



FABIANA REINIS FRANCA PASSAMANI

**OCORRÊNCIA E DESENVOLVIMENTO DE UM
MODELO PREDITIVO PARA A INCIDÊNCIA
DE *Aspergillus* Seção *Nigri* E OCRATOXINA A
EM REGIÕES VITÍCOLAS DO BRASIL**

LAVRAS – MG

2014

FABIANA REINIS FRANCA PASSAMANI

**OCORRÊNCIA E DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO
PREDITIVO PARA A INCIDÊNCIA DE *Aspergillus* Seção *Nigri* E
OCRATOXINA A EM REGIÕES VITÍCOLAS DO BRASIL**

Tese 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 Doutor.

Orientador

Dr. Luis Roberto Batista

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Passamani, Fabiana Reinis Franca.

Ocorrência e desenvolvimento de um modelo preditivo para incidência de *Aspergillus* seção *Nigri* e ocratoxina A em regiões vitícolas do Brasil / Fabiana Reinis Franca Passamani. – Lavras : UFLA, 2014.

116 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. *Aspergillus* seção *Nigri*. 2. Ocratoxina A. 3. Fatores abióticos. 4. Mudanças climáticas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

FABIANA REINIS FRANCA PASSAMANI

**OCORRÊNCIA E DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO
PREDITIVO PARA A INCIDÊNCIA DE *Aspergillus* Seção *Nigri* E
OCRATOXINA A EM REGIÕES VITÍCOLAS DO BRASIL**

Tese 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 Doutor.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2014.

Dr. Giuliano Elias Pereira	EMBRAPA
Dra. Margareth Marin Lordelo Volpato	EPAMIG
Dr. Luis Carlos de Oliveira Lima	UFLA
Dra. Sara Maria Chaulfoun	EPAMIG

Dr. Luís Roberto Batista
Orientador

LAVRAS – MG

2014

*A Deus, por tanto me ouvir e me guiar.
Aos meus queridos pais, Sonia e Emilson,
por continuarem me incentivando, mesmo depois de tanto tempo.
Ao meu irmão, Emilsinho, por admirar o que faço e
acreditar que ainda vou encontrar o meu lugar.
Aos meus amores, Bruno, Clara e Marcelo,
pelo amor e apoio incondicional.
Minha vida não existe sem vocês.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Luis Roberto Batista, pela orientação, amizade e confiança e também por ter me concedido tantas oportunidades, durante a execução deste trabalho, que muito contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada.

Ao pesquisador da Embrapa Semiárido Dr. Giuliano Elias Pereira, por compartilhar sabedoria e conhecimento na arte do processo de cultivo e elaboração de vinhos finos em uma região tropical, com características peculiares e não encontradas em nenhum outro lugar do mundo. Também pelo apoio financeiro e institucional que permitiu a coleta das amostras e a execução de análises no laboratório.

À professora Dra. Thais Hernandez, por dedicar seu tempo na padronização da metodologia de extração e quantificação da ocratoxina A e por sempre estar pronta para me ajudar. Você é um exemplo.

À professora Dra. Sabrina Carvalho Bastos, pelo carinho e presteza e por me auxiliar com o delineamento experimental deste trabalho.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, por permitir e apoiar as análises de cromatografia em seu laboratório.

Ao Wilder, por dedicar-se e auxiliar-me na padronização da metodologia para a quantificação da ocratoxina A.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização deste projeto de pesquisa.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos vitivinicultores que permitiram a coleta nas suas propriedades.

As amigas do Laboratório de Micologia e Micotoxinas em Alimentos, em especial a Abiah, Daiani, Gislaine, Luisa, Michelle, Natasha, Noelly e

Priscilla, por todo o apoio, não só na realização das análises, mas também nos momentos mais difíceis. Vocês são especiais.

Enfim, a todos que estiveram ao meu lado e, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

Os fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* são relatados como as principais espécies contaminantes de uvas viníferas em diferentes regiões do mundo, especialmente as situadas na zona temperada. Dentre estes, *A. carbonarius* é o principal produtor de uma toxina, a ocratoxina A (OTA). O perfil de produção da OTA pode ser afetado sob diferentes condições de cultivo do fungo, tais como disponibilidade de água, nutrientes, pH e temperatura. Nesse sentido, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a ocorrência de fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas cultivadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais, e no Vale do Submédio do São Francisco, analisando as diferenças observadas entre as regiões e se a temperatura do ambiente, a atividade de água e o pH do substrato influenciam o crescimento e a produção de OTA por *A. carbonarius* e *A. niger*. Para isso, foram coletadas 54 amostras de uvas (*Vitis vinifera*) das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon, em 2011 e 2012. As bagas, as sementes e o mosto dessas amostras foram plaqueados em meio DRBC e avaliados quanto ao percentual de contaminação por *Aspergillus* Seção *Nigri*. Também foi analisada a frequência de ocorrência das espécies desse grupo. Os resultados obtidos mostram que não existe diferença estatística significativa entre as regiões de São Paulo (SP) e de Minas Gerais (MG) para a Syrah, mas essas regiões são diferentes estatisticamente de Pernambuco (PE)/ Bahia (BA), onde se observou o maior percentual de contaminação. Para a Cabernet Sauvignon, a região de SP foi diferente de MG e PE/BA. Os menores percentuais de contaminação foram encontrados na região de SP. Não foi identificada nenhuma espécie de fungo ocratoxigênico nas regiões do sudeste. No nordeste, 1,3% e 13% das espécies foram identificadas como produtoras de OTA, nas safras de 2011 e 2012, respectivamente. Dois isolados dessas espécies ocratoxigênicas foram cultivados em meio de cultura de uva com diferentes atividades de água (aw), pH e temperatura, para avaliar a influência dessas variáveis no crescimento e na produção de OTA por essas espécies. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada. As condições de cultivo onde *A. carbonarius* apresentou maior crescimento foram temperatura entre 20 °C a 33 °C; aw entre 0,95 e 0,98 e pH entre 5 e 6,5. A maior concentração de toxina (10 µg/g) foi na temperatura de 15 °C, pH superior a 6,0 e aw de 0,99. Para o *A. niger*, a condição de cultivo ótima para o crescimento foi na temperatura entre 25 °C e 40 °C, aw superior a 0,96 e pH entre 4,0 e 6,5. A maior síntese de toxina (7 µg/g) ocorreu na temperatura de 15 °C e níveis superiores a 0,98 de aw. Os resultados obtidos mostram que as variáveis estudadas influenciam o crescimento e a produção da OTA. Essas informações podem contribuir para o desenvolvimento de modelos que previnam o risco de contaminação por ocratoxina A nos vinhos produzidos em diferentes regiões.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. *Aspergillus*. Vinícolas. Brasil. Mudanças Climáticas.

GENERAL ABSTRACT

The *Aspergillus* section *Nigri* are reported as the main contaminant species of wine grapes in different regions of the world, especially those located in the temperate zone. Among them *A. carbonarius* is the main producer of a toxin, ochratoxin A (OTA). The production profile of OTA can be changed under different fungus cultivation conditions, such as availability of water, nutrients, pH and temperature. In this sense, the present study aimed to evaluate the occurrence of *Aspergillus* section *Nigri* in grapes cultivated in São Paulo, Minas Gerais and the Submiddle São Francisco Valley, analyzing the differences observed between the regions and the ambient temperature, water activity and pH of the substrate on growth and OTA production by *A. carbonarius* and *A. niger*. For that 54 samples of Cabernet Sauvignon and Syrah grapes were collected in 2011 and 2012. Berries, seeds and grape must samples were plated on DRBC medium and evaluated for percentage of contamination by *Aspergillus* section *Nigri*. The frequency of occurrence of the species in this group was also analyzed. The results show no statistically significant differences between the regions of SP and MG for Syrah, but these regions are statistically different PE/BA, which also produced the highest percentage of contamination. For Cabernet Sauvignon the SP region was different from MG and PE/BA. The lowest levels of contamination were found in the region of SP. The southeast regions did not present any kind of ochratoxigenic fungus. In the northeast 1.3% and 13% of species were identified as producing OTA in the 2011 and 2012 harvests, respectively. Two isolates of these ochratoxigenic species were grown in grape culture medium with different water activities (aw), pH, and temperature, to assess the influence of these variables on the growth and production of OTA by these species. The response surface methodology was used. The growth conditions where *A. carbonarius* showed higher growth were with a temperature between 20 and 33 °C, aw between 0.95 and 0.98 and pH between 5 and 6.5. The highest toxin concentration (10 µg/g) was at 15 °C, pH 6.0 and aw of 0.99. A. For *A. niger* optimum culture condition for the growth were temperature between 25 and 40 °C, aw over 0.96 and pH between 4.0 and 6.5. The highest toxin synthesis (7 µg/g) occurred at a temperature of 15 °C and aw levels above 0.98 aw. The results showed that the variables influence the growth and production of OTA. This information may contribute to the development of models to prevent the risk of contamination by ochratoxin A in wine produced in different regions.

Keywords: Filamentous fungi. *Aspergillus*. Wineries. Brazil. Climatic Changes.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Estudos realizados sobre a ocorrência de *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas cultivadas em diferentes regiões do mundo (extraído de LEONG et al., 2006).....24
- Figura 2 Principais cidades vitivinícolas brasileiras.....29

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Percentual de contaminação das bagas após 7 dias de incubação em meio DRBC50
- Figura 2 Percentual de contaminação das sementes após 7 dias de incubação51
- Figura 3 Contagem das unidades formadoras de colônias de *Aspergillus* Seção *Nigri* em mosto.....52
- Figura 4 Características macroscópicas (coloração e tamanho da colônia) dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri*.....52
- Figura 5 Características microscópicas de *Aspergillus japonicus*53
- Figura 6 Percentual de contaminação das bagas da variedade Syrah e Cabernet Sauvignon, por *Aspergillus* Seção *Nigri*, nas três regiões avaliadas: São Paulo (SP), Minas Gerais (MG) e Pernambuco/Bahia (PE/BA).....55
- Figura 7 Percentual médio de contaminação das sementes, das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon, nas três regiões analisadas: São Paulo (SP), Minas Gerais (MG) e Pernambuco/Bahia (PE/BA).....60
- Figura 8 Contagem de *Aspergillus* Seção *Nigri* (UFC/mL) no mosto obtido das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon, nas três regiões analisadas: São Paulo (SP), Minas Gerais (MG) e Pernambuco/Bahia (PE/BA).....62
- Figura 9 Frequência de ocorrência das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* na variedade Syrah coletada em SP nos anos de 2011 e 201264
- Figura 10 Frequência de ocorrência das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* na variedade Cabernet Sauvignon coletada em SP nos anos de 2011 e 2012.....65

Figura 11	Frequência de ocorrência das espécies de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> nas variedades Syrah e Cabernet Sauvignon coletadas em Minas Gerais no ano de 2011	66
Figura 12	Frequência de ocorrência das espécies de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> na variedade Syrah coletada em Pernambuco/Bahia nos anos de 2011 e 2012.....	67
Figura 13	Frequência de ocorrência das espécies de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> na variedade Cabernet Sauvignon coletada em Pernambuco/Bahia nos anos de 2011 e 2012	68

