<i>Vitis vinifera L.</i>)</b> .....	58
<b>2.4</b>	<b>Análise micológica das uvas (<i>Vitis vinifera L.</i>)</b> .....	61
<b>2.5</b>	<b>Análise micológica dos solos de cultivo de uvas (<i>Vitis vinifera L.</i>)</b> .....	62
<b>2.6</b>	<b>Identificação fenotípica das espécies de fungos dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i></b> .....	62
<b>2.7</b>	<b>Detecção da produção de ocratoxina A por fungos do gênero <i>Aspergillus</i> pertencentes à Seção <i>Nigri</i> e <i>Circumdati</i></b> .....	63
<b>2.8</b>	<b>Detecção da produção de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 por fungos do gênero <i>Aspergillus</i> pertencentes à Seção <i>Flavi</i></b> .....	64

2.9	Detecção da produção de citrinina por fungos do gênero <i>Penicillium</i> pertencentes à Seção <i>Citrina</i> .....	64
2.10	Análise de Ocratoxina A em vinhos experimentais .....	65
2.10.1	Preparo das amostras e purificação em coluna de imunoafinidade .....	65
2.10.2	Quantificação por CLAE .....	66
2.11	Ensaio de recuperação .....	67
2.12	Análises estatísticas .....	67
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	68
3.1	Percentual de contaminação por fungos pertencentes aos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> em uvas viníferas e solos de cultivo .....	68
3.2	Incidência de fungos dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> em uvas viníferas e solos de cultivo .....	74
3.3	Capacidade toxigênica de espécies dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> .....	83
3.4	Ocorrência de ocratoxina A em vinhos experimentais .....	90
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	94
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	95
	<b>CAPÍTULO 3</b> Influência das características físico-químicas de uvas viníferas na incidência de fungos dos gêneros <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i> .....	106
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	107
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	108
2.1	Área de estudo .....	108
2.2	Amostragem .....	109
2.3	Análise micológica das uvas ( <i>Vitis vinifera</i> L.) .....	110
2.4	Identificação fenotípica das espécies de fungos dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> .....	111
2.5	Detecção da produção de ocratoxina A por fungos do gênero <i>Aspergillus</i> pertencentes à Seção <i>Nigri</i> .....	112
2.6	Detecção da produção de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 por fungos do gênero <i>Aspergillus</i> pertencentes à Seção <i>Flavi</i> .....	112
2.7	Detecção da produção de citrinina por fungos do gênero <i>Penicillium</i> pertencentes à Seção <i>Citrina</i> .....	113
2.8	Análises físico-químicas das uvas .....	113
2.8.1	Acidez Total Titulável (ATT) .....	114
2.8.2	Potencial Hidrogeniônico (pH) .....	114
2.8.3	Sólidos Solúveis Totais (SST) .....	114
2.8.4	Peso e Diâmetro .....	114
2.8.5	Açúcares Totais .....	115
2.8.6	Pectinas total e solúvel .....	115

2.8.7	Porcentagem de solubilização de pectinas.....	115
2.8.8	Atividade antioxidante .....	115
2.8.9	Coloração .....	116
2.8.10	Compostos fenólicos totais .....	116
2.8.11	Antocianinas monoméricas.....	116
2.8.12	Compostos fenólicos .....	117
2.8.12.1	Reagentes e solventes.....	117
2.8.12.2	Preparo das amostras.....	118
2.8.12.3	Quantificação de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	119
2.9	Análises estatísticas .....	120
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	121
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	139
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	140
	<b>APÊNDICE</b> .....	146

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

O cultivo de uvas viníferas e a elaboração de vinhos finos no Vale do Submédio São Francisco têm sido intensificados nos últimos anos devido ao clima propício da região, obtendo frutos de excelente qualidade, sendo responsável por aproximadamente 15% da produção de vinhos finos no Brasil (LEÃO; SOARES, 2009). Apesar do cenário favorável, os vinhos brasileiros possuem baixa competitividade, já que a maior parte do vinho consumido no país é importada. Sendo assim, é necessário aumentar a visibilidade da região, para que esta seja reconhecida como região polo de produção de vinhos finos. Para tal, é extremamente importante o desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de melhorar a qualidade microbiológica e tipicidade dos vinhos da região através das indicações geográficas.

As uvas (*Vitis vinifera* L.) estão sujeitas à contaminação por microrganismos presentes no ambiente da lavoura, colheita e na elaboração dos vinhos. Atualmente, dentre os microrganismos contaminantes, há uma maior preocupação com relação aos fungos produtores de micotoxinas, sendo *Aspergillus* o principal gênero produtor destas toxinas em uvas (*Vitis vinifera* L.) (ROUSSEAU et al., 2014; SERRA et al., 2006). Dentre as micotoxinas, a ocratoxina A (OTA) é a principal contaminante de uvas e vinhos, sendo considerada uma das mais prejudiciais para a saúde humana (LOMBAERT et al., 2004; OTTENDER; MAJERUS, 2000; ROSA et al., 2004).

No entanto, têm-se observado que a incidência destes fungos e os níveis desta toxina variam em função da variedade das uvas, da região vitivinícola, das práticas agrícolas adotadas, das condições climáticas, da safra e do processo de elaboração dos vinhos. Além disto, não há informações precisas sobre a

influência das diferentes variedades de uvas na incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e na produção de OTA. Sendo assim, o conhecimento da microbiota das uvas da região permitirá que sejam realizadas alterações no sistema de cultivo das uvas ou no processo de elaboração dos vinhos.

Neste sentido, o objetivo neste estudo foi avaliar a diversidade micológica através de um estudo fenotípico de espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas a partir de uvas (*Vitis vinifera L.*) e solos de cultivo destas uvas na região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco, bem como avaliar a presença de OTA nos vinhos experimentais elaborados a partir das uvas e a correlação entre a ocorrência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e as características físico-químicas de uvas viníferas cultivadas na região.

Os resultados deste trabalho estão apresentados em dois capítulos. No primeiro capítulo foi avaliado se existe diferença no percentual de contaminação por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* dos solos de cultivo de uvas viníferas e das bagas de diferentes variedades cultivadas no Vale do Submédio São Francisco, com ênfase nas espécies toxigênicas. Analisou-se também o teor de ocratoxina A em vinhos experimentais elaborados a partir das uvas (*Vitis vinifera L.*) e a correlação com a presença de espécies ocratoxigênicas nestas. No segundo capítulo foram avaliadas as características físico-químicas das diferentes variedades de uvas viníferas cultivadas na região e a sua correlação com a ocorrência de espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Região tropical semiárida do Brasil produtora de uvas viníferas**

No Brasil, atualmente, há cerca de 80 mil hectares de vinhedos, entre as variedades de uvas de mesa (*Vitis labrusca*) e viníferas (*Vitis vinifera L.*) localizados de Norte (05°S de latitude) ao Sul (31°S de latitude) do país. As regiões de vitivinicultura temperada, que possuem repouso hibernar, são as regiões da Fronteira, Serra do Sudeste, Serra Gaúcha, Campos de Cima da Serra, regiões central e norte do estado do Rio Grande do Sul; as regiões do Vale do Rio do Peixe, Planalto Serrano, Planalto Norte e Carbonífera, no estado de Santa Catarina; a região sudeste do estado de São Paulo e; a região sul do estado de Minas Gerais. A região norte do Paraná é subtropical, com dois ciclos anuais, e as regiões noroeste do estado de São Paulo, norte do estado de Minas Gerais e Vale do Submédio São Francisco (Pernambuco e Bahia), distinguem-se como zonas tropicais, onde é possível até dois ciclos e meio por ano (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011; LEÃO; SOARES, 2009; PASTOR, 2012).

No Vale do Submédio São Francisco a vitivinicultura tem se intensificado nos últimos anos, já que possui um clima predominantemente quente e seco e as temperaturas mínimas não são suficientemente baixas para induzir a videira à dormência (abaixo de 12°C). Também possui uma infraestrutura de irrigação, que favorece a regularidade da produção, e mão de obra disponível, o que proporciona condições favoráveis para o desenvolvimento da cultura vitivinífera, obtendo frutos de excelente qualidade e competição no mercado internacional (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011).

Localizado entre os paralelos 8 e 9°S a 320m de altitude, o clima tropical semiárido proporciona temperatura média anual de 26 °C, umidade relativa de 50%, intensidade de luz solar elevada e pluviosidade de aproximadamente

500mm, concentrada entre os meses de dezembro a abril, período de maior incidência de doenças fúngicas. É uma região que produz uvas o ano todo, sendo possível obter até duas safras e meia, anualmente, dependendo da variedade (FLORES; FLORES, 2012; LEÃO; SOARES, 2009). Também é possível realizar o escalonamento da produção ao longo do ano, o que reduz os investimentos de infraestrutura e mão de obra, além de permitir a produção em épocas do ano mais favoráveis, obtendo uvas com maior sanidade e vinhos com tipicidade (LEÃO; SOARES, 2009; PASTOR, 2012).

A viticultura consolidou-se na região devido à produção de uvas de mesa, iniciada no ano de 1960. Porém, a produção de vinhos finos iniciou-se apenas nos anos oitenta, na Vinícola Vale do São Francisco no município de Santa Maria da Boa Vista - PE com o cultivo de videiras europeias trazidas do Sul do Brasil, sendo pioneiro nesta atividade em regiões tropicais do mundo (PROTAS; CAMARGO, 2011).

Atualmente, as vinícolas encontram-se nos municípios de Lagoa Grande e Santa Maria da Boa Vista, em Pernambuco e Casa Nova na Bahia (FLORES; FLORES, 2012), que juntas representam 15% da produção nacional, sendo a segunda maior região produtora de vinhos finos do Brasil, atrás apenas do Rio Grande do Sul (PEREIRA; GUERRA; MANFROI, 2009).

Nos últimos anos, tem-se intensificado os avanços tecnológicos tanto na produção das uvas quanto no processo industrial. Os vinhos vêm sendo diversificados, aumentando o portfólio de produtos da região, tendo como foco os vinhos jovens e vinhos espumantes. Também estão sendo produzidos *brandy* e vinhos de mesa (PROTAS; CAMARGO, 2011). Estes avanços são responsáveis pela evolução e reconhecimento nacional e internacional dos vinhos finos da região.

## **2.2 Indicações geográficas de vinhos elaborados no Vale do Submédio São Francisco**

A vitivinicultura mundial demonstra que os países que possuem maior tradição (França, Itália, Espanha, Portugal) são aqueles consolidados com indicações geográficas nas formas de indicação de procedência ou de denominação de origem. Os vinhos produzidos nestes países possuem características organolépticas que são a expressão dos fatores naturais e humanos influenciados pelos processos de produção, elaboração e envelhecimento do produto. Vinhos produzidos em diferentes regiões, mesmo que elaborados com tecnologia semelhante, possuem características distintas justificando a importância das indicações geográficas (GOLLO, 2006; TONIETTO, 2003).

Segundo o Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI (2000), as indicações geográficas consistem em dois estágios: a Indicação de Procedência e a Denominação de Origem. A Indicação de Procedência é “o nome geográfico de país, cidade, região ou localidade de seu território, que se tenha tornado conhecido como centro de extração, produção ou fabricação de determinado produto ou de prestação de determinado serviço”. Já a Denominação de Origem é o “nome geográfico de país, cidade, região ou localidade de seu território, que designe produto ou serviço cujas qualidades ou características se devam exclusiva ou essencialmente ao meio geográfico, incluídos fatores naturais e humanos”.

Após ser reconhecida, apenas membros daquela localidade, que produzem de maneira homogênea, poderão utilizar a indicação, tornando-se uma estratégia para o desenvolvimento do território (DULLIUS, 2009).

A diversificação das regiões produtoras no país, em busca de qualificação da produção de vinhos, amplia os ecossistemas vitícolas criando

potencial para gerar produtos diferenciados, com tipicidade. Observa-se um direcionamento para potenciais indicações geográficas como a Serra Gaúcha, Campanha; Serra do Sudeste e Vale do Submédio São Francisco (Figura 1). Estas proporcionarão um fortalecimento e consolidação da identidade nacional e regional do vinho brasileiro, com aumento de competitividade no mercado interno e externo (TONIETTO, 2003).

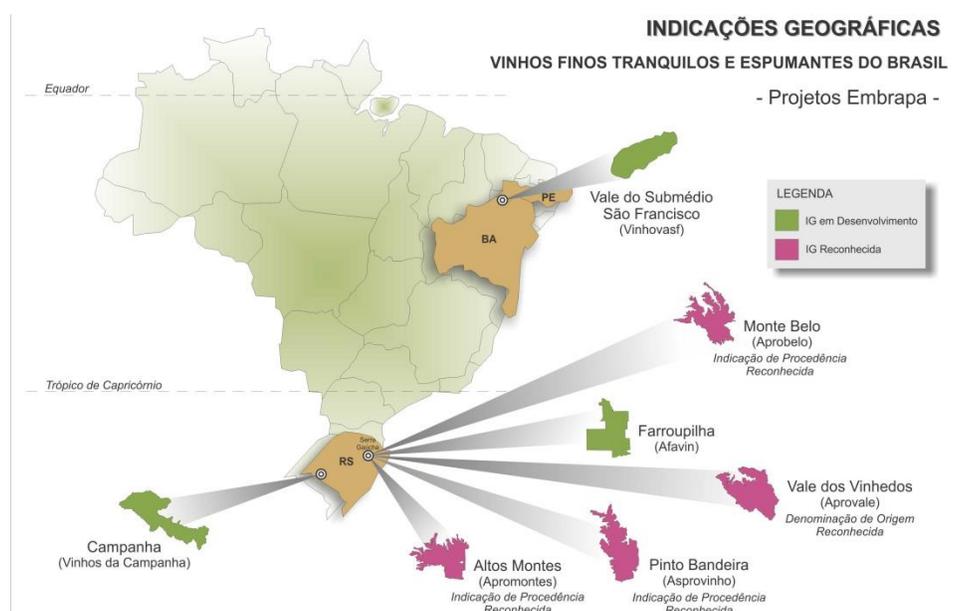


Figura 1 Regiões potenciais para obtenção de Indicações Geográficas no Brasil  
Fonte: Embrapa Uva e Vinho (2013)

### 2.3 Uvas (*Vitis vinifera L.*) cultivadas na região do Vale do Submédio São Francisco

A uva é o fruto da videira, pertencente ao gênero *Vitis*, família das vitáceas. Dentre estas se destacam as americanas (*Vitis labrusca*, *Vitis bourquina*), mais rústicas e resistentes a doenças; e as europeias (*Vitis vinifera L.*) que se desenvolvem melhor em climas secos, com baixa umidade relativa e

alta insolação, sendo utilizadas na produção de vinhos finos (CARNEIRO; COELHO, 2007). Em todo o mundo existe uma grande diversidade de videiras, o que resulta em grande variabilidade de características físico-químicas das uvas, e conseqüentemente dos vinhos produzidos (ABE et al., 2007).

Apesar de a videira ser uma planta originada de regiões de clima temperado, esta se adaptou muito bem às condições tropicais do Vale do Submédio São Francisco. Os sistemas de cultivo utilizados na região são de condução latada (cultivo horizontal) e espaldeira (cultivo vertical), sendo o sistema espaldeira mais utilizado devido à possibilidade de mecanização das práticas agrícolas (PEREIRA; GUERRA; MANFROI, 2009).

Após a poda realizada em fevereiro-março, as plantas se desenvolvem e a colheita é realizada em junho-julho. Após a colheita, as plantas são mantidas em “dormência”, reduzindo-se o nível de irrigação para 5 -10% Kc (coeficiente de cultura) por 20-30 dias. Em seguida as plantas são podadas e aumenta-se o nível de irrigação. Neste novo ciclo as uvas são colhidas em novembro-dezembro. O ciclo depende da cultivar utilizada, estando entre 100-140 dias (PEREIRA et al., 2010).

No Vale do Submédio São Francisco há uma elevada incidência de radiação solar, o que pode causar alterações na coloração das bagas. Porém, o sombreamento excessivo pode aumentar a umidade relativa no interior do vinhedo, criando um microclima que pode favorecer o desenvolvimento de fungos (LEÃO; SOARES, 2009).

As pragas que atacam a videira nesta região são o ácaro-branco, ácaro-rajado, broca-dos-ramos, mosca-branca, lagarta-das-folhas, mosca-das-frutas, tripses, traça, traça-dos-cachos e as cochonilhas (LIMA et al., 2009). Em relação às doenças fúngicas, as principais, presentes nos vinhedos da região são o oídio, míldio, antracnose e a morte descendente. Estas ocorrem com maior frequência entre dezembro e abril devido à maior incidência de chuvas. As espécies

causadoras destas doenças têm sido controladas com a utilização de fungicidas, porém tal ação pode favorecer o desenvolvimento de outros microrganismos não afetados por estes tratamentos químicos, como alguns fungos filamentosos saprófitas oportunistas (NALLY et al., 2012; SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005).

Nesta região, as principais variedades *Vitis vinifera L.* cultivadas são Cabernet Sauvignon, Tempranillo, Ruby Cabernet e Alicante Bouschet utilizadas na elaboração de vinhos tintos; Syrah, utilizada tanto em vinhos tintos quanto rosé, além de espumantes; Chenin Blanc, Moscato Canelli e Sauvignon Blanc, em vinhos brancos, e Mostaco Itália e Moscato Canelli na elaboração de espumantes (PEREIRA, 2009).

### **2.3.1 Barbera**

Variedade tinta, originária da Itália, possui boas características de produção, açúcar, acidez, antocianinas e taninos, vigor moderado e boa sanidade, já que apresenta resistência ao míldio e ao oídio (CAMARGO et al., 2007; LEÃO; SOARES; RODRIGUES, 2009). Seus teores de sólidos solúveis alcançam 20,5°Brix. Os vinhos tintos elaborados a partir desta variedade são vibrantes, compactos e ligeiramente rústicos (MACNEIL, 2003), quando em assemblagem, é responsável por adicionar acidez aos vinhos (JACKSON, 2008).

### **2.3.2 Ruby Cabernet**

Esta variedade tinta originou-se do cruzamento entre as variedades Carignane e Cabernet Sauvignon na Califórnia. É cultivada principalmente no Vale Central da Califórnia e em pequenas áreas na Austrália, Argentina, Chile, África do Sul e no Vale do Submédio São Francisco. É resistente à seca, com

vigor de baixo a moderado, em solos pobres e arenosos, e vigor elevado, em solos profundos e areno-argiloso. Possui cachos médios, cônico-alongados, com bagas medianas, redondas e ovaladas. É pobre em açúcar, possui elevada acidez e boa coloração (LEÃO; SOARES; RODRIGUES, 2009).

### **2.3.3 Syrah**

É uma das mais antigas variedades tintas cultivadas. Algumas referências sugerem que esta seria originária de Schiraz, na Pérsia, outras, da Vila de Siracusa, na Sicília (CAMARGO, 1994). É uma variedade muito vigorosa e produtiva, porém altamente sensível a podridões do cacho. Entretanto, nas condições semiáridas do Nordeste, tem mostrado ótimo desempenho, destacando-se como a principal cultivar para vinhos tintos. Seus cachos são medianos, cilíndricos-cônicos, compactos, possui pedúnculos longos, bagas pequenas a medianas, ovaladas, negro-azuladas. Acumula até 25°Brix de sólidos solúveis, sendo estes diferentes para as safras do primeiro e segundo semestre (LEÃO; SOARES; RODRIGUES, 2009). O vinho elaborado a partir desta variedade possui um bom potencial alcóolico, cor intensa, aromático, fino, complexo, tânico e estruturado com acidez moderada (MIELE; MIOLO, 2003).

### **2.3.4 Tempranillo**

A variedade tinta Tempranillo é originária da Espanha e é cultivada em diversas regiões do mundo, principalmente na Península Ibérica (CHILE, 2006). No Vale do Submédio São Francisco, apresenta médio a alto vigor, cachos cheios e de tamanho médio. Seu ciclo produtivo é de apenas 113 dias, sendo sensível ao míldio. Destaca-se pela boa produção, quantidade de açúcar (22°Brix), acidez e antocianinas (CAMARGO et al., 2007).

### **2.3.5 Touriga Nacional**

Touriga Nacional é uma importante variedade tinta *Vitis vinifera L.* originária de Portugal utilizada na produção de vinho do Porto, vinho de mesa e em vinhos varietais. Apresenta maturação média a precoce, possui cachos pequenos a médio, ligeiramente compacto, de tamanho não uniforme, com bagas pequenas e arredondadas com película rígida. Porém apresenta alguns distúrbios fisiológicos na frutificação e sensibilidade a doenças fúngicas (JAYASANKAR; GRAY, 2000).

### **2.3.6 Chenin Blanc**

Cultivada em diversas regiões do mundo, é uma variedade originária da França, que devido à sua elevada acidez, torna-se a mais versátil cultivar vinífera, já que é possível elaborar vinhos secos, suaves, de sobremesa e *brandy*. Suas plantas são vigorosas e produtivas, os cachos são de medianos a grandes, alongados e cônicos, com bagas pequenas a médias, ovaladas, de coloração verde-amareladas, porém seus cachos são extremamente susceptíveis a podridão. No vale do Submédio São Francisco esta variedade apresenta valores entre 18-22°Brix de sólidos solúveis e destaca-se como a principal cultivar utilizada na elaboração de vinhos brancos tranquilos e espumantes, responsável pelo frescor devido à boa acidez (LEÃO; SOARES; RODRIGUES, 2009).

### **2.3.7 Moscato Canelli**

Variedade procedente da Itália. Apresentou ótima adaptação às condições do Vale do Submédio São Francisco, sendo a segunda principal uva branca cultivada, atualmente na região, para elaboração de espumantes

moscatéis. Além de utilizada na elaboração de vinhos de mesa varietais, também tem sido usada na elaboração de vinhos espumantes do tipo moscatel (GUERRA et al., 2009). As plantas apresentam vigor baixo a moderado e são pouco produtivas nas condições do semiárido brasileiro, além das bagas serem susceptíveis ao apodrecimento no final do ciclo. Os cachos são medianos, cilíndricos-cônicos e compactos, possuem bagas pequenas a medianas, redondas, de coloração amarelada, levemente escura após a maturação (LEÃO; SOARES; RODRIGUES, 2009). Os sólidos solúveis podem alcançar até 27°Brix e a acidez pode variar de 0,50% a 0,80% de ácido tartárico (LIMA et al., 2004).

### **2.3.8 Moscato Itália**

Variedade de película branca, semelhante à Moscato Canelli, possui sabor moscatel, aromática e alcança cerca de 27°Brix (GIOVANINNI, 2008). Foi obtida na Itália através do cruzamento entre Bicane e Moscatel de Hamburgo. Possui cachos grandes, cilindro-cônicos, alongados e muito compactos. As bagas também são grandes, ovaladas, de cor verde-amarelada, consistência carnosa e sabor moscatel. É a principal variedade utilizada na elaboração de espumantes moscatéis e também como uva de mesa (LEÃO; SOARES; RODRIGUES, 2009).

### **2.3.9 Composição física e química das uvas (*Vitis vinifera L.*)**

As variedades de uvas possuem diferentes características físico-químicas, o que está diretamente relacionado à tipicidade do vinho. Na região do Vale do Submédio São Francisco, vinhos elaborados em diferentes épocas do ano apresentam características físico-químicas e sensoriais diferentes devido à variação climática intra-anual da região (TONIETTO; TEIXEIRA, 2004). Tais

características são adquiridas durante o desenvolvimento do fruto através de uma série complexa de alterações físicas e bioquímicas (COOMBE, 1992).

O cacho de uvas é composto pelo engaço que é rico em compostos fenólicos e pobre em açúcares; e pelas bagas. Estas são formadas pela casca, rica em compostos fenólicos; polpa, matéria principal para a vinificação composta por açúcares (glicose, frutose e sacarose), ácidos minerais e orgânicos (ácido málico e ácido tartárico), minerais, polifenóis, pectina, aromas, vitaminas e enzimas; e sementes, que são fontes de taninos. Estes compostos estão presentes em proporções que variam com o decorrer da maturação (FLANZY, 1998).

Durante a fase inicial de crescimento da baga, a divisão celular é rápida e todas as células são formadas nas duas primeiras semanas após a floração, seguida por um aumento no tamanho das bagas devido à expansão celular. Durante esta fase são sintetizados os ácidos orgânicos, málico e tartárico, atingindo concentrações máximas (CONDE et al., 2007). Também ocorre a síntese de taninos e hidroxicinamato que são os principais precursores de compostos voláteis fenólicos. Os taninos encontram-se principalmente na casca e nas sementes do fruto, e são percebidos como compostos adstringentes importantes para a estabilidade do corpo do vinho (DELUC et al., 2007).

A segunda fase é a de retardamento, porém continua-se o aumento no tamanho das bagas. Os processos biossintéticos ainda não são bem caracterizados nesta fase, mas sabe-se que o acúmulo de açúcar inicia-se durante a fase imediatamente anterior ao início do amadurecimento (COOMBE, 1992).

A terceira fase caracteriza-se pelo início do amadurecimento, em que a baga dobra de tamanho, início do desenvolvimento da cor (fase pintor), devido ao acúmulo de antocianinas em uvas tintas, e amaciamento da baga (DELUC et al., 2007). Os açúcares (principalmente glicose e frutose) continuam a acumular-se, e as concentrações de ácidos orgânicos a diminuir junto ao aumento do pH, ocasionado pela formação de sais devido aos ácidos livres (JACKSON, 2008).

Um grande número de aromas voláteis é sintetizado no final desta fase (CONDE et al., 2007). Além disto, a disponibilidade de taninos na semente diminui através de processos oxidativos reduzindo os componentes adstringentes dentro da baga. Já os taninos da casca começam a interagir com as antocianinas e uns aos outros, aumentando o tamanho e complexidade do polímero.

O estágio pintor se inicia quando desaparece a clorofila da casca e as bagas tornam-se translúcidas, amareladas nas variedades brancas e azuladas ou negro-azuladas nas variedades tintas (MOTA et al., 2006). É um fator determinante para definir a data da colheita, mas variações no amadurecimento das bagas dentro de um mesmo vinhedo tornam difícil determinar quando uma cultura está no seu melhor estágio de maturação (DELUC et al., 2007). Porém quando as uvas não são colhidas no estágio em que se atinge o maior acúmulo de açúcar possível e uma acidez fixa equilibrada com esse açúcar, as uvas entram no período de sobrematuração. Este período caracteriza-se pela queima de parte dos açúcares, murchamento das bagas e ataque de parasitas e saprófitas, como fungos.

As características físico-químicas das uvas também são influenciadas pela variedade e porta-enxerto, forma de cultivo, tipo de solo, estresse hídrico, irrigação, variabilidade climática, insolação, pluviosidade, temperatura, umidade relativa, demanda evaporativa, área foliar, carga de frutas e presença de patógenos (LEÃO; SOARES, 2009).

#### **2.4 Microbiota das uvas**

O ecossistema microbiano da uva é composto por uma grande diversidade de microrganismos, incluindo leveduras, bactérias e fungos, saprófitos, fitopatogênicos e toxigênicos. Os gêneros de fungos filamentosos comumente encontrados em uvas são: *Alternaria*, *Acremonium*, *Aspergillus*,

*Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus* (ABRUNHOSA et al., 2001; BELLÍ et al., 2006; MUNDY; CASONATO; MANNING, 2009; SERRA et al., 2006).

Estes microrganismos podem ter influência direta nos vinhos, já que diferentes espécies têm sido encontradas em diferentes regiões e variedades de uvas e são responsáveis pela produção de metabólitos específicos presentes no vinho, o que gera uma identidade regional (BOKULICH et al., 2014; KNIGHT et al., 2015). Apesar de tal influência, estes microrganismos também podem afetar a saúde das videiras e uvas, deteriorando-as e produzindo micotoxinas (DUBOURDIEU et al., 2006; SWIEGERS et al., 2009).

Estudos têm relatado que na superfície de bagas saudáveis a maior parte da microbiota é formada por leveduras. Sendo algumas espécies produtoras de compostos antifúngicos, inibindo o crescimento de fungos filamentosos na superfície das bagas. Já nas bagas injuriadas ocorre uma maior incidência de fungos filamentosos (NALLY et al., 2012).

O principal fungo filamentoso responsável pela podridão da uva é *Botrytis cinerea*, um patógeno que danifica as bagas e tem um efeito prejudicial nas propriedades organolépticas das uvas e seus derivados. No entanto, a maioria dos estudos sobre fungos filamentosos em uvas tem-se concentrado nos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais também causam podridão nas uvas, tornando-as secas e com aspecto enrugado e têm sido associados à deterioração de uvas e produção de micotoxinas (ROUSSEAU et al., 2014; SERRA et al., 2006).

O gênero *Penicillium* tem sido relatado como agente causador do mofo verde, uma doença secundária em bagas maduras resultando em perda de mosto, cor e uma diminuição na concentração de açúcares (KASSEMAYER; BERKELMANN-LÖHNERTZ, 2009). Este gênero é mais frequentemente encontrado em vinhedos mais frios e secos em relação a vinhedos mais quentes e

úmidos. Algumas espécies deste gênero têm sido relatadas como produtores de micotoxinas em uvas, como a patulina, mas esta toxina tende a ser degradada no processo de fermentação na elaboração de vinhos (ROUSSEAU et al., 2014).