CAPÍTULO 3

Figura 1	Plugs retirados da área interna, meio e borda de cada colônia no 10° dia do período de incubação para a extração da OTA	88
Figura 2	Cromatograma padrão de Ocratoxina A.....	89
Figura 3	Colônias de <i>Aspergillus carbonarius</i> cultivada em meio semi-sintético de uva com 0,99 de aw; 4,5 de pH e incubados a 15°C (a); 0,99 de aw; 5,35 de pH e incubados a 27,5°C (b); 0,99 de aw, 4,5 de pH e incubados a 40°C (c); 0,99 de aw, 6,2 de pH e incubados a 40°C (d).	92
Figura 4	Colônias de <i>Aspergillus carbonarius</i> cultivada em meio sintético de uva com 0,96 de aw, pH3,92 e incubados a 27,5°C (a); 0,96 de aw, 5,35 de pH e incubados a 27,5°C (b); 0,96 de aw, 6,78 de pH e incubados a 27,5°C (c).....	93
Figura 5	Diagrama de Pareto (a) com efeito da temperatura (X1), atividade de água (X2) e pH (X3) e suas interações sobre o crescimento de <i>Aspergillus carbonarius</i> e curva de contorno (b, c, d) para o crescimento do fungo em função das interações entre as variáveis	96
Figura 6	Diagrama de Pareto (a) com efeito da temperatura (X1), atividade de água (X2) e pH (X3) e suas interações sobre o crescimento de <i>Aspergillus niger</i> e curva de contorno (b, c, d) para o crescimento do fungo em função das interações entre as variáveis	97
Figura 7	Diagrama de Pareto (a) com efeito da temperatura (X1), atividade de água (X2) e pH (X3) e suas interações sobre a produção de ocratoxina A por <i>Aspergillus carbonarius</i> e curvas de contorno (b, c, d) para a produção de OTA pelo fungo em função das interações entre as variáveis.....	99
Figura 8	Diagrama de Pareto (a) com efeito da temperatura (X1), atividade de água (X2) e pH (X3) e suas interações sobre a produção de ocratoxina A por <i>Aspergillus niger</i> e curvas de	

	contorno (b, c e d) para a produção de OTA pelo fungo em função das interações entre as variáveis.....	101
Figura 9	Concentração de OTA ($\mu\text{g/g}$) na temperatura média mensal atual do município de Três Corações(MG) e considerando as projeções do aumento da temperatura ambiental em $1,15^{\circ}\text{C}$ (cenário otimista) e em $3,7^{\circ}\text{C}$ (cenário pessimista), segundo o quinto relatório do IPCC sobre mudanças climáticas	104
Figura 10	Concentração de OTA ($\mu\text{g/g}$) na temperatura média mensal atual do município de Espírito Santo do Pinhal (SP) e considerando as projeções do aumento da temperatura ambiental em $1,15^{\circ}\text{C}$ (cenário otimista) e em $3,7^{\circ}\text{C}$ (cenário pessimista), segundo o quinto relatório do IPCC sobre mudanças climáticas	105

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Matriz do delineamento experimental com os 17 ensaios com diferentes combinações entre as variáveis temperatura (T°C), atividade de água (aw) e pH realizado em laboratório.....	85
Tabela 2	Variáveis experimentais com valores reais e codificados	86
Tabela 3	Modelo predito e o coeficiente de determinação (R ²) a partir das variáveis obtidas neste estudo	90
Tabela 4	Matriz do delineamento com as variáveis reais e codificadas (-1,68, -1,0, 0, +1, +1,68) e os resultados obtidos nos ensaios de avaliação do crescimento e produção de ocratoxina A por <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>A. niger</i>	93
Tabela 5	Modelos preditos para o crescimento (mm) e produção de ocratoxina A (µg/g) pelos fungos avaliados.....	94

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	18
	INTRODUÇÃO GERAL	18
1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	Fungos produtores de micotoxinas	21
2.2	Principais fungos produtores de micotoxinas em uvas	23
2.2.1	<i>Aspergillus carbonarius</i>	25
2.2.2	<i>Aspergillus niger</i>	26
2.3	Regiões produtoras de vinho no mundo	26
2.4	Panorama da vitivinicultura no Brasil	28
2.4.1	Rio Grande do Sul	29
2.4.2	Santa Catarina	30
2.4.3	São Paulo	30
2.4.4	Minas Gerais	31
2.4.5	Vale do Submédio do São Francisco	31
2.5	Variedades comuns a estas regiões	32
2.5.1	Syrah	32
2.5.2	Cabernet Sauvignon	32
2.6	Fatores abióticos que influenciam o crescimento e a produção de ocratoxina A pelo fungo	33
2.7	Efeito da região na produção da ocratoxina A pelo fungo	34
2.8	Mudanças climáticas x regiões vinícolas	35
2.9	Legislação de micotoxinas em vinhos e seus derivados	37
	REFERÊNCIAS	39
	CAPÍTULO 2 Ocorrência de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> em duas variedades de uvas cultivadas em vinícolas localizadas no norte de São Paulo, no sul de Minas Gerais e no Vale do Submédio do São Francisco	45
1	INTRODUÇÃO	46
2	OBJETIVO GERAL	48
2.1	Objetivos Específicos	48
3	MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1	Amostragem das uvas	49
3.2	Avaliação do percentual de contaminação por <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> nas bagas das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon	49
3.3	Avaliação do percentual de contaminação por <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> nas sementes das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon	50

3.4	Contagem de colônias de fungos de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> em mosto.....	51
3.5	Identificação das espécies de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i>	52
3.6	Screening do potencial ocratoxigênico de <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>A. niger</i>	53
3.7	Análises estatísticas.....	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	Percentual de contaminação por <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> nas bagas das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon.....	55
4.2	Percentual de contaminação por <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> das sementes.....	59
4.3	Contagem de colônias de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> dos mostos obtidos das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon.....	61
4.4	Frequência de ocorrência de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigrinas</i> uvas Syrah e Cabernet Sauvignon.....	63
4.5	Potencial ocratoxigênico de <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>A. niger</i>	70
5	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
	CAPÍTULO 3 Efeito de fatores abióticos no crescimento e produção de Ocratoxina A por <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus niger</i> isolados de uvas viníferas cultivadas no Brasil	79
1	INTRODUÇÃO	80
2	OBJETIVO GERAL	82
2.1	Objetivos Específicos.....	82
3	MATERIAL E MÉTODOS	83
3.1	Obtenção dos Isolados.....	83
3.2	Preparo do meio de cultura semi-sintético de uva com diferentes pH e aw.....	83
3.3	Delineamento Experimental.....	84
3.4	Avaliação do crescimento de <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus niger</i>	86
3.5	Determinação da concentração da solução estoque e preparo da curva padrão para a OTA.....	86
3.6	Ensaio de recuperação.....	87
3.7	Extração da OTA das culturas fúngicas.....	87
3.8	Quantificação da produção da OTA por <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus niger</i>	89
3.9	Uso do modelo predito para estimar a produção de OTA por <i>Aspergillus carbonarius</i> nas regiões vinícolas do Brasil.....	90
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
4.1	Ensaio de recuperação da OTA em meio de cultura semi-sintético de uva.....	92

4.2	Crescimento e produção de ocratoxina A por <i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus niger</i>	92
4.3	Uso do modelo predito para estimar a produção de OTA por <i>Aspergillus carbonarius</i> nas regiões vinícolas do Brasil.....	103
5	CONCLUSÃO	108
	REFERÊNCIAS	109
	APÊNDICE	114

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a vitivinicultura é considerada uma atividade de importância crescente e diversas regiões do país, com condições climáticas bem distintas, vêm se envolvendo cada vez mais com a atividade. Na região sul, destacam-se os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina; na região sudeste, o norte e o leste do estado de São Paulo, e o sul e o leste de Minas Gerais e na região nordeste, o Vale do Submédio do São Francisco, cujas cidades polo são Juazeiro, na Bahia e Petrolina, em Pernambuco, que se destacam por serem pioneiras na produção de uva e vinho sob condições tropicais, com características completamente diferentes das regiões de vitivinicultura tradicional das zonas de clima temperado (PROTAS; CAMARGO, 2011).

A maioria dos estudos sobre micobiota das uvas já realizados foi desenvolvida em países localizados na zona temperada (BATTILANI et al., 2003; SERRA et al., 2003; BELLI et al., 2004; BELLI et al., 2007). No Brasil, apenas dois trabalhos foram publicados, tendo um sido realizado por Rosa et al. (2002), em parceria com pesquisadores argentinos, no qual apenas a micobiota das uvas provenientes da região de Campanha, no Rio Grande do Sul, foi analisada. O outro trabalho foi realizado por Passamani et al. (2012), sobre a distribuição de espécies *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas cultivadas no Vale do Submédio do São Francisco.

Os fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* são considerados as principais espécies contaminantes de uvas, não só pela doença da podridão negra que causa nas bagas das uvas, mas também pela produção de uma micotoxina classificada

como Grupo B, possível carcinogênica para humanos, a ocratoxina A (OTA) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993).

Nos países vinícolas localizados nas regiões temperadas, o vinho é considerado a segunda fonte de contaminação de OTA para humanos, ficando os cereais em primeiro lugar. Além disso, a principal espécie produtora de OTA em vinhos, o *Aspergillus carbonarius*, cresce e produz a toxina em diferentes condições de temperatura e atividade de água e a região de onde o fungo foi isolado também parece influenciar a fisiologia da espécie (CABAÑES et al., 2002; MAGAN; ALDRED, 2005). Por isso, conhecer a distribuição desses fungos e a influência de variáveis ambientais no crescimento e na produção de OTA por essas espécies são de extrema relevância, auxiliando não só no conhecimento do comportamento do fungo, como também no desenvolvimento de modelos preditivos que ajudam a evitar ou a reduzir as perdas de produção e os riscos para a saúde humana.

Nesse sentido, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a ocorrência de fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas Syrah e Cabernet Sauvignon, cultivadas no norte do estado de São Paulo, no sul de Minas Gerais e no Vale do Submédio do São Francisco, analisando as diferenças observadas entre as regiões e se a temperatura do ambiente, a atividade de água e o pH do substrato influenciam o crescimento e a produção de OTA por *A. carbonarius* e *A. niger*.

Os resultados deste trabalho são apresentados em dois capítulos. No primeiro capítulo foi avaliado se existe diferença no percentual de contaminação por *Aspergillus* Seção *Nigri* nas bagas, nas sementes e nos mostos das uvas cultivadas nas três regiões vinícolas. No segundo capítulo foram avaliados o efeito da temperatura, a atividade de água e o pH, além da interação entre essas variáveis no crescimento e na produção de OTA, por duas das principais espécies responsáveis pela contaminação dos vinhos. Analisou-se também o uso

do modelo preditivo obtido, em condições laboratoriais, para estimar a concentração de OTA nos meses que antecedem a colheita da uva nas três regiões analisadas e nas temperaturas previstas pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas para o próximo século.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos produtores de micotoxinas

Os fungos compreendem uma variedade de microrganismos e, numericamente, são considerados os eucariotos mais abundantes da biosfera da Terra, colonizando diferentes ecossistemas (HAWKSWORTHN, 1991; HAWKSWORTHN, 2001; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; FISCHER, 2007). Parte desse processo evolutivo está relacionada com o desenvolvimento da capacidade do fungo de produzir uma diversidade de produtos químicos extracelulares, conhecidos como metabólitos secundários (MUELLER; SCHMIT, 2007).

Os metabólitos secundários podem ser definidos como um conjunto de compostos químicos que não aparentam ter função definida no crescimento celular. Este conceito é considerado contrário ao estabelecido para o metabolismo primário, o qual fornece energia e precursores químicos às células, que são essenciais para o crescimento e a reprodução dos organismos (BRAKHAGE; SCHROEKHE, 2010).

No último século, muitos fungos foram identificados como produtores de metabólitos secundários com aplicação em diferentes áreas na indústria (penicilina, estatina, ciclosporina) (BENNET, 1998; MEYER, 2008), no entanto, outros metabólitos secundários são considerados tóxicos e, por serem produzidos por fungos, são conhecidos como micotoxinas. Duas dessas micotoxinas são a ocratoxina A (OTA), possível carcinogênica e pertencente ao Grupo 2B e a aflatoxina, classificada como carcinogênica e pertencente ao grupo 1A, segundo a Agência Internacional do Câncer (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993). Outras, como tricotecenos,

zearalenona, patulina e fumonisina, são agentes importantes na contaminação de alimentos destinados ao consumo humano e à alimentação animal.

O conhecimento sobre esse grupo de compostos químicos é especialmente importante por causa da ameaça que podem representar à cadeia de produção de alimentos. Em estudos anteriores consideravam-se esses compostos como substâncias produzidos por fungos deteriorantes de alimentos e utilizados, com sucesso, para auxiliar na identificação e na diferenciação das espécies relacionadas (FRISVAD; FILTENBORG, 1983; FRISVAD; FILTENBORG, 1989; SMEDSGAARD, 1997). Atualmente, os estudos demonstram que centenas de metabólitos secundários foram descritos e, com muitos mais, sem dúvida, ainda a ser descoberto. Na verdade, cada espécie de fungo pode ser capaz de produzir um grande número de metabólitos e o perfil de produção pode ser alterado sob diferentes condições de cultivo, tais como disponibilidade de água, nutrientes, pH e temperatura (MAGAN; MEDINA; ALDRED, 2011).

Durante décadas, a produção dos metabólitos secundários vem sendo debatida e perguntas sobre quando e por que os fungos produzem essas micotoxinas ainda são investigadas. Segundo Magan e Aldred (2005), ainda não existe um consenso sobre a origem, a finalidade e a importância dos produtos do metabolismo secundário. Sabe-se que as enzimas envolvidas na produção dos metabólitos secundários são exclusivas desse processo e dos substratos, diferindo das do metabolismo primário, e que a síntese desses compostos apresenta um elevado gasto energético para o organismo, sendo fisiologicamente regulada em resposta a fatores ambientais. Além disso, a produção é ordenada por um conjunto de genes associados com mecanismos reguladores especiais que controlam o sincronismo e o nível de expressão gênica.

2.2 Principais fungos produtores de micotoxinas em uvas

Os principais fungos produtores de OTA em uvas pertencem aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. As OTAs são produzidas, principalmente, por espécies de *Penicillium* em regiões de clima temperado, com temperaturas mais baixas e por um número de espécies de *Aspergillus* em regiões tropicais, com temperaturas mais elevadas. Existem várias espécies de *Aspergillus* pertencentes à Seção *Circundati* e à Seção *Flavi* que são capazes de produzir elevados níveis de OTA. Entretanto, nos últimos 10 anos, os *Aspergillus* Seção *Nigri* são considerados os principais responsáveis pelo acúmulo de OTA em uvas.

Em estudos sobre a frequência de ocorrência de fungos realizados em diferentes regiões produtoras de uvas observou-se que as espécies bisseriadas *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. niger* Agregado e as espécies unisseriadas *A. aculeatus* e *A. japonicus* são prevalentes nas uvas (BATTILANI et al., 2003; ROSA et al., 2002; PERRONE et al., 2007), sendo *A. carbonarius* considerada a principal fonte de OTA em uvas e vinhos (CABAÑES et al, 2002; ROSA et al., 2002; BATILANI et al., 2006; MAGNOLI et al., 2004; LEONG et al., 2006) (Figura 1).

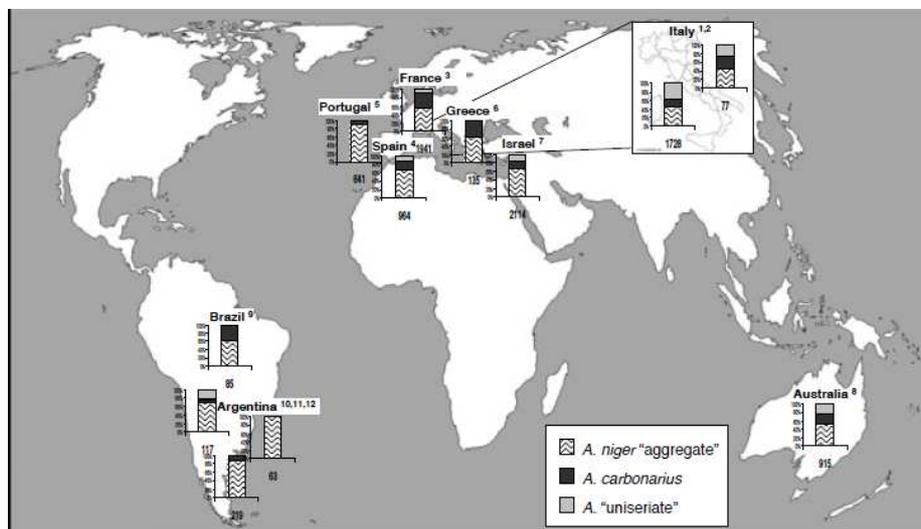


Figura 1 Estudos realizados sobre a ocorrência de *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas cultivadas em diferentes regiões do mundo (extraído de LEONG et al., 2006)

De acordo com os estudos realizados, as bagas infectadas por espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* apresentam coloração pálida, no início da doença e, então, se tornam pretas durante o crescimento e a esporulação dos fungos. A cabeça conidial do fungo pode ser vista a olho nu e os esporos se desprendem facilmente quando atingem a maturidade, colonizando as bagas adjacentes.

O fungo habita o solo e os conídios são disseminados nas videiras pelas correntes quentes de ar (LEONG et al., 2006). A infecção fúngica ocorre por meio de injúrias, principalmente nas bagas maduras, e sob condições de calor (20-25 °C), e se espalha promovendo a colonização de todo o cacho. Essas injúrias podem ser causadas por manuseio inadequado dos cachos, rachaduras mecânicas ou ferimentos causados por insetos ou pássaros, que acabam fornecendo uma porta de entrada para o tecido das bagas, no qual os fungos encontram um hábitat ideal para o seu desenvolvimento (COZZI et al., 2006).

A colonização por *Aspergillus* Seção *Nigri* nas bagas também é facilitada pela resistência à luz solar dos esporos, devido à sua coloração preta (PITT; HOCKING, 1997). Segundo Leong et al. (2006), esta característica permite a sobrevivência em regiões nas quais a intensidade de luz é alta, pois a exposição por vários dias à luz solar reduz a viabilidade dos esporos fúngicos.

2.2.1 *Aspergillus carbonarius*

Aspergillus carbonarius se caracteriza morfológicamente por apresentar conídios pretos com paredes rugosas, estipes longas e largas. Devido às suas características morfológicas microscópicas, pode ser facilmente distinguível de outras espécies bisseriadas pertencentes à Seção *Nigri*. A germinação dos esporos de *A. carbonarius* é muito rápida e ocorre num período de 24 horas à temperatura entre 25 °C e 35 °C, e atividade de água entre 0,90 a 0,99. A temperatura ótima para o crescimento é de 25 °C a 30 °C, com temperatura mínima de 10 °C e máxima de 42 °C, e atividade de água ótima entre 0,95 e 0,99 (PERRONE et al., 2008). Entretanto, as condições ótimas para a produção de OTA por *A. carbonarius* diferem das condições ótimas para o crescimento do fungo e ocorrem a 15 °C e 20°C, e a 0,95-0,99 de atividade de água (BELLI et al., 2007; LEONG et al., 2006). Não foi observada produção de OTA a 0,90 de atividade de água (MITCHELL et al., 2003).

O efeito da atividade de água (aw) e da temperatura na taxa de crescimento radial e produção de OTA de dois isolados de *A. carbonarius*, *in vitro*, foram testados na Grécia. Os dois isolados cresceram otimamente a 30 °C–35 °C e 0,96 de aw, mas a produção máxima de OTA ocorreu em condições subótimas de crescimento (15 °C–20 °C e 0,93-0,96 de aw) e os valores encontrados foram de 3,14 e 2,67 µg/g, para as cepas analisadas. É importante observar que os isolados da Grécia podem ser considerados mais xerotolerantes

que os dos outros estudos realizados nos países mediterrâneos, demonstrando, assim, a influência das condições climáticas da região produtora na produção da micotoxina pelo fungo. Esses resultados também demonstram a habilidade do *A. carbonarius* em crescer e produzir toxina sob diferentes condições ecológicas, auxiliando no desenvolvimento de modelos que previnam o risco de contaminação por OTA nas regiões produtoras do vinho (TASSOU et al., 2007). Por isso, o interesse em avaliar não só a presença desses fungos ocratoxigênicos, mas também em quais condições ambientais ocorre a maior produção de OTA.

2.2.2 *Aspergillus niger*

O fungo da espécie *Aspergillus niger* apresenta distribuição geográfica mundial e é considerado uma das principais espécies deteriorantes de alimentos. É responsável pela contaminação pré e pós-colheita de frutas, como as uvas, alguns vegetais e grãos. Esta espécie cresce em temperaturas de 30 °C a 35 °C e atividade de água entre 0,93 e 0,98 (KLICH, 2002). A produção de OTA, normalmente, ocorre a 20 °C e 25 °C e 0,95 e 0,98 de atividade de água (ESTEBAN et al., 2004). Apenas uma baixa porcentagem (5% a 10%) de cepas de *A. niger* é produtora de OTA (PERRONE et. al., 2008).

Devido às suas características fisiológicas, essa espécie se torna predominante em regiões ou em determinadas estações do ano nas quais as temperaturas atingem os 40 °C.

2.3 Regiões produtoras de vinho no mundo

A produção mundial de vinhos se localiza, principalmente, em regiões de clima temperado, mas também existe produção nas regiões subtropical e tropical. Algumas regiões vitivinícolas de clima temperado apresentam verão

quente e seco, e as mais conhecidas são aquelas próximas ao mar Mediterrâneo, na Itália, na França e nos países ibéricos. Outras regiões apresentam clima estival quente e abrangem os Estados Unidos, a Austrália e a África do Sul (GUERRA et al., 2006). A França, a Itália e a Espanha são consideradas os três países com maior produção de vinhos do mundo (QUINTELA et al., 2011). Na América do Sul, os países que se destacam por essa atividade são o Chile e a Argentina. Neste último, a região produtora de vinhos se localiza nas províncias de Mendoza e San Juan (MAGNOLI et al., 2004).

Assim, o mundo inteiro tem grandes regiões para a produção de vinhos tintos. Algumas são consideradas tradicionais, pela história, a qualidade e o volume de sua produção. A mais importante região produtora de vinhos tintos do mundo é Bordeaux, localizada no sudoeste da França. Outra região de destaque é a Borgonha, que produz vinho tinto de uma só variedade de uva, a Pinot Noir. O segundo maior produtor mundial, a Itália, adota o vinho tinto por preferência nacional, correspondendo a 80% de sua produção. A região italiana mais importante na produção de vinhos tintos é a Toscana central. A Espanha é o país com a maior área plantada em vinhedos de todo o globo, com 1,25 milhões de hectares de parreirais, sendo considerado o terceiro produtor mundial. Em relação aos tintos, o norte da Espanha é a região mais importante, principalmente no cultivo da variedade Tempranillo. Portugal, no oeste da península Ibérica, também apresenta o predomínio de vinhos tintos. Entretanto, existem quase todos os estilos de vinho. A principal uva tinta portuguesa é a Touriga Nacional, seguida pela ibérica Tempranillo (VIOTTI, 2010).