*Penicillium chrysogenum* foi a espécie mais comumente isolada na Argentina (MAGNOLI et al., 2003). Já na França e Portugal a espécie de maior incidência foi *P. brevicompactum* (SAGE et al., 2002; SERRA et al., 2006). No entanto, outros estudos identificaram *P. expansum* como a espécie de maior ocorrência em vinhedos portugueses (ABRUNHOSA et al., 2001) e franceses (BEJAOUI et al., 2006). Estes estudos demonstram que a incidência de diferentes espécies do gênero varia não apenas com a localização geográfica, mas também com a safra e condições climáticas. Por isso, é provável que seja difícil generalizar a gestão de controle de fungos filamentosos (ROUSSEAU et al., 2014).

Fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* estão presentes na camada superior do solo de cultivo das videiras. Este é levado para os cachos e se desenvolve nas bagas (LEONG et al., 2006b). Estão presentes nos cachos desde o início do ciclo, porém sua ocorrência aumenta significativamente nos estádios posteriores de crescimento das uvas até a colheita, estágio em que a umidade relativa e temperatura encontram-se mais elevadas (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003).

Segundo Leong et al. (2006a) o período após a maturação, quando a película da baga amacia, os açúcares acumulam e há redução da acidez, ocorre uma maior suscetibilidade à infecção das bagas por fungos do gênero *Aspergillus*. No entanto, antes da suscetibilidade, os fungos precisam sobreviver no vinhedo, provavelmente, no solo. Fatores como a atividade de água e temperatura afetam a sobrevivência dos esporos destes fungos, influenciando no inóculo inicial quando as uvas se tornam suscetíveis (BATTILANI et al., 2006; BELLÍ et al., 2005; SERRA; BRAGAB; VENÂNCIO, 2005).

*A. carbonarius* e *A. niger*, pertencentes à Seção *Nigri*, são as espécies mais isoladas, representando 50 a 98,5% de fungos do gênero *Aspergillus* isolados de bagas de uvas (*Vitis vinifera* L.) (ROUSSEAUX et al., 2014). Isolados de *A. aculeatus*, *A. awamori*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *A. melleus*, *A. niveus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. tubingensis*, *A. uvarum* e *A. wentii* também têm sido encontrados, mas em baixas frequências (BAU et al., 2005; BEJAOUI et al., 2006; LEONG et al., 2007; SAGE; GARON; EIGLE-MURANDI, 2004; SERRA; BRAGAB; VENÂNCIO, 2005; SOMMA; PERRONE; LOGRIECO, 2012; SPADARO et al., 2012).

Clarke et al. (2004) encontraram o solo como a principal fonte de inóculo de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* nos vinhedos australianos. Estes foram mais encontrados a partir de solo cultivado frequentemente. Adicionalmente, a contagem de fungos foi maior no solo sob as videiras do que no solo entre as linhas das videiras.

A incidência de fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* em uvas aumenta quando ocorre irrigação excessiva durante o estágio de maturação ou períodos de chuva durante a colheita, o que provoca o rompimento das bagas. Os danos na superfície das bagas também podem ser causados por insetos, aves e outros fungos. Além disto, traças e insetos podem dispersar ou carregar esporos para as bagas de uvas, facilitando assim a penetração rápida dos fungos na fruta (LEONG et al., 2006b).

Diferentes condições climáticas podem afetar o desenvolvimento dos fungos (BATTILANI et al., 2006; BELLÍ et al., 2005, LEONG et al., 2006b).

Temperaturas mais elevadas no mês que precede a colheita das uvas favorece o desenvolvimento de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, que devido aos seus esporos pretos, são altamente resistentes à luz solar e sobrevivem à exposição ao sol, obtendo uma vantagem competitiva em clima mais quente (BELLÍ et al., 2005). O aumento da umidade relativa entre 80 e

100% também favorece o desenvolvimento, bem como a produção de toxinas por esses fungos (BELLÍ et al., 2007).

Em um estudo realizado em Portugal, *Aspergillus* Seção *Nigri* foram isolados principalmente de vinhedos situados na parte Sul, caracterizada por verões quentes e secos, e quase nenhum foram encontrados em vinhedos situados na parte Norte, onde as temperaturas são moderadas durante o verão (ABRUNHOSA et al., 2001; SERRA et al., 2003).

A diversidade de fungos filamentosos também pode variar entre as variedades das uvas e diferentes cores das bagas. A diversidade da população de fungos filamentosos isolados a partir de uvas Moscatel cultivadas na Espanha foi menor do que a de variedades tintas, como Bobal, Tempranillo, Garnacha e Monastrell (MEDINA et al., 2005), o que demonstra que a fenologia da planta e as características físico-químicas das uvas também irão determinar a contaminação (BATTILANI et al., 2004).

## **2.5 Fungos filamentosos produtores de ocratoxina A em uvas e vinhos**

Embora os estudos demostrem que a ocratoxina A é produzida principalmente em zonas tropicais, por *Aspergillus carbonarius*, *A. niger* e *A. ochraceus*, e em zonas temperadas, por *Penicillium verrucosum* e *P. nordicum* (ABRUNHOSA et al., 2001; O'CALLAGHAN; CADDICK; DOBSON, 2003; PITT et al., 2000), estudos recentes demonstram que as espécies produtoras de OTA mais frequentes nas uvas de diversas regiões (temperadas, subtropicais e tropicais) pertencem à Seção *Nigri*, sendo *A. niger* e *A. carbonarius* os maiores representantes (ABRUNHOSA et al., 2001; BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2006; SERRA et al., 2006).

Os isolados de *A. niger* são mais comuns nas uvas que *A. carbonarius*, entretanto, *A. carbonarius* é mais relevante devido à maior proporção de

isolados produtores de OTA, e em níveis mais elevados que *A. niger*, sendo o maior responsável pela acumulação de OTA em uvas e vinhos (BATTILANI; PIETRI, 2002; MAGNOLI et al., 2003; OLIVERI; TORTA; CATARA, 2008).

Abarca et al. (2003), ao avaliarem a presença de fungos potencialmente toxigênicos em uvas secas na Espanha, encontraram 98% das amostras contaminadas por *A. niger* e apenas 58% por *A. carbonarius*. Destes, 96,7% foram produtores de OTA e apenas 0,6 % de *A. niger* foram capazes de produzir esta micotoxina. Porém, alguns autores afirmam que alguns isolados de *A. carbonarius* podem não produzir OTA (BAU et al., 2005).

*Aspergillus carbonarius* desenvolvem nas bagas, especialmente após o estágio pintor (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006). O período entre o início do pintor e a colheita é considerado o período crítico para a produção de ocratoxina A e sua acumulação nas bagas de uva. Sendo que, o retardamento da colheita pode aumentar o risco de contaminação com esta toxina (GAMBUTI et al., 2005).

Apesar de incomum, Medina et al. (2005) observaram *A. tubingensis* isolados de uvas produtores de OTA. Já as espécies da Seção *Circumdati*, produtoras de OTA, não são relevantes devido a sua baixa ocorrência em uvas (BAU et al., 2005).

Os requisitos para a produção da micotoxina são mais específicos que os exigidos para o crescimento do fungo (MITCHELL et al., 2004). Podem variar largamente, mas, em geral, depende da disponibilidade de nutrientes, atividade de água, pH, temperatura, e da presença ou ausência de gases específicos.

Segundo Passamani et al. (2014) a melhor condição para produção de OTA por *A. niger* e *A. carbonarius*, em meio semissintético de uva, foi a 15 °C, 0,99 aw e pH 5,35. Com relação ao crescimento destes isolados as condições ótimas foram de 20 a 33 °C, 0,95 a 0,99aw e pH entre 5 e 6,5, para *A. carbonarius* e de 24 a 37 °C, atividade de água maior que 0,95 e pH entre 4 e

6,5 para *A. niger*, o que demonstra que a presença de fungos potencialmente toxigênicos não implica a presença de micotoxinas (FUNG; CLARK, 2004). Porém, controlando a esporulação e o crescimento de espécies potencialmente toxigênicas, a produção de OTA em uvas pode ser afetada, garantindo a comercialização de um produto que não apresente riscos à saúde do consumidor (DANTIGNY; NANGUY, 2009).

As uvas podem estar suscetíveis à infecção por fungos filamentosos desde os estágios iniciais da maturação (BAU et al., 2005). Portanto, a presença de OTA em mostos e vinhos é devido à contaminação das uvas por fungos que se desenvolvem na pré-colheita, colheita ou durante as fases que antecedem a vinificação. Este metabólito pode retardar o crescimento de levedura durante a fermentação, causando falhas no processo de elaboração de vinhos, além de ser um risco potencial à saúde (DONÈCHE, 1993).

Cachos sem visível desenvolvimento de fungos também podem conter OTA, pois as espécies do gênero *Aspergillus* são invasivas, capazes de penetrar nas bagas mesmo sem danos na casca, embora bagas com contaminação visível normalmente apresentem níveis mais altos de OTA, quando comparados às bagas sadias (BATTILANI; PIETRI, 2002). No entanto, danos nas bagas nem sempre levam a contaminação por OTA em vinho (BATTILANI et al., 2004; DRUSCH; RAGAB, 2003).

Além dos fatores intrínsecos e ambientais, a microbiota competitiva também é um fator importante na contaminação das uvas por espécies potencialmente toxigênicas e a produção de OTA. *A. japonicus*, *A. wentii*, *A. versicolor*, *A. clavatus* e algumas espécies de leveduras competem por espaço e nutrientes reduzindo a concentração de OTA em uvas e vinhos (ABRUNHOSA et al., 2001; PONSONE et al., 2012).

## 2.6 Ocratoxina A em uvas (*Vitis vinifera L.*) e vinhos

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos sintetizados, sob condições específicas, por determinadas espécies de fungos filamentosos. Algumas dessas toxinas permanecem restritas ao micélio fúngico enquanto que a maior parte é secretada no substrato (COPETTI et al., 2012).

A Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Estão presentes em diversos produtos agrícolas como trigo (RIBA et al., 2008), milho (MAGNOLI et al., 2007), café (LEONG et al., 2007), cacau (MOUNJOUENPOU et al., 2008), cerveja (KAWSHIMA; VIEIRA; VALENTE SOARES, 2007), queijo (DALL'ASTA et al., 2008), uva (LASRAM et al., 2007) e seus derivados, como suco e vinho (BURDASPAL; LEGARDA, 2007; ZIMMERLI; DICK, 1996). Sendo que, na Europa, o vinho é a segunda maior fonte de OTA para população, representando 15% do consumo total, atrás apenas dos cereais.

Esta ocorrência de OTA em vinhos deve-se ao crescimento de fungos filamentosos sobre as uvas e a produção da micotoxina, sendo que, apesar dos esporos fúngicos serem destruídos por processos químicos, físicos ou alterações ambientais, as micotoxinas são compostos estáveis, não sendo completamente destruídos durante a maioria dos processos de alimentos (BRERA; DEBEGNACH; SANTIS, 2011; CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1998; COPETTI et al., 2012; IAMANAKA et al., 2005; MIRAGLIA; BRERA, 2002).

A OTA (7-(L-fenilalanil- $\beta$ -carbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocumarin) (Figura 2) é uma dihidroisocumarina ligada através de 7 grupos carboxílicos por uma ponte amida a L-fenilalanina, com propriedades fluorescentes que possui diversos efeitos tóxicos (JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES - JECFA, 2001).

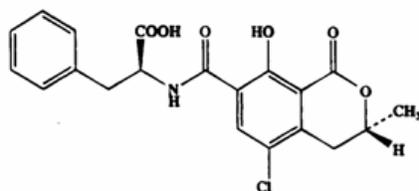


Figura 2 Estrutura química da ocratoxina A  
Fonte: Vilatoro (2011)

Esta micotoxina foi associada à nefropatia endêmica dos Balcãs, doença renal degenerativa em humanos. Tem demonstrado efeitos neurotóxicos (SAVA et al., 2006), genotóxicos (TOZLOVANU et al., 2006), carcinogênicos (BROWN; ODELL; MANTLE, 2007), mutagênicos (PALMA et al., 2007), teratogênicos (BALASAHEB et al., 2007) e imunossupressores (ROSSIELLO et al., 2008) em animais. Devido a este risco potencial, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer classificou a ocratoxina A como grupo 2B, ou seja, possivelmente carcinogênica para humanos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 1993).

Os países possuem diferentes limites de níveis toleráveis de OTA em diferentes produtos alimentares. A União Europeia fixou 2µg/kg de OTA máxima permitida em vinhos e sucos de uvas (CE, 2006). Este mesmo limite foi fixado no Brasil em 2011 (BRASIL, 2011).

A OTA foi detectada pela primeira vez em vinhos por Zimmerli e Dick (1996). A partir de então, a ocorrência desta micotoxina tem sido relatada em uvas, vinho e suco de uva na Europa, América do Sul e do Norte, África e Austrália (LOMBAERT et al., 2004; OTTENDER; MAJERUS, 2000; ROSA et al., 2004) (Tabela 1), porém a contaminação de vinhos por OTA na Europa, especialmente na região Sul, é geralmente maior do que a contaminação em outras regiões vitivinícolas no mundo devido ao seu clima mais quente que propicia uma maior ocorrência e desenvolvimento fúngico e a produção de OTA (OTTENEDER; MAJERUS, 2000; SHEPHARD et al., 2003; VEGA et al.,

2012). Concomitantemente observa-se que os vinhos do Brasil possuem baixas concentrações quando comparados com os de origem europeia (SHUNDO et al., 2006; TERRA et al., 2012).

Quintela et al. (2011), ao avaliarem vinhos da Espanha, detectaram que o número de amostras contendo OTA foi maior na área semiárida (71%) do que na área seca (43%), e consideram que esta diferença pode estar relacionada com a baixa precipitação e temperaturas elevadas da região semiárida, o que favoreceria o desenvolvimento de espécies produtoras de OTA. Isso demonstra a influência das condições climáticas na distribuição de espécies produtoras de OTA e na produção desta micotoxina (BATTILANI et al., 2006).

Tabela 1 Presença de Ocratoxina A em uvas e vinhos de diversas regiões

<b>Referência</b>	<b>Origem</b>	<b>Amostra</b>	<b>Níveis de OTA</b>
Filali et al. (2001)	Marrocos	Vinho	30-3240 ng/L
Hocking et al. (2003)	Austrália	Vinho	<20-1000 ng/L
Soufleros, Tricard e Boloumpasi (2003)	Grécia	Vinho	<20-3200 ng/L
Shephard et al. (2003)	África do Sul	Vinho	40-380 ng/L
Shundo et al. (2006)	Brasil- Vale São Francisco	Vinho	360-1330 ng/L
Shundo et al. (2006)	Brasil - Rio Grande Do Sul	Vinho	100-1240 ng/L
Burdaspal e Legarda (2007)	Espanha	Vinho	<10-4630 ng/L
Brera et al. (2008)	Itália	Vinho	<10-7500 ng/L
Flajs et al. (2009)	Croácia	Vinho	0-21 ng/L
Ponsone et al. (2010)	Argentina	Vinho	0,02-4,82 ng/L
Terra et al. (2012)	Brasil- Vale São Francisco	Vinho	< 30-620 ng/L
Sage et al. (2002)	França	Uva	<10-461 ng/g
Battilani e Pietri (2002)	Itália	Uva	0,40-0,65ng/g
Chiotta et al. (2009)	Argentina	Uva	0,10-1,20 ng/g

Blesa et al. (2006) consideram que a contaminação por OTA em uvas e vinhos, varia dependendo diretamente das condições climáticas e, indiretamente, da safra e latitude, sendo, geralmente, superior em latitudes mais baixas.

A variedade também possui influência significativa na ocorrência de fungos potencialmente toxigênicos e na produção da toxina. O vinho tinto tem sido relatado com maiores concentrações de OTA que os vinhos brancos ou rosés (GRAZIOLI; FUMI; SILVA, 2006). Isto pode estar relacionado com o processo de elaboração dos vinhos (LASRAM et al., 2008), já que na produção do vinho branco as cascas separam-se do mosto logo após o esmagamento, havendo pouco contato entre eles. No vinho tinto, após o esmagamento, as cascas fermentam junto ao mosto, para potencializar a extração da cor, ocorrendo também uma maior extração da micotoxina, caso esteja presente nas uvas. Já na fermentação de vinhos rosé, o tempo de contato entre a casca e o mosto é menor (FERNANDES et al., 2003).

Apesar dos frequentes estudos da presença de OTA em uvas e vinhos, não há informações precisas do efeito das diferentes variedades de uvas na produção de OTA por fungos do gênero *Aspergillus*. Battilani et al. (2004) sugerem que pesquisas devem ser realizadas a fim de selecionar uvas resistentes ao ataque de fungos potencialmente toxigênicos e a produção de OTA.

## REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L. et al. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, p. 504–506, 2003.

ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 394–400, 2007.

ABRUNHOSA, L. et al. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 240-242, 2001.

BALASAHEB, W. P. et al. 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, v. 8, n. 4, p. 357- 364, 2007.

BATTILANI, P. et al. Mapping of *Aspergillus* Section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, p. 72–82, 2006.

BATTILANI, P. et al. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 1736-1740, 2004.

BATTILANI, P.; GIORNI, P.; PIETRI, A. Epidemiology of toxin producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 715–722, 2003.

BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 2-4, 2006.

BATTILANI, P.; PIETRI, A. Ochratoxin A in grapes and wine. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 639-643, 2002.

BAU, M. et al. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, p. 125-130, 2005.

BEJAOU, H. et al. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, p. 46-52, 2006.

BELLÍ, N. et al. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, p. 40-45, 2006.

BELLÍ, N. et al. Ochratoxin A-producing fungi in Spanish wine grapes and their relationship with meteorological conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 113, p. 233-239, 2005.

BELLÍ, N. et al. Skin damage, high temperature and relative humidity as detrimental factors for *Aspergillus carbonarius* infection and ochratoxin A production in grapes. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 11, p. 1343-1349, 2007.

BLESA, J. et al. Factors affecting the presence of ochratoxin a in wines. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 46, p. 473-478, 2006.

BOKULICH, N. A. et al. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 111, p. 139-148, 2014.

BRASIL. **Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>>. Acesso em: 22 set. 2014.

BRERA, C. et al. Ochratoxin A in cocoa and chocolate products from the Italian market: Occurrence and exposure assessment. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 10, p. 1663–1667, 2011.

BRERA, C. et al. Ochratoxin A contamination in Italian wine samples and evaluation of the exposure in Italian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 22, p. 10611-10618, 2008.

BROWN, A. L.; ODELL, E. W.; MANTLE, P.G. DNA ploidy distribution in renal tumors induced in male rats by dietary ochratoxin. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Jena, v. 59, n. 2, p. 85-95, 2007.

BURDASPAL, P.; LEGARDA, T. Occurrence of ochratoxin A in sweet wines produced in Spain and other countries. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 24, n. 9, p. 976- 986, 2007.

CAMARGO, U. A. et al. Introdução e avaliação de novas cultivares para vinho no vale do São Francisco. In: WORKSHOP INTERNACIONAL DE PESQUISA, 1., 2004, Recife. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 103-109.

CAMARGO, U. A. et al. O clima vitícola do Sub-médio Introdução e avaliação de novas cultivares para vinho no Vale do São Francisco. In: WORKSHOP INTERNACIONAL DE PESQUISA SOBRE A PRODUÇÃO DE VINHOS EM REGIÕES TROPICAIS, RECIFE E PETROLINA, PE, BRASIL, 1., 2004, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007. p. 103-109.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Advances in grape culture in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, p. 144–149, 2011. Especial.

CAMARGO, U. A. **Uvas do Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI; Bento Gonçalves: Embrapa-CNPV, 1994. 90 p.

CARNEIRO, W. M. A.; COELHO, M. C. S. G. **Vitivinicultura nordestina: características e perspectivas**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. 135 p.

CHILE. Ministerio de Agricultura. Servicio Agrícola y Ganadero. **Catastro del viñedo chileno 2005**. Santiago, 2006. 51 p.

CHIOTTA, M. L. et al. *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, p. 137–141, 2009.

CLARKE, K. et al. Incidence of black *Aspergillus* spp. in vineyards. In: EMMETT, B. (Ed.). **Fungal contaminants and their impact on wine quality**. Urrbrae: Cooperative Research Centre for Viticulture, 2004. p. 132-142.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Position paper on ochratoxin A**. London, 1998. (CX/Food Additives and Contaminants 99/14).

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES). Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, n° 1881/2006 of 19 Dec. 2006. **Official Journal of the European Union**, Bruxelles, v. L364, p. 5-24, 2006.

CONDE, C. et al. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. **Food**, Chicago, v. 1, p. 1-22, 2007.

COOMBE, B.G. Research on development and ripening of the grape berry. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 43, n. 1, p. 101-110, 1992.

COPETTI, M. V. et al. The effect of cocoa fermentation and weak organic acids on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 155, n. 3, p. 158–164, 2012.

DALL'ASTA, C. et al. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. **Food Chemistry**, London, v. 106, n. 2, p. 729-734, 2008.

DANTIGNY, P.; NANGUY, S. P. M. Significance of the physiological state of fungal spores. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n. 1/2, p. 16–20, 2009.

DELUC, L. G. et al. Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. **BMC Genomics**, London, v. 42, p. 1–42, 2007.

DONECHE, B. Botrytized wines. In: FLEET, G. H. (Ed.). **Wine microbiology and biotechnology**. Chur: Harwood Academic, 1993. p. 327–353.

DRUSCH, S.; RAGAB, W. S. M. Mycotoxins in fruits, fruit juices and dried fruits. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, p. 1514-1527, 2003.

DUBOURDIEU, D. et al. The role of yeasts in grape flavor development during fermentation: The example of Sauvignon blanc. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 57, p. 81–88, 2006.

DULLIUS, P. R. **Indicações Geográficas e desenvolvimento territorial: as experiências do Rio Grande do Sul**. 2009. 148 p. Dissertação (Mestrado em Extensão Rural) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA UVA E VINHO **Indicações geográficas de vinhos finos do Brasil**. 2013. Disponível em: <<http://www.cnpv.embrapa.br/tecnologias/ig/>>. Acesso em: 5 fev. 2016.

FERNANDES, A. et al. Fate of ochratoxin A during a vinification trial. **Aspects of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 68, p. 73-80, 2003.

FILALI, A. et al. Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, p. 565–568, 2001.

FLAJS, D. et al. ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 6, p. 590–592, 2009.

FLANZY, C. Métabolisme anaérobique et maturation du raisin. In: FLANZY, C. **Oenologie: fondements scientifiques et technologiques**. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 1998. p. 561–578.

FLORES, M. A. D.; FLORES, A. **Diagnóstico do enoturismo brasileiro**. Bento Gonçalves: IBRAVIN, 2012. 62 p.

FUNG, F.; CLARK, R. F. Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**, New York, v. 42, n. 2, p. 217-234, 2004.

GAMBUTI, A. et al. Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 56, n. 2, p. 155-162, 2005.

GIOVANINNI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. 3. ed. Porto Alegre: Renascença, 2008. 362 p.

GOLLO, S. S. **Inovação e estratégia de cooperação competitiva: estudo de caso da indicação de procedência vale dos vinhedos - Serra Gaúcha/RS**. 2006. 361 f. Tese (Doutorado em Administração) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GRAZIOLI, B.; FUMI, M. D.; SILVA, A. The role of processing on ochratoxin A content in Italian must and wine: a study on naturally contaminated grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, p. 93-96, 2006.

GUERRA, C.C. et al. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. (Documentos, 48).

HOCKING, A. D. et al. Occurrence of ochratoxin A in Australian wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 9, p. 72-78, 2003.

IAMANAKA, B. T. et al. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. **Food Additives & Contaminants**, London, v. 22, p. 1258–1263, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL. **Resolução nº 075/2000, de 28 de novembro de 2000**. Estabelece as condições para o registro das indicações geográficas. Rio de Janeiro, 2000.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon, 1993. 571 p.

JACKSON, R. S. **Wine science: principles and applications**. 3th ed. San Diego: Academic, 2008.

JAYASANKARS, L. I. Z.; GRAY, D. J. In vitro selection of *Vitis vinifera* 'Chardonnay' with *Elsinoe ampelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase. **Planta**, Berlin, v. 211, n. 2, p. 200–208, 2000.

JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Geneva, 2001. (WHO Food Additives Series, 47). Disponível em: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=RedirectURL&\\_method=externObjLink&\\_locator=url&\\_cdi=6800&\\_issn=07400020&\\_origin=article&\\_zone=art\\_page&\\_plusSign=%2B&\\_targetURL=http%253A%252F%252Fwww.inchem.org%252Fdocuments%252Fjecfa%252Fjecmono%252Fv47je01.htm](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=RedirectURL&_method=externObjLink&_locator=url&_cdi=6800&_issn=07400020&_origin=article&_zone=art_page&_plusSign=%2B&_targetURL=http%253A%252F%252Fwww.inchem.org%252Fdocuments%252Fjecfa%252Fjecmono%252Fv47je01.htm)>. Acesso em: 29 set. 2014.

KASSEMEYER, H. H.; BERKELMANN-LÖHNERTZ, B. Fungi of grapes. In: KÖNIG, H.; UNDEN, G.; FRÖHLICH, J. (Ed.). **Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine**. Berlin: Springer, 2009. p. 61-87.

KAWASHIMA, L. M.; VIEIRA, A. P.; VALENTE SOARES, L. M. Fumonisin B1 and ochratoxin A in beers made in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 317-323, 2007.

KNIGHT, S. et al. Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. **Scientific Reports**, Sydney, v. 5, n. 14233, p. 1-10, 2015.

LASRAM, S. et al. Evolution of ochratoxin A content during red and rose vinification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, n. 10, p. 1696-1703, 2008.

LASRAM, S. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 3, p. 376- 379, 2007.

LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. Implantação do vinhedo. In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. S. (Ed.). **A vitivinicultura no Semiárido brasileiro**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica; Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 756 p.

LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M.; RODRIGUES, B. L. Principais cultivares. In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. S. (Ed.). **A vitivinicultura no Semiárido brasileiro**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica; Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 756 p.

LEONG, S. L. et al. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, p. 10–17, 2006b.

LEONG, S. L. et al. Black *Aspergillus* spp. in Australian vineyards: from soil to ochratoxin A in wine. In: HOCKING, A. D. et al. (Ed.). **Advances in food mycology**. New York: Springer, 2006a. p. 158-171.

LEONG, S. L. et al. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 301-306, 2007.

LIMA, M. A. C. et al. Maturação de uvas para vinhos no Vale do São Francisco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., 2004. **Resumos expandidos...** Florianópolis: Epagri: SBF, 2004. 1 CD ROM.

LIMA, M. F. et al. Doenças e alternativas de controle. In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. S. (Ed.). **A vitivinicultura no Semiárido brasileiro**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. p. 543-596.

LOMBAERT, G. et al. Ochratoxin A in dried vine fruits on the Canadian retail market. **Food Additives & Contaminants**, London, v. 22, p. 578–585, 2004.

MACNEIL, K. **A Bíblia do vinho**. 4. ed. Rio de Janeiro: Ediouro, 2003.

MAGNOLI, C. E. et al. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, p. 179-184, 2003.

MAGNOLI, C. E. et al. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 163, n. 5, p. 249-260, 2007.

MEDINA, A. et al. Study of spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section Nigri. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4696–4702, 2005.

MIELE, A.; MILO, A. **O sabor do vinho**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. 136 p. (Vinícola Miolo).

MIRAGLIA, M.; BRERA, C. **Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States**: reports on tasks for scientific cooperation: directorate general of health and consumer protection. Brussels: European Commission, 2002. 148 p.

MITCHELL, D. et al. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 439–445, 2004.

MOTA, R. V. et al. Fatores que afetam a maturação e a qualidade da uva para vinificação. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 234, p. 56-64, 2006.

MOUNJOUENPOU, P. et al. Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 121, p. 234–241, 2008.

MUNDY, D. C.; CASONATO, S. G.; MANNING, M. A. **Incidence of fungi isolated from grape trunks in New Zealand Vineyards**. New Castle: The Australasian Plant Pathology Society, 2009. p. 86.

NALLY, M. C. et al. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. **Postharvest Biology & Technology**, Amsterdam, v. 64, p. 40-48, 2012.

O'CALLAGHAN, J.; CADDICK, M. X.; DOBSON, D. W. A polyketide synthase gene required for Ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. **Microbiology**, New York, v.149, p. 3485–3491, 2003.

OLIVERI, 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**, Amsterdam, v. 127, p. 147–154, 2008.

OTTENDER, H.; MAJERUS, P. Occurrence of ochratoxin A in wines: Influence of the type of wine and its geographical origin. **Food Additives & Contaminants**, London, v. 17, p. 793–798, 2000.

PALMA, N. et al. Ochratoxin A-induced mutagenesis in mammalian cells is consistent with the production of oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 20, n. 7, p. 1031-1037, 2007.

PASSAMANI, F. R. F. et al. Effect of temperature , water activity , and pH on growth and production of Ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian Grapes. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 77, n. 11, p. 1947-1952, 2014.

PASTOR, L. V. E. Um olhar sobre o turismo do vinho brasileiro e sua paisagem. In: FLORES, M. A. D.; FLORES, A. **Diagnostico do Enoturismo Brasileiro**. Bento Gonçalves: Ibravin, 2012. p. 10.

PEREIRA, G. E. et al. **Técnicas de manejo e vinificação em condições de clima tropical**. 2010. Disponível em: <[https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/133080/1/OPB\\_2078.pdf](https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/133080/1/OPB_2078.pdf)>. Acesso em: 21 set. 2015.

PEREIRA, G. E.; GUERRA, C. C.; MANFROI, L. Vitivinicultura e enologia. In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. S. **A Vitivinicultura no Semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 756 p.

PEREIRA, G. E. **Tempranillo e Petit Verdot ganham espaço em vinícolas do Semiárido**. 2009. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009>>. Acesso em: 3 set. 2014.

PITT, J. I. et al. **A laboratory guide to Common Penicillium Species**. Sydney: Food Science Australia. 2000. 187 p.

PONSONE, M. L. et al. Control of ochratoxin A production in grapes. **Toxins**, Basel, v. 4, n. 5, p. 364–72, 2012.

PONSONE, M. L. et al. Natural occurrence of ochratoxin A in musts, wines and grape vine fruits from grapes harvested in Argentina. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 8, p. 1984–1996, 2010.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. **A vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010**. Brasília: Sebrae, 2011.

QUINTELA, S. et al. Occurrence of ochratoxin A in Rioja Alavesa wines. **Food Chemistry**, Easton, v. 126, n. 1, p. 302-305, 2011.

RIBA, A. et al. Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 1/2, p. 85-92, 2008.

ROSA, C. A. et al. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives & Contaminants**, London v. 21, p. 358–364, 2004.

ROSSIELLO, M. R. et al. 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**, San Diego, v. 229, p. 227-231, 2008.

ROUSSEAU, S. et al. Non-Botrytis grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins. **Food Microbiology**, London, v. 38, p. 104–121, 2014.

SAGE, L. et al. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 1306-1311, 2002.

SAGE, L.; GARON, D.; EIGLE-MURANDI, F. Fungal microflora and ochratoxin a risk in French vineyards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 5764-5768, 2004.

SAVA, V. et al. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 1, n. 27, p. 82- 92, 2006.

SERRA, R.; BRAGA, B. A.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, p. 515-521, 2005.

SERRA, R. et al. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, p. 63-68, 2003.

SERRA, R. et al. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, p. 971–978, 2006.

SHEPHARD, G. S. et al. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 1102-1106, 2003.

SHUNDO, L. et al. Ochratoxin a in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 533-537, 2006.

SOMMA, S.; PERRONE, G.; LOGRIECO, A. Diversity of black Aspergilli and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 51, p. 131-147, 2012.

SOUFLEROS, E. H.; TRICARD, C.; BOLOUMPASI, E. C. Occurrence of Ochratoxin A in Greek wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 83, p. 173-179, 2003.

SPADARO, D. et al. Ochratoxigenic black species of Aspergilli in grape fruits of Northern Italy identified by an improved PCR-RFLP procedure. **Toxins**, Basel, v. 4, p. 42-54, 2012.

SWIEGERS, J. H. et al. The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 2, p. 204-211, 2008.

TERRA, M. F. et al. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 93, n. 4, p. 890-894, 2012.

TONIETTO, J. O conceito de denominação de origem como agente promotor da qualidade dos vinhos. **Viticultura e enologia: atualizando conceitos**. Andradadas: Epamig, 2002. p. 151-163.

TONIETO, O. J.; TEIXEIRA, A. H. C. Zonage climatique des périodes viticoles de production dans l'année em zonaetropicale: application de la méthodologie du Système CCM Géoviticole. In: JOINT INTERNATIONAL CONFERENCE ON VITICULTURAL ZONING, 1., 2004, Cape Town. **Proceedings...** Cape Town: African Society for Enology and Viticulture, 2004. p. 193-201.

TONIETTO, J. **Vinhos brasileiros de 4º geração**: o Brasil na era das indicações geográficas. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. (Comunicado Técnico, n. 45).

TOZLOVANU, M. et al. Genotoxicity of the hydroquinone metabolite of ochratoxin A: structure-activity relationships for covalent DNA ad- duction. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 19, p. 1241–1247, 2006.

VEGA, M. et al. Ochratoxin A occurrence in wines produced in Chile. **Food Control**, Guildford, v. 28, p. 147–150, 2012.

VILLATORO, F. R. **IV Carnaval de la química**: la cantidad de cafeína y de ocratoxina A en uma taza de café. Disponível em: <<http://francis.naukas.com/2011/04/23/iv-carnaval-de-la-quimica-la-cantidad-de-cafeina-y-de-ocratoxina-a-en-una-taza-de-cafe/>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, p. 655–668, 1996.

## CAPÍTULO 2

### Fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em uvas viníferas e solos de videiras e ocratoxina A em vinhos do Vale do Submédio São Francisco

#### RESUMO

As uvas (*Vitis vinifera* L.) estão sujeitas à contaminação por fungos filamentosos presentes na lavoura, colheita e na elaboração dos vinhos, sendo *Aspergillus* o principal gênero produtor de ocratoxina A em uvas. Neste sentido, o objetivo neste estudo foi avaliar a diversidade micológica de espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas a partir de uvas e solo de cultivo destas uvas na região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco, bem como avaliar a presença de ocratoxina A nos vinhos experimentais. Foram avaliadas 14 amostras de uvas e solos de videiras coletadas na safra de 2014/2 e 2015/1 no Vale do Submédio São Francisco. Para o isolamento de fungos filamentosos das bagas foi utilizada a técnica de plaqueamento direto em meio de cultura DRBC. Para as amostras de solo utilizou-se a técnica de plaqueamento em superfície em meio DG-18. As espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram identificadas através de características morfológicas. As espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram testadas quanto ao potencial toxigênico através de Cromatografia de Camada Delgada e as espécies de *Penicillium* através do método Ágar Creme de Coco. A presença de ocratoxina A nos vinhos experimentais foi detectada por CLAE. A contaminação dos solos dos vinhedos variou de  $2,34 \times 10^3$  UFC/g a  $4,35 \times 10^4$  UFC/g. As espécies encontradas nas uvas viníferas foram *Aspergillus niger*, *A. carbonarius*, *A. aculeatus*, *A. niger* Agregado, *A. flavus*, *A. sojae*, *Penicillium sclerotiorum*, *P. citrinum*, *P. glabrum*, *P. decumbens*, *P. implicatum* e *P. solitum*. Todos os isolados de *A. carbonarius*, 18,18% de *A. niger*, 14,29% de *A. niger* Agregado e 60% de *A. ochraceus* foram produtores de OTA. Todos os *A. parasiticus* foram produtores de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, enquanto que apenas 14% de *A. flavus* foram produtores de aflatoxinas B1, B2. Todos os *P. citrinum* foram produtores de citrinina. Apenas 14,28% das amostras de vinhos tintos e 50% de vinhos brancos foram positivas para presença de OTA. A maior concentração de OTA foi encontrada em vinho tinto (0,29µg/L) e variou em vinhos brancos de 0,02 a 0,04µg/L.

Palavras-chave: *A. carbonarius*. Micotoxinas. Safra. Variedades. Vitivinicultura.

## 1 INTRODUÇÃO

O principal fungo filamentosos responsável pela podridão da uva é *Botrytis cinerea*, um patógeno que danifica as bagas e tem um efeito prejudicial nas propriedades organolépticas das uvas e seus derivados. No entanto, a maioria dos estudos sobre fungos filamentosos em uvas tem se concentrado nos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais também causam deterioração das uvas e têm sido associados à produção de micotoxinas (ROUSSEAU et al., 2014; SERRA et al., 2006).

A incidência de diferentes espécies fúngicas varia não apenas com a localização geográfica, mas também com a safra e condições climáticas (BATTILANI et al., 2006; BELLÍ et al., 2005; LEONG et al., 2006). Temperatura, umidade, aeração, período de infecção, e a interação entre diferentes microrganismos são fatores que irão influenciar no desenvolvimento de fungos e consequentemente na produção de micotoxinas (FUNG; CLARK, 2004).

Dentre as micotoxinas, a ocratoxina A (OTA) é a principal contaminante de uvas e vinhos, sendo considerada uma das mais prejudiciais para a saúde humana. É produzida por espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, e tem demonstrado efeitos neurotóxicos (SAVA et al., 2006), genotóxicos (TOZLOVANU et al., 2006), carcinogênicos (BROWN; ODELL; MANTLE, 2007), mutagênicos (PALMA et al., 2007), teratogênicos (BALASAHEB et al., 2007) e imunossupressores (ROSSIELLO et al., 2008) em animais. Sua ocorrência em vinhos deve-se ao crescimento de fungos filamentosos sobre as uvas e a produção da micotoxina, sendo que esta permanece ao longo do processo de vinificação, estando presente no produto final (CODEX, 1998; MIRAGLIA; BRERA, 2002).

O cultivo de uvas viníferas e a elaboração de vinhos finos no Vale do Submédio São Francisco têm sido intensificados nos últimos anos devido ao

clima propício da região (LEÃO; SOARES, 2009). Apesar do cenário favorável, os vinhos brasileiros possuem baixa competitividade, já que a maior parte do vinho consumido no país é importada. Sendo assim, é necessário aumentar a visibilidade da região, para que esta seja reconhecida como região polo de produção de vinhos finos.

Neste sentido, o objetivo neste estudo foi avaliar a diversidade micológica através de um estudo fenotípico de espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas a partir de uvas (*Vitis vinifera L.*) e solos de cultivo destas uvas na região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco, bem como avaliar a presença de OTA nos vinhos experimentais elaborados a partir das uvas (*Vitis vinifera L.*).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de estudo

As amostras foram coletadas em quatro vinícolas da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco, localizadas nos municípios de Lagoa Grande e Santa Maria da Boa Vista, em Pernambuco, e Casa Nova na Bahia (Figura 1), as quais possuem a intenção de adquirir a Indicação Geográfica para os vinhos elaborados a partir das variedades coletadas.



Figura 1 Região Vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco em que foram coletadas as amostras de uvas (*Vitis vinifera L.*) e solos de videira  
Fonte: Flores e Flores (2012)

## **2.2 Amostragem das uvas (*Vitis vinifera L.*)**

Foram coletadas cinco amostras de uvas brancas e sete amostras de uvas tintas nos estágios finais de maturação das bagas (época de colheita), em duas safras (julho/agosto/setembro e janeiro/fevereiro/março), nos anos de 2014 e 2015 (Tabela 1). Para isso, um transecto diagonal ao longo do vinhedo foi traçado e três cachos de uvas de três plantas equidistantes foram coletadas (P1, P2, P3), desprezando-se as extremidades (Figura 2A). As uvas foram transportadas para o laboratório em sacos plásticos estéreis dentro de caixas térmicas.

## **2.3 Amostragem dos solos de cultivo de uvas (*Vitis vinifera L.*)**

As amostras de solo foram coletadas nos mesmos pontos em que foram coletadas as uvas (P1, P2, P3). Quatro subamostras (p1, p2, p3, p4) foram retiradas na profundidade de 10 cm, em um raio de 20 cm no entorno da planta (Figura 2B). As subamostras foram homogeneizadas em sacos plásticos estéreis formando uma amostra composta em cada ponto. As amostras foram transportadas para o laboratório em caixas térmicas.

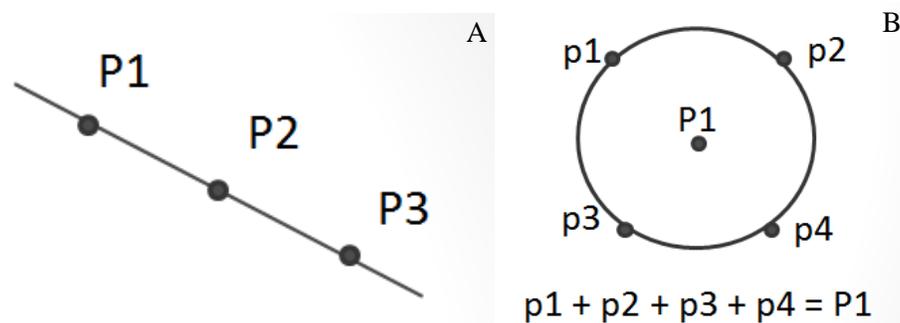


Figura 2 Transecto diagonal traçado ao longo do vinhedo para coleta das amostras de uvas e solos (A); Amostragem do solo em cada ponto(B)

Tabela 1 Amostras coletadas e coordenadas geográficas da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco (continua)

Variedade	Local	Ponto	Coordenadas geográficas		
			Latitude	Longitude	Altitude
Moscató Itália 1	Casa Nova – BA	1	9° 16' 29.59934" S	40° 52' 18.49320" W	422
		2	9° 16' 1.44726" S	40° 52' 19.86256" W	422
		3	9° 15' 57.75142" S	40° 52' 17.12385" W	422
Moscató Itália 2	Casa Nova – BA	1	9° 16' 21.63262" S	40° 52' 6.01331" W	415
		2	9° 16' 21.43256" S	40° 52' 6.92956" W	414
		3	9° 16' 21.46117" S	40° 52' 7.68322" W	414
Syrah 1	Casa Nova – BA	1	9° 16' 17.10196" S	40° 51' 54.85057" W	418
		2	9° 16' 18.41723" S	40° 51' 52.26939" W	418
		3	9° 16' 16.24204" S	40° 51' 51.24231" W	420
Syrah 2	Casa Nova – BA	1	9° 16' 13.37789" S	40° 51' 57.5173" W	418
		2	9° 16' 11.45879" S	40° 51' 57.3106" W	418
		3	9° 16' 9.67438" S	40° 51' 37.4808" W	419
Touriga Nacional	Lagoa Grande – PE	1	9° 2' 17.68761" S	40° 11' 23.90578" W	369
		2	9° 2' 16.3678" S	40° 11' 9.22964" W	372
		3	9° 2' 15.13419" S	40° 11' 8.14487" W	372
Syrah 3	Lagoa Grande – PE	1	9° 2' 14.16059" S	40° 11' 27.30014" W	372
		2	9° 2' 14.99725" S	40° 11' 30.31585" W	371
		3	9° 2' 13.4313" S	40° 11' 31.32593" W	370
Moscató Canelli 1	Lagoa Grande – PE	1	9° 3' 6.2281" S	40° 11' 53.80291" W	371
		2	9° 3' 5.24963" S	40° 11' 54.35644" W	371
		3	9° 3' 4.17317" S	40° 11' 55.00788" W	371
Moscató Canelli 2	Lagoa Grande – PE	1	9° 3' 0.1268" S	40° 11' 47.95312" W	370
		2	9° 3' 0.23067" S	40° 11' 46.05393" W	369
		3	9° 3' 0.04101" S	40° 11' 44.31752" W	369

Tabela 1, conclusão

Variedade	Local	Ponto	Coordenadas geográficas		
			Latitude	Longitude	Altitude
Ruby Cabernet	Santa Maria	1	8° 59' 43.13479" S	39° 59' 45.17365" W	377
	da Boa	2	8° 59' 41.08367" S	39° 59' 45.16805" W	377
	Vista – PE	3	8° 59' 38.64594" S	39° 59' 43.65499" W	377
Chenin Blanc	Santa Maria	1	8° 59' 32.36227" S	39° 59' 43.67057" W	375
	da Boa	2	8° 59' 31.29336" S	39° 59' 41.63731" W	374
	Vista – PE	3	8° 59' 30.12668" S	39° 59' 39.63654" W	373
Tempranillo	Lagoa	1	9° 2' 25.16715" S	40° 3' 39.79076" W	364
	Grande –	2	9° 2' 25.8461" S	40° 3' 41.4303" W	364
	PE	3	9° 2' 25.80985" S	40° 3' 42.70749" W	362
Barbera	Lagoa	1	9° 2' 17.47204" S	40° 3' 43.82935" W	366
	Grande –	2	9° 2' 18.18449" S	40° 3' 45.14147" W	367
	PE	3	9° 2' 18.73453" S	40° 3' 46.32212" W	367

Dados médios mensais de temperatura, precipitação e umidade relativa durante o período de coleta foram obtidos através dos boletins climáticos das estações agrometeorológicas de Mandacaru – Juazeiro - BA e de Bebedouro – Petrolina - PE (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2014, 2015) (Tabela 2).

Tabela 2 Amostras coletadas e dados meteorológicos da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco

Variedade	Coleta	Dados meteorológicos			
		Temperatura (°C)	Umidade (%)	Precipitação (mm)	Radiação Solar (ly/dia)
Moscato Itália 1	set/2014	26,3	56	5,2	553,9
Moscato Itália 2	jan/2015	27,7	59	15,5	552,6
Syrah 1	jul/2014	24,3	65	19,1	357,8
Syrah 2	jul/2014	24,3	65	19,1	357,8
Touriga Nacional	set/2014	26,4	56	1,5	559,1
Syrah 3	jul/2014	24,5	61	6,8	386,4
Moscato Canelli 1	jul/2014	24,5	61	6,8	386,4
Moscato Canelli 2	jul/2014	24,5	61	6,8	386,4
Ruby Cabernet	jul/2014	24,5	61	6,8	386,4
Chenin Blanc	jul/2014	24,5	61	6,8	386,4
	mar/2015	27,6	61	44,5	471,7
Tempranillo	jul/2014	24,5	61	6,8	386,4
	mar/2015	27,6	61	44,5	471,7
Barbera	ago/2014	25	55	3,9	501,6

#### 2.4 Análise micológica das uvas (*Vitis vinifera* L.)

De cada ponto (P1, P2, P3) foram selecionadas 100 bagas, ao acaso, e realizou-se a desinfecção superficial destas com Álcool a 70% (1 min) e Hipoclorito de Sódio a 1% (30 seg) e, em seguida, três lavagens com água destilada estéril. Após a desinfecção, as bagas foram plaqueadas diretamente na superfície do meio DRBC- Dicloran Rosa Bengal Cloranfenicol (HIMEDIA®) (Digestão Péptica de tecido animal: 5,0g, Dextrose: 10,0g, Fosfato Monopotássico: 1,0g, Sulfato de Magnésio: 0,5g, Rosa Bengala: 0,025g, Dicloran: 0,002g, Agar: 15,0g, Cloranfenicol: 0,1g e Água Destilada: 1L) conforme descrito por Samson et al. (2000). As placas foram incubadas a 25 °C por sete dias. Após esse período, realizou-se a contagem das uvas contaminadas.

Os resultados foram expressos em porcentagem de bagas contaminadas por fungos filamentosos, conforme Pitt e Hocking (1997).

Em seguida, utilizando a técnica da raiz quadrada, apenas as colônias com características morfológicas de *Aspergillus* e *Penicillium* foram transferidas para o meio de cultura MA - Ágar Extrato de Malte (ACUMEDIA) (Extrato de Malte: 20g, Ágar: 20g e Água Destilada: 1L) e incubadas a 25 °C, por sete dias.

### **2.5 Análise micológica dos solos de cultivo de uvas (*Vitis vinifera* L.)**

Para o plaqueamento dos solos utilizou-se a técnica de diluição seriada em que 10g de cada ponto coletado (P1, P2, P3) foram homogeneizados com 90mL de água peptonada 0,1%. Utilizou-se as diluições 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000 para o plaqueamento em meio de cultura DG-18 – Ágar Dicloran Glicerol a 18% (HIMEDIA®) (Digestão Péptica de tecido animal: 5,0g, Dextrose: 10,0g, Fosfato Monopotássico: 1,0g, Sulfato de Magnésio: 0,5g, Dicloran: 0,002g, Agar: 15,0g, Cloranfenicol: 0,1g, Glicerol: 110g e Água Destilada: 1L). As placas foram incubadas a 25 °C por sete dias, e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia de fungos filamentosos (UFC/g), conforme Pitt e Hocking (1997).

Em seguida, utilizando a técnica da raiz quadrada, apenas as colônias com características morfológicas de *Aspergillus* e *Penicillium* foram transferidas para o meio de cultura MA - Ágar Extrato de Malte (ACUMEDIA) (Extrato de Malte: 20g, Ágar: 20g e Água Destilada: 1L) e incubadas a 25 °C, por sete dias.

### **2.6 Identificação fenotípica das espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium***

A partir das culturas puras, foram identificados os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* de acordo com Klich (2002) e Pitt (2000). Os isolados

foram incubados em meios de cultura CYA - Ágar Czapek Levedura (SYNTH) ( $K_2HPO_4$ : 1,0g; Concentrado Czapek: 10,0mL; Extrato de Levedura: 5,0g, Agar: 15,0g, Água Destilada: 1L; (Concentrado Czapek:  $NaNO_3$ : 30,0g, KCl: 5,0g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 5,0g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,1g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,1g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ : 0,05g, Água Destilada: 100mL)) a 25 °C e a 37 °C e MEA - Ágar Extrato de Malte (ACUMEDIA) (Extrato de Malte: 20,0g, Peptona: 1,0g, Glucose: 30,0g, Agar: 20g, Água Destilada: 1L) a 25 °C. Após sete dias de incubação foram observadas as características macroscópicas e microscópicas dos fungos filamentosos.

## **2.7 Detecção da produção de ocratoxina A por fungos do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Nigri* e *Circumdati***

Para teste do potencial ocratoxigênico pelo método Plug Agar as espécies potencialmente toxigênicas do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Nigri* foram inoculadas em meio CYA - Ágar Czapek Levedura (SYNTH) ( $K_2HPO_4$ : 1,0g; Concentrado Czapek: 10,0mL; Extrato de Levedura: 5,0g, Agar: 15,0g, Água Destilada: 1L; (Concentrado Czapek:  $NaNO_3$ : 30,0g, KCl: 5,0g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 5,0g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,1g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,1g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ : 0,05g, Água Destilada: 100mL)) por 7 dias a 25 °C. Já as espécies potencialmente toxigênicas pertencentes à Seção *Circumdati* foram inoculadas em meio YES - Ágar Extrato de Levedura Sacarose (Extrato de levedura: 20,0g; Sacarose: 150g; Agar: 20,0g;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,1g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ : 0,05g; Água destilada: 1L), por 7 dias a 25 °C conforme Filtenborg e Frisvad (1980). Utilizou-se uma solução padrão de OTA (SIGMA-ALDRICH), Placas de Cromatografia de Camada Delgada (MERK-SÍLICA GEL 60, 20x20) e como Fase móvel TEF - Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (60:30:10). Após a eluição, as placas foram secas em capela de fluxo laminar. A confirmação quanto à produção de OTA foi realizada em luz ultravioleta com  $\lambda$

366nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de OTA apresentaram um FR (fator de retenção) e um *spot* de fluorescência semelhante ao do padrão da OTA.

### **2.8 Detecção da produção de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 por fungos do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Flavi***

Para teste do potencial aflatoxigênico pelo método Plug Agar as espécies potencialmente toxigênicas do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Flavi* foram inoculadas em meio YES - Ágar Extrato de Levedura Sacarose (Extrato de levedura: 20,0g; Sacarose: 150g; Agar: 20,0g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1g, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0,05g; Água destilada: 1L), por 7 dias a 25 °C conforme Filtenborg e Frisvad (1980). Utilizou-se uma solução padrão de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (SIGMA-ALDRICH), Placas de Cromatografia de Camada Delgada (MERK-SÍLICA GEL 60, 20x20) e como Fase móvel TEF - Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (60:30:10). Após a eluição, as placas foram secas em capela de fluxo laminar. A confirmação quanto à produção de aflatoxinas foi realizada em luz ultravioleta com  $\lambda$  366nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 apresentaram um RF (fator de retenção) e um *spot* de fluorescência semelhante ao do padrão.

### **2.9 Detecção da produção de citrinina por fungos do gênero *Penicillium* pertencentes à Seção *Citrina***

A avaliação da produção de citrinina foi realizada pelo método de Ágar Creme de Coco, em que os isolados pertencentes à espécie *Penicillium citrinum* foram inoculados em meio de cultivo ÁGAR-COCO (Creme de leite de coco: 400g; Ágar: 12g; Água destilada: 400mL) por 10 dias a 25 °C, no escuro

segundo metodologia descrita por Mohamed et al. (2013). A confirmação quanto à produção de citrinina foi realizada em luz ultravioleta com  $\lambda$  366nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de citrinina apresentaram fluorescência verde-amarelo intenso ao redor da colônia.

## **2.10 Análise de Ocratoxina A em vinhos experimentais**

Os vinhos experimentais, em que foram avaliadas as concentrações de OTA presentes, foram elaborados a partir das variedades de uvas tintas e brancas coletadas para a avaliação do percentual de contaminação nos estágios finais de maturação da baga (época de colheita), em duas safras (julho/agosto/setembro e janeiro/fevereiro/março), nos anos de 2014 e 2015.

A quantificação da OTA foi realizada pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência, conforme descrito em EN 14133/2003 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2003).

### **2.10.1 Preparo das amostras e purificação em coluna de imunoafinidade**

Inicialmente, as amostras foram resfriadas a 4 °C por 12 horas. De cada amostra, 40mL foram adicionados a 40mL da solução de diluição (10g de Polietilenoglicol 8000 e 50g de bicarbonato de sódio em 1000mL de água purificada (q.s.p.)) e homogeneizados sob agitação mecânica em *shaker*, em velocidade média, por 30 minutos. Esta solução foi submetida à filtração a vácuo (2mL/min) em membrana GFA e 40mL do filtrado foi passado por uma coluna de imunoafinidade (Ochraprep, R- Biopharm Rhône Ltd) adaptada ao sistema Visiprep™ SPE Vacuum Manifold (Sigma-Aldrich). A coluna foi lavada com 10mL da solução de lavagem (25g de cloreto de sódio (NaCl) e 5g de

bicarbonato de sódio em 1000mL de água purificada (q.s.p.)) e, em seguida, com 10mL de água purificada para remoção dos resíduos não específicos. Posteriormente, foi adicionado 2mL de metanol à coluna para liberação da OTA vinculada ao anticorpo, com repetição do procedimento por três vezes. O eluato obtido foi evaporado com aquecimento ( $\pm 50$  °C) da amostra sob atmosfera de nitrogênio. Este extrato seco foi reconstituído em 250  $\mu$ L de fase móvel (acetonitrila:metanol:ácido acético aquoso (35:35:30)). Injetou-se então 50 $\mu$ L das soluções padrão de OTA e dos extratos das amostras no Cromatógrafo Líquido. A solução estoque de OTA (SIGMA) foi preparada em tolueno:ácido acético (99:1, v/v). A concentração foi determinada de acordo com a Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1997), sendo verificada em Espectrofotômetro UV a 333nm, com  $\epsilon = 5440\text{cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ .

### 2.10.2 Quantificação por CLAE

A quantificação foi conduzida em um sistema de cromatografia líquida Shimadzu com detector de fluorescência (Modelo LC-10AD) em comprimentos de onda de 333 e 476nm para excitação e emissão, respectivamente. Utilizou-se a coluna Shim-pack CLC-ODS RP-18 (5 $\mu$ m; 4,6 x 250mm), precedida da pré-coluna Shim-pack G-ODS (5 $\mu$ m; 4,6 x 25mm), sendo o fluxo de 0,8mL/min. A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ( $y = 6935,3x + 913,169$ , em que y: área do pico e x: concentração de OTA), correlacionando a área do pico *versus* a concentração da respectiva solução padrão, sendo que o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido foi de 0,99. Sob estas condições, o tempo de retenção foi cerca de 10minutos. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, sendo calculados pelas respectivas relações matemáticas:  $LD = 3DP/m$  e  $LQ = 10DP/m$  (em que, DP = estimativa do desvio padrão da linha de regressão e m =

coeficiente angular da linha de calibração). O limite de detecção (LD) foi de  $0,001087 \mu\text{g L}^{-1}$ , e o limite de quantificação (LQ) foi de  $0,006254 \mu\text{g L}^{-1}$ . Todas as amostras foram analisadas em duplicatas, enquanto as soluções padrão de OTA foram injetadas em triplicatas.

### **2.11 Ensaios de recuperação**

Para avaliar o desempenho da metodologia analítica utilizada, testes de recuperação foram realizados pela adição de OTA em amostras de vinhos não contaminadas ( $<0,03 \mu\text{g. L}^{-1}$ ). A amostra de vinho foi contaminada, em cinco repetições, com duas concentrações de OTA:  $0,22 \mu\text{g/L}$  e  $0,44 \mu\text{g/L}$ . A solução de trabalho foi preparada por diluição apropriada em tolueno:ácido acético (99:1, v/v) para os testes de recuperação e curva de calibração. Os resultados dos ensaios de recuperação utilizando  $0,22 \mu\text{g/L}$  e  $0,44 \mu\text{g/L}$  foi de 71, e 74%, respectivamente. Esta recuperação provou a notável reprodutibilidade do método e está dentro das normas recomendadas em EC 401/2006 (EUROPEAN COMMISSION, 2006) para valores de contaminação inferiores a  $1,0 \mu\text{g/L}$ .