A indústria vitivinícola do Chile adquiriu fama internacional por produzir vinhos de custo médio com boa relação preço/qualidade. A Argentina é o quinto produtor mundial, com produção de 1,6 milhão de litros de vinhos. Também é elevado o consumo per capita do argentino, que consome 33 litros de vinho por ano, quase 17 vezes mais que o brasileiro (VIOTTI, 2010).

2.4 Panorama da vitivinicultura no Brasil

No Brasil, em 2012, a produção de uvas destinadas ao processamento (vinho, suco e derivados) foi de 830,92 milhões de kg, o que representa 57,07% da produção nacional. O restante da produção (42,93%) foi destinado ao consumo *in natura* (MELLO, 2012).

A viticultura brasileira ocupa área de, aproximadamente, 71 mil hectares, distribuída desde o extremo sul do país (latitude de 30° 56' 15"), até regiões situadas próximas à Linha do Equador (latitude de 5° 11' 15"). Devido à sua extensão territorial e às diferentes condições climáticas, existem áreas produtivas característica de regiões temperadas, com um período de repouso hibernal; áreas subtropicais, nas quais a videira é cultivada em dois ciclos anuais e áreas de viticultura tropical, em que é possível a realização de dois e meio a três ciclos vegetativos por ano (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006).

A vitivinicultura é uma atividade tradicional em nove regiões brasileiras. Como zonas temperadas destacam-se as regiões da Fronteira, Serra do Sudeste e Serra Gaúcha, no estado do Rio Grande do Sul; a região do Vale do Rio do Peixe, em Santa Catarina; a região sudeste de São Paulo e a região sul de Minas Gerais. A região norte do Paraná é considerada subtropical. As regiões noroeste de São Paulo, norte de Minas Gerais e Vale do Submédio do São Francisco caracterizam-se como zonas tropicais.

As regiões vinícolas do Brasil compreendem o sul, o sudeste e o nordeste. No mapa da Figura 2 mostram-se as principais cidades vitivinícolas brasileiras.



Figura 2 Principais cidades vitivinícolas brasileiras

2.4.1 Rio Grande do Sul

A história da vitivinicultura no Rio Grande do Sul tem estreita relação com a colonização italiana estabelecida no estado, sobretudo na Serra Gaúcha e na região Central, a partir de 1875. Esta vitivinicultura pioneira se manteve, até meados de 1970, sem investimentos externos significativos e produzindo, quase que exclusivamente, uvas e elaborando derivados a partir de variedades americanas e híbridas interespecíficas, embora algumas vinícolas tradicionais da Serra Gaúcha já se empenhassem na produção de uvas viníferas e na elaboração de vinhos finos. Assim, a vitivinicultura do Rio Grande do Sul, em 2010, estava estruturada com base em quatro pólos produtores: Serra Gaúcha, onde se encontra o maior pólo vitivinícola brasileiro, além da Região da Campanha, Serra do Sudeste e Região Central (PROTAS; CAMARGO, 2011).

2.4.2 Santa Catarina

De modo semelhante ao Rio Grande do Sul, o estado de Santa Catarina tem sua tradição vitivinícola intimamente relacionada com a colonização italiana nas regiões do Vale do Rio do Peixe, onde se destacam os municípios de Videira, Tangará e Pinheiro Preto, na região carbonífera, no sul do estado, com destaque para os municípios de Urussanga, Pedras Grandes e Morro da Fumaça, e na região do Vale do Rio Tijucas, com destaque para os municípios de Nova Trento e Major Gercino. Nestas regiões, a viticultura se consolidou com base em cultivares de origem americana, seja para a produção de vinhos de mesa, de suco de uva ou de uva de mesa.

A partir de meados do ano 2000, uma nova vitivinicultura começou a ser implantada no estado, com o propósito de produzir vinhos finos de qualidade, com base em vinhedos instalados em regiões de altitude, em municípios pertencentes às regiões de São Joaquim, Campos Novos e Caçador (PROTAS; CAMARGO, 2011).

2.4.3 São Paulo

A vitivinicultura paulista originou-se na região leste do estado, nos arredores das cidades de São Paulo e de Campinas. Nas primeiras décadas do século XX, a atividade ganhou expressão no município de São Roque, como produtor de vinhos de mesa e, na sequência, expandiu-se para a região de Jundiaí, tanto para a produção de uvas para a elaboração de vinho de mesa, quanto para a produção de uva de mesa, destacando-se, neste caso, a variedade Niágara. Como novidade no setor vitivinícola de São Paulo, registram-se iniciativas no sentido da produção de vinhos finos. Estão sendo feitos investimentos em municípios como São Carlos, Espírito Santo do Pinhal, Itobi e

Divinolândia, com o plantio de castas finas, visando à produção de vinhos e espumantes finos (PROTAS; CAMARGO, 2011).

2.4.4 Minas Gerais

A produção vitivinícola no estado de Minas Gerais é composta por três segmentos. Um segmento tradicional, no sul do estado, tem o seu foco principal na produção de uvas americanas e híbridas e na elaboração de vinho de mesa e suco de uva. Um segundo segmento, no norte do estado, é produtor de uvas de mesa, sob condições irrigadas, na região de Pirapora. O terceiro segmento, este mais recente e difuso em áreas de altitude do estado, avançando, inclusive em municípios limítrofes ao estado de São Paulo, está focado na produção de uvas viníferas para a elaboração de vinho fino. Cada segmento tem características peculiares de estrutura fundiária, tecnologia de produção e estratégias de comercialização (PROTAS; CAMARGO, 2011).

2.4.5 Vale do Submédio do São Francisco

A região do Vale do Submédio do São Francisco, cujas cidades polo são Petrolina, em Pernambuco, e Juazeiro, na Bahia, é pioneira na produção de uvas e vinhos sob condições tropicais, no Brasil. A viticultura comercial consolidou-se na região a partir da produção de uvas finas de mesa, iniciada na década de 1960. Na década de 1980 foram elaborados os primeiros vinhos com uvas de castas viníferas na região e, desde 2005, estão sendo introduzidas variedades de uvas híbridas de *Vitis labrusca*, ainda numa fase de ajustes de manejo para adaptação às condições ambientais da região, com as quais começam a ser elaborados os primeiros sucos de uva. Trata-se de uma região tropical de clima semiárido, onde a videira não tem período de repouso definido, com

características completamente diferentes das regiões de viticultura tradicional, das zonas de clima temperado (SOARES; LEÃO, 2009).

2.5 Variedades comuns a estas regiões

2.5.1 Syrah

Existem controvérsias em relação à origem da variedade de uva Syrah. Alguns acreditam que ela seja originária de Shyraz, na Pérsia; outros mencionam a Vila de Siracusa, na Sicília. É a principal cultivar utilizada para a elaboração de vinhos tintos no Submédio do São Francisco, no Brasil e na Austrália. Segundo Conde et al. (2007), essa variedade acumula os maiores teores de sólidos solúveis totais, quando comparada a outras cultivares, principalmente quando a sua produção ocorre no segundo semestre.

Seus cachos são medianos, cilíndricos-cônicos, compactos, com pedúnculos longos; as bagas são pequenas a medianas, ovaladas, de coloração negro-azulada e tendem a desidratar quando em estágio avançado de maturação.

2.5.2 Cabernet Sauvignon

Essa cultivar de origem europeia é utilizada para a elaboração de vinhos tintos finos e espumantes. É originária da região de Bordeaux, França, onde é a mais importante cultivar. Muito cultivada no leste europeu, Austrália, Chile, Argentina e Estados Unidos. No Brasil, o início do seu cultivo ocorreu em 1921, na região da Serra Gaúcha, mas somente em 1980 é que a sua produção foi intensificada, no Rio Grande do Sul (SOARES; LEÃO, 2009).

Seus cachos são de pequenos a medianos, cilíndricos, compactos com pedúnculos médios a longos; as bagas são pequenas, redondas e de coloração negro-azulada.

2.6 Fatores abióticos que influenciam o crescimento e a produção de ocratoxina A pelo fungo

A OTA é um composto tóxico sintetizado por diferentes espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Esta toxina apresenta baixo peso molecular e estabilidade, sendo considerada uma das toxinas mais importantes para a saúde humana e animal (PITT; HOCKING, 1997). Apresenta propriedade nefrotóxica, carcinogênica, teratogênica e imunossupressora, o que despertou, nos últimos anos, o interesse da comunidade científica e de comitês alimentares sobre os fatores que governam a produção da toxina pelo fungo.

Os fatores abióticos, como temperatura e atividade de água, afetam o crescimento e a produção da OTA pelo fungo. Esses organismos requerem temperatura ótima para o seu crescimento, que pode ser diferente da temperatura para a produção da toxina. Este mesmo comportamento já foi observado para a atividade de água (QUINTELA et al., 2011; SELOUANE et al., 2009; BELLI et al., 2004; PATERAKI et al., 2007). Por isso, a presença do fungo ocratoxigênico não significa presença da OTA em um determinado alimento.

Para melhor avaliar a influência desses dois fatores sobre a produção de OTA, alguns estudos foram realizados em escala laboratorial, utilizando o meio de cultura como substrato para o crescimento do fungo. Os resultados obtidos mostraram que a atividade de água (a_w), a temperatura e o tempo de incubação influenciam tanto o crescimento do fungo como a produção de OTA, e isso difere entre as espécies analisadas e dentro da mesma espécie estudada.

A contaminação por micotoxinas em produtos agrícolas é difícil de ser prevista devido ao fato de essa contaminação depender de uma complexa interação de fatores, como umidade, temperatura, tipo de produto, condições e tempo de armazenamento (POSE et al., 2010; GARCIA et al., 2011). No entanto, avaliar o efeito de cada fator e a interação entre os mesmos com a produção da toxina, mesmo que em escala laboratorial, é fundamental para garantir o consumo de alimentos seguros por homem e animais (KHALESIA; KHATIB, 2011).

Segundo Magan, Medina e Aldred (2011), os fatores mais importantes e que influenciam o crescimento, a esporulação e a produção da toxina pelo fungo são temperatura e atividade de água. Entretanto, o efeito da região também parece influenciar a produção da toxina pelos fungos.

2.7 Efeito da região na produção da ocratoxina A pelo fungo

Em relação ao campo, a localização e as condições climáticas da região vinícola parecem influenciar a ocorrência e a frequência de espécies ocratoxigênicas. Em países localizados próximo ao mar Mediterrâneo e na Austrália, as espécies mais comumente encontradas nas uvas são similares e pertencem às espécies *Aspergillus carbonarius* e *A. niger* Agregado (LEONG et al., 2006), sendo a primeira a de maior potencial ocratoxigênico. Segundo Tjamos et al. (2004), 78,35% dos isolados de *Aspergillus carbonarius* avaliados no seu estudo apresentaram potencial toxigênico e somente 6,29% dos isolados de *Aspergillus niger* eram produtores.

Ao contrário, *A. niger* é a principal espécie produtora de OTA nas uvas produzidas na Argentina. Nessa região, estudos indicam que o *A. carbonarius* foi a espécie mais frequente nas uvas, mas com baixa produção de OTA (PERRONE et al., 2007).

O impacto da produção desta toxina nas uvas produzidas na Espanha, sob diferentes temperaturas e umidade relativa, foi analisado. Esses dois fatores ambientais tiveram influência significativa na infecção fúngica e concentração da micotoxina. Os valores de OTA detectados a 30 °C foram mais altos do que a 20 °C, em ambos os tratamentos. No valor mais elevado de umidade (100%) obteve-se o valor máximo de OTA, entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre 90% e 80% de umidade (BELLI et al., 2007).