### **2.12 Análises estatísticas**

Para avaliar se houve diferença na frequência de ocorrência de *Aspergillus* e *Penicillium* nas variedades de uvas viníferas e solos de videiras e na presença de ocratoxina A nos vinhos utilizou-se uma análise de variância (ANOVA), com um teste *a posteriori* de Tukey.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Percentual de contaminação por fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em uvas viníferas e solos de cultivo

A análise do percentual de contaminação das amostras de uvas viníferas coletadas no Vale do Submédio São Francisco demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na diversidade encontrada de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, variando de 0 a 100% de bagas contaminadas.

É possível observar que as variedades Touriga Nacional e Chenin Blanc, cultivadas em sistema de condução horizontal, apresentaram a maior porcentagem de contaminação por fungos do gênero *Aspergillus* (100%) (Gráfico 1). Sendo que a variedade Touriga Nacional também apresentou a maior porcentagem de contaminação por fungos do gênero *Penicillium* (64,67%) (Gráfico 2).

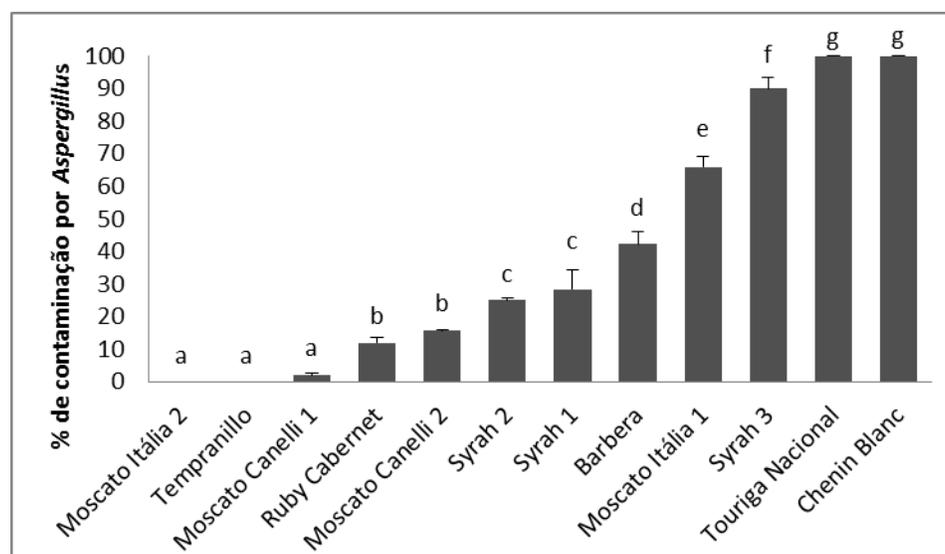


Gráfico 1 Percentual de contaminação de uvas viníferas por fungos do gênero *Aspergillus* e as respectivas proporções médias de colonização. Letras diferentes mostram diferença estatística significativa a  $p < 0,05$

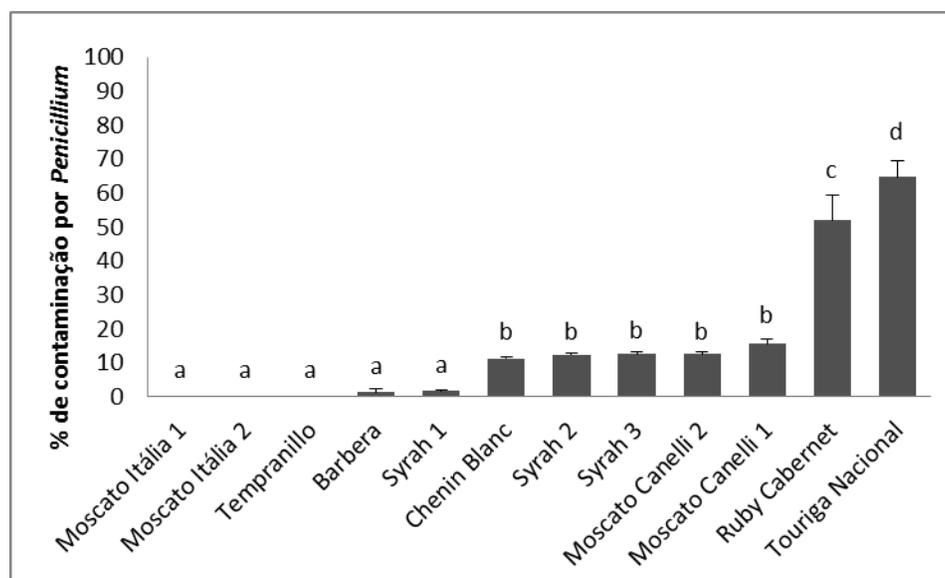


Gráfico 2 Percentual de contaminação de uvas viníferas por fungos do gênero *Penicillium* e as respectivas proporções médias de colonização. Letras diferentes mostram diferença estatística significativa a  $p < 0,05$

A contaminação por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* foi maior que por *Penicillium* na maioria das amostras exceto na Moscato Canelli 1 e Ruby Cabernet que apresentaram maior incidência de fungos do gênero *Penicillium*. Concomitantemente, Kizis et al. (2014) ao avaliarem a colonização de uvas por fungos filamentosos em áreas de cultivo na Grécia encontraram *Aspergillus* como o gênero mais frequentemente isolado em todas as regiões, exceto na Macedônia em que *Alternaria* foi o gênero mais comumente encontrado. Porém, Serra et al. (2006) encontram uma maior contaminação por fungos do gênero *Penicillium* ao avaliarem uvas de regiões produtoras de Portugal, o que demonstra a influência da localização na incidência de fungos filamentosos.

Temperaturas mais elevadas no mês que precede a colheita das uvas favorecem o desenvolvimento dos *Aspergillus* Seção *Nigri*, que devido aos seus esporos pretos, são altamente resistentes à luz solar e sobrevivem a exposição ao

sol, sendo uma vantagem competitiva em clima mais quente (BELLÍ et al., 2005), como é o caso da região do Vale do Submedio São Francisco, em que há uma elevada incidência de radiação solar global (LEÃO; SOARES, 2009). Já o gênero *Penicillium* é mais frequentemente encontrado em vinhedos localizados em regiões mais frias e secas do que em vinhedos cultivados em clima mais quente e úmido (ROUSSEAU et al., 2014).

Não houve ocorrência de fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* nas variedades Moscato Itália 2 e Tempranillo. Porém a amostra Moscato Itália 1 apresentou-se contaminada por fungos do gênero *Aspergillus* (66%), o que demonstra que apesar das amostras pertencerem à mesma variedade, outros fatores contribuem para a contaminação, como condições climáticas e práticas de cultivo. O mesmo ocorre com a diferença de colonização entre as amostras pertencentes às variedades Syrah e Moscato Canelli.

O sistema de condução adotado nas videiras Moscato Itália 1 é horizontal, enquanto que a Moscato Itália 2 é vertical. O cultivo horizontal facilita um acúmulo de umidade, o que pode favorecer a maior incidência de fungos. As amostras de Syrah foram coletadas em duas vinícolas, onde práticas agrícolas diferentes podem ter influenciado na contaminação. Já as amostras de Moscato Canelli apesar de pertencerem à mesma vinícola, foram cultivadas em porta-enxerto diferentes. Setati et al. (2012) demonstraram que a variação intravinhedo pode ser maior do que a variação intervinhedo em uma mesma safra, presumivelmente devido a influências microclimáticas sobre a microbiota das uvas viníferas.

O cultivo da variedade Tempranillo é orgânico, o que pode ter favorecido a proteção das uvas contra a colonização fúngica, embora a variedade Barbera, também cultivada de forma orgânica, tenha apresentado contaminação mediana. Ponsone et al. (2007) encontraram influência significativa na colonização das bagas de uvas por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*

devido ao estágio de crescimento, variedade de uva e sistema de cultivo (orgânico e convencional).

A diversidade de fungos filamentosos também pode variar entre as variedades das uvas e diferentes cores das bagas. A diversidade da população de fungos filamentosos isolados a partir de uvas Moscatel cultivadas na Espanha foi menor do que a de variedades tintas, como Bobal, Tempranillo, Garnacha e Monastrell (MEDINA et al., 2005), o que demonstra que a fenologia da planta e as características físico-químicas das uvas também irão determinar a contaminação (BATTILANI et al., 2004).

Somente duas amostras de uvas foram coletadas novamente na safra de 2015/1, Chenin Blanc e Tempranillo. Apenas 15% das bagas de Chenin Blanc e 6% das bagas de Tempranillo estavam contaminadas por fungos do gênero *Aspergillus*. Nenhum isolado pertencente ao gênero *Penicillium* foi encontrado. Estes dados diferem dos encontrados na safra de 2014/2 (Tabela 3) em que foi possível observar uma maior contaminação da variedade Chenin Blanc e nenhuma contaminação da variedade Tempranillo.

Estudos demonstram a diferença na frequência de isolados em diferentes safras e vinhedos. Terra (2011), ao avaliar a incidência de *Aspergillus* Seção *Nigri* nas uvas Syrah da região tropical do Brasil, não encontrou nenhuma baga contaminada na safra de 2009, porém na safra de 2010, 50% das bagas estavam colonizadas. Já Passamani (2014) encontrou um percentual de contaminação de 35,6% na safra de 2012.

Tabela 3 Contaminação das uvas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* nas safras 2014/2 e 2015/1

Safra	Variedades de uvas ( <i>Vitis vinifera</i> L.) *			
	Chenin Blanc		Tempranillo	
	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>
2014/2	100% ± 0 b	11,33% ± 0,58 B	0% ± 0 a	0% ± 0 A
2015/1	15% ± 1 a	0% ± 0 A	6% ± 0,58 b	0% ± 0 A

\*Letras diferentes mostram diferença estatística significante a  $p < 0,05$

Bokulich et al. (2014) avaliaram mostos de duas safras de Chardonnay, Zinfandel e Cabernet Sauvignon, demonstrando que a comunidade microbiana foi diferente entre as regiões produtoras da Califórnia. Além disto, os autores mostram que o grau de diferenciação é maior quando se observa a biogeografia dentro de um mesmo vinhedo. Esta descoberta sugere que fatores como genótipo e fenótipo da variedade e variação climática local e interanual (safra) também desempenham um papel significativo.

A presença de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foi detectada em todas as amostras de solos analisadas (Gráfico 3). O solo é considerado um inóculo para as uvas, já que antes da suscetibilidade das bagas os fungos precisam sobreviver no vinhedo. Fatores como a atividade de água e temperatura afetam a sobrevivência dos esporos destes fungos, influenciando no inóculo inicial quando as uvas se tornam suscetíveis (BATTILANI et al., 2006; BELLÍ et al., 2005; SERRA; BRAGAB; VENÂNCIO, 2005).

A incidência fúngica nos solos dos vinhedos variou de  $2,34 \times 10^3$  UFC/g a  $4,35 \times 10^4$  UFC/g, sendo que o solo com maior incidência foi coletado na área de plantio da Syrah 1, amostra esta que apresentou níveis medianos de contaminação por *Aspergillus* (28,33%) e *Penicillium* (1,67%).

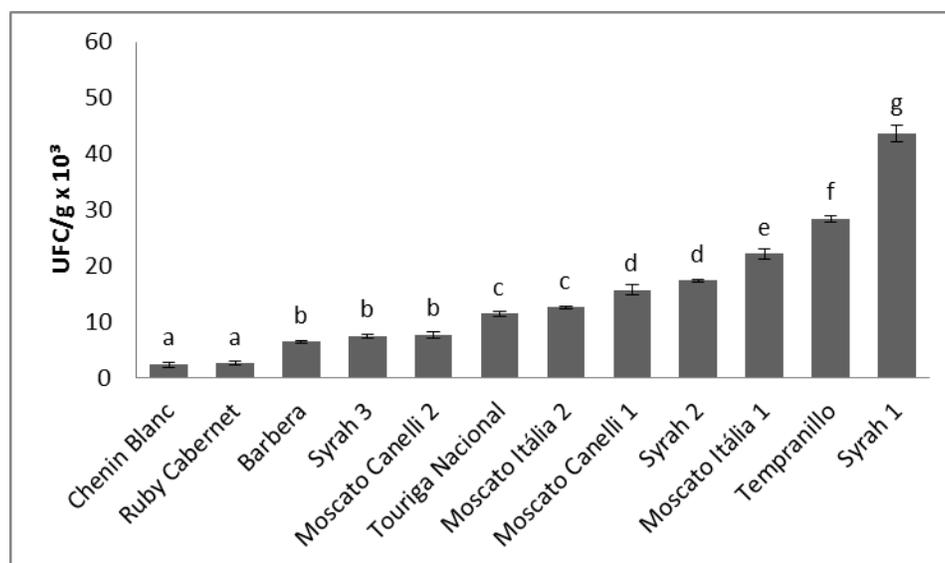


Gráfico 3 Incidência de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* nas amostras de solo de cultivo das variedades estudadas. Letras diferentes mostram diferença estatística significativa a  $p < 0,05$

No solo de vinhedos argentinos a contaminação variou de  $2,55 \times 10^4$ UFC/g a  $6,72 \times 10^4$ UFC/g. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram o segundo e quarto gênero de maior prevalência, respectivamente (BARBERIS et al.,2014) .

Clarke et al. (2004) encontraram o solo como a principal fonte de inóculo de *Aspergillus* Seção *Nigri* nos vinhedos australianos. Estes foram mais encontrados a partir de solo cultivado frequentemente. Adicionalmente, a contagem de fungos foi maior no solo sob as videiras do que no solo entre as linhas das videiras.

A contaminação das bagas pode estar relacionada com a dispersão dos esporos do solo, através do ar, para as bagas. Porém, segundo Garbeva, Van Veen e Van Elsas (2004), as interações entre as plantas e solo são complexas, com ambos exercendo efeito sobre a comunidade microbiana.

### 3.2 Incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em uvas viníferas e solos de cultivo

Um total de 466 fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foram isolados a partir de amostras de uvas viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco coletadas na safra de 2014/2.

A incidência do gênero *Aspergillus* foi significativamente dominante. Dentre os 466 fungos isolados, 351 pertencem ao gênero *Aspergillus* (75,32%), enquanto que apenas 115 pertencem ao gênero *Penicillium*, o que representa 24,68% do número total de isolados. Entretanto, a riqueza de espécies de *Penicillium* foi semelhante à de *Aspergillus*. El Khoury et al. (2008) observaram resultados semelhantes em vinhedos libaneses em que 95,5% do isolados pertenciam ao gênero *Aspergillus*, enquanto que apenas 4,5% pertenciam ao gênero *Penicillium*.

As espécies de *Aspergillus* encontradas nas uvas viníferas da região foram *A. niger* (35,33%), *A. carbonarius* (33,90%), *A. aculeatus* (20,51%), *A. niger* Agregado (8,83%), *A. flavus* (1,14%) e *A. sojae* (0,28%). As espécies pertencentes à Seção *Nigri* representam 98,58% dos isolados de *Aspergillus*, sendo *A. niger* e *A. carbonarius* a maioria dos isolados identificados.

Estes resultados estão de acordo com os relatos de Battilani et al. (2006), que constataram que *Aspergillus* Seção *Nigri* são as espécies mais frequentemente isoladas em áreas quentes e secas. Dentre estas, *A. carbonarius* e *A. niger*, são as espécies mais frequentes, representando 50 a 98,5% de *Aspergillus* isolados de bagas de uvas (ROUSSEAU et al., 2014).

Isolados de *Aspergillus aculeatus*, *A. awamori*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *A. melleus*, *A. niveus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. tubingensis*, *A. uvarum* e *A. wentii* também têm sido encontrados, mas em baixa frequência (BAU et al., 2005; BEJAOU et al., 2006; LEONG et al., 2007;

SAGE; GARON; EIGLE-MURANDI, 2004; SERRA; BRAGAB; VENÂNCIO, 2005; SOMMA; PERRONE; LOGRIECO, 2012; SPADARO et al., 2012).

Em vinhedos argentinos a maioria das amostras apresentou-se contaminada por *A. niger* e *A. tubingensis* (PONSONE et al., 2007). Já neste estudo, nenhuma espécie de *A. tubingensis* foi identificada. Possivelmente deve-se à proximidade das características morfológicas das espécies pertencentes ao grupo *Aspergillus niger* Agregado que torna difícil a separação morfológica destas (LASRAM et al., 2012) e provavelmente esta espécie encontra-se inserida nos 8,83% de *A. niger* Agregado detectados no presente estudo.

Em uvas viníferas da Tunísia *A. carbonarius* representou 43% dos isolados de *Aspergillus*, sendo a segunda espécie de maior incidência, estando atrás apenas dos *A. niger* Agregado (LASRAM et al., 2012). Enquanto em vinhedos libaneses foram encontrados apenas 1,8% (EL KHOURY et al., 2008). A alta incidência de *A. carbonarius* na região de La Rioja na Argentina foi atribuída ao clima semiárido, com baixa umidade e verões extremamente quentes (CHIOTTA et al., 2009). Segundo Lasram et al. (2010), isolados de *A. carbonarius* de diferentes regiões demonstram habilidades diferentes de crescimento, sendo que alguns isolados poderiam desenvolver uma tolerância ao clima semiárido, clima este encontrado na região do Vale do Submédio São Francisco, o que poderia justificar a alta incidência desta espécie na região.

As espécies identificadas pertencentes ao gênero *Penicillium* foram *P. sclerotiorum* (44,35%), *P. citrinum* (20,00%), *P. glabrum* (18,26%), *P. decumbens* (13,04%), *P. implicatum* (2,61%) e *P. solitum* (1,74%). Estes resultados diferem dos encontrados em vinhedos portugueses, em que as espécies de *Penicillium* mais comuns foram *P. brevicompactum*, *P. thomii* e *P. glabrum*. (SERRA et al., 2006).

A frequência de isolados de espécies do gênero *Penicillium* também foi baixa em vinhedos espanhóis (BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2006). Já em

vinhedos europeus com diferentes condições climáticas o gênero *Penicillium* foi predominante (ABRUNHOSA et al., 2001; SERRA et al., 2006).

Houve diferença expressiva no número de isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* incidentes nas diferentes variedades coletadas.

Isolados da espécie *A. niger* foram dominantes em 33,33% das amostras avaliadas (Syrah 1, Syrah 2 e Syrah 3), sendo mais alto na Syrah 1 (93%). Em contraste *A. flavus* foi encontrada apenas em 16,67% das amostras, Syrah 2 e Moscato Canelli 2, representando 10% dos isolados, e *A. sojae* foi encontrado apenas na variedade Barbera, representando 3% dos isolados (Gráfico 4).

A maior incidência de *Aspergillus carbonarius* foi nas amostras Moscato Itália 1 e Touriga Nacional, representando 98% e 75% do total de isolados nas variedades, respectivamente. Do total de *A. aculeatus* 69,44% foram isolados da variedade Chenin Blanc, sendo a espécie de maior incidência nesta amostra (82%).

*A. niger* Agregado esteve presente em 75% das amostras, variando o percentual de contaminação de 0% (Moscato Itália 1, Touriga nacional e Syrah 3) a 71% (Ruby Cabernet). Também foi a espécie de maior incidência na amostra Moscato Canelli 1 (67%) e Barbera (45%). Já na Moscato Canelli 2 a maior incidência foi de *A. carbonarius* (38%) e *A. niger* (38%).

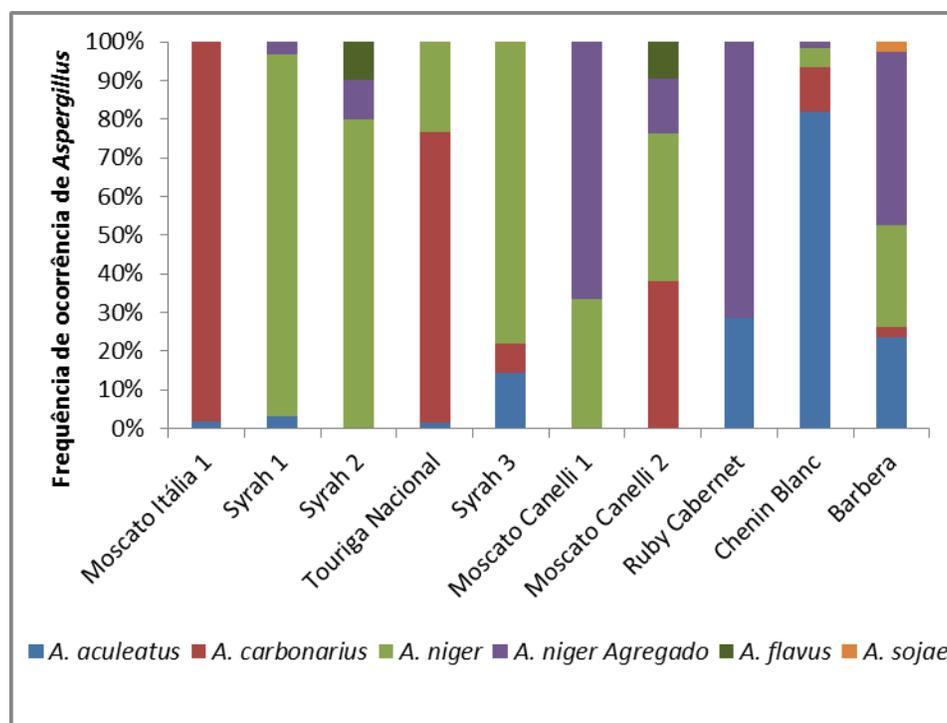


Gráfico 4 Frequência de ocorrência de espécies do gênero *Aspergillus* nas variedades de uvas viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco

*Aspergillus niger* Agregado foi o grupo dominante encontrado em uvas viníferas de regiões da Tunísia. Em contraste, um pequeno número de espécies unisseriadas foi isolado nas diferentes regiões (LASRAM et al., 2012). Concomitantemente, em nosso estudo *A. aculeatus* foi encontrado em 58,33% das amostras, sendo tal contaminação baixa na maioria das variedades, variando de 0-29%, exceto na variedade Chenin Blanc em que a porcentagem de contaminação foi de 82%.

A influência da variedade na incidência de fungos filamentosos nas uvas viníferas foi relatada por Battilani et al. (2004). Cabernet Sauvignon foi a variedade mais suscetível a contaminação por *Aspergillus* Seção *Nigri* em estudo *in vitro*. Observações semelhante foram apresentadas por Chiotta et al. (2009)

que relataram uma maior porcentagem de *A. carbonarius* (50%) em Cabernet Sauvignon do que nas variedades Malbec e Syrah em vinhedos argentinos. Diaz et al. (2009) detectaram uma maior contaminação por *A. carbonarius* e *A. niger* em variedades tintas do que em variedades brancas em vinhedos chilenos. No entanto, em um vinhedo da Tunísia, não houve diferença significativa no número de isolados de *Aspergillus* Seção *Nigri* nas variedades Carignan (tinta) e Itália (branca) (LASRAM et al., 2007). Resultados semelhantes foram observados em nosso estudo em que a incidência de *A. carbonarius* foi expressiva, tanto na variedade Moscato Itália 1 (branca) como na variedade Touriga Nacional (tinta).

Nas variedades Syrah 3, Chenin Blanc e Barbera as espécies *Penicillium citrinum*, *P. sclerotiorum* e *P. glabrum* representam 100% dos isolados incidentes, respectivamente (Gráfico 5).

*P. decumbens* esteve presente apenas na variedade Touriga Nacional, sendo a espécie de maior incidência nesta variedade (50%).

A maioria das variedades foi colonizada por *P. sclerotiorum*, sendo esta a espécie dominante em 33,33% das amostras avaliadas representando 63% dos isolados da variedade Moscato Canelli 1 e 2, e 50% dos isolados da variedade Ruby Cabernet. *Penicillium citrinum* também estava presente, porém a distribuição variou de acordo com a variedade. Já *Penicillium glabrum* foi o de maior incidência na variedade Syrah 2 (67%) e *P. implicatum* na Syrah 1 (67%), estando este presente também na Syrah 2 (10%).

Apenas as variedades Syrah 1 e Ruby Cabernet estavam contaminadas por *P. solitum*, sendo 33% e 3% dos isolados, respectivamente.

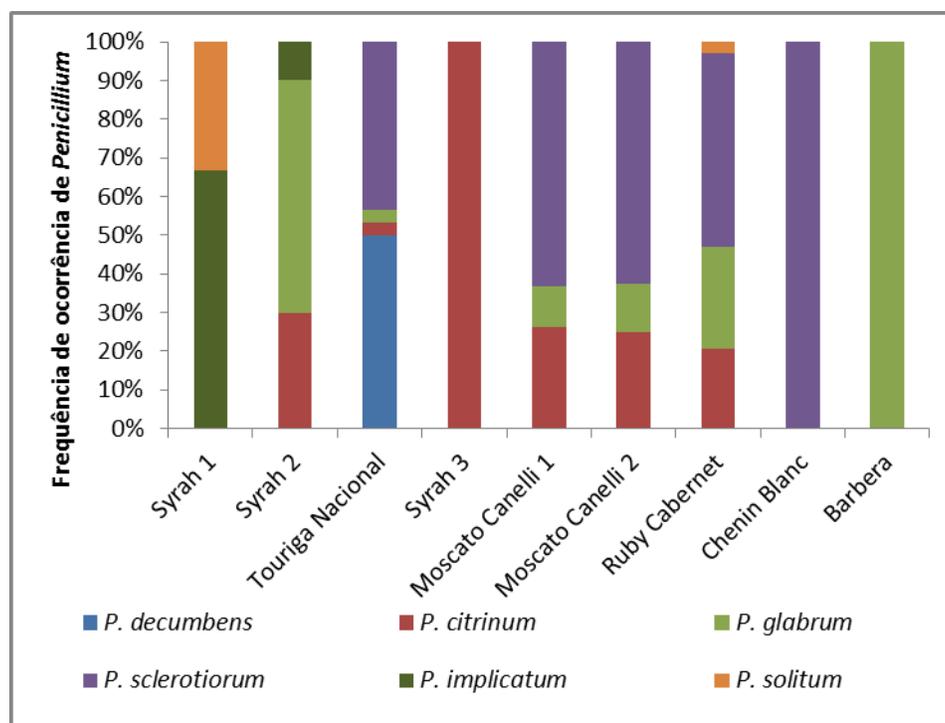


Gráfico 5 Frequência de ocorrência de espécies do gênero *Penicillium* nas variedades de uvas viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco

*P. chrysogenum* foi a espécie mais comumente isolada na Argentina (MAGNOLI et al., 2003). Já na França e Portugal a espécie de maior incidência foi *P. brevicompactum* (SAGE et al., 2002; SERRA et al., 2006). No entanto, outros estudos identificaram *P. expansum* como a espécie mais frequentemente isolada de vinhedos portugueses (ABRUNHOSA et al., 2001) e franceses (BEJAOUÏ et al., 2006). Estas espécies não foram relatadas em nosso estudo, o que demonstra a diferença de ocorrência de espécies em diferentes regiões com variações climáticas.

Na safra de 2015/1 foram isolados 41 fungos pertencentes apenas ao gênero *Aspergillus*. A espécie *A. niger* foi isolada em todas as variedades

coletadas (Chenin Blanc e Tempranillo) sendo a espécie mais comum (82,93% dos isolados), seguida por *A. carbonarius* (17,07% dos isolados) (Tabela 4).

Tabela 4 Incidência de *Aspergillus* e *Penicillium* nas safras 2014/2 e 2015/1

Espécies	Variedades de uvas ( <i>Vitis vinifera</i> L.)			
	Chenin Blanc		Tempranillo	
	Safra 2014/2	Safra 2015/1	Safra 2014/2	Safra 2015/1
<i>A. aculeatus</i>	50	0	0	0
<i>A. carbonarius</i>	7	7	0	0
<i>A. niger</i>	3	18	0	16
<i>A. niger</i> Agregado	1	0	0	0
<i>P. sclerotiorum</i>	4	0	0	0

A variedade Tempranillo foi colonizada apenas por *A. niger* (16 isolados). Já na variedade Chenin Blanc, 72% dos isolados pertencem à espécie *A. niger* e apenas 28% à espécie *A. carbonarius*. Estes dados diferem dos dados encontrados na safra de 2014/2 em que não se encontrou contaminação na variedade Tempranillo, e a espécie *A. aculeatus* foi a dominante na variedade Chenin Blanc (76,92%). Além disto, as espécies *A. niger* Agregado e *P. sclerotiorum* anteriormente encontradas, não estavam mais presentes nas variedades coletadas na safra 2015/2.

Estudos realizados na França demonstram que as espécies mais frequentemente isoladas diferem entre safras e vinhedos. Guérin et al. (2007) observaram que a espécie predominante isolada de *Penicillium* diferiu entre vinhedos em 2004: *P. expansum* (Bordeaux, Alsace e Val de Loire) e *P. purpurescens* (Beaujolais e Borgonha). Já Diguta et al. (2011) identificaram *P. spinolusum* como a espécie mais frequentemente isolada, na safra de 2008, na Borgonha. Estes estudos demonstram que a incidência de diferentes espécies de fungos varia não apenas com a localização geográfica, mas também com a safra

e condições climáticas. Portanto, é difícil generalizar a gestão de controle de fungos filamentosos (ROSSEAU et al., 2014).

Foram isolados um total de 508 fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* a partir de solos de cultivo de uva viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco coletados na safra de 2014/2. Destes, 68,70% pertencentes ao gênero *Aspergillus* e 31,30% ao gênero *Penicillium*.

*Aspergillus* Seção *Nigri* foram encontrados em todos os solos avaliados, *Aspergillus* Seção *Flavi* em 83,33% dos solos e *Aspergillus* Seção *Circumdati* em apenas 46,67%.

*A. niger* foi a espécie de maior incidência nos solos de vinhedos do Vale do Submédio São Francisco, seguido por *P. citrinum*, estando ambos presentes em todas as amostras (Gráfico 6).

*Aspergillus aculeatus* foram encontrados em todas as amostras, exceto no solo de cultivo da variedade Moscato Itália 2. Já *A. japonicus* foi encontrado em apenas 33,33% das amostras avaliadas.

Neste estudo, *A. carbonarius* foi isolado em baixa frequência e somente em 50% das amostras, o que demonstra que a prevalência de *A. carbonarius* é baixa em solos. Resultados semelhantes foram encontrados por Barberis et al. (2014) em solos de vinhedos argentinos.

*Aspergillus niger* Agregado, *A. foetidus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. sojae*, *P. sclerotiorum*, *P. implicatum*, *P. chrysogenus* e *P. corylophilum* também estavam presentes nos solos de vinhedo, porém em baixa frequência e sua distribuição variou de acordo com as amostras.

A maioria das espécies encontradas nos solos também foi detectada nas uvas viníferas, o que confirma a proposição de que o solo seria um inóculo inicial para as bagas de uvas. Somma, Perrone e Logrieco (2012) demonstraram que os principais fungos envolvidos na contaminação de uvas por ocratoxina A são os *Aspergillus* Seção *Nigri* e que estes sobrevivem como saprófitas na

camada superficial do solo dos vinhedos, constituindo um reservatório de inóculo.

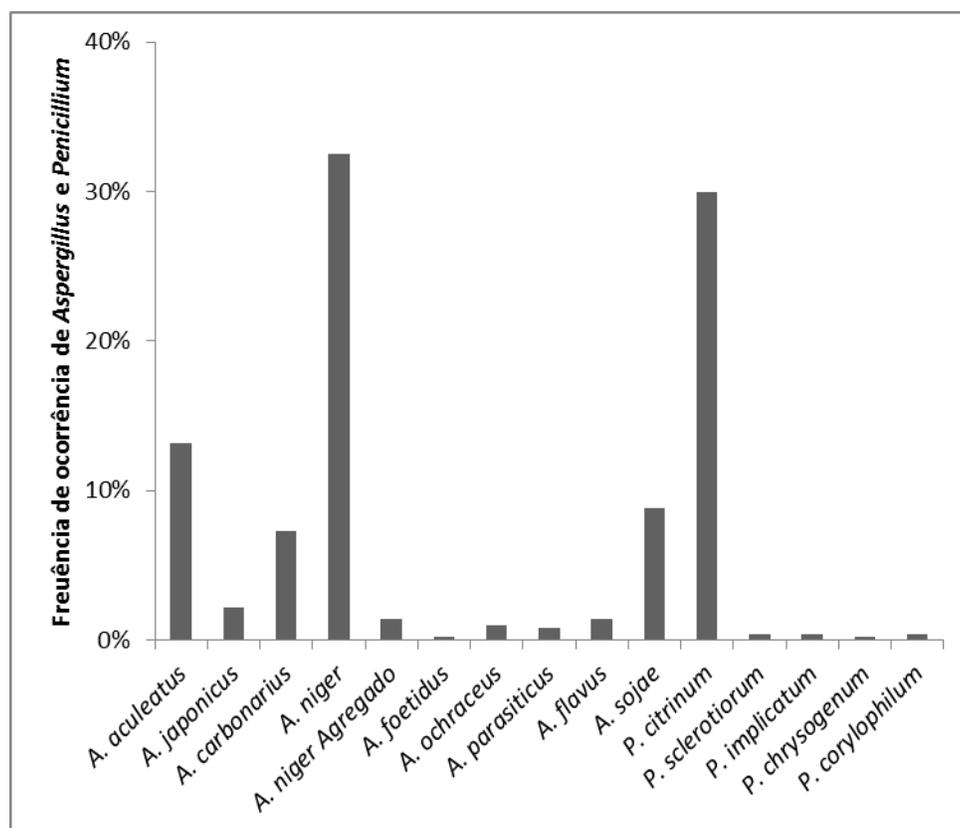


Gráfico 6 Frequência de ocorrência de espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* nos solos de cultivo das variedades de uvas viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco

Em solos de vinhedos argentinos *A. niger* Agregado foi o grupo mais comum em todas as regiões avaliadas, já *Aspergillus* unisseriado variou de 4 a 40% e *A. carbonarius* representou apenas 2% dos isolados (BARBERIS et al., 2014). Resultados semelhantes foram encontrados em nossos estudos se considerarmos as espécies identificadas como *A. niger* e *A. foetidus* também pertencentes ao grupo *A. niger* Agregado. *Aspergillus* unisseriado (*A. japonicus*

e *A. aculeatus*) variaram de 8 a 35% e *A. carbonarius* representou apenas 7% dos isolados.

A influência da temperatura e atividade de água na sobrevivência de *A. carbonarius* no solo é complexa. Kazi et al. (2003) relataram um nível de sobrevivência máximo de *A. carbonarius* no solo a 25 °C, porém o aumento do teor de umidade do solo diminuiu a sobrevivência deste. Além disso, quando os vinhedos foram irrigados, a incidência de *A. carbonarius* diminuiu, mas retornou aos níveis anteriores quando o solo foi seco. No Vale do Submédio São Francisco, na época da colheita, as temperaturas médias variaram de 24,5 °C a 26,3 °C e a umidade relativa de 55 a 65% (Tabela 2), condições estas que possibilitariam o crescimento de *A. carbonarius* nos solos e nas uvas.

Informações sobre contaminação fúngica em solos são escassas, pois a maioria dos estudos limita-se na contaminação fúngica das uvas. Porém, nos vinhedos, a melhor forma de reduzir a presença de micotoxinas é controlando a presença de fungos potencialmente toxigênicos como *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. flavus* e *P. citrinum* tanto nas uvas quanto no solo. Para tal, o conhecimento sobre os fatores ecológicos que afetam a ocorrência de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em vinhedos é uma regra importante (BARBERIS et al., 2014).

### **3.3 Capacidade toxigênica de espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium***

Um total de 700 espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* e 175 ao gênero *Penicillium*, isoladas de uvas viníferas e solo de cultivo destas uvas na safra de 2014/2, foram testadas quanto ao potencial toxigênico. Um total de 634 isolados de *Aspergillus* Seção *Nigri* e 5 de *Aspergillus* Seção *Circumdati* foram testados quanto à capacidade de produção de ocratoxina A, 61 isolados de *Aspergillus* Seção *Flavi* quanto à capacidade de produção de aflatoxinas B1, B2,

G1 e G2, e 175 *Penicillium citrinum* quanto à capacidade de produção de citrinina (Tabela 5).

Tabela 5 Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* isolados de uvas viníferas e solo de cultivo potencialmente toxigênicas

Variedade	Número total de isolados (Número de isolados toxigênicos)													
	OTA						AFLATOXINAS B1 B2 G1 G2						Citrinina	
	<i>A. carbonarius</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. niger</i> Agregado		<i>A. ochraceus</i>		<i>A. parasiticus</i> *		<i>A. flavus</i> **		<i>P. citrinum</i>	
	Baga	Solo	Baga	Solo	Baga	Solo	Baga	Solo	Baga	Solo	Baga	Solo	Baga	Solo
Moscato Itália 1	51(51)	11(11)	0(0)	9(4)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(2)
Moscato Itália 2	0(0)	12(12)	0(0)	12(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0)	0(0)	11(11)
Syrah 1	0(0)	0(0)	28(0)	13(1)	1(0)	1(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	8(8)
Syrah 2	0(0)	3(3)	16(0)	24(11)	2(0)	3(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(0)	0(0)	3(3)	24(24)
Touriga Nacional	48(48)	0(0)	15(0)	17(5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)	1(1)	22(22)
Syrah 3	4(4)	0(0)	43(0)	8(2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	5(5)	10(10)
Moscato Canelli 1	0(0)	7(7)	1(0)	24(1)	2(0)	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)	0(0)	2(0)	5(5)	18(16)
Moscato Canelli 2	0(0)	2(2)	8(0)	12(3)	3(0)	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)	2(0)	2(0)	2(2)	8(8)
Ruby Cabernet	0(0)	0(0)	0(0)	4(0)	5(0)	0(0)	0(0)	1(0)	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)	7(7)	6(6)
Chenin Blanc	7(7)	2(2)	3(0)	6(0)	1(0)	1(0)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0)	0(0)	15(15)
Tempranillo	0(0)	0(0)	0(0)	23(2)	0(0)	2(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	16(16)
Barbera	1(1)	0(0)	10(0)	13(1)	17(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	12(12)

\* produtor de G1 G2 B1 B2

\*\* produtor apenas de B1 B2

Das 346 espécies pertencentes à Seção *Nigri* isoladas das bagas, 32,08% foram produtoras de OTA, enquanto que das 293 isoladas dos solos de cultivo apenas 24,23% dos isolados foram produtores.

*Aspergillus carbonarius* mostrou-se a única espécie 100% produtora de ocratoxina A, enquanto as espécies *A. japonicus*, *A. aculeatus* e *A. foetidus* não mostraram habilidade para produção desta toxina; 18,18% de *A. niger* e 14,29% de *A. niger* Agregado isolados dos solos foram produtores de OTA, porém nenhum isolado das bagas pertencente a estas espécies foram produtores. Em contraste, em solos de videira Argentina, nenhum isolado de *A. niger* Agregado foi produtor de OTA (BARBERIS et al., 2014).

A espécie *A. ochraceus* não foi isolada das bagas, no entanto, 60% de isolados dos solos foram produtores de ocratoxina A. A porcentagem relatada de *A. ochraceus* produtores de OTA é bastante variável, variando de 10 a 54,5% (ABARCA et al., 2001; PITT; HOCKING, 1997). Bellí et al. (2006) encontram 35% dos *A. ochraceus* isolados de uvas na Espanha produtores de OTA. Segundo Bau et al. (2005) as espécies da Seção *Circumdati*, produtoras de OTA, não são relevantes devido a sua baixa ocorrência em uvas.

Nossos resultados corroboram com os achados de Lasram et al. (2012) em que 99,5% dos isolados ocratoxigênicos de uvas de vinhedos da Tunísia foram *A. carbonarius*, somente 3,2% *A. niger* Agregado e nenhuma espécie unisseriada produtora. Kizis et al. (2014) também reportaram 98,33% dos *A. carbonarius* e 1,61% dos *A. niger* Agregado isolados de uvas da Grécia produtores de OTA e nenhum *A. ibericus* e *A. japonicus* produtor. Sendo que a maioria dos isolados ocratoxigênicos veio das regiões áridas e de baixa altitude.

Os isolados de *A. niger* são mais comuns nas uvas que *A. carbonarius*, entretanto, *A. carbonarius* é mais relevante devido à maior proporção de isolados produtores de OTA, e em níveis mais elevados que *A. niger*, sendo o maior responsável pela acumulação de OTA em uvas e vinhos (MAGNOLI et al., 2003; OLIVERI; TORTA; CATARA, 2008).

Abarca et al. (2003), ao avaliarem a presença de fungos potencialmente toxigênicos em uvas secas na Espanha, encontraram 98% das amostras contaminadas por *A. niger* e apenas 58% por *A. carbonarius*. Destes, 96,7% foram produtores de OTA e apenas 0,6% de *A. niger* foram capazes de produzir esta micotoxina. Porém, alguns autores afirmam que alguns isolados de *A. carbonarius* podem não produzir OTA (BAU et al., 2005). Resultados similares foram encontrados por Bellí et al. (2006).

A maior incidência de isolados ocratoxigênicos nas uvas e nos solos de cultivo deve-se à espécie *A. carbonarius* (82,11%), o que confirma ser esta a principal espécie responsável pela contaminação de uvas por OTA no Vale do Submédio São Francisco.

Nenhum fungo do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* produtor de OTA foi encontrado nas amostras Moscato Itália 2, Syrah 1, Syrah 2, Moscato Canelli 1, Ruby Cabernet e Tempranillo. Enquanto que 98,08% dos isolados da amostra Moscato Itália 1 e 75% dos isolados da Touriga Nacional foram produtores de OTA, sendo estes identificados como *A. carbonarius*.

As amostras Syrah 3 (7,27%), Moscato Canelli 2 (42,11%), Chenin Blanc (11,48%) e Barbera (2,70%) também estavam contaminadas por *A. carbonarius* produtor de OTA, porém em menor incidência. Estes resultados demonstram que a incidência de espécies ocratoxigênicas é influenciada pela variedade das uvas, mesmo estas estando situadas em uma mesma região.

Apesar dos frequentes estudos da presença de OTA em uvas e vinhos, não há informações precisas do efeito das diferentes variedades de uvas na produção de OTA. Battilani et al. (2004), ao avaliarem a produção de OTA por isolados toxigênicos inoculados em 12 variedades de uvas, detectaram as variedades Bianco di Alessano, Pampanuto e Uva di Troia com baixos níveis de ocratoxina A, enquanto que a variedade Cabernet Sauvignon obteve o maior nível de OTA.

As amostras Moscato Canelli 1 e Ruby Cabernet obtiveram um maior índice de contaminação por espécies do gênero *Penicillium*, o que pode ter influenciado na ausência de espécies ocratoxigênicas. Alguns estudos relatam que, além dos fatores intrínsecos e ambientais, a micobiota competitiva também é um fator importante na contaminação das uvas por espécies potencialmente toxigênicas e a produção de OTA. *A. japonicus*, *A. wentii*, *A. versicolor*, *A. clavatus* e algumas espécies de leveduras competem por espaço e nutrientes, reduzindo a concentração de OTA em uvas e vinhos (ABRUNHOSA et al., 2001; PONSONE et al., 2012). Concomitantemente, Kogkaki et al. (2015) demonstraram que *B. Cinerea*, fungo pertence à micobiota de uvas, poderia ser um obstáculo para o crescimento e produção de OTA por *A. carbonarius* no campo.

Segundo Lasram et al. (2012) a ocorrência de espécies ocratoxigênicas em vinhedos e a incidência de OTA em uvas depende não apenas de condições climáticas, mas também de fatores relacionados com a variedade, sistema de colheita e irrigação, e tratamentos fitossanitários que podem influenciar a contaminação fúngica das uvas.

Na safra 2015/1 apenas 41 *Aspergillus* Seção *Nigri* foram testados quanto ao potencial ocratoxigênico. Destes, 100% (7 isolados) dos *A. carbonarius* isolados da variedade Chenin Blanc foram produtores de OTA, enquanto nenhum *A. niger* foi produtor. Nesta safra, os isolados ocratoxigênicos na variedade Chenin Blanc representaram 28%, em contraste com a safra de 2014/2, em que os isolados ocratoxigênicos representaram 11,48%. Não foi encontrada nenhuma espécie ocratoxigênica na variedade Tempranillo, resultado semelhante foi encontrado na safra 2014/2.

Apenas 4 *Aspergillus flavus* e 1 *A. sojae* foram isolados das uvas viníferas, sendo estes não produtores de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. O que confirma o baixo risco desta toxina nas uvas e produtos derivados. Já nos solos de cultivo, foram isolados 56 *Aspergillus* Seção *Flavi*, destes, todos os *A.*

*parasiticus* (4) foram produtores de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, enquanto que apenas 14% de *A. flavus* foram produtores de aflatoxina B1, B2. Além disto, nenhum *A. sojae* foi produtor.

Serra, Braga e Venâncio (2005) encontraram 27 *A. flavus* produtores de aflatoxina B1 isolados de uvas em Portugal. No Líbano, 43% dos *A. flavus* isolados de uvas foram produtores de aflatoxina B1 (EL KHOURY et al., 2008) e na Tunísia 23% dos isolados (MELKI BEN FREDJ; CHEBIL; MLIKI, 2009). Porém, esta espécie não é considerada um membro comum da microbiota das uvas. Estudos conduzidos em países mediterrâneos reportaram baixa incidência destas espécies nos vinhedos (MARTINEZ-CULEBRAS; RAMON, 2007; MEDINA et al., 2005).

Todos os *Penicillium* produtores de citrinina pertencem à espécie *P. citrinum* reconhecida como importante produtora desta toxina em produtos alimentícios (PITT; HOCKING 1997), já tendo sido reportada em uvas (BAU et al., 2005; SERRA et al., 2006). Embora a citrinina tenha demonstrado efeitos nefratóxicos e não seja degradada durante a fermentação, a presença desta toxina nos vinhos não é preocupante devido à baixa incidência destas espécies nas uvas (ROUSSEAU et al., 2014).

Dos 115 fungos do gênero *Penicillium* isolados das uvas viníferas, apenas 20% são *Penicillium citrinum*, o que demonstra um baixo risco desta toxina nas uvas e seus derivados da região do Vale do Submédio São Francisco.

A temperatura, atividade da água e substrato são os principais fatores que influenciam a esporulação fúngica, crescimento e produção de toxinas por isolados de uvas e outros substratos (ASTORECA et al., 2007; SCHMIDT-HEYDT et al., 2011). Controlando a esporulação e o crescimento de espécies potencialmente toxigênicas, a produção de toxinas em uvas pode ser afetada, garantindo a comercialização de um produto que não apresente riscos à saúde do consumidor.

### 3.4 Ocorrência de ocratoxina A em vinhos experimentais

A presença de ocratoxina A nos vinhos experimentais elaborados a partir de uvas viníferas coletadas no Vale do Submédio São Francisco demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no teor de contaminação.

Apenas 14,28% das amostras de vinhos tintos e 50% de vinhos brancos foram positivas para presença de OTA, sendo as médias de concentração de 0,29 $\mu\text{g/L}$  e 0,04 $\mu\text{g/L}$  em vinhos tintos e em vinhos brancos, respectivamente, tendo, portanto, os vinhos tintos um maior teor de contaminação do que os brancos.

Remiro et al. (2013) encontraram 100% dos vinhos tintos provenientes de países ao redor do Mar Mediterrâneo contaminados por OTA. Já em vinhos chineses, apenas 2,9% dos vinhos brancos encontraram-se contaminados, enquanto 57,1% dos vinhos tintos apresentaram OTA, com concentrações médias de 0,07  $\mu\text{g/L}$  e 0,8  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente (ZANG et al., 2013). Segundo Sarigiannis et al. (2014), estas diferenças podem estar relacionadas às técnicas de cultivo da uva, ao microclima e aos diferentes processos de vinificação.

O vinho tinto tem sido relatado com maiores concentrações de OTA que os vinhos brancos ou rosés (GRAZIOLI; FUMI; SILVA, 2006). Isto pode estar relacionado com o processo de vinificação (LASRAM et al., 2008), já que na elaboração do vinho branco as cascas separam-se do mosto logo após o esmagamento, havendo pouco contato entre eles. No vinho tinto, as cascas fermentam junto ao mosto, para potencializar a extração da cor, ocorrendo também uma maior extração da micotoxina, caso esteja presente nas uvas. Já na fermentação de vinhos rosé, o tempo de contato entre a casca e o mosto é menor (FERNANDES et al., 2003).

A tabela 6 demonstra que a maior concentração de ocratoxina A foi observada no vinho elaborado a partir da variedade Touriga Nacional (0,29 $\mu\text{g/L}$ ), sendo esta também a variedade de maior percentual de

contaminação por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Além disto, esta variedade também apresentou alta incidência de isolados toxigênicos.

Em contraste, Terra et al. (2013), ao avaliarem OTA em vinhos e sucos de uva da região tropical do Brasil, detectaram 38,24% das amostras contaminadas (0,03-0,62µg/L), sendo 12 vinhos tintos e apenas um vinho branco. Destes, o vinho elaborado a partir da variedade Syrah apresentou a maior contaminação (0,62 µg/L).

Tabela 6 Espécies toxigênicas isoladas de uvas viníferas e presença de ocratoxina A em vinhos experimentais

Variedade	Número de isolados toxigênicos ( <i>A. carbonarius</i> )	Níveis de OTA nos vinhos (µg/L) *
Moscato Itália 1	51	ND** a
Moscato Itália 2	0	ND a
Syrah 1	0	<LQ a
Ruby Cabernet	0	<LQ a
Chenin Blanc	7	<LQ a
Tempranillo	0	<LQ a
Barbera	1	<LQ a
Syrah 3	4	<LQ a
Tempranillo 2015/1	0	<LQ a
Moscato Canelli 1	0	0,02 ± 0 b
Moscato Canelli 2	8	0,03 ± 0,01 b
Chenin Blanc 2015/1	7	0,06 ± 0 c
Touriga Nacional	48	0,29 ± 0,01 d

\*Letras diferentes mostram diferença estatística significativa a  $p < 0,05$ .

\*\*ND= não detectado

Apesar da variedade Moscato Itália 1 apresentar elevada contaminação por *A. carbonarius* produtores de OTA, esta não foi detectada no vinho elaborado a partir desta variedade.

Em geral, os vinhos brancos apresentam níveis de OTA inferiores, quando comparados com vinhos tintos, sendo assim, a presença de OTA nos vinhos elaborados a partir da variedade Chenin Blanc e Moscato Canelli pode ser atribuída à possibilidade da baixa qualidade das amostras analisadas (SOTO et al., 2014). Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo realizado por Pena et al. (2010) ao avaliarem vinhos de diferentes regiões em Portugal em que, apesar de 26% das amostras de vinho tinto e 12% das amostras de vinho branco estar contaminadas por OTA, apenas uma amostra de vinho branco excedeu o nível permitido pela União Europeia. Porém em nosso estudo, nenhum dos vinhos analisados excedeu o limite máximo tolerável de OTA em vinhos e sucos de uva propostos pela União Europeia (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES - CE, 2006) e pelo Brasil de  $2\mu\text{g}/\text{kg}$  (BRASIL, 2011).

De acordo com nossos resultados, observa-se que os vinhos do Brasil possuem baixas concentrações quando comparados com os de origem europeia em que o teor de OTA geralmente varia entre 0,01 e  $15,60\mu\text{g}/\text{L}$  (CE, 2002; SHUNDO et al., 2006; TERRA et al., 2013). Segundo Terra et al. (2013) o baixo nível de OTA pode estar relacionado ao clima semiárido da região, onde são registradas temperaturas mais elevadas ao longo de todo o ano.

A ocorrência de OTA em vinhos está relacionada ao crescimento do fungo nas uvas, sendo a temperatura e umidade relativa do ar no mês antes da colheita, o tipo de vinho, e a porcentagem de frutos danificados antes de vinificação os fatores que mais influenciam a contaminação (QUINTELA et al., 2013).

*Aspergillus carbonarius* desenvolvem nas bagas, especialmente após o estágio pintor (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006). O período entre o início do pintor e a colheita é considerado o período crítico para a produção de ocratoxina A e seu acúmulo nas bagas de uva. Sendo que, o retardamento da

colheita pode aumentar o risco de contaminação com OTA (GAMBUTI et al., 2005).

Segundo Passamani et al. (2014) a melhor condição para produção de OTA por *A. carbonarius* em meio semissintético de uva, foi a 15 °C e 0,99 aw. Com relação ao crescimento destes isolados as condições ótimas foram de 20 a 33 °C e 0,95 a 0,99aw, o que sugere que as condições semiáridas da região favorecem o crescimento desta espécie, porém a presença de fungos potencialmente toxigênicos não implica a presença de micotoxinas nas uvas e seus derivados (FUNG; CLARK, 2004).

O efeito quantitativo da fertilização, irrigação, sistema de condução e variedade da uva na presença de OTA nos vinhos é bastante difícil de demonstrar devido à forte interrelação existente entre eles (BATTILANI; CAMARDO, 2015; COVARELLI et al., 2012). Porém, estratégias adequadas de gestão do vinhedo, como o controle de pragas e doenças, controle biológico e químico de *Aspergillus* Seção *Nigri* e a otimização do processamento podem contribuir para a redução da contaminação de OTA em vinhos (BATTILANI et al., 2006; HOCKING et al., 2007).

#### 4 CONCLUSÃO

As espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* encontradas nas uvas viníferas foram *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. aculeatus*, *A. niger* Agregado, *A. flavus*, *A. sojae*, *P. sclerotiorum*, *P. citrinum*, *P. glabrum*, *P. decumbens*, *P. implicatum* e *P. solitum*. Sendo possível observar que a incidência de fungos e os níveis de OTA variam em função da variedade das uvas e da safra.

A maior incidência de isolados ocratoxigênicos nas uvas e no solo de cultivo deve-se a espécie *A. carbonarius*, o que confirma ser esta a principal espécie responsável pela contaminação de uvas por OTA no Vale do Submédio São Francisco.

A maior concentração de ocratoxina A foi observada no vinho elaborado a partir da variedade Touriga Nacional, sendo esta também a variedade de maior percentual de contaminação por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. Além disto, esta variedade também apresentou alta incidência de isolados toxigênicos.

Todos os vinhos experimentais analisados apresentaram teor de OTA abaixo do limite proposto pela legislação (2µg/Kg), o que confirma a qualidade e segurança microbiológica dos vinhos da região.

Estes resultados demonstram que a avaliação da presença de fungos toxigênicos nas uvas não é suficiente para predizer a presença de ocratoxina A nos vinhos, embora tal informação nos auxilie a mapear as áreas de riscos para controlar a presença de fungos toxigênicos nas uvas.

## REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L. et al. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, p. 504–506, 2003.

ABARCA, M. L. et al. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, p. 903–906, 2001.

ABRUNHOSA, L. et al. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 240-242, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16<sup>th</sup> ed. Washington, 1997. 806 p.

ASTORECA, A. et al. Ochratoxin A production in relation to ecophysiological factors by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from different substrates in Argentina. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 388, n. 1/3, p. 16-23, 2007.

BALASAHEB, W. P. et al. 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, v. 8, n. 4, p. 357-364, 2007.

BARBERIS, M. G. et al. Factors affecting distribution and abundance of *Aspergillus* section *Nigri* in vineyard soils from grapevine growing regions of Argentina. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 94, n. 14, p. 3001-3007, 2014.

BATTILANI, P.; CAMARDO, L. M. OTA-Grapes: a mechanistic model to predict Ochratoxin A risk in grapes, a step beyond the systems approach. **Toxins**, Basel, v. 7, n. 8, p. 3012-3029, 2015.

BATTILANI, P. et al. Mapping of *Aspergillus* Section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, p. 72–82, 2006.

BATTILANI, P. et al. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 1736-1740, 2004.

BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 2-4, 2006.

BAU, M. et al. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, p. 125-130, 2005.

BEJAOU, H. et al. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, p. 46 -52, 2006.

BELLÍ, N. et al. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, p. 40–45, 2006.

BELLÍ, N. et al. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 591-594, 2004.

BELLÍ, N. et al. Ochratoxin A - producing fungi in Spanish wine grapes and their relationship with meteorological conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 113, p. 233–239, 2005.

BOKULICH, N. A. et al. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 111, p. E139–E148, 2014.

BRASIL. **Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>>. Acesso em: 22 set. 2014.

BROWN, A. L.; ODELL, E. W.; MANTLE, P. G. DNA ploidy distribution in renal tumors induced in male rats by dietary ochratoxin. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Jena, v. 59, n. 2, p. 85-95, 2007.

CHIOTTA, M. L. et al. *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, p. 137–141, 2009.

CLARKE, K. et al. Incidence of black *Aspergillus* spp. in vineyards. In: EMMETT, B. (Ed.). **Fungal contaminants and their impact on wine quality**. Urrbrae: Cooperative Research Centre for Viticulture, 2004. p. 132-142.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU member states**. Bruxellas, 2002. (Report of experts participating in Task 3.2.7).

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, nº 1881/2006 of 19 Dec. 2006. **Official Journal of the European Union**, Bruxelles, v. 364, p. 5-24, 2006.

COVARELLI, L. et al. A review on the occurrence and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A in dehydrated grapes, non-fortified dessert wines and dried vine fruit in the mediterranean area. **Food Control**, Guildford, v. 26, p. 347–356, 2012.

DIAZ, G. A. et al. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 133, p. 195-199, 2009.

DIGUTA, C. F. et al. PCR ITS-RFLP: a useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. **Food Microbiology**, London, v. 28, p. 1145-1154, 2011.

EL KHOURY, A. et al. 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.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Boletins agrometeorológicos**. 2014. Disponível em: <<http://www.cpatia.embrapa.br:8080/bhsf/labagrometeorologia/index.php?opcao=artigos>>. Acesso em: 10 out. 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Boletins agrometeorológicos**. 2015. Disponível em: <<http://www.cpatia.embrapa.br:8080/bhsf/labagrometeorologia/index.php?opcao=artigos>>. Acesso em: 10 out. 2015.