2.8 Mudanças climáticas x regiões vinícolas

As conseqüências das mudanças climáticas nas regiões vinícolas preocupam os cientistas. A temperatura é um dos fatores que mais influenciam a qualidade e as características das uvas e dos vinhos. As projeções de diversos estudos meteorológicos indicam que as regiões tradicionais do velho mundo serão as mais afetadas. Até 2049, a região de Bordeaux, na França, sofrerá um aumento de 2,3 °C, deixando a região no limite da temperatura ideal para o crescimento da tradicional 'Cabernet Sauvignon'. No sul do país, na região do Rhône, a elevação de temperatura deverá ser maior e o amadurecimento da uva Syrah, por exemplo, poderá acontecer até cinco semanas antes do que ocorre atualmente, prejudicando o sabor e a cor do vinho (ORDUÑA, 2010).

Na Austrália, a previsão é de que a temperatura se eleve entre 1 °C a 6 °C, até 2070. Ou seja, o tempo de amadurecimento das uvas será antecipado, sendo a colheita realizada por volta de dez dias antes do que acontece hoje em dia, prejudicando o nível de acidez e o sabor de variedades, como, por exemplo, a Syrah. O problema mais grave que o país enfrentará, no entanto, é a falta de água. A maior necessidade de irrigação das plantações elevará os preços do produto e diminuirão a competitividade dos vinhos australianos. Em países como a África do Sul, a elevação de temperatura será bem menor, com um

aumento de 0,9 °C, em 50 anos, afetando, principalmente, o suprimento de água, o que encarece os custos de produção. Segundo especialistas, o país mais afetado pelo aquecimento global será Portugal, onde se espera um aumento de temperatura de 4,5 °C, em 50 anos e pode haver uma redução de até 70% na umidade do solo. Outro país bastante afetado pelas mudanças climáticas será a Espanha, onde o aumento de temperatura, no interior do país, será de 5 °C e 7 °C e, na costa, de 3 °C a 5 °C. Esses países estão em busca de uvas resistentes ao calor e à baixa umidade.

Estima-se que o potencial de produção de vinhos de prestígio dos Estados Unidos pode se reduzir a 81%, até o final do século XXI. A principal região produtora, Napa Valley, na Califórnia, deve ter um aumento de até 2,2 °C na média de temperatura até 2049, o que poderá diminuir a produção da região ou fazer com que as vinícolas optem por produzir vinhos com características diferentes. As regiões de Washington e Oregon, na costa oeste, se tornarão alternativas para a produção. Outra aposta é o estado de Nova York, devido à diminuição do risco de geadas. A principal região afetada na Itália será a de Toscana, com previsão de aumento de temperatura de 1,3 °C, para os próximos 50 anos (JONES et al., 2005).

Apesar desse panorama nada favorável para as principais regiões produtoras de vinho no mundo, algumas regiões poderão ser privilegiadas. No Brasil, as previsões apontam de 1 °C a 6 °C o aumento da temperatura no país (INTERNATIONAL PAINEL CLIMATIC CHANGE, 2012). A região da Serra Gaúcha, já bastante úmida, poderia sofrer com uma eventual elevação pluviométrica. O Vale do Submédio do São Francisco, a segunda maior região produtora do Brasil, já convive com altas temperaturas e necessidade de irrigação. A cidade de São Joaquim, no sul de Santa Catarina, seria uma das apostas do futuro. O clima da região já está menos frio e há vinhos brancos e tintos sendo produzidos a partir das variedades Chardonnay, Sauvignon Blanc e

Pinot noir. Outros países também teriam um impacto positivo na produção de vinhos com a elevação da temperatura. Entre eles destacam-se o Canadá, a Alemanha, a Inglaterra, a Rússia, o Chile, a Argentina e a Dinamarca.

Conforme o exposto, as projeções de aumento de temperatura indicam um novo mapa mundi para as regiões produtoras de vinho no mundo. Mas, são poucos os estudos que avaliam a influência da temperatura na produção da toxina nessas regiões produtoras, mesmo tendo conhecimento de que essa variável é um dos fatores que mais influenciam a germinação, a esporulação e a produção da toxina pelo fungo.

Assim como o aumento de temperatura afeta as características da uva e a qualidade do vinho, essas mudanças climáticas também podem favorecer a produção da toxina pelo fungo. Segundo Magan, Medina e Aldred (2011), essas mudanças terão um elevado impacto na presença e na produção desses metabólitos secundários e os maiores riscos estão relacionados aos países desenvolvidos localizados nas regiões temperadas. O impacto das mudanças climáticas na produção da toxina deve ser analisado para cada região, devido às diferentes condições ótimas e aos limites para o crescimento e a produção das toxinas pelos fungos (PATERSON; LIMA, 2010). No Brasil, acredita-se que o aumento da temperatura não influenciará muito as regiões vinícolas, entretanto, são necessários estudos que avaliem a influência das condições climáticas no crescimento e na produção de ocratoxina A por esses microrganismos.

2.9 Legislação de micotoxinas em vinhos e seus derivados

A legislação visa minimizar a exposição dos humanos às micotoxinas e sérios problemas de saúde e mortes vêm ocorrendo através do consumo desses metabólitos secundários tóxicos. Entretanto, é de conhecimento que existem diversos fatores envolvidos com a contaminação por micotoxinas, e os fatores

climáticos são, de longe, considerados os mais importantes (PATERSON; LIMA, 2010).

Em 1998 a Comunidade Científica da União Européia para alimento estimou aceitável a ingestão diária de OTA inferior a 5ng/Kg. Em 2002 a União Européia propôs regulamentar todos os alimentos e bebidas em relação à quantidade de OTA. A concentração máxima permitida era de 0.5µg/L de vinho e suco de uva (BELLI et al., 2004).

No Brasil existe um regulamento técnico aprovado e publicado em 22 de fevereiro de 2011, sobre os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Esse regulamento tem o objetivo de estabelecer os limites máximos para aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e AFM1), ocratoxina A (OTA), desoxivalenol (DON), fumonisinas (FB1 e FB2), patulina (PAT) e zearalenona (ZON) admissíveis em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas. Os limites máximos tolerados referem-se aos resultados obtidos por metodologias que atendam aos critérios de desempenho estabelecidos pelo Codex Alimentarius. Este regulamento aplica-se às empresas que importem, produzam, distribuam e comercializem alguns produtos descritos nesta resolução. Entre as bebidas encontram-se os vinhos e seus derivados e os limites máximos aceitáveis para a ocratoxina A são de 2 µg/L (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011).

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGIÂNCIA SANITÁRIA. Resolução **No. 7 de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília: ANVISA, 2011.

BATTILANI, P. et al. Mapping of *Aspergillus* section *Nigri* in Souther Europe and Israel based on geostatistical analysis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, supl. 1, p. 72-82, Sept. 2006.

BATTILANI, P. et al. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in grapes grown in Italy. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 66, n. 4, p. 633-636, Apr. 2003.

BELLI, N. et al. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v. 38, n. 1, p. 72-77, 2004.

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

BENNET, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 66, n. 2-3, p. 101-107, Dec. 1998.

BRAKHAGE, A. A.; SCHROEKHE, V. Fungalsecondary metabolites: strategies to active silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 48, n. 1, p. 16-22, Jan. 2010.

- CABAÑES, F. J. et al. What is the source of ochratoxin A in wine? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 79, n. 3, p. 213–215, Dec. 2002.
- CONDE, C. et al. Biochemical changes throughout grape Berry development and fruit and wine quality. **Food Japan**, London, v. 1, n. 1, p. 1-22, Apr. 2007.
- COZZI, G. et al. Effect of *Lobesia betrana* damages on Black aspergilli rot and ochratoxin A content in grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, supl. 1, p. 588-592, Sept. 2006.
- ESTEBAN, A. et al. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, n. 10, p. 861–866, Dec. 2004.
- FISCHER, G. **Biodiversity of soil fungi in biodiversity in agricultural production systems**. New York: CRC Press, 2007.
- FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxin and other secondary metabolites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 46, n. 6, p. 1301-1310, Dec. 1993.
- FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. **Micologia**, Buenos Aires, v. 81, n. 6, p. 836-861, 1989.
- GARCIA, D. et al. Is intraspecific variability of growth and mycotoxin production dependent on environmental conditions? A study with *Aspergillus carbonarius* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 432–439, Jan. 2011.
- GUERRA, C. C. et al. Vinhos tropicais: novo paradigma enológico e mercadológico. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 234, p. 100-104, set./out. 2006.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 6, p. 641-655, June 1991.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimated revised. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 1422-1431, 2001.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins: volume 56**. Lyon: World Health Organization, 1993.

INTERNATIONAL PAINEL CLIMATIC CHANGE. **Climate change 2012: the physical science**. Swtzerland: IPCC, 2012.

JONES, G. V. et al. Climate change and global wine quality. **Climatic Change**, Dordrecht, v. 73, n. 3, p. 319-343, Dec. 2005.

KHALESIA, M.; KHATIB, N. The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 113–121, Sept. 2011.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002.

LEONG, S. L. et al. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.111, supl. 1, p. 10–17, Sept. 2006.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, supl. 1, p. 10–16, 2005.

MAGAN, N.; MEDINA, A.; ALDRED, D. Possible climate-change effects on mycotoxin contaminant of food crops pre and postharvest. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 150-163, Feb. 2011.

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, n. 2, p. 179-184, 2004.

MELLO, L. M. **Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial: panorama 2011**. Brasília: EMBRAPA, 2012.

MEYER, G. Genetic engineering of filamentous fungi: progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 177-185, Mar./Apr.2008.

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, 2003.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. atual. e ampl. Lavras: Editora da UFLA, 2006.

MUELLER, G.M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, London, v. 16, n. 1, p. 1-5, Jan. 2007.

ORDUÑA, R. M. de. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. **Food Research International**, Davis, v. 43, n. 7, p. 1844-1845, Aug. 2010.

PASSAMANI, F. R. F. et al. *Aspergillus* Section *Nigri* in grapes cultivated in the tropical Winery Region of Brazil. **Food and Public Health**, Rosemead, v. 2, n. 6, p. 276-280, Nov. 2012.

PATERAKI, M. et al. Influence on sulphur dioxide, controlled atmospheres and water availability on in vitro germination, growth and ochratoxin A production by strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 141-149, May 2007.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food. **Food Research International**, Davis, v. 43, n. 7, p. 1902-1914, Aug. 2010.

PERRONE, G. et al. *Aspergillus* in grapes: ecology, biodiversity and genomics. In: VARGA, J.; SAMSOM, R. **Aspergillus in the genomic era**. Wageningen: Wageningen Academic, 2008. p. 179-203.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, London, v. 59, p. 53-66, 2007.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2 ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997.

POSE, G. et al. Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 142, n. 3, p. 348-353, Sept. 2010.

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

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. Vinicultura brasileira: regiões tradicionais e pólos emergentes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 234, p. 7-15, set./out. 2006.

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

ROSA, C. A. da R. et al. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 4, p. 408-414, Apr. 2002.

SELOUANE, A. et al. Impact of some environmental factors on growth and production of Ochratoxin A of/by *Aspergillus tubingensis*, *A. niger*, and *A. carbonarius* isolated from moroccan grapes. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 47, n. 4, p. 411-419, Aug. 2009.

SERRA, R. et al. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.88, n. 1, p. 63-68, Nov. 2003.

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 760, n. 2, p. 264-270, 1997.

SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. S. **A vitivinicultura no semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

TASSOU, C. C. et al. Impact of water activity and temperature on growth and ochratoxin A production of two *Aspergillus carbonarius* isolates from wine grapes in Greece. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 70 n. 12, p. 2884-2888, Dec. 2007.