EUROPEAN COMMISSION. European Commission Regulation No. 401/2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, Brussels, v. 70, p. 12–34, 2006.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. **EN 14133**: foodstuffs: determination of ochratoxin A in wine and beer, HPLC method with immunoaffinity column clean-up. Brussels, 2003. 16 p.

FERNANDES, A. et al. Fate of ochratoxin A during a vinification trial. **Aspects of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 68, p. 73-80, 2003.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 128-130, 1980.

FLORES, M. A. D.; FLORES, A. **Diagnóstico do enoturismo brasileiro**. Bento Gonçalves: IBRAVIN, 2012. p. 62

FUNG, F.; CLARK, R. F. Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**, New York, v. 42, n. 2, p. 217-234, 2004.

GAMBUTI, A. et al. Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 56, n. 2, p. 155-162, 2005.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 243–270, 2004.

GRAZIOLI, B.; FUMI, M. D.; SILVA, A. The role of processing on ochratoxin A content in Italian must and wine: a study on naturally contaminated grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, p. 93-96, 2006.

GUÉRIN, L. et al. **Schémas épidémiologiques des déviations nommées goût moisi-terreux (GMT) dans différents vignobles**. 2007. Disponível em: <<http://www.techniloire.com/documents/124963587/article45.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2015.

HOCKING, A. D. et al. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, p. 84–88, 2007.

KAZI, B. A. et al. Effects of temperature, moisture and/or irrigation on the survival of *Aspergillus carbonarius* in soil. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8., 2003, Christchurch . **Proceedings...** Christchurch : [s. n.], 2003. v. 2, p. 140.

KIZIS, D. et al. biodiversity and ITS-RFLP characterisation of *Aspergillus* section *Nigri* isolates in grape from four traditional grape-producing áreas in Greece. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. e93923, 2014.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: CBS, 2002. 116 p.

KOGKAKI, E. A. et al. Effect of interaction between *Aspergillus carbonarius* and non-ochratoxigenic grape-associated fungal isolates on growth and ochratoxin A production at different water activities and temperatures. **Food Microbiology**, London, v. 46, p. 521-527, 2015.

LASRAM, S. et al. Evolution of ochratoxin A content during red and rose vinification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, n. 10, p. 1696-1703, 2008.

LASRAM, S. et al. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, p. 376-379, 2007.

LASRAM, S. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic áreas. **Food Control**, Guildford, v. 25, p. 5-80, 2012.

LASRAM, S. et al. Water activity and temperature effects on fungal growth and ochratoxin A production by Ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* isolated from Tunisian grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 2, p. 89-97, 2010.

LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. Implantação do vinhedo. In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. S. (Ed.). **A vitivinicultura no Semiárido brasileiro**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica; Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. p. 756.

LEONG, S. L. et al. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 301-306, 2007.

LEONG, S. L. et al. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, p. 10-17, 2006.

MAGNOLI, C. et al. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, p. 179-184, 2003.

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V.; RAMÓN, D. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, p. 147-153, 2007.

MEDINA, A. et al. Study of spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4696-4702, 2005.

MELKI BEN FREDJ, S.; CHEBIL, S.; MLIKI, A. Isolation and characterization of ochratoxin A and aflatoxin B1 producing fungi infecting grapevines cultivated in Tunisia. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 3, p. 523-527, 2009.

MIRAGLIA, M.; BRERA, C. **Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States: reports on tasks for scientific cooperation: directorate general of health and consumer protection**. Brussels: European Commission, 2002. 148 p.

MOHAMED, S. et al. An extension of the coconut cream agar method to screen *Penicillium citrinum* isolates for citrinin production. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 57, p. 214-219, 2013.

OLIVERI, 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**, Amsterdam, v. 127, p. 147-154, 2008.

PALMA, N. et al. Ochratoxin A-induced mutagenesis in mammalian cells is consistent with the production of oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 20, n. 7, p. 1031-1037, 2007.

PASSAMANI, F. R. F. et al. Effect of temperature , water activity , and ph on growth and production of Ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian Grapes. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 77, n. 11, p. 1947-1952, 2014.

PASSAMANI, F. R. F. **Ocorrência e desenvolvimento de um modelo preditivo para a incidência de *Aspergillus* Seção *Nigri* e ocratoxina A em regiões vitícolas do Brasil**. 2014. 116 p. Tese (Doutrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

PENA, A. et al. Ochratoxin A survey in Portuguese wine by LC–FD with direct injection. **Talanta**, v. 82, n. 4, p. 1556–1561, 2010.

PITT, J. I. **A laboratory guide to Common *Penicillium* Species**. Sydney: Food Science Australia, 2000. 187 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 593 p.

PONSONE, M. L. et al. Control of ochratoxin A production in grapes. **Toxins**, Basel, v. 4, n. 5, p. 364–72, 2012.

PONSONE, M. L. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, p. 131–135, 2007.

QUINTELA, S. et al. Ochratoxin A removal in wine: a review. **Food Control**, Guildford, v. 30, p. 439–445, 2013.

REMIRO, R. et al. Levels of ochratoxins in Mediterranean wines. **Food Control**, Guildford, v. 32, p. 63–68, 2013.

ROSSIELLO, M. R. et al. 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**, San Diego, v. 229, p. 227-231, 2008.~

ROUSSEAU, J. **Ochratoxin A in wines**: current knowledge. 2004. Disponível em: <<http://www.infowine.com/default.asp?scheda%41038>>. Acesso em: 23 out. 2015.

ROUSSEAU, S. et al. Non-Botrytis grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins. **Food Microbiology**, London, v. 38, p. 104–121, 2014.

SAGE, L.; GARON, D.; EIGLE-MURANDI, F. Fungal microflora and ochratoxin a risk in French vineyards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 5764-5768, 2004.

SAGE, L. et al. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 1306-1311, 2002.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food-borne fungi**. 4th ed. Centraalbureau: Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000.

SARIGIANNIS, Y. et al. Ochratoxin A levels in Greek retail wines. **Food Control**, Guildford, v. 42, p. 139–143, 2014.

SAVA, V. et al. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 1, n. 27, p. 82- 92, 2006.

SCHMIDT-HEYDT, M. et al. Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin A producing species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 229-237, 2011.

SERRA, R.; BRAGA, A.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, p. 515-521, 2005.

SERRA, R. et al. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, p. 971–978, 2006.

SETATI, M. E. et al. The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n.12, p. 52609, 2012.

SHUNDO, L. et al. Ochratoxin a in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 533–537, 2006.

SOMMA, S.; PERRONE, G.; LOGRIECO, A. Diversity of black Aspergilli and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 51, p. 131-147, 2012.

SOTO, J. B. et al. Presence of Ochratoxin A (OTA) Mycotoxin in alcoholic drinks from Southern European Countries: Wine and Beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 62, n. 31, p. 7643–7651, 2014.

SPADARO, D. et al. Ochratoxigenic black species of Aspergilli in grape fruits of Northern Italy identified by an improved PCR-RFLP procedure. **Toxins**, Basel, v. 4, p. 42-54, 2012.

TERRA, M. F. et al. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal of the science of food and agriculture**, Oxford, v. 93, n. 4, p. 890-994, 2013.

TERRA, M. F. **Fungos toxigênicos em solos de vinhas, uvas e mostos e ocratoxina A em vinhos e sucos do vale do Submédio São Francisco**. 2011. 151 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

TOZLOVANU, M. et al. Genotoxicity of the hydroquinone metabolite of ochratoxin A: structure-activity relationships for covalent DNA ad- duction. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 19, p. 1241–1247, 2006.

ZHANG, X. et al. Occurrence of Ochratoxin A in Chinese wines: influence of local meteorological parameters. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 236, p. 277–283, 2013.

### CAPÍTULO 3

#### **Influência das características físico-químicas de uvas viníferas na incidência de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus***

##### **RESUMO**

A incidência de fungos e os níveis de toxina variam em função da variedade das uvas, da região vitivinícola, das práticas agrícolas adotadas, das condições climáticas, da safra e do processo de elaboração dos vinhos. Neste sentido, o objetivo neste estudo foi avaliar a correlação entre a ocorrência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e as características físico-químicas de uvas viníferas cultivadas na região tropical semiárida do Brasil. Foram avaliadas 11 amostras de uvas viníferas coletadas na safra de 2014/2 no Vale do Submédio São Francisco. Para o isolamento de fungos filamentosos das bagas foi utilizada a técnica de plaqueamento direto em meio de cultura DRBC. As espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram identificadas através de características morfológicas. As espécies de *Aspergillus* foram testadas quanto ao potencial toxigênico através de CCD e as espécies de *Penicillium* através do método Ágar creme de coco. Foram avaliados os parâmetros de acidez titulável total, pH, sólidos solúveis totais, peso e diâmetro da baga, açúcares totais, pectina, atividade antioxidante, cor e compostos fenólicos. As espécies de *Aspergillus* encontradas nas uvas viníferas foram *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. aculeatus*, *A. niger* Agregado, *A. flavus* e *A. sojae*. Já as pertencentes ao gênero *Penicillium* foram *P. sclerotiorum*, *P. citrinum*, *P. glabrum*, *P. decumbens*, *P. implicatum* e *P. solitum*. Todos os isolados de *Aspergillus carbonarius* foram produtores de OTA e todos os *P. citrinum* foram produtores de citrinina. Todas as espécies identificadas neste estudo apresentaram uma correlação positiva com pelo menos um parâmetro físico-químico avaliado, destacando-se os teores de pectina, açúcares totais, acidez total e compostos fenólicos. O conhecimento destas relações pode auxiliar na adoção de estratégias adequadas de gestão do vinhedo, o que pode contribuir para a redução destes fungos e da presença de micotoxinas em uvas e derivados.

Palavras-chave: Açúcares. Ácidos orgânicos. *A. carbonarius*. Compostos Fenólicos. Pectina.

## 1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo existe uma grande diversidade de videiras, o que resulta em grande variabilidade de características físico-químicas das uvas, e consequentemente dos vinhos produzidos (ABE et al., 2007). Estas são influenciadas pela variedade e porta-enxerto, forma de cultivo, tipo de solo, estresse hídrico, irrigação, condições climáticas, insolação, pluviosidade, temperatura, umidade relativa, demanda evaporativa, área foliar, carga de frutas e presença de patógenos (LEÃO; SOARES, 2009).

As uvas podem estar suscetíveis à infecção por fungos filamentosos desde os estágios iniciais da maturação (BAU et al., 2005). Isto ocorre devido à capacidade dos fungos de produzir um complexo enzimático, responsável pela degradação de substratos específicos, e a produção de metabolitos secundários e voláteis (MEDINA, 2015). Portanto, a presença de micotoxinas em vinhos é devido à contaminação das uvas por fungos que se desenvolvem na pré-colheita, colheita ou durante as fases que antecedem a vinificação.

No entanto, têm-se observado que a incidência destes fungos e os níveis de toxina variam em função da variedade das uvas, da região vitivinícola, das práticas agrícolas adotadas, das condições climáticas, da safra e do processo de elaboração dos vinhos. Além disto, não há informações precisas sobre a influência das diferentes variedades de uvas na incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e na produção de toxina.

Neste sentido, o objetivo neste estudo foi avaliar a correlação entre a ocorrência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e as características físico-químicas de uvas viníferas cultivadas na região tropical semiárida do Brasil.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de estudo

As amostras de uvas viníferas foram coletadas em quatro vinícolas da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco, localizadas nos municípios de Lagoa Grande e Santa Maria da Boa Vista, em Pernambuco, e Casa Nova na Bahia (Figura 1), vinícolas estas que possuem a intenção de adquirir a Indicação Geográfica para os vinhos elaborados a partir das variedades coletadas.



Figura 1 Região Vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco em que foram coletadas as amostras de uvas (*Vitis vinifera* L.)

Fonte: Flores e Flores (2012)

## 2.2 Amostragem

Foram coletadas quatro amostras de uvas brancas e sete amostras de uvas tintas nos estágios finais de maturação das bagas (época de colheita), na safra julho/agosto/setembro no ano de 2014 (Tabela 1). Para isso, traçou-se um transecto diagonal ao longo do vinhedo e coletaram-se três cachos de uvas de três plantas equidistantes (P1, P2, P3), desprezando-se as extremidades (Figura 2). As uvas foram transportadas para o laboratório em sacos plásticos estéreis dentro de caixas térmicas.

Tabela 1 Amostras coletadas e coordenadas geográficas da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco (continua)

Variedade	Local	Ponto	Coordenadas geográficas		
			Latitude	Longitude	Altitude
Moscatto Itália 1	Casa Nova – BA	1	9° 16' 29.59934" S	40° 52' 18.49320" W	422
		2	9° 16' 1.44726" S	40° 52' 19.86256" W	422
		3	9° 15' 57.75142" S	40° 52' 17.12385" W	422
Syrah 1	Casa Nova – BA	1	9° 16' 17.10196" S	40° 51' 54.85057" W	418
		2	9° 16' 18.41723" S	40° 51' 52.26939" W	418
		3	9° 16' 16.24204" S	40° 51' 51.24231" W	420
Syrah 2	Casa Nova – BA	1	9° 16' 13.37789" S	40° 51' 57.5173" W	418
		2	9° 16' 11.45879" S	40° 51' 57.3106" W	418
		3	9° 16' 9.67438" S	40° 51' 37.4808" W	419
Touriga Nacional	Lagoa Grande – PE	1	9° 2' 17.68761" S	40° 11' 23.90578" W	369
		2	9° 2' 16.3678" S	40° 11' 9.22964" W	372
		3	9° 2' 15.13419" S	40° 11' 8.14487" W	372
Syrah 3	Lagoa Grande – PE	1	9° 2' 14.16059" S	40° 11' 27.30014" W	372
		2	9° 2' 14.99725" S	40° 11' 30.31585" W	371
		3	9° 2' 13.4313" S	40° 11' 31.32593" W	370
Moscatto Canelli 1	Lagoa Grande – PE	1	9° 3' 6.2281" S	40° 11' 53.80291" W	371
		2	9° 3' 5.24963" S	40° 11' 54.35644" W	371
		3	9° 3' 4.17317" S	40° 11' 55.00788" W	371

Tabela 1, conclusão

Variedade	Local	Ponto	Coordenadas geográficas		
			Latitude	Longitude	Altitude
Moscatto Canelli 2	Lagoa	1	9° 3' 0.1268" S	40° 11' 47.95312" W	370
	Grande – PE	2	9° 3' 0.23067" S	40° 11' 46.05393" W	369
		3	9° 3' 0.04101" S	40° 11' 44.31752" W	369
Ruby Cabernet	Santa	1	8° 59' 43.13479" S	39° 59' 45.17365" W	377
	Maria da Boa Vista – PE	2	8° 59' 41.08367" S	39° 59' 45.16805" W	377
		3	8° 59' 38.64594" S	39° 59' 43.65499" W	377
Chenin Blanc	Santa	1	8° 59' 32.36227" S	39° 59' 43.67057" W	375
	Maria da Boa Vista – PE	2	8° 59' 31.29336" S	39° 59' 41.63731" W	374
		3	8° 59' 30.12668" S	39° 59' 39.63654" W	373
Tempranillo	Lagoa	1	9° 2' 25.16715" S	40° 3' 39.79076" W	364
	Grande – PE	2	9° 2' 25.8461" S	40° 3' 41.4303" W	364
		3	9° 2' 25.80985" S	40° 3' 42.70749" W	362
Barbera	Lagoa	1	9° 2' 17.47204" S	40° 3' 43.82935" W	366
	Grande – PE	2	9° 2' 18.18449" S	40° 3' 45.14147" W	367
		3	9° 2' 18.73453" S	40° 3' 46.32212" W	367

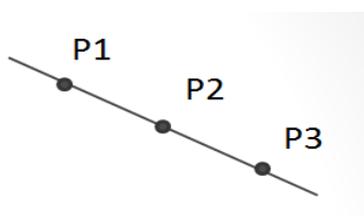


Figura 2 Transecto diagonal traçado ao longo do vinhedo para coleta das amostras de uvas viníferas

### 2.3 Análise micológica das uvas (*Vitis vinifera* L.)

De cada ponto (P1, P2, P3) foram selecionadas 100 bagas, ao acaso, e realizou-se a desinfecção superficial destas com Álcool a 70% (1 min) e

Hipoclorito de Sódio a 1% (30 seg) e, em seguida, três lavagens com água destilada estéril. Após a desinfecção, as bagas foram plaqueadas diretamente na superfície do meio DRBC- Dicloran Rosa Bengal Cloranfenicol (HIMEDIA®) (Digestão Péptica de tecido animal: 5,0g, Dextrose: 10,0g, Fosfato Monopotássico: 1,0g, Sulfato de Magnésio: 0,5g, Rosa Bengala: 0,025g, Dicloran: 0,002g, Agar: 15,0g, Cloranfenicol: 0,1g e Água Destilada: 1L) conforme descrito por Samson et al. (2000). As placas foram incubadas a 25 °C por sete dias. Após esse período realizou-se a contagem das uvas contaminadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de bagas contaminadas por fungos filamentosos, conforme Pitt e Hocking (1997).

Em seguida, utilizando a técnica da raiz quadrada, apenas as colônias com características morfológicas de *Aspergillus* e *Penicillium* foram transferidas para o meio de cultura MA - Ágar Extrato de Malte (ACUMEDIA) (Extrato de Malte: 20g, Ágar: 20g e Água Destilada: 1L) e incubadas a 25 °C, por sete dias.

#### **2.4 Identificação fenotípica das espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium***

A partir das culturas puras os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foram identificados de acordo com Klich (2002) e Pitt (2000). Os isolados foram incubados em meios de cultura CYA - Ágar Czapek Levedura (SYNTH) ( $K_2HPO_4$ : 1,0g; Concentrado Czapec: 10,0mL; Extrato de Levedura: 5,0g, Agar: 15,0g, Água Destilada: 1L; (Concentrado Czapec:  $NaNO_3$ : 30,0g, KCl: 5,0g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 5,0g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,1g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,1g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ : 0,05g, Água Destilada: 100mL)) a 25 °C e a 37 °C e MEA - Ágar Extrato de Malte (ACUMEDIA) (Extrato de Malte: 20,0g, Peptona: 1,0g, Glucose: 30,0g, Agar: 20g, Água Destilada: 1L) a 25 °C. Após sete dias de incubação foram observadas as características macroscópicas e microscópicas dos fungos filamentosos.

## **2.5 Detecção da produção de ocratoxina A por fungos do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Nigri***

Para teste do potencial ocratoxigênico pelo método Plug Agar as espécies potencialmente toxigênicas do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Nigri* foram inoculadas em meio CYA - Ágar Czapek Levedura (SYNTH) ( $K_2HPO_4$ : 1,0g; Concentrado Czapek: 10,0mL; Extrato de Levedura: 5,0g, Agar: 15,0g, Água Destilada: 1L; (Concentrado Czapek:  $NaNO_3$ : 30,0g, KCl: 5,0g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 5,0g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,1g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,1g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ : 0,05g, Água Destilada: 100mL)) por 7 dias a 25 °C conforme Filtenborg e Frisvad (1980). Utilizou-se uma solução padrão de OTA (SIGMA-ALDRICH), Placas de Cromatografia de Camada Delgada (MERK-SÍLICA GEL 60, 20x20) e como Fase móvel TEF - Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (60:30:10). Após a eluição, as placas foram secas em capela de fluxo laminar. A confirmação quanto à produção de OTA foi realizada em luz ultravioleta com  $\lambda$  366nm 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 OTA.

## **2.6 Detecção da produção de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 por fungos do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Flavi***

Para teste do potencial aflatoxigênico pelo método Plug Agar as espécies potencialmente toxigênicas do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Flavi* foram inoculadas em meio YES - Ágar Extrato de Levedura Sacarose (Extrato de levedura: 20,0g; Sacarose: 150g; Agar: 20,0g;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,1g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ : 0,05g; Água destilada: 1L), por 7 dias a 25 °C conforme Filtenborg e Frisvad (1980). Utilizou-se uma solução padrão de aflatoxina B1, B2, G1 e G2 (SIGMA-ALDRICH), Placas de Cromatografia de Camada

Delgada (MERK-SÍLICA GEL 60, 20x20) e como Fase móvel TEF - Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (60:30:10). Após a eluição, as placas foram secas em capela de fluxo laminar. A confirmação quanto à produção de aflatoxinas foi realizada em luz ultravioleta com  $\lambda$  366nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 apresentaram um RF (fator de retenção) e um *spot* de fluorescência semelhante ao do padrão.

### **2.7 Detecção da produção de citrinina por fungos do gênero *Penicillium* pertencentes à Seção *Citrina***

A avaliação da produção de citrinina foi realizada pelo método de Ágar Creme de Coco, em que os isolados pertencentes à espécie *Penicillium citrinum* foram inoculados em meio de cultivo ÁGAR-COCO (Creme de leite de coco: 400g; Ágar: 12g; Água destilada: 400mL) por 10 dias a 25 °C, no escuro segundo metodologia descrita por Mohamed et al. (2013). A confirmação quanto à produção de citrinina foi realizada em luz ultravioleta com  $\lambda$  366nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de citrinina apresentaram fluorescência verde-amarelo intenso ao redor da colônia.

### **2.8 Análises físico-químicas das uvas**

Foram avaliados os parâmetros de atividade antioxidante, compostos fenólicos, antocianinas, açúcares totais, pectina solúvel e total, cor, acidez total titulável, sólidos solúveis totais, potencial hidrogeniônico, peso e diâmetro das bagas.

### **2.8.1 Acidez Total Titulável (ATT)**

A acidez total titulável foi expressa em gramas de ácido tartárico por 100g de polpa (g de ácido tartárico  $100\text{g}^{-1}$ ), obtida por meio da titulação de 5g de bagas homogeneizada e diluída para 45 ml de água destilada, com solução padronizada de hidróxido de sódio a 0,01N, tendo como indicador do ponto de viragem a fenolftaleína, segundo a técnica preconizada pela Association of Official Analytical Chemists - AOAC (2012).

### **2.8.2 Potencial Hidrogeniônico (pH)**

O pH foi avaliado por potenciometria em eletrodo de vidro, nas bagas trituradas e filtradas, segundo técnica da AOAC (2012).

### **2.8.3 Sólidos Solúveis Totais (SST)**

Os sólidos solúveis totais foram determinados por refratometria, utilizando um refratômetro digital ATAGO PR-100 com compensação de temperatura automática a 25 °C e os resultados foram expressos em % de sólidos solúveis, conforme a AOAC (2012).

### **2.8.4 Peso e Diâmetro**

Foram avaliados o peso e o diâmetro das bagas de diferentes pontos do cacho, em dez repetições. Para a pesagem utilizou-se balança analítica Marte AY220. O diâmetro foi medido em duas direções perpendiculares, com o auxílio de um paquímetro digital LEE TOOLS.

### **2.8.5 Açúcares Totais**

Os Açúcares totais foram determinados espectrofotometricamente a 620nm, pelo método de Antrona (DISCHE, 1962), e expressos como g de glicose por 100g de fruto.

### **2.8.6 Pectinas total e solúvel**

As pectinas total e solúvel foram extraídas de acordo com a técnica de McCready e McComb (1952) e o doseamento realizado em espectrofotômetro Beckman 640B, a 520nm, segundo técnica de Bitter e Muir (1973). Os resultados foram expressos em mg de ácido galacturônico por 100 g de uva.

### **2.8.7 Porcentagem de solubilização de pectinas**

A porcentagem de solubilização das pectinas foi calculada dividindo-se os teores obtidos de pectina solúvel pelos teores de pectina total e multiplicando-se o resultado por cem.

### **2.8.8 Atividade antioxidante**

A determinação da atividade antioxidante foi realizada por dois métodos: DPPH e ABTS.

Para o método de DPPH utilizou-se a metodologia descrita por Rufino et al. (2007b) baseada na captura do radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhidrazil) por antioxidantes, o qual produz um decréscimo da absorbância a 515nm, sendo os resultados expressos em porcentagem de sequestro de radicais livres (%SRL).

A avaliação da atividade antioxidantes pelo sistema ABTS consistiu na captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS),

podendo-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{M}$  trolox/g (RUFINO et al., 2007a).

### **2.8.9 Coloração**

Para determinação da cor das uvas utilizou-se um colorímetro Minolta CR 400, no modo CIE  $L^*a^*b^*$  realizando-se duas medidas em lados opostos de cada baga, analisando-se 5 frutos por repetição. No padrão CIE  $L^*a^*b^*$  a coordenada  $L^*$  expressa o grau de luminosidade da cor medida ( $L^* = 100 =$  branco;  $L^* = 0 =$  preto). A coordenada  $a^*$  expressa o grau de variação entre o vermelho e o verde ( $a^*$  mais negativo = mais verde;  $a^*$  mais positivo = mais vermelha) e a coordenada  $b^*$  expressa o grau de variação entre o azul e o amarelo ( $b^*$  mais negativo = mais azul;  $b^*$  mais positivo = mais amarelo). O Chroma é a relação entre os valores de  $a^*$  e  $b^*$ , com o qual se obtém a cor real da amostra. O ângulo Hue (tonalidade) é o ângulo formado entre  $a^*$  e  $b^*$ , e indica a saturação da cor da amostra (BIBLE; SINGHA, 1997).

### **2.8.10 Compostos fenólicos totais**

Os fenólicos totais foram obtidos conforme o método colorimétrico desenvolvido por Singleton e Rossi (1965), com a utilização do reagente de Folin-Ciocalteu, em solução com concentração de 10% (v/v). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g da amostra ( $\text{mg EAG} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ).

### **2.8.11 Antocianinas monoméricas**

Os teores de antocianinas totais foram quantificados seguindo o método do pH diferencial, proposto por Giusti e Wrolstad (2001).

O conteúdo de antocianinas monoméricas (AM) foi calculado como cianidina-3-glicosídeo (PM = 449,2) através da fórmula abaixo:

$$AM \text{ (mg.100 mL}^{-1}\text{)} = \frac{A \times PM \times \text{fator de diluição}}{\varepsilon (22900) \times l}$$

Em que:  $\varepsilon$  = Absortividade Molar

$$A \text{ (Absorbância)} = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH} = 1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH} = 4,5}$$

### 2.8.12 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos (flavanóis: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-galato epicatequina, (-)-galato epigalocatequina, procianidina A2, procianidina B1, procianidina B2; flavonóis: caempferol-3-O-glicosídeo, rutina, quercetina, isorhamnetina-3-O-glicosídeo, miricetina; Antocianinas: malvidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo, delphinidina 3-O-glicosídeo, peonidina-3-O-glicosídeo; ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido p-cumárico; estilbeno: *trans*-resveratrol) presentes nas uvas foram determinados segundo metodologia de Corrêa et al. (2012) modificada.

#### 2.8.12.1 Reagentes e solventes

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico. O padrão de ácido gálico foi obtido da Chem (West Chester, EUA). Caempferol-3-O-glicosídeo, (+)-catequina, cianidina-3-O-glicosídeo, (-)-epicatequina, (-)-galato epicatequina, (-)-galato epigalocatequina, isohamnetina-3-O-glicosídeo, malvidina-3-O-glicosídeo, miricetina, delphinidina-3-glicosídeo, peonidina-3-O-glicosídeo, procianidina A2, procianidina B1, procianidina B2, quercetina,

*trans-resveratrol* e rutina foram obtidos a partir da Extrasynthese (Genay, França). Ácido p-cumárico foi adquirido a partir de Sigma (Reino Unido).

O metanol, a acetonitrila e ácido fosfórico foram fornecidos pela empresa Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, Brasil), JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) e Fluka (Suíça), respectivamente. A água ultrapura foi obtida através do Purelab Q Sistema Elga (EUA).

### **2.8.12.2 Preparo das amostras**

Para a obtenção dos extratos, as bagas congeladas foram retiradas do freezer, pesou-se 100 gramas de bagas e transferiu-se a amostra para um becker de 500mL completando o volume para 200mL com etanol absoluto, em seguida foram homogeneizados com auxílio de um mixer (PHILIPS WALITA 400 WATT), em velocidade média, por 1 minuto. Após o processo de trituração/homogeneização, as amostras foram levadas a um agitador mecânico refrigerado e permaneceram por 1 hora. Em seguida foram transferidas para uma centrífuga a uma rotação de 4500 rpm por 5 minutos, visando à separação das soluções, procedendo a transferência de 1,5 mL da solução em suspensão para ependorfs de 2 mL que foram inseridos em equipamento “*speed vac*” modelo DVC-220660-N00 marca MIVAC (GENEVAC LTD-IPSW, Chengland) até que o líquido fosse todo evaporado, procedendo-se a ressuspensão com Acetonitrila UV/HPLC para o volume de 1,5 mL, agitando-se os extratos após o processo. O extrato obtido foi então filtrado com filtro de polipropileno de 0,45µm e colocado em vials âmbar para posterior leitura em Cromatógrafo.

### **2.8.12.3 Quantificação de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A quantificação dos compostos foi realizada utilizando cromatógrafo líquido Waters (modelo Alliance e2695), acoplado a detector de arranjos de diodo (220, 320, 360 e 520 nm) e fluorescência (280 nm excitação e 360 nm emissão), utilizando a coluna Gemini-NX C18 (150mm x 4,60mm x 3µm) e a pré-coluna Gemini-NX C18 (4,0mm x 3,0mm), ambas da marca Phenomenex® (USA). A fase móvel foi constituída por fosfato de potássio diácido a 0,025 M, ajustado para pH= 2,05 com ácido orto-fosfórico (Fase A), metanol (fase B) e acetonitrila (fase C). As amostras dos extratos foram filtradas em filtros de polipropileno de 0,45 µm e em seguida injetou-se 10 µL no equipamento HPLC. A temperatura do forno estava a 40 °C, fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> e o tempo da corrida foi de 70 minutos.

A Tabela 2 demonstra as equações das curvas de calibração, limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) de cada composto fenólico avaliado. A coleta dos dados e as análises foram realizadas utilizando o software Empore™ 2 (MILFORD, EUA).

Tabela 2 Equações das curvas de calibração, coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>), limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os compostos fenólicos

Compostos fenólicos	Equações das curvas de calibração	R <sup>2</sup>	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
(+)-Catequina	$Y = 4.01e+006 X - 4.07e+005$	0,9994	0,06	0,19
(-)-Epicatequina	$Y = 1.61e+007 X + 2.94e+006$	0,9991	0,26	0,86
(-)-Galato epicatequina	$Y = 8.93e+004 X + 8.55e+003$	0,9997	0,13	0,42
(-)-Galato epigallocatequina	$Y = 9.64e+004 X + 3.22e+003$	0,9999	0,09	0,31
Procianidina A2	$Y = 1.66e+006 X + 5.87e+005$	0,9972	0,23	0,76
Procianidina B1	$Y = 1.17e+005 X + 8.54e+003$	0,9996	0,09	0,31
Procianidina B2	$Y = 1.87e+006 X + 4.44e+004$	0,9977	0,27	0,89
Caempferol-3-O-glicosídeo	$Y = 2.80e+004 X + 1.90e+003$	0,9996	0,03	0,1
Rutina	$Y = 2.77e+004 X + 1.84e+003$	0,9940	0,06	0,2
Quercetina	$Y = 5.62e+004 X + 1.70e+002$	0,9999	0,06	0,18
Isohamnetina-3-O-glicosídeo	$Y = 3.06e+004 X + 2.48e+003$	0,9995	0,03	0,09
Miricetina	$Y = 5.42e+004 X - 4.14e+003$	0,9999	0,03	0,11
Malvidina-3-O-glicosídeo	$Y = 3.47e+004 X + 1.46e+004$	0,9997	0,27	0,89
Cianidina-3-O-glicosídeo	$Y = 6.42e+004 X + 4.84e+003$	0,9997	0,04	0,12
Delfinidina-3-O-glicosídeo	$Y = 5.56e+004 X + 6.28e+003$	0,9995	0,09	0,3
Peonidina-3-O-glicosídeo	$Y = 6.35e+004 X + 4.12e+003$	0,9995	0,04	0,13
Ácido gálico	$Y = 1.34e+005 X + 5.31e+004$	0,9996	0,12	0,41
Ácido p-cumárico	$Y = 1.09e+005 X + 1.79e+004$	0,9997	0,08	0,27
<i>trans</i> -resveratrol	$Y = 1.16e+005 X + 4.02e+003$	0,9997	0,03	0,09

## 2.9 Análises estatísticas

Para avaliar o efeito das características físico-químicas das variedades de uvas viníferas na incidência de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* utilizou-se a correlação de Pearson. As análises foram efetuadas no software R (versão 2.11.1, 2010).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados 466 fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* a partir de amostras de uvas viníferas coletadas na safra de 2014/2. Destes, 351 pertencem ao gênero *Aspergillus* (75,32%), enquanto que apenas 115 pertencem ao gênero *Penicillium* (24,68%), o que demonstra a dominância do gênero *Aspergillus* em bagas de uvas cultivadas na região.

As espécies identificadas pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram *A. niger* (35,33%), *A. carbonarius* (33,90%), *A. aculeatus* (20,51%), *A. niger* Agregado (8,83%), *A. flavus* (1,14%) e *A. sojae* (0,28%). Já as pertencentes ao gênero *Penicillium* foram *P. sclerotiorum* (44,35%) *P. citrinum* (20,00%), *P. glabrum* (18,26%), *P. decumbens* (13,04%), *P. implicatum* (2,61%) e *P. solitum* (1,74%) (Tabela 3).

Do total de fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* identificados, 346 pertencem à Seção *Nigri* e foram testados quanto à capacidade de produção de ocratoxina A. Destes, 32,08% foram produtores de OTA e identificados como *Aspergillus carbonarius*, enquanto que as espécies *A. aculeatus*, *A. niger* e *A. niger* Agregado não mostraram habilidade para produção desta toxina. Estes resultados confirmam a relevância da espécie *A. carbonarius* na incidência de OTA em uvas e seus derivados.

Apenas quatro *Aspergillus flavus* e um *A. sojae* foram isolados das uvas viníferas sendo estes não produtores de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Entretanto, os 23 *Penicillium citrinum* testados quanto à capacidade de produção de citrinina foram produtores. Porém, estes representam apenas 20% dos 115 isolados pertencentes ao gênero *Penicillium*, o que demonstra um baixo risco da presença desta toxina nas uvas e seus derivados na região do Vale do Submédio São Francisco.

Tabela 3 Incidência de espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* nas variedades de uvas viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco

Espécies	Variedades de uvas ( <i>Vitis vinifera</i> L.)										
	Moscato Itália	Syrah 1	Syrah 2	Touriga Nacional	Syrah 3	Moscato Canelli 1	Moscato Canelli 2	Ruby Cabernet	Chenin Blanc	Tempranillo	Barbera
<i>A. aculeatus</i>	1	1	0	1	8	0	0	2	50	0	9
<i>A. carbonarius</i>	51	0	0	48	4	0	8	0	7	0	1
<i>A. niger</i>	0	28	16	15	43	1	8	0	3	0	10
<i>A. niger</i> Agregado	0	1	2	0	0	2	3	5	1	0	17
<i>A. flavus</i>	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>A. sojae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b><math>\Sigma</math> <i>Aspergillus</i></b>	<b>52</b>	<b>30</b>	<b>20</b>	<b>64</b>	<b>55</b>	<b>3</b>	<b>21</b>	<b>7</b>	<b>61</b>	<b>0</b>	<b>38</b>
<i>P. decumbens</i>	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. citrinum</i>	0	0	3	1	5	5	2	7	0	0	0
<i>P. glabrum</i>	0	0	6	1	0	2	1	9	0	0	2
<i>P. sclerotiorum</i>	0	0	0	13	0	12	5	17	4	0	0
<i>P. implicatum</i>	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. solitum</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<b><math>\Sigma</math> <i>Penicillium</i></b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>5</b>	<b>19</b>	<b>8</b>	<b>34</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>2</b>

A diferença na frequência de ocorrência das espécies fúngicas encontradas neste estudo demonstra que a incidência de fungos em uvas é influenciada, não só pela localização geográfica, mas também por condições climáticas, safra, e a variedade da uva, o que demonstra que a fenologia da planta e as características físico-químicas das bagas também irão determinar a contaminação (BATTILANI et al., 2004).

Os parâmetros de atividade antioxidante, compostos fenólicos totais, antocianinas, açúcares totais, pectina solúvel e total, cor, acidez total titulável, sólidos solúveis totais, pH, peso e diâmetro das bagas, foram avaliados para diagnosticar uma possível correlação entre as variedades das uvas viníferas e a incidência de fungos filamentosos (Tabela 4).

Nas variedades brancas (Chenin Blanc, Moscato Itália e Moscato Canelli) não foram detectadas antocianinas, já nas variedades tintas, o teor destas variou de 54,35mg/100g na Syrah 2 a 218,92mg/100g na Ruby Cabernet, variedade esta que apresentou um teor de acidez total de 0,76%. Já a variedade Barbera (tinta) obteve um teor de acidez total de 1,69%.

As atividades antioxidantes das variedades avaliadas variaram de 60,76%SRL na variedade Moscato Itália (branca) a 95,13%SRL na variedade Tempranillo (tinta) pelo método de DPPH. Já pelo método de ABTS a atividade antioxidante variou de 131,97 $\mu$ M trolox/g na Moscato Itália a 2638,90 $\mu$ M trolox/g na variedade Syrah 3 (tinta).

Os teores de açúcares totais detectados variaram de 21,36mg/100g na variedade Tempranillo, variedade esta utilizada na elaboração de vinhos tintos, a 37,56mg/100g na Moscato Canelli 1, utilizada na elaboração de espumantes. Já, o teor de sólidos solúveis observado variou de 14% na variedade Moscato Itália (branca) a 22% na variedade Touriga Nacional (tinta), variedade esta em que foi observado um teor de pectina total de 885,42mg/100g.

Tabela 4 Características físico-químicas avaliadas nas variedades de uvas viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco

Características físico-químicas	Variedades de uvas ( <i>Vitis vinifera L.</i> )*										
	Moscato Itália	Syrah 1	Syrah 2	Touriga Nacional	Syrah 3	Moscato Canelli 1	Moscato Canelli 2	Ruby Cabernet	Chenin Blanc	Tempranillo	Barbera
Atividade antioxidante-DPPH (%SRL)	60,76	94,77	94,58	94,83	94,81	76,82	86,46	94,47	91,67	95,13	86,35
Atividade antioxidante-ABTS ( $\mu\text{M}$ trolox/g)	131,97	1359,24	1271,17	1687,86	2638,90	334,30	707,94	1864,06	758,87	258,47	625,51
Compostos Fenólicos Totais (mg/100g)	634,80	641,12	652,62	1128,79	817,56	308,02	460,23	879,51	437,85	981,57	606,84
Antocianinas (mg/100g)	ND	65,48	54,35	176,56	79,12	ND	ND	218,92	ND	91,14	88,48
Açúcares totais (mg/100g)	21,41	34,90	35,06	27,53	28,74	37,56	28,27	33,28	27,83	21,36	26,37
Pectina Solúvel (mg/100g)	15,68	76,14	61,54	157,10	95,26	78,90	119,46	114,19	133,05	153,20	166,34
Pectina Total (mg/100g)	664,40	491,88	396,77	885,42	505,22	306,46	507,45	429,78	528,18	590,47	716,74
Solubilização das pectinas (%)	2,36	15,49	15,51	17,74	18,86	25,74	23,55	26,57	25,21	25,97	23,21
L*	39,61	27,80	24,88	21,48	27,80	36,96	40,85	28,14	47,13	23,92	24,11
a*	2,48	0,14	0,24	3,36	0,14	-3,54	-3,23	-0,22	-2,75	2,95	6,52
b*	14,90	-0,48	-1,54	-3,27	-0,48	14,21	15,56	-1,14	22,47	-0,59	-3,43
Chroma	13,25	0,76	1,57	4,71	0,76	14,67	15,92	1,19	22,99	3,05	6,49
Tonalidade	87,09	288,42	280,68	312,83	288,42	103,84	101,54	252,93	97,02	345,86	325,55
Acidez total (%)	1,12	0,84	0,83	0,84	0,84	0,84	1,39	0,76	0,97	0,99	1,69
Sólidos solúveis totais (%)	14,00	20,87	18,57	22,00	15,95	15,98	12,37	18,43	15,76	14,58	21,00
pH	3,50	3,98	3,74	3,90	3,98	3,83	3,74	3,86	3,88	4,02	3,30
Peso (g)	9,60	2,63	2,30	1,72	1,80	2,07	2,29	1,35	2,13	1,42	2,06
Diâmetro (mm)	21,48	13,54	12,11	9,60	12,25	13,40	12,70	11,79	11,22	11,69	13,97

\*ND= não detectado

A correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ) mostrou informações relevantes sobre o efeito das características físico-químicas das uvas na incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus* (Tabela 5) e *Penicillium* (Tabela 6).

Todas as espécies identificadas neste estudo pertencentes ao gênero *Aspergillus*, exceto *A. flavus*, apresentaram correlação positiva com pelo menos uma variável avaliada.

*Aspergillus aculeatus* demonstrou correlação positiva com o parâmetro de cor Chroma (0,55), que é a relação entre os valores de  $a^*$  e  $b^*$ , com o qual se obtém a cor real da amostra. Já *A. carbonarius* apresentou correlação positiva com o teor de pectina total (0,69). Correlação positiva também foi evidenciada entre a espécie *A. niger* e a atividade antioxidante medida pelo método de ABTS (0,75).

*Aspergillus niger* Agregado e *A. sojae* confirmaram correlação positiva com os teores de acidez total, 0,74 e 0,77, respectivamente. Além disto, uma correlação positiva também foi observada entre a espécie *A. sojae* e o parâmetro de cor  $a^*$  (0,50) que expressa o grau de variação entre o vermelho e o verde ( $a^*$  mais negativo = mais verde;  $a^*$  mais positivo = mais vermelha). A presença de tons de cores com uma maior contribuição de cor vermelha é comumente associada com uma maior porcentagem de antocianinas.

Apenas as espécies *P. decumbens*, *P. citrinum* e *P. sclerotiorum*, pertencentes ao gênero *Penicillium*, apresentaram correlação com as características físico-químicas. As espécies *P. glabrum*, *P. implicatum* e *P. solitum* não obtiveram correlação.

*P. decumbens* correlacionou-se positivamente com o teor de pectina total (0,66) e sólidos solúveis totais (0,50). Já *P. citrinum* alcançou correlação positiva com atividade antioxidante medida pelo método ABTS (0,54) e teores de açúcares totais (0,53). Correlação positiva entre *P. sclerotiorum* e teores de antocianinas também foi encontrada, sendo esta a maior correlação observada (0,92).

Tabela 5 Análise de correlação de Pearson, correlacionando as características físico-químicas e a presença de espécies do gênero *Aspergillus* nas uvas (*Vitis vinifera* L.)

Características físico-químicas	<i>A. aculeatus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> Agregado	<i>A. flavus</i>	<i>A. sojae</i>
Atividade antioxidante-DPPH	0,1125974	-0,5122948	0,3851516	-0,030459	0,08840622	-0,06753027
Atividade antioxidante-ABTS	-0,01757712	-0,07624012	0,7569257*	-0,1082873	-0,0207732	-0,1659477
Compostos Fenólicos Totais	-0,2278191	0,3612777	0,2755516	-0,09101186	-0,1804208	-0,05992985
Antocianinas	0,03583473	0,4620449	-0,1728603	0,1200564	-0,2539379	-0,05265123
Açúcares totais	-0,1409781	-0,5011004	0,1844534	-0,02418371	0,1970005	-0,1899065
Pectina Solúvel	0,2837701	-0,1044284	0,04272867	0,4395531	-0,08483105	0,4201572
Pectina Total	0,07089821	0,6921479*	0,163663	0,2182807	-0,2051257	0,3524532
Solubilização das pectinas	0,2822927	-0,5239138	-0,06892437	0,3241954	0,0304964	0,1713844
L*	0,4910977	0,03071649	-0,4054053	-0,2593333	0,05632458	-0,2885031
a*	-0,2766999	0,1784187	-0,07486773	0,3247715	-0,3480111	0,5055028*
b*	0,4755787	0,1079294	-0,4614858	-0,2964231	0,06815683	-0,3078767
Chroma	0,5527904*	0,1461168	-0,5318797	-0,08553254	0,03455098	-0,07178006
Tonalidade	-0,2305772	-0,1232694	0,4761207	0,288523	-0,08849886	0,3229777
Acidez total	0,08284941	0,05061407	-0,1187733	0,7451955*	0,201038	0,772943*
Sólidos solúveis totais	-0,07324649	0,04178194	0,323754	0,3817104	-0,2549064	0,4020973
Ph	0,0801428	-0,165983	0,3410034	-0,6509208	-0,07885862	-0,6911641
Peso	-0,1685295	0,3095212	-0,3210762	-0,2438591	-0,1530019	-0,1254105
Diâmetro	-0,2183126	0,08804441	-0,3143084	-0,1222793	-0,1714172	-0,0213274

\* correlações significativas a  $p < 0,05$

Tabela 6 Análise de correlação de Pearson, correlacionando as características físico-químicas e a presença de espécies do gênero *Penicillium* nas uvas (*Vitis vinifera* L.)

<b>Características físico-químicas</b>	<i>P. decumbens</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>P. glabrum</i>	<i>P. sclerotiorum</i>	<i>P. implicatum</i>	<i>P. solitum</i>
Atividade antioxidante-DPPH	0,1910055	0,1193208	0,2011789	0,06049087	0,2608816	0,2738106
Atividade antioxidante-ABTS	0,2774481	0,5439395*	0,3042732	0,2330235	0,178391	0,3643432
Compostos Fenólicos Totais	0,5789561	0,09997005	0,1823557	0,2230168	-0,01849936	0,1897496
Antocianinas	0,4668133	0,5425089	0,5478802	0,9184943*	-0,2996231	0,4035267
Açúcares totais	-0,1192058	0,5309605*	0,4566208	0,34839354	0,4642874	0,4162248
Pectina Solúvel	0,361999	-0,02883554	0,04609737	0,28631334	-0,2482918	-0,04127967
Pectina Total	0,6652656*	-0,4183958	-0,2565082	0,02436504	-0,1718397	-0,1811402
Solubilização das pectinas	-0,05280198	0,3909442	0,2965089	0,45488509	-0,2016667	0,1216816
L*	-0,3865768	-0,1456794	-0,3073072	-0,05234589	-0,2608152	-0,2144206
a*	0,2136979	-0,4789744	-0,1527434	-0,35555029	-0,1122544	-0,1487237
b*	-0,302454	-0,1803714	-0,3565515	-0,01894272	-0,3063385	-0,3249493
Chroma	-0,1468276	-0,2999559	-0,3780122	0,02198129	-0,42074	-0,4513514
Tonalidade	0,286774	-0,06961385	0,2237567	-0,04055775	0,2925221	0,2473929
Acidez total	-0,1611824	-0,3629124	-0,1783176	-0,28386706	-0,2296731	-0,3042737
Sólidos solúveis totais	0,5058866*	-0,03332665	0,2717267	0,204762	0,4305634	0,3885816
pH	0,1788327	0,3021259	-0,03361061	0,26157096	0,2491606	0,3082655
Peso	-0,1576116	-0,3914284	-0,3135275	-0,36222127	-0,1140306	-0,1958472
Diâmetro	-0,2844825	-0,328818	-0,2730869	-0,38013142	-0,105784	-0,1481944

\* correlações significativas a  $p < 0,05$

Devido à grande relevância dos compostos fenólicos presentes nas uvas, o teor de 19 destes, dentre os mais importantes, foram avaliados (Tabela 7).

Na variedade Moscato Itália foi detectada apenas a presença do flavanol procianidina B1 e na amostra Moscato Canelli 1 observou-se apenas a presença dos flavanóis (+)-catequina e procianidina B2. Já na amostra Moscato Canelli 2 foi observado o composto flavanol caempferol-3-O-glicosídeo e os flavanóis procianidina B1 e (+)-catequina, sendo este um dos principais compostos fenólicos responsáveis pelo sabor e adstringência das uvas (ABE et al., 2007).

As antocianinas não foram identificadas nas variedades brancas, como era de se esperar, devido à ausência de coloração vermelha azulada nestas uvas. No entanto, estas representam a maioria dos compostos encontrados em todas as variedades tintas, variando de 52,69% (Barbera) a 83,86% (Ruby Cabernet) do total dos fenólicos de cada variedade, exceto nas amostras Syrah 3 e Tempranillo, em que o maior teor de compostos fenólicos detectado pertence a classe dos flavanóis, representando 52,36 e 50,99% do total dos fenólicos, respectivamente. Já os compostos flavanóis procianidina B1 e (+)-catequina estiveram presentes na maioria das amostras.

O maior número de compostos fenólicos foi encontrado na variedade Touriga Nacional, sendo esta a variedade mais contaminada por fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*.

A variação no teor de compostos fenólicos detectados nas uvas viníferas está relacionada a diferentes cultivares, tipo de solo, condições climáticas, época da colheita e práticas agrícolas adotadas (GRANATO; KATAYAMA; CASTRO, 2011; PORGALI; BUYUKTUNCEL, 2012). Sendo que cada cultivar apresenta uma composição fenólica peculiar (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009; NATIVIDADE et al., 2013) e a acumulação destes pode estar relacionada a um mecanismo de resposta da planta a um estresse químico, microbiológico e hídrico; irradiação da luz; disponibilidade de carbono e à temperatura ambiente (DELOIRE et al., 2004; VIAN et al., 2006).

Tabela 7 Concentração de compostos fenólicos presentes nas variedades de uvas viníferas da região do Vale do Submédio São Francisco

Compostos fenólicos (mg/L)	Variedades de uvas ( <i>Vitis vinifera L.</i> )*										
	Moscato Itália	Syrah 1	Syrah 2	Touriga Nacional	Syrah 3	Moscato Canelli 1	Moscato Canelli 2	Ruby Cabernet	Chenin Blanc	Tempranillo	Barbera
<b>Flavanóis</b>											
(+)-Catequina	< LQ	1,68	2,12	3,02	3,72	1,43	5,50	1,43	2,13	1,51	3,49
(-)-Epicatequina	ND	1,19	0,97	2,84	2,90	ND	< LQ	1,03	<LQ	< LQ	1,46
(-)-Galato epicatequina	ND	0,44	< LQ	3,68	0,47	ND	< LQ	0,52	< LQ	ND	< LQ
(-)-Galato epigalocatequina	ND	0,35	1,14	1,84	0,59	ND	< LQ	2,11	ND	0,33	2,39
Procianidina A2	ND	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Procianidina B1	0,84	0,88	0,94	2,32	1,35	< LQ	1,01	2,25	0,79	7,22	2,30
Procianidina B2	ND	2,84	3,11	5,01	10,92	3,92	ND	2,01	ND	1,21	2,23
<b>∑ Flavanóis</b>	<b>0,84</b>	<b>7,38</b>	<b>8,28</b>	<b>18,71</b>	<b>19,95</b>	<b>5,35</b>	<b>6,51</b>	<b>9,35</b>	<b>2,92</b>	<b>10,27</b>	<b>11,87</b>
<b>Flavonóis</b>											
Caempferol-3-O- glicosídeo	< LQ	0,91	0,10	0,20	0,36	ND	0,31	0,32	0,62	ND	1,27
Rutina	ND	0,42	0,28	0,33	0,29	ND	< LQ	< LQ	ND	ND	0,42
Quercetina	ND	ND	ND	< LQ	ND	ND	ND	ND	< LQ	ND	ND
Isohamnetina-3-O- glicosídeo	ND	2,24	0,96	2,06	1,30	ND	< LQ	0,48	0,25	0,18	0,74
Miricetina	ND	0,55	0,37	0,67	0,36	ND	< LQ	0,63	0,11	0,12	0,26
<b>∑ Flavonóis</b>	<b>-</b>	<b>4,12</b>	<b>1,71</b>	<b>3,26</b>	<b>2,31</b>	<b>-</b>	<b>0,31</b>	<b>1,43</b>	<b>0,98</b>	<b>0,30</b>	<b>2,69</b>

Tabela 7, conclusão

Compostos fenólicos (mg/L)	Variedades de uvas ( <i>Vitis vinifera L.</i> )*										
	Moscato Itália	Syrah 1	Syrah 2	Touriga Nacional	Syrah 3	Moscato Canelli 1	Moscato Canelli 2	Ruby Cabernet	Chenin Blanc	Tempranillo	Barbera
<b>Antocianinas</b>											
Malvidina-3-O- glicosídeo	ND	13,42	20,18	36,67	12,38	ND	ND	39,22	ND	7,55	11,36
Cianidina-3-O- glicosídeo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Delfinidina-3-O- glicosídeo	ND	1,44	3,73	5,12	0,99	ND	ND	12,00	ND	1,10	1,79
Peonidina-3-O- glicosídeo	ND	3,00	6,90	11,29	2,01	ND	ND	4,79	ND	0,92	3,07
<b>Σ Antocianinas</b>	<b>-</b>	<b>17,86</b>	<b>30,81</b>	<b>53,08</b>	<b>15,38</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>56,01</b>	<b>-</b>	<b>9,57</b>	<b>16,22</b>
<b>Ácidos fenólicos</b>											
Ácido gálico	ND	<LQ	ND	0,46	0,46	<LQ	<LQ	ND	ND	<LQ	<LQ
Ácido p-cumárico	ND	ND	0,44	0,71	<LQ	ND	<LQ	<LQ	ND	ND	<LQ
<b>Σ Ácidos fenólicos</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>0,44</b>	<b>1,17</b>	<b>0,46</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Estilbenos</b>											
<i>Trans</i> -resveratrol	ND	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

\*ND= não detectado

A análise de correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ) também foi realizada para avaliar a influência dos compostos fenólicos presentes nas uvas viníferas na incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus* (Tabela 8) e *Penicillium* (Tabela 9).

Todas as espécies identificadas neste estudo pertencentes ao gênero *Aspergillus*, exceto *A. flavus*, apresentaram correlação com pelo menos um composto fenólico avaliado.

*Aspergillus aculeatus* obteve correlação positiva com o flavanol quercetina (0,57). Já *A. niger* correlacionou-se positivamente com os flavanóis (-)-epicatequina (0,75), procianidina A2 (0,68) e procianidina B2 (0,80); com os flavonóis rutina (0,68) e isohamnetina-3-O-glicosídeo (0,72) e com o ácido fenólico ácido gálico (0,73).

*Aspergillus sojae* e *A. niger* Agregado demonstraram uma correlação positiva com o flavanol (-)-galato epigallocatequina de 0,58 e 0,65, e com o flavanol caempferol-3-O-glicosídeo de 0,73 e 0,70, respectivamente. Por sua vez, *A. carbonarius* apresentou uma correlação positiva com o flavanol (-)-galato epicatequina (0,56).

Todas as espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* apresentaram correlação com os compostos fenólicos avaliados neste estudo.

*Penicillium decumbens* foi a espécie que obteve um maior número de correlações. Correlacionou-se positivamente com os flavanóis (-)-epicatequina (0,60), (-)-galato epicatequina (0,98), procianidina A2 (0,54) e procianidina B2 (0,70); com os flavonóis quercetina (0,60) e isohamnetina-3-O-glicosídeo (0,54), com as antocianinas malvidina-3-O-glicosídeo (0,56) e peonidina-3-O-glicosídeo (0,78) e com o ácido fenólico ácido p-cumárico (0,82). Já *P. citrinum* alcançou correlação positiva apenas com a antocianina delphinidina-3-O-glicosídeo (0,55).

Uma correlação positiva também foi evidenciada entre a espécie *P. glabrum* e as antocianinas delphinidina-3-O-glicosídeo (0,65) e malvidina-3-O-glicosídeo (0,54) e com o flavanol (-)-galato epigallocatequina (0,58). Correlação positiva entre *P. sclerotiorum* e as antocianinas delphinidina-3-O-glicosídeo (0,65) e malvidina-3-O-glicosídeo (0,54) também foi encontrada.

*Penicillium implicatum* obteve correlação positiva com os flavonóis rutina (0,54) e isohamnetina-3-O-glicosídeo (0,61) e com o estilbeno *trans*-resveratrol (0,70). Já *P. solitum* apresentou correlação somente com a antocianina delphinidina-3-O-glicosídeo (0,60) e o estilbeno *trans*-resveratrol (0,78).

Tabela 8 Análise de correlação de Pearson, correlacionando os compostos fenólicos e a presença de espécies do gênero *Aspergillus* nas uvas (*Vitis vinifera* L.)

Compostos fenólicos	<i>A. aculeatus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> Agregado	<i>A. flavus</i>	<i>A. sojae</i>
<b>Flavanóis</b>						
(+)-Catequina	0,02	-0,18	0,39	0,28	0,49	0,25
(-)-Epicatequina	-0,08	0,16	0,75*	0,02	-0,18	0,12
(-)-Galato epicatequina	-0,14	0,56*	0,19	-0,13	-0,14	-0,06
(-)-Galato epigalocatequina	-0,19	-0,01	0,04	0,65*	-0,11	0,58*
Procianidina A2	0,11	0,15	0,68*	-0,05	-0,08	0,03
Procianidina B1	-0,19	-0,12	-0,23	0,01	-0,22	0,08
Procianidina B2	-0,13	-0,08	0,80*	-0,16	-0,22	-0,07
<b>Flavonóis</b>						
Caempferol-3-O-glicosídeo	0,34	-0,31	0,28	0,70*	-0,21	0,73*
Rutina	-0,17	-0,09	0,68*	0,41	-0,03	0,48
Quercetina	0,57*	0,23	0,26	-0,03	-0,16	0,09
Isohamnetina-3-O-glicosídeo	-0,16	0,11	0,72*	-0,09	-0,15	0,00
Miricetina	-0,21	0,04	0,43	0,02	-0,13	-0,04
<b>Antocianinas</b>						
Malvidina-3-O-glicosídeo	-0,28	0,11	0,16	0,07	-0,09	-0,03
Cianidina-3-O-glicosídeo	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Delfinidina-3-O-glicosídeo	-0,22	-0,05	-0,12	0,14	-0,07	-0,05
Peonidina-3-O-glicosídeo	-0,27	0,30	0,24	0,02	0,08	0,01
<b>Ácidos fenólicos</b>						
Ácido gálico	-0,15	0,10	0,73*	0,15	-0,20	0,32
Ácido p-cumárico	-0,22	0,42	0,22	-0,04	0,28	0,00
<b>Estilbenos</b>						
<i>Trans</i> -resveratrol	-0,27	-0,11	0,49	-0,15	-0,02	-0,24

\* correlações significativas a  $p < 0,05$

Tabela 9 Análise de correlação de Pearson, correlacionando os compostos fenólicos e a presença de espécies do gênero *Penicillium* nas uvas (*Vitis vinifera* L.)