TJAMOS, S. E. et al. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in corinth raisin and wine-producing vineyards in greece: population composition, Ochratoxin A production and chemical control. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 4, p. 250-255, Apr. 2004.

VIOTTI, E. **O vinho tinto**: volume 1. São Paulo: Folha de São Paulo, 2010.

CAPÍTULO 2

Ocorrência de *Aspergillus* Seção *Nigri* em duas variedades de uvas cultivadas em vinícolas localizadas no norte de São Paulo, no sul de Minas Gerais e no Vale do Submédio do São Francisco

RESUMO

Os fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* são relatados como as principais espécies contaminantes de uvas viníferas em diferentes regiões do mundo, especialmente as situadas na zona temperada. Dentre estes o *A. carbonarius* é o principal produtor de uma toxina, a ocratoxina A (OTA). O perfil de produção da OTA pode ser afetado sob diferentes condições de cultivo do fungo, tais como disponibilidade de água, nutrientes, pH e temperatura. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas cultivadas em São Paulo, Minas Gerais e no Vale do Submédio do São Francisco, analisando as diferenças observadas entre as regiões e se a temperatura do ambiente, a atividade de água e o pH do substrato influenciam no crescimento e produção de OTA por *A. carbonarius* e *A. niger*. Para isso foram coletadas 54 amostras de uvas (*Vitis vinifera*) das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon em 2011 e 2012. As bagas, sementes e o mosto dessas amostras foram plaqueadas em meio DRBC e avaliadas quanto ao percentual de contaminação por *Aspergillus* Seção *Nigri*. Também foi analisada a frequência de ocorrência das espécies desse grupo. Os resultados obtidos mostram que não existe diferença estatística significativa entre as regiões de SP e de MG para a Syrah, mas essas regiões são diferentes estatisticamente de PE/BA, onde se observou o maior percentual de contaminação. Para a Cabernet Sauvignon a região de SP foi diferente de MG e PE/BA. Os menores percentuais de contaminação foram encontrados na região de SP. Não foi identificada nenhuma espécie de fungo ocratoxigênico nas regiões do Sudeste. No Nordeste 1,3% e 13% das espécies foram identificadas como produtoras de OTA nas safras de 2011 e 2012, respectivamente.

Palavras-chave: *Aspergillus* Seção *Nigri*. Ocorrência. Regiões Produtoras. Vinhos e Práticas Agrícolas.

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a ocorrência de espécies de fungos filamentosos em uvas viníferas estava relacionada ao desenvolvimento das doenças fúngicas causadas por esses fungos, como a podridão cinzenta, pelo fungo *Botrytis cinerea*, a podridão verde causada por espécies do gênero *Penicillium* e a podridão negra, por *Aspergillus* Seção *Nigri*. No entanto, essas investigações permitiram avanços nessa área e atualmente, o interesse na identificação da microbiota das uvas se deve ao fato de que algumas espécies desses fungos são produtoras de micotoxinas (MENDONÇA et al., 2003).

Na avaliação da ocorrência de espécies de fungos, os estudos têm mostrado que o gênero *Aspergillus* apresenta alta prevalência em uvas viníferas cultivadas sob as mais variadas condições climáticas, desde regiões localizadas em zona temperada até zonas tropicais, próximas à linha do Equador (CABAÑES et al., 2002; ROSA et al., 2002; SAGE et al., 2002; BATTILANI et al., 2003; SERRA et al., 2003; BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2004a; COZZI et al., 2007; LASRAM et al., 2007; VISCONTI et al., 2008).

Além de prevalecerem nas uvas, os *Aspergillus* Seção *Nigri* são considerados a principal fonte de uma micotoxina de grande interesse econômico e de saúde pública nos vinhos, a ocratoxina A (ZIMMERLI; DICK, 1996; SERRA et al., 2003; BATTILANI et al., 2006; LEONG et al., 2006; VAR; KABAK, 2007; VALERO; FARRE; SANCHIS, 2008).

A ocratoxina A é uma micotoxina que apresenta propriedades carcinogênicas, nefrotóxicas, imunossupressoras e teratogênicas para humanos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993).

Portanto, a presença desta toxina pode trazer risco à saúde dos consumidores permanecendo no produto final.

A presença desses fungos também diminui a produtividade e afeta a qualidade das uvas, podendo modificar a sua composição química, alterando o sabor, odor e a cor dos vinhos, provocando grandes perdas econômicas para as regiões vinícolas (FLEET, 1999; FLEET, 2001; MAGNOLI et al., 2003). Por esses motivos os fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* vêm sendo o grupo mais estudado nos países produtores de vinhos.

Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de *Aspergillus* Seção *Nigri* em duas variedades de uvas viníferas (*Vitis vinifera*) cultivadas no norte de São Paulo, sul de Minas Gerais e no Vale do Submédio do São Francisco no nordeste Brasileiro. Essas informações são fundamentais para o conhecimento da distribuição e ocorrência de espécies produtoras de OTA, assegurando a produção segura dos vinhos elaborados a partir das uvas (*Vitis vinifera*) das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon cultivadas nessas regiões.

2 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo avaliar a frequência de ocorrência de fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* nas uvas (*Vitis vinifera*) das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon cultivadas no norte de São Paulo, no sul de Minas Gerais e no Vale do Submédio do São Francisco.

2.1 Objetivos Específicos

- a) avaliar a frequência de ocorrência de *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas, sementes e mostos das três regiões vinícolas;
- b) determinar o potencial toxigênico das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* isolados de uvas, sementes e mostos;
- c) avaliar se há diferença na frequência de ocorrência de espécies toxigênicas em relação às regiões geográficas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem das uvas

Para avaliar a ocorrência das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* e o potencial ocratoxigênico destes isolados, foram coletadas 27 amostras de uvas (*Vitis vinifera*) da variedade Syrah e 27 amostras de uvas (*Vitis vinifera*) da variedade Cabernet Sauvignon, em 5 vinícolas, localizadas nos municípios de Espírito Santo do Pinhal/SP e Três Corações/MG, na região Sudeste do Brasil, Casa Nova/BA e Petrolina/PE, na região Nordeste do Brasil.

Na região Sudeste, no estado de São Paulo as amostras foram coletadas nos meses de julho e agosto nas safras de 2011 e 2012 e no estado de MG somente na safra de 2011. Na região Nordeste, essas amostras foram coletadas em junho e novembro, também nos anos de 2011 e 2012. Em cada região foram coletados 5 cachos de uvas saudáveis, distantes pelo menos 20m um dos outros ao longo de um transecto de 100m. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em recipientes estéreis e mantidas no gelo até a chegada ao laboratório, onde foram armazenadas a 18°C até serem processadas.

3.2 Avaliação do percentual de contaminação por *Aspergillus* Seção *Nigri* nas bagas das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon

De cada cacho foram selecionadas 20 bagas saudáveis (totalizando 100 bagas por amostra), desinfetadas superficialmente com Álcool a 70% (1 min) e Hipoclorito de Sódio a 1% (30 seg) e, lavadas com água destilada estéril por três vezes consecutivas. Após a desinfecção, as bagas foram plaqueadas diretamente na superfície do meio Dichloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). As

placas foram incubadas a uma temperatura de 25°C por um período de 7 dias. Após esse período, as placas foram analisadas para a avaliação do percentual de contaminação das uvas (Figura 1). Somente as colônias com características morfológicas de *Aspergillus* Seção *Nigri* foram transferidas para o meio de cultura Ágar Extrato de Malte (MA), incubadas a 25°C, por um período de 7 dias.



Figura 1 Percentual de contaminação das bagas após 7 dias de incubação em meio DRBC

3.3 Avaliação do percentual de contaminação por *Aspergillus* Seção *Nigri* nas sementes das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon

De cada cacho foram selecionadas algumas bagas de onde foram retiradas as sementes (totalizando 100 sementes por amostra), desinfectadas superficialmente, plaqueadas e incubadas conforme descrito no item 3.2. Após 7 dias, as placas foram analisadas para a avaliação do percentual de contaminação das sementes (Figura 2). Somente as colônias com características morfológicas de *Aspergillus* Seção *Nigri* foram transferidas para o meio de cultura Ágar Extrato de Malte (MA), incubadas a 25°C, por um período de 7 dias.

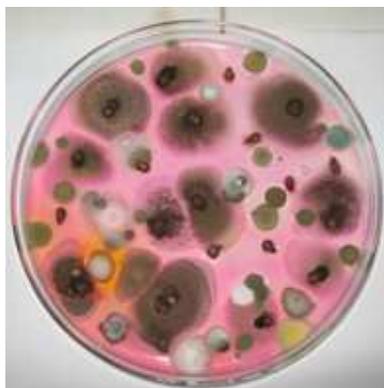


Figura 2 Percentual de contaminação das sementes após 7 dias de incubação

3.4 Contagem de colônias de fungos de *Aspergillus* Seção *Nigri* em mosto

Para a análise do mosto foram utilizadas 25 g de uvas de cada amostra coletada, que foram maceradas para a obtenção do mosto. A avaliação do mosto foi realizada utilizando-se a técnica de diluição seriada. Por espalhamento, 0,1 mL de cada diluição (1:10, 1:100 e 1:1000) foi transferido para as placas contendo o meio DRBC e então incubadas a 25°C por um período de 7 dias. Esse experimento foi realizado em triplicata. Após esse período as placas foram analisadas e realizadas a contagem de unidades formadoras de colônias com características morfológicas de *Aspergillus* Seção *Nigri* (Figura 3). Somente as colônias de interesse foram purificadas em meio de cultura Ágar Extrato de Malte (MA), incubadas a 25°C, por um período de 7 dias.



Figura 3 Contagem das unidades formadoras de colônias de *Aspergillus* Seção *Nigri* em mosto

3.5 Identificação das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*

A partir das culturas puras os fungos do gênero *Aspergillus* foram identificados de acordo com Klich (2002) e Varga et al. (2011). Todos os isolados selecionados foram incubados em meios de cultura e temperaturas padronizados CYA (Ágar Czapek Levedura) a 25°C e a 37°C e MEA (Ágar Extrato de Malte) a 25°C. Após 7 dias de incubação foram observadas as características macroscópicas e microscópicas dos fungos filamentosos (Figuras 4 e 5).



Figura 4 Características macroscópicas (coloração e tamanho da colônia) dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri*



Figura 5 Características microscópicas de *Aspergillus japonicus*

A purificação e identificação dos fungos filamentosos foram realizadas no Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

3.6 Screening do potencial ocratoxigênico de *Aspergillus carbonarius* e *A. niger*

Para a determinação do potencial de produção de ocratoxina A foi utilizado o método Plug Ágar, conforme descrito por Filtenborg e Frisvad (1980). Os isolados de *Aspergillus carbonarius* e *A. niger* testados foram inoculados em meio de cultura CYA (Ágar Czapek Levedura) a 25 °C por 7 dias. Foram utilizadas Placas de Cromatografia de Camada Delgada (Merk-Sílica Gel 60, 20x20), solução padrão de ocratoxina A (Sigma-Aldrich) e a Fase móvel TEF composta por Tolueno, Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (50:40:10). A confirmação quanto à produção de OTA foi efetuada sob luz ultravioleta de 366 nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados foram considerados produtores de OTA quando apresentaram um RF (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão da ocratoxina A.