<b>Compostos fenólicos</b>	<i>P. decumbens</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>P. glabrum</i>	<i>P. sclerotiorum</i>	<i>P. implicatum</i>	<i>P. solitum</i>
<b>Flavanóis</b>						
(+)-Catequina	0,15	0,04	-0,01	-0,05	-0,18	-0,28
(-)-Epicatequina	0,60*	0,17	-0,06	0,09	0,00	-0,01
(-)-Galato epicatequina	0,98*	-0,07	-0,01	0,44	-0,07	-0,05
(-)-Galato epigalocatequina	0,38	0,21	0,58*	0,34	-0,10	0,23
Procianidina A2	0,54*	0,10	-0,22	0,06	-0,16	-0,23
Procianidina B1	0,08	-0,23	-0,07	-0,11	-0,23	-0,07
Procianidina B2	0,23	0,45	-0,08	0,00	0,00	-0,08
<b>Flavonóis</b>						
Caempferol-3-O-glicosídeo	-0,15	-0,33	-0,11	-0,27	0,30	0,29
Rutina	0,29	-0,16	0,03	-0,24	0,54*	0,27
Quercetina	0,60*	-0,39	-0,23	0,01	0,14	-0,14
Isohammetina-3-O-glicosídeo	0,54*	-0,13	-0,09	-0,04	0,61*	0,37
Miricetina	0,52	0,25	0,43	0,36	0,38	0,61
<b>Antocianinas</b>						
Malvidina-3-O-glicosídeo	0,56*	0,39	0,54*	0,54*	-0,09	0,47
Cianidina-3-O-glicosídeo	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Delfinidina-3-O-glicosídeo	0,25	0,55*	0,65*	0,65*	-0,02	0,60*
Peonidina-3-O-glicosídeo	0,78*	0,09	0,35	0,35	0,18	0,14
<b>Ácidos fenólicos</b>						
Ácido gálico	0,48	-0,19	-0,18	-0,18	0,12	-0,11
Ácido p-cumárico	0,82*	0,01	0,26	0,26	0,00	-0,23
<b>Estilbenos</b>						
<i>Trans</i> -resveratrol	0,21	0,28	0,42	0,20	0,70*	0,78*

\* correlações significativas a  $p < 0,05$

Jiang, Shi e Zhu (2013) detectaram danos às bagas e acúmulo de ocratoxina A mais rápido na variedade Thompson Seedless, intermediário na Kyoho, e mais lenta nas uvas Red Terra. Ao longo do período de incubação, observaram a diminuição nos teores de açúcares e de sólidos solúveis em algumas variedades, possivelmente consumidos por *A. carbonarius*, e o aumento destes componentes em outras, possivelmente devido à hidrólise de polissacarídeos (amido e pectina), o que demonstra a capacidade de degradação destes fungos e a diferença na suscetibilidade das variedades.

Concomitantemente, o presente estudo demonstra a existência de uma correlação positiva entre algumas características físico-químicas das variedades de uvas viníferas e a incidência de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* nestas. Portanto, deduz-se que quanto maior o valor do parâmetro físico-químico correlacionado, maior a incidência da espécie.

Podemos inferir que os teor de açúcares totais presentes na amostra Moscato Canelli 1 favorecem a incidência da espécie *P. citrinum*. Espécie esta também favorecida pela atividade antioxidante presente na amostra Syrah 3 e na variedade Ruby Cabernet.

Segundo Magan (2007), fungos micotoxigênicos possuem um mecanismo de adaptação a diferentes ambientes se tornando bons competidores. Isto ocorre devido à sua capacidade de produzir um complexo enzimático, responsável pela degradação de substratos específicos, e a produção de metabolitos secundários e voláteis (MEDINA, 2015).

O crescimento e a produção de metabólitos por fungos filamentosos, geralmente, são uma resposta às condições físico-químicas do substrato que está inserido. Em estudo *in vitro*, a produção de enzimas extracelulares por *P. janczewskii* foi influenciada pela fonte de carbono, sendo que a presença de frutose no meio de cultura estimulou a liberação da enzima p-

fructofuranosidases, o que favoreceu o crescimento desta espécie (PESSONI et al., 2015).

A presença dos compostos (-)-epicatequina, (-)-galato epicatequina, procianidina A2, quercetina, isohamnetina-3-O-glicosídeo, malvidina-3-O-glicosídeo, peonidina-3-O-glicosídeo, ácido p-cumárico, a porcentagem de sólidos solúveis totais e o teor de pectina total podem ter favorecido a incidência de *P. decumbens* na variedade Touriga Nacional. O teor de pectina também está relacionado com a presença de *A. carbonarius* nesta mesma variedade e na variedade Moscato Itália.

Espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* são reconhecidas como as principais produtoras de pectinases (SANDRI et al., 2011), o que confirma a capacidade de degradação de pectinas por fungos filamentosos, e portanto o seu desenvolvimento em substratos com maiores teores de pectinas. Porém, Teixeira, Lima Filho e Duran (2000), em ensaio *in vitro*, descreveram uma inibição na produção de pectinases por *Aspergillus japonicus*, quando as concentrações de glicose, sacarose e pectina estavam em excesso.

O principal grupo contaminante da variedade Barbera foi *A. niger* Agregado. Os compostos fenólicos (-)-galato epigalocatequina, caempferol-3-O-glicosídeo e a acidez total podem estar relacionados com essa contaminação. *A. sojae* esteve presente apenas nesta variedade e também possui correlação com estes mesmos parâmetros avaliados.

Lorenzini et al. (2012) ao infectarem uvas com *Botrytis cinera* e cepas nativas das uvas relataram uma diminuição de ácido tartárico devido à degradação causada pelos fungos presentes.

Em estudo avaliando o crescimento de *A. carbonarius* inoculados em uvas, Lasram et al. (2012) observaram uma maior produção de ocratoxina A em uvas com maior acidez e menor teores de açúcares, o que sugere que os ácidos presentes nas uvas podem favorecer o crescimento fúngico. Em contraste, a

inibição de *P. commune*, *in vitro*, por ácidos orgânicos foi relatada por Zhang et al. (2005). Estes resultados confirmam as diferentes relações existentes entre as espécies fúngicas e as características físico-químicas do substrato.

A amostra Syrah 1 exibiu concentrações consideráveis de isohamnetina-3-O-glicosídeo, o que pode estar associado com incidência de *P. implicatum* nesta variedade. Já a maior incidência de *A. niger* ocorreu na amostra Syrah 3. Tal variedade apresentou altos valores dos compostos fenólicos (-)-epicatequina e Procianidina B2 e atividade antioxidante.

O maior número de isolados pertencentes à espécie *A. aculeatus* foi encontrado na variedade Chenin Blanc, uma variedade branca. Tal espécie apresentou correlação positiva com o parâmetro de cor Chroma que é um parâmetro relacionado com a intensidade da cor. Tal resultado sugere a preferência de *A. aculeatus* por uvas brancas.

A presença do composto delphinidina-3-O-glicosídeo na variedade Ruby Cabernet pode estar relacionada com a maior incidência das espécies *P. glabrum*, *P. citrinum*, *P. sclerotiorum* e *P. solitum* nesta variedade. Os teores de antocianinas totais também podem estar associados à infecção das bagas por *P. sclerotiorum*. Já os compostos (-)-galato epigalocatequina e malvidina-3-O-glicosídeo podem ter favorecido o crescimento de *P. glabrum* nesta variedade.

Os compostos fenólicos são considerados os principais antioxidantes de plantas medicinais, cogumelos, óleos essenciais, especiarias, frutos, e vegetais (MOKBEL; HASHINAGA, 2006), além de possuírem capacidade inibitória ao crescimento microbiano (LI et al., 2007; ORTUÑO et al., 2006). Porém, tal inibição encontra-se estritamente relacionada com a espécie e a concentração em que se encontra no substrato. Wu et al. (2014) relatam que a inibição do crescimento de *A. niger* por flavonóis polimetoxilados é mais eficiente do que a de *P. corylophilum*.

Em avaliação da inibição da produção de ocratoxina A por compostos fenólicos, Palembo, O’Keeffe e Mahoney (2007), evidenciaram uma forte inibição da produção de OTA por *A. albertensis* na presença de catequina (87-94%) e ácido gálico (57-87%). Em contraste, *A. melleus* na presença de catequina produziu de 5 a 8 vezes mais OTA do que no controle. Estes autores destacam que, apesar de café e uvas serem fontes de compostos antioxidantes, estes substratos também são comumente colonizados por espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, o que indica que o papel dos antioxidantes e produção de micotoxinas na ecologia dos fungos é bastante complexo.

Santos Júnior et al. (2014) observaram a inibição do crescimento de *A. ochraceus* inoculados em grãos de café pelos compostos fenólicos Guaijaverin, Quercetina 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopiranosídeo, Quercetina 3-O-robinobioside e Rutina. Entretanto, Tranchimand, Brouant e Iacazio (2010) relatam a capacidade de espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* de metabolizar flavonóis, sendo estes a única fonte de carbono.

Neste trabalho, uma correlação positiva entre diversos compostos fenólicos e espécies fúngicas foi observada, o que nos leva a acreditar que tais espécies possuem capacidade de metabolizar estes compostos. Além disto, a maior concentração destes compostos nas variedades avaliadas pode estar relacionada com o mecanismo de defesa das uvas frente ao estresse causado pela colonização por fungos. Estes resultados demonstram o efeito das diferentes variedades de uvas na incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. No entanto, diferentes correlações foram observadas para uma mesma variedade de uva (Syrah e Moscato Canelli). Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que a composição química não depende apenas da variedade, mas também da qualidade da planta, a origem geográfica, das condições climáticas e de fatores ambientais e tecnológicos (MARTÍNEZ-ÁVILA et al., 2012).

#### 4 CONCLUSÃO

O efeito quantitativo das características físico-químicas das variedades de uvas viníferas na presença de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* é bastante difícil de demonstrar devido à forte inter-relação existente entre elas e demais fatores de influência na contaminação fúngica. Porém, o conhecimento destas relações pode auxiliar na adoção de estratégias adequadas de gestão do vinhedo, que podem contribuir para a redução destes fungos e da presença de micotoxinas em uvas e derivados, já que algumas espécies relatadas neste estudo foram potencialmente toxigênicas.

O maior número de compostos fenólicos foi detectado na variedade Touriga Nacional, sendo esta a variedade mais contaminada por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Todas as espécies identificadas neste estudo apresentaram uma correlação positiva com pelo menos um parâmetro físico-químico avaliado, destacando-se os teores de pectina, açúcares totais, acidez total e compostos fenólicos.

## REFERÊNCIAS

ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 394–400, 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of the Association of the Agricultural Chemists**. 19th ed. Washington, 2012. 1410 p.

BATTILANI, P. et al. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 1736-1740, 2004.

BAU, M. et al. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, p. 125-130, 2005.

BIBLE, B. B.; SINGHA, S. Canopy position influences CIELab coordinates of peach color. **Hortscience**, Alexandria, v. 28, p. 992-993, 1997.

BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 4, n. 4, p. 330-334, 1973.

CASTILLO-MUÑOZ, N. et al. Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* cv. Petit Verdot red wine grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 209–219, 2009.

CORRÊA, L. C. et al. Desenvolvimento e validação de metodologia para a determinação de compostos fenólicos em vinhos brancos e tintos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CROMATOGRAFIA E TÉCNICAS RELACIONADAS, 14., 2012, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: [s. n.], 2012. p. 320.

DELOIRE, A. et al. Vine and water: a short review. **Journal International des Sciences de la Vigne et du vin**, Villenave d'Ornon, v. 38, n. 1, p. 1-13, 2004.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAN, M. L. (Ed.). **Carbohydrates chemistry**. New York: Academic, 1962. v. 1, p. 477-512.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 128-130, 1980.

FLORES, M. A. D.; FLORES, A. **Diagnóstico do enoturismo brasileiro**. Bento Gonçalves: IBRAVIN, 2012. 62 p.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins: characterization and measurement with uv-visible spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: J. Wiley, 2001. cap. 1, p. 1- 13.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F.; CASTRO, I. A. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. **Food Chemistry**, Easton, v. 129, p. 366–373. 2011.

JIANG, C.; SHI, J.; ZHU, C. Fruit spoilage and ochratoxin a production by *Aspergillus carbonarius* in the berries of different grape cultivars. **Food Control**, Guildford, v. 30, p. 93-100, 2013.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: CBS, 2002. 116 p.

LASRAM, S. et al. Growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* at different pHs and grape maturation stages. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 54, p. 418–424, 2012.

LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. Implantação do vinhedo. In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. S. (Ed.). **A vitivinicultura no Semiárido brasileiro**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica; Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 756 p.

LI, S. et al. Isolation and syntheses of polymethoxy flavones and hydroxylated polymethoxy flavones as inhibitors of HL-60 cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v.15, n. 10, p. 3381- 3389, 2007.

LORENZINI, M. et al. Postharvest grape infection of *Botrytis cinerea* and its interactions with other moulds under withering conditions to produce noble-rotten grapes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 114, p. 762-770, 2012.

MAGAN, N. Fungi in extreme environments. In: KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. (Ed.). **Environmental and microbial relationships: the mycota IV**. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer, 2007. p. 85–103.

MARTÍNEZ-ÁVILA, G. C. et al. Fungal enhancement of the antioxidant properties of grape waste. **Annales de Microbiologie**, Paris, v. 62, p. 923–930, 2012.

MEDINA, A. et al. Impacts of environmental stress on growth, secondary metabolite biosynthetic gene clusters and metabolite production of xerotolerant/xerophilic fungi. **Current genetics**, New York, v. 61, p. 325-334, 2015.

MCCREADY, P. M.; MCCOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic material. **Analytical Chemistry**, New York, v. 24, n. 12, p. 1586-1588, 1952.

MOHAMED, S et al. An extension of the Coconut Cream Agar method to screen *Penicillium citrinum* isolates for citrinin production. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 214-219, 2013.

MOKBEL, M. S.; HASHINAGA, F. Evaluation of the antioxidante activity of extracts from Buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. **Food Chemistry**, Barking, v. 94, p. 529-534, 2006.

NATIVIDADE, M. M. P. et al. Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: Method validation and characterization of São Francisco Valley samples. **Microchemical Journal**, New York, v.110, p. 665–674, 2013.

ORTUÑO, A. et al. Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, Easton, v. 98, n. 2, p. 351-358, 2006.

PALUMBO, J. D.; O'KEEFFE, T. L.; MAHONEY, N. E. Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. **Mycopathologia**, The Hague, v. 164, p. 241–248, 2007.

PESSONI, R. A. B. et al. Fructose affecting morphology and inducing  $\beta$ -fructofuranosidases in *Penicillium janczewskii*. **SpringerPlus**, London, v. 4, n. 487, p. 1-11, 2015.

PITT, J. I. **A laboratory guide to Common Penicillium Species**. Sydney: Food Science Australia. 2000. 187 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 593 p.

PORGALI, E.; BUYUKTUNCEL, E. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. **Food Research International**, Essex, v. 45, p. 145–154, 2012.

RUFINO, M. S.M. et al. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Brasília: Embrapa, 2007a. (Comunicado Técnico, 126 ).

RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Brasília: Embrapa, 2007b. (Comunicado Técnico, 127).

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food-borne fungi**. 4th ed. Centraalbureau: Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000.

SANDRI, I. G. et al. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 44, p. 2217–2222, 2011.

SANTOS JÚNIOR, H. M. et al. Antifungal activity of flavonoids from *Heteropterys byrsonimifolia* and a commercial source against *Aspergillus ochraceus*: In silico interactions of these compounds with a protein kinase. **Crop Protection**, Guildford, v. 62, p. 107-114, 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-hosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 20, n. 2, p. 144-158, 1965.

TEIXEIRA, M. F. S.; LIMA FILHO, J. L.; DURAN, N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 286-290, 2000.

TRANCHIMAND, S.; BROUANT, P.; IACAZIO, G. The rutin catabolic pathway with special emphasis on quercetinase. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 21, p. 833-859, 2010.

VIAN, M. A. et al. Comparison of the Anthocyanin composition during ripening of syrah grapes grown using organic or conventional agricultural practices.

**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 5230-5235, 2006.

WU, T. et al. Antifungal action and inhibitory mechanism of polymethoxylated flavones from *Citrus reticulata* Blanco peel against *Aspergillus niger*. **Food Control**, Guildford, v. 35, p. 354-359, 2014.

ZHANG, Z. et al. Weak organic acids and inhibitors of pH Homeostasis Suppress Growth of *Penicillium* Infesting Litchi Fruits. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p. 667-673, 2005.

## APÊNDICE

Fungos identificados neste trabalho depositados na Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos:

<b>CÓDIGO</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>DEPÓSITO</b>
CCDCA10614	<i>A. carbonarius (+)</i>	MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	20/01/2016
CCDCA10615	<i>A. carbonarius (+)</i>	MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	20/01/2016
CCDCA10616	<i>A. aculeatus</i>	MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	20/01/2016
CCDCA10617	<i>A. niger</i>	SYRAH	CASA NOVA – BA	20/01/2016
CCDCA10618	<i>A. niger</i>	SYRAH	CASA NOVA – BA	20/01/2016
CCDCA10619	<i>A. aculeatus</i>	SYRAH	CASA NOVA – BA	20/01/2016
CCDCA10620	<i>A. niger</i>	SYRAH	CASA NOVA – BA	20/01/2016
CCDCA10621	<i>A. niger</i>	SYRAH	CASA NOVA – BA	20/01/2016
CCDCA10622	<i>A. flavus</i>	SYRAH	CASA NOVA – BA	20/01/2016
CCDCA10623	<i>A. flavus</i>	SYRAH	CASA NOVA – BA	20/01/2016
CCDCA10624	<i>A. carbonarius (+)</i>	TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10625	<i>A. carbonarius (+)</i>	TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10626	<i>A. niger</i>	TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10627	<i>A. niger</i>	TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10628	<i>A. carbonarius (+)</i>	TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10629	<i>A. carbonarius (+)</i>	TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10630	<i>A. aculeatus</i>	TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10631	<i>A. niger</i>	SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016

<b>CÓDIGO</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>DEPÓSITO</b>
CCDCA10632	<i>A. carbonarius (+)</i>	SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10633	<i>A. niger</i>	SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10634	<i>A. carbonarius (+)</i>	SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10635	<i>A. aculeatus</i>	SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10636	<i>A. aculeatus</i>	SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10637	<i>A. niger</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10638	<i>A. carbonarius (+)</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10639	<i>A. niger</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10640	<i>A. niger</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10641	<i>A. flavus</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10642	<i>A. flavus</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10643	<i>A. carbonarius (+)</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10644	<i>A. carbonarius (+)</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10645	<i>A. aculeatus</i>	RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10646	<i>A. aculeatus</i>	CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10647	<i>A. aculeatus</i>	CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10648	<i>A. carbonarius (+)</i>	CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10649	<i>A. carbonarius (+)</i>	CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10650	<i>A. niger</i>	CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10651	<i>A. niger</i>	CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10652	<i>A. niger</i>	BARBERA	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10653	<i>A. niger</i>	BARBERA	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10654	<i>A. carbonarius (+)</i>	BARBERA	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10655	<i>A. aculeatus</i>	BARBERA	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10656	<i>A. aculeatus</i>	BARBERA	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016

<b>CÓDIGO</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>DEPÓSITO</b>
CCDCA10657	<i>A. carbonarius (+)</i>	CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10658	<i>A. carbonarius (+)</i>	CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10659	<i>A. niger</i>	CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10660	<i>A. niger</i>	CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10661	<i>A. niger</i>	TEMPRANILLO	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10662	<i>A. niger</i>	TEMPRANILLO	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10444	<i>A. carbonarius (+)</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10445	<i>A. niger</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10446	<i>A. niger</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10447	<i>A. carbonarius (+)</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10448	<i>A. aculeatus</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10449	<i>A. aculeatus</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10450	<i>A. niger</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10451	<i>A. carbonarius (+)</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10452	<i>A. carbonarius (+)</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10453	<i>A. sojae</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10454	<i>A. sojae</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10455	<i>A. niger (+)</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10456	<i>A. flavus</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10457	<i>A. niger</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10458	<i>A. aculeatus</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10459	<i>A. aculeatus</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10460	<i>A. japonicus</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10461	<i>A. japonicus</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10462	<i>A. niger (+)</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA – BA	15/09/2015

<b>CÓDIGO</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>DEPÓSITO</b>
CCDCA10463	<i>A. niger (+)</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA – BA	15/09/2015
CCDCA10464	<i>A. aculeatus</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA - BA	15/09/2015
CCDCA10465	<i>A. niger</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA - BA	15/09/2015
CCDCA10466	<i>A. carbonarius (+)</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA - BA	15/09/2015
CCDCA10467	<i>A. aculeatus</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA - BA	15/09/2015
CCDCA10468	<i>A. sojae</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA - BA	15/09/2015
CCDCA10469	<i>A. carbonarius (+)</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA - BA	15/09/2015
CCDCA10470	<i>A. niger (+)</i>	SOLO TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10471	<i>A. niger</i>	SOLO TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10472	<i>A. sojae</i>	SOLO TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10473	<i>A. aculeatus</i>	SOLO TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10474	<i>A. sojae</i>	SOLO TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10475	<i>A. parasiticus (+)</i>	SOLO TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10476	<i>A. aculeatus</i>	SOLO TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10477	<i>A. japonicus</i>	SOLO TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10478	<i>A. aculeatus</i>	SOLO SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10479	<i>A. sojae</i>	SOLO SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10480	<i>A. aculeatus</i>	SOLO SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10481	<i>A. niger</i>	SOLO SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10482	<i>A. sojae</i>	SOLO SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10483	<i>A. niger (+)</i>	SOLO SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10484	<i>A. carbonarius (+)</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10485	<i>A. aculeatus</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10486	<i>A. aculeatus</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10487	<i>A. sojae</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015

<b>CÓDIGO</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>DEPÓSITO</b>
CCDCA10488	<i>A. niger</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10489	<i>A. sojae</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10490	<i>A. ochraceus (+)</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10491	<i>A. carbonarius (+)</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10492	<i>A. flavus</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10493	<i>A. ochraceus (+)</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10494	<i>A. flavus</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10495	<i>A. foetidus</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10496	<i>A. parasiticus (+)</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10497	<i>A. niger (+)</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	15/09/2015
CCDCA10498	<i>A. sojae</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10499	<i>A. niger</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10500	<i>A. parasiticus (+)</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10501	<i>A. aculeatus</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10502	<i>A. niger (+)</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10503	<i>A. carbonarius (+)</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10504	<i>A. sojae</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10505	<i>A. aculeatus</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10506	<i>A. ochraceus (+)</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10507	<i>A. carbonarius (+)</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10508	<i>A. flavus</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10509	<i>A. flavus</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10510	<i>A. parasiticus (+)</i>	SOLO RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10511	<i>A. niger</i>	SOLO RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10512	<i>A. niger</i>	SOLO RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015

<b>CÓDIGO</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>DEPÓSITO</b>
CCDCA10513	<i>A. aculeatus</i>	SOLO RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10514	<i>A. aculeatus</i>	SOLO RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10515	<i>A. flavus (+)</i>	SOLO RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10516	<i>A. niger</i>	SOLO CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10517	<i>A. aculeatus</i>	SOLO CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10518	<i>A. niger</i>	SOLO CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10519	<i>A. aculeatus</i>	SOLO CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10520	<i>A. flavus</i>	SOLO CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10521	<i>A. ochraceus (+)</i>	SOLO CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10522	<i>A. carbonarius (+)</i>	SOLO CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10523	<i>A. carbonarius (+)</i>	SOLO CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10524	<i>A. niger</i>	SOLO TEMPRANILLO	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10525	<i>A. niger (+)</i>	SOLO TEMPRANILLO	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10526	<i>A. aculeatus</i>	SOLO TEMPRANILLO	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10527	<i>A. aculeatus</i>	SOLO TEMPRANILLO	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10528	<i>A. sojae</i>	SOLO TEMPRANILLO	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10529	<i>A. sojae</i>	SOLO TEMPRANILLO	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10530	<i>A. japonicus</i>	SOLO TEMPRANILLO	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10531	<i>A. japonicus</i>	SOLO TEMPRANILLO	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10532	<i>A. niger</i>	SOLO BARBERA	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10533	<i>A. sojae</i>	SOLO BARBERA	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10534	<i>A. sojae</i>	SOLO BARBERA	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10535	<i>A. niger (+)</i>	SOLO BARBERA	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10536	<i>A. aculeatus</i>	SOLO BARBERA	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10537	<i>A. aculeatus</i>	SOLO BARBERA	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015

<b>CÓDIGO</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>DEPÓSITO</b>
CCDCA10663	<i>P. solitum</i>	SYRAH	CASA NOVA - BA	20/01/2016
CCDCA10664	<i>P. implicatum</i>	SYRAH	CASA NOVA - BA	20/01/2016
CCDCA10665	<i>P. implicatum</i>	SYRAH	CASA NOVA - BA	20/01/2016
CCDCA10666	<i>P. glabrum</i>	SYRAH	CASA NOVA - BA	20/01/2016
CCDCA10667	<i>P. glabrum</i>	SYRAH	CASA NOVA - BA	20/01/2016
CCDCA10668	<i>P. citrinum (+)</i>	SYRAH	CASA NOVA - BA	20/01/2016
CCDCA10669	<i>P. citrinum (+)</i>	SYRAH	CASA NOVA - BA	20/01/2016
CCDCA10670	<i>P. sclerotiorum</i>	TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10671	<i>P. sclerotiorum</i>	TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10672	<i>P. decumbens</i>	TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10673	<i>P. citrinum (+)</i>	TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10674	<i>P. glabrum</i>	TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10675	<i>P. citrinum (+)</i>	SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10676	<i>P. citrinum (+)</i>	SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10677	<i>P. sclerotiorum</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10678	<i>P. sclerotiorum</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10679	<i>P. citrinum (+)</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10680	<i>P. glabrum</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10681	<i>P. glabrum</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10682	<i>P. glabrum</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10683	<i>P. sclerotiorum</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10684	<i>P. citrinum (+)</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10685	<i>P. sclerotiorum</i>	MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	20/01/2016
CCDCA10686	<i>P. glabrum</i>	RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10687	<i>P. glabrum</i>	RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016

<b>CÓDIGO</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>DEPÓSITO</b>
CCDCA10688	<i>P. sclerotiorum</i>	RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10689	<i>P. citrinum (+)</i>	RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10690	<i>P. citrinum (+)</i>	RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10691	<i>P. sclerotiorum</i>	RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10692	<i>P. solitum</i>	RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10693	<i>P. sclerotiorum</i>	RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10694	<i>P. sclerotiorum</i>	CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10695	<i>P. sclerotiorum</i>	CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10696	<i>P. glabrum</i>	BARBERA	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10697	<i>P. glabrum</i>	BARBERA	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	20/01/2016
CCDCA10538	<i>P. corylophilum</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA - BA	16/09/2015
CCDCA10539	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA - BA	16/09/2015
CCDCA10540	<i>P. implicatum</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA - BA	16/09/2015
CCDCA10541	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA - BA	16/09/2015
CCDCA10542	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA - BA	16/09/2015
CCDCA10543	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO MOSCATO ITÁLIA	CASA NOVA - BA	16/09/2015
CCDCA10544	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA - BA	16/09/2015
CCDCA10545	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA - BA	16/09/2015
CCDCA10546	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA - BA	16/09/2015
CCDCA10547	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO SYRAH	CASA NOVA - BA	16/09/2015
CCDCA10548	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10549	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10550	<i>P. chrysogenus</i>	SOLO TOURIGA NACIONAL	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10551	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10552	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO SYRAH	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015

<b>CÓDIGO</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>SUBSTRATO</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>DEPÓSITO</b>
CCDCA10553	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10554	<i>P. citrinum</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10555	<i>P. sclerotiorum</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10556	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10557	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10558	<i>P. corylophilum</i>	SOLO MOSCATO CANELLI	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10559	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10560	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO RUBY CABERNET	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10561	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10562	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO CHENIN BLANC	SANTA MARIA DA BOA VISTA - PE	16/09/2015
CCDCA10563	<i>P. sclerotiorum</i>	SOLO TEMPRANILLO	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10564	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO TEMPRANILLO	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10565	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO TEMPRANILLO	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10566	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO BARBERA	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015
CCDCA10567	<i>P. citrinum (+)</i>	SOLO BARBERA	LAGOA GRANDE - PE	16/09/2015