3.7 Análises estatísticas

Para avaliar se houve diferença em relação às regiões geográficas, assim como se as variedades de uvas apresentaram diferente frequência de ocorrência de *Aspergillus* Seção *Nigri*, foi empregada uma análise de variância (ANOVA), com um teste *a posteriori* de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Percentual de contaminação por *Aspergillus* Seção *Nigri* nas bagas das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon

O percentual de contaminação das bagas da variedade Syrah encontrado foi de 3% em São Paulo (SP), de 2,2% em Minas Gerais (MG) e de 35,6% em Pernambuco/Bahia (PE). Para a variedade Cabernet Sauvignon, observamos que o percentual de contaminação das bagas, nas regiões de SP, MG e PE/BA foi de 1,3%, 20,5% e 14,7% respectivamente (Figura 6).

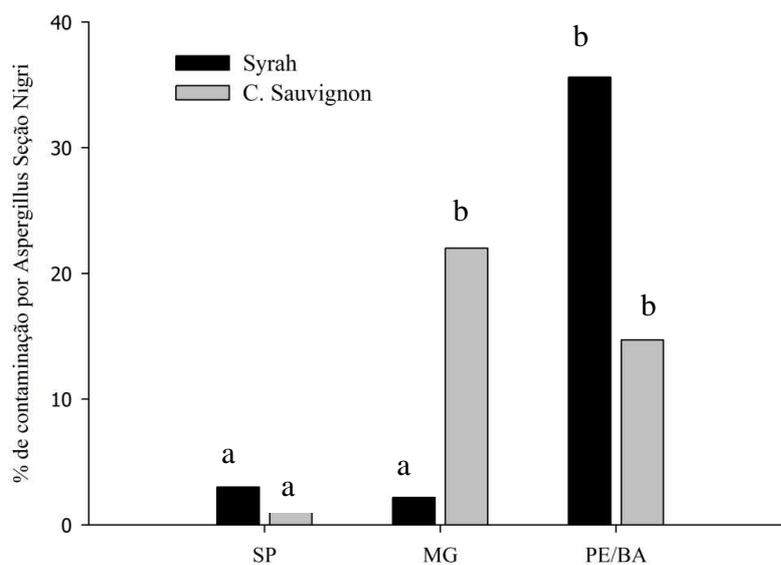


Figura 6 Percentual de contaminação das bagas da variedade Syrah e Cabernet Sauvignon, por *Aspergillus* Seção *Nigri*, nas três regiões avaliadas: São Paulo (SP), Minas Gerais (MG) e Pernambuco/Bahia (PE/BA)

Comparando os valores médios das regiões para a Syrah, observamos que não existe diferença estatística significativa entre as regiões de SP e MG ($p = 0.998$), mas que essas regiões são estatisticamente diferentes da região PE/BA ($p = 0.021$ e $p = 0.018$). Para a Cabernet Sauvignon a análise de variância demonstrou que a região de SP é estatisticamente diferente das regiões de MG e PE/BA ($p = 0.0064$; $p = 0.029$). No entanto, não existe diferença estatística significativa entre as regiões de MG e PE/BA ($p = 0.457$).

Os valores baixos de contaminação encontrados para as duas variedades analisadas e coletadas na região de São Paulo podem estar associados a uma prática de cultivo adotada na vinícola, que é o uso de uma tela de malha bem fina na altura do dossel da planta. A proteção é utilizada com o objetivo de dificultar o ataque de aves e insetos que provocariam injúrias à superfície das uvas. Essas injúrias poderiam facilitar a presença de fungos patogênicos e fungos oportunistas, como os *Aspergillus* Seção *Nigri*.

Para a variedade Syrah coletada na região de MG o valor encontrado também pode ser considerado baixo, no entanto, para a variedade Cabernet Sauvignon esse valor foi semelhante ao encontrado para a mesma variedade na região de PE/BA. Se considerarmos a localização geográfica e o clima como fatores que influenciam a ocorrência dessas espécies, era de se esperar que os resultados obtidos nas regiões localizadas no Sudeste fossem semelhantes. Mas, alguns estudos indicam que a variedade também influencia na presença desses fungos nas uvas, e pode ser que a variedade cultivada em MG seja mais suscetível a contaminação por fungos filamentosos, por isso os resultados serem diferentes (BATTILANI et al., 2004).

A região de PE/BA apresentou valores de percentual de contaminação das bagas mais elevados nas duas variedades analisadas, podendo estar relacionado às temperaturas encontradas na região, à irrigação contínua e a posição geográfica. Segundo Battilani et al. (2006) e Visconti et al. (2008),

diversos fatores extrínsecos afetam a ocorrência destes fungos nas vinícolas. Fatores climáticos do ambiente (temperatura, umidade), posição geográfica (latitude e longitude), variedade das uvas cultivadas e tipo de cultivo podem ser considerados como fatores extrínsecos. A irrigação excessiva, assim como um alto índice pluviométrico, provoca um aumento na incidência de rachaduras nas bagas, o que pode proporcionar um aumento na porta de entrada de fungos oportunistas (COZZI et al., 2007). Esses autores sugerem ainda que existe uma maior ocorrência destas espécies com a proximidade da linha do equador, devido ao aumento da temperatura e umidade. A região de PE/BA é a mais próxima da linha do equador quando comparada com as outras duas regiões analisadas neste estudo.

Os valores obtidos nas regiões de SP e MG podem ser considerados próximos quando comparados com estudos realizados nas regiões vinícolas de clima temperado, pelo menos para a variedade Syrah. Belli et al. (2006), avaliando a micobiota das uvas sadias em três regiões vinícolas da Espanha, encontraram valores entre 0 e 10% de contaminação das bagas de diferentes variedades (Garnacha, Tempranillo, Bobal, Graciano, Cabernet Sauvignon e Merlot) e uma correlação positiva entre o percentual de contaminação por *Aspergillus* Seção *Nigri* e as temperaturas máxima, mínima e média no mês que antecedeu a coleta das amostras. No entanto, não foi observada uma correlação positiva com a umidade relativa e a pluviosidade. Na região de Mendoza, Argentina, o percentual médio de bagas sadias infectadas por *Aspergillus* Seção *Nigri*, foi de 20% para a variedade Merlot, 5% para Malbec e 2% para Cabernet Sauvignon, na safra de 2006/2007. Na safra de 2008/2009 só foi observado contaminação da variedade Malbec e esse valor foi de 14% (CHIOTTA et al., 2010).

Estudo realizado em quatro regiões vinícolas de Portugal, com diferentes condições climáticas, demonstrou que o clima influencia na distribuição das

espécies de fungos na uva. A frequência de ocorrência de *Aspergillus* Seção *Nigri* variou entre as regiões estudadas. Na região de Vinhos Verdes essas espécies não representaram mais do que 10% nas amostras analisadas; no Ribatejo variaram entre 18 e 48%; no Douro os valores encontrados foram de 20 a 92%; e no Alentejo foram de 72 a 100%. As duas últimas regiões, onde a incidência de *Aspergillus* Seção *Nigri* foi elevada, apresenta clima Mediterrâneo, com verão quente e seco, atingindo temperaturas próximas aos 40°C (SERRA et al., 2003).

Os fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* são considerados a microbiota predominante das uvas na época da colheita, embora possam ser encontrados na superfície de uvas sadias em todos os estágios de maturação (CABAÑES et al., 2002; ROSA et al., 2002; SAGE et al., 2002; BATTILANI et al., 2003; SERRA et al., 2003; BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2004a). Da mesma forma Bau et al. (2005), Cozzi et al. (2007), Lasram et al. (2007) e Visconti et al. (2008) mostraram que a contaminação por *Aspergillus* Seção *Nigri* aumenta a cada período de desenvolvimento do fruto, atingindo o máximo de ocorrência durante a maturação das uvas na época da colheita. Apesar das diferenças de contaminação, a ocorrência desses fungos em regiões tropicais e subtropicais também pode ser explicada pela coloração negra dos seus conídios, que fornecem proteção a luz solar e luz ultravioleta, proporcionando uma vantagem competitiva em climas mais quentes e secos (PITT; HOCKING, 1997).

As uvas, assim como outras frutas, podem ser contaminadas por diferentes grupos microbianos que possuem a capacidade de se desenvolver em pH ácido e altos teores de açúcar. Essa contaminação afeta a qualidade, alterando a composição química das uvas e as características sensoriais de cor e sabor dos vinhos. Além disso, a prevalência desses contaminantes pode alterar a fermentação durante o processamento (FLEET, 1999).

O uso de fungicidas para o controle de fungos patogênicos também pode afetar a ocorrência de *Aspergillus* nas uvas, pois os mesmos seriam beneficiados por não serem afetados por esses fungicidas (SERRA et al., 2006). O que tem se observado é que os fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* apresentam alta prevalência em uvas cultivadas sob as mais variadas condições climáticas, desde regiões localizadas em zona temperada até zonas tropicais. Por esse motivo, vem sendo o grupo mais estudado em diversos países, além de possuir espécies potencialmente produtoras de micotoxinas de grande interesse econômica e de saúde pública (EINLOFT, 2012).

4.2 Percentual de contaminação por *Aspergillus* Seção *Nigri* das sementes

O percentual de contaminação das sementes, da variedade Syrah, foi de 3,7% para São Paulo (SP), 15,8% para Minas Gerais (MG) e 24,8% para Pernambuco/Bahia (PE/BA). Para a variedade Cabernet Sauvignon podemos observar que a média do percentual de contaminação das sementes por *Aspergillus* Seção *Nigri*, foi de 2% para São Paulo (SP), 11,8% para Minas Gerais (MG) e 8,7% para Pernambuco (PE/BA) (Figura 7).

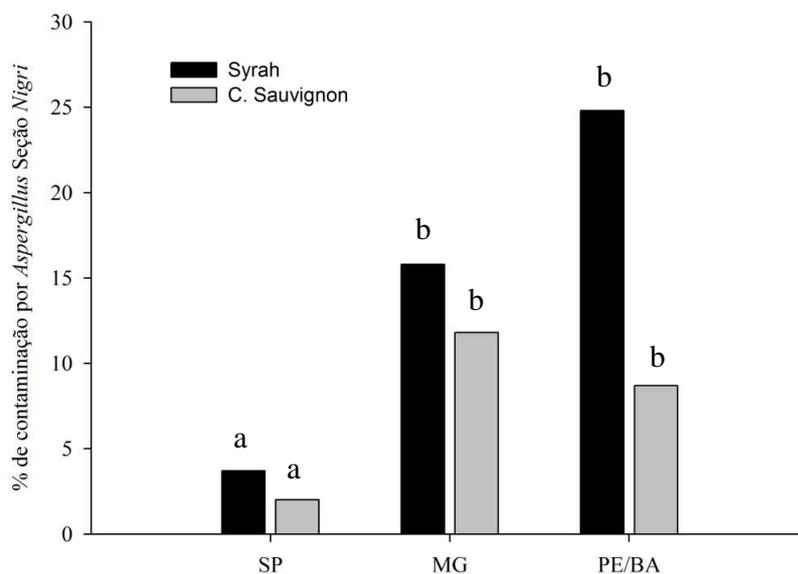


Figura 7 Percentual médio de contaminação das sementes, das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon, nas três regiões analisadas: São Paulo (SP), Minas Gerais (MG) e Pernambuco/Bahia (PE/BA)

Assim como o observado nas bagas, os menores percentuais de contaminação encontrados nas sementes foram obtidos das amostras coletadas na região de São Paulo. Os resultados obtidos neste estudo indicam que as bagas das duas variedades estão mais suscetíveis à contaminação por *Aspergillus* Seção *Nigri* quando comparadas com as sementes, provavelmente porque estas se encontram protegidas no interior da baga. Apesar de estarem protegidas pela baga, é interessante observar que os fungos pertencentes à Seção *Nigri* conseguem colonizar as sementes. Este comportamento pode estar associado ao fato da semente ser considerada uma estrutura do fruto que apresenta alto valor nutritivo, sendo composta principalmente por carboidrato (amido) e o metabolismo fúngico é favorecido nos substratos ricos em carboidratos (PITT;

HOCKING, 1997). No entanto, não existem estudos realizados sobre o percentual de contaminação das sementes de uvas viníferas.

No tocante à produção de vinho, estes resultados demonstram que mesmo que a vinícola adote práticas de higienização dos frutos, minimizando os riscos da presença de fungos potencialmente toxigênicos na superfície das bagas, os mesmos podem estar presentes nas sementes, ressaltando a importância no controle dos fungos na época da pré-colheita.

4.3 Contagem de colônias de *Aspergillus* Seção *Nigri* dos mostos obtidos das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon

O percentual médio de contaminação do mosto obtido das uvas da variedade Syrah foi de $1,67 \times 10^0$ UFC/mL para MG e de $1,07 \times 10^3$ UFC/mL para PE/BA. Não foi observada nenhuma colônia de *Aspergillus* seção *Nigri* no mosto obtido das uvas coletadas na região de SP. A contagem de *Aspergillus* Seção *Nigri* no mosto obtido da variedade Cabernet Sauvignon foi de $2,68 \times 10^1$ UFC /mL para SP, de $3,27 \times 10^2$ UFC/mL para MG e de $3,17 \times 10^2$ UFC/mL para PE/BA (Figura 8).

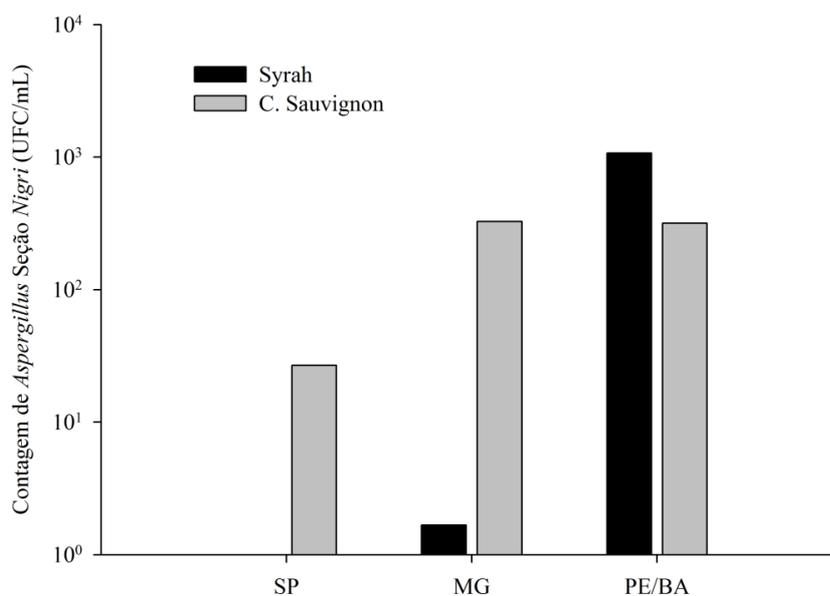


Figura 8 Contagem de *Aspergillus* Seção *Nigri* (UFC/mL) no mosto obtido das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon, nas três regiões analisadas: São Paulo (SP), Minas Gerais (MG) e Pernambuco/Bahia (PE/BA)

Fleet (1999), avaliando o grau de contaminação por microrganismos na superfície de uvas sadias, observou valores entre $1,0 \times 10^3$ e $1,0 \times 10^5$ Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC/g).

Oliveira et al. (2009), analisando a superfície de uvas injuriadas e principalmente o mosto, encontraram valores mais elevados quando comparado com o das uvas sadias e esses valores foram de 10^6 e 10^8 UFC/g. Esses resultados podem ser considerados elevados quando comparados com os obtidos neste estudo, onde a contaminação do mosto não apresentou valores acima de $1,0 \times 10^3$ UFC/g. Vale lembrar que, para a análise do mosto, foram utilizadas bagas saudáveis, que são menos propícias à infecção por fungos oportunistas como os *Aspergillus* Seção *Nigri*.

4.4 Frequência de ocorrência de *Aspergillus* Seção *Nigrinas* uvas Syrah e Cabernet Sauvignon

Para avaliar a frequência de ocorrência dos *Aspergillus* Seção *Nigri* foram avaliadas um total de 27 amostras da variedade Syrah e 27 amostras da variedade Cabernet Sauvignon nas cinco vinícolas analisadas. Do total das amostras foram isolados e identificados 180 fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* na variedade Syrah e 196 fungos na variedade Cabernet Sauvignon, totalizando 376 isolados. No norte de São Paulo, para a variedade Syrah, foram identificados 47 isolados de *Aspergillus* Seção *Nigri* na safra de 2011 e 56 isolados na safra de 2012. Em 2011, as espécies mais frequentes foram: *A. niger* (63,8%), *A. japonicus* (25,6%) e *A. niger* Agregado (10,6%). Na safra de 2012 a espécie mais frequente também foi o *A. niger* (46,4%), seguido de *A. japonicus* (32,1%), *A. niger* Agregado (17,9%) e *A. aculeatus* com 3,6% (Figura 9).

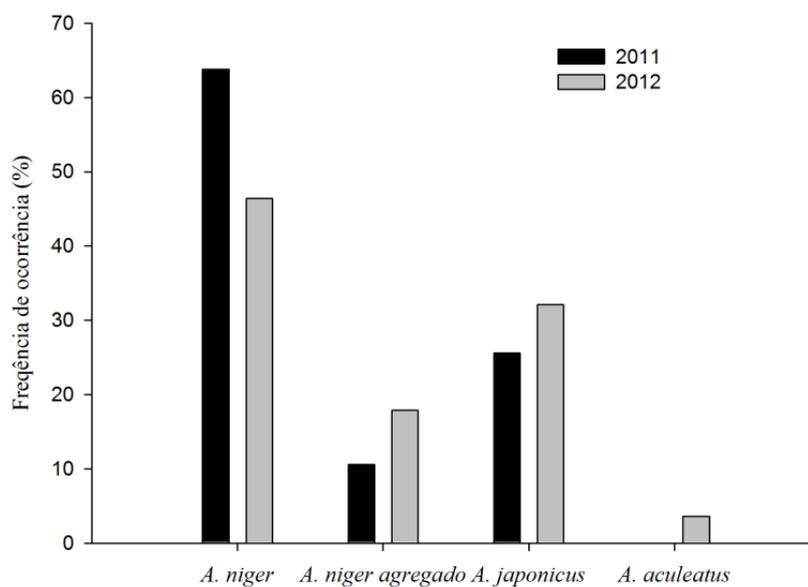


Figura 9 Frequência de ocorrência das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* na variedade Syrah coletada em SP nos anos de 2011 e 2012

Na variedade Cabernet Sauvignon foram isolados e identificados 67 fungos filamentosos da Seção *Nigri* na safra de 2011 e 47 fungos em 2012 (Figura 10).

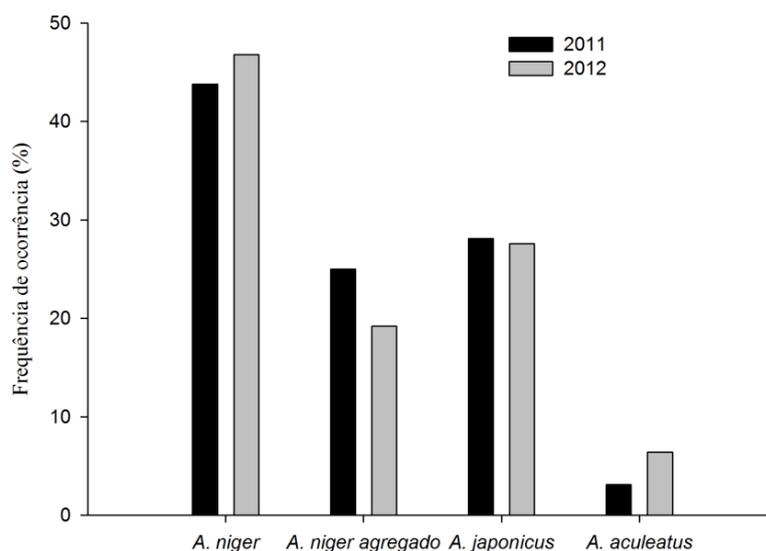


Figura 10 Frequência de ocorrência das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* na variedade Cabernet Sauvignon coletada em SP nos anos de 2011 e 2012

Em 2011, as espécies mais frequentes foram: *A. niger* (43,8%), *A. niger* Agregado (25%), *A. japonicus* (28,1%) e *A. aculeatus* (3,1%). Na safra de 2012 foram identificadas as seguintes espécies de fungos da Seção *Nigri*: *A. niger* (46,8%), *A. japonicus* (27,6%), *A. niger* Agregado (19,2%) e *A. aculeatus* (6,1%).

No sul de Minas Gerais, para a variedade Syrah, foram identificados 29 isolados de *Aspergillus* Seção *Nigri* e as espécies mais frequentes foram: *A. niger* Agregado (51,7%), *A. niger* (31,1%) e *A. japonicus* (17,2%). Na variedade Cabernet Sauvignon foram isolados e identificados 80 fungos filamentosos da Seção *Nigri* no ano de 2011 e as espécies mais frequentes foram: *A. niger* Agregado (41,2%), *A. niger* (36,3%) e *A. japonicus* (22,5%) (Figura 11).

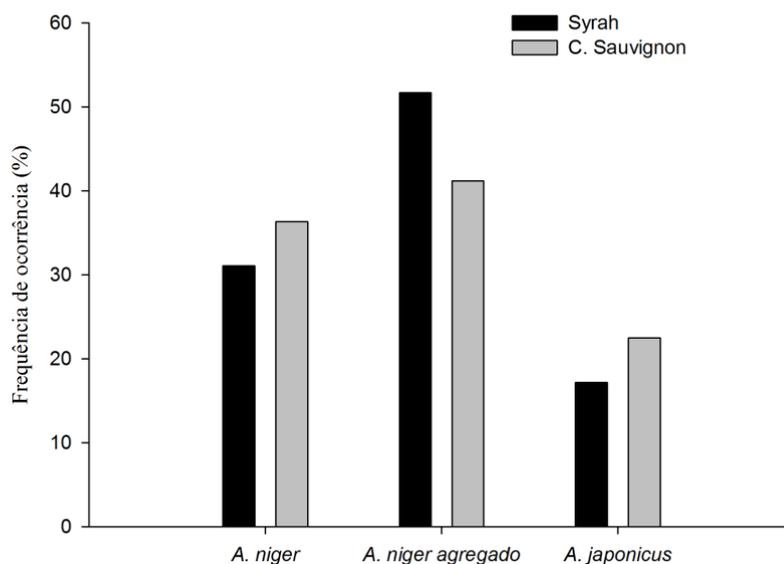


Figura 11 Frequência de ocorrência das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* nas variedades Syrah e Cabernet Sauvignon coletadas em Minas Gerais no ano de 2011

No Vale do Submédio do São Francisco na variedade Syrah, na safra de 2011 foram identificados 88 isolados de *Aspergillus* Seção *Nigri* e as espécies mais frequentes foram: *A. japonicus* (54,6%), *A. niger* Agregado (27%), *A. niger* (17,2%) e *A. carbonarius* (1,2%). Em 2012 foram isolados e identificados 15 fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* e as espécies apresentaram o seguinte percentual de ocorrência: *A. japonicus* (33,3%), *A. niger* Agregado (33,3%), *A. niger* (20,1%) e *A. carbonarius* (13,3%). (Figura 12).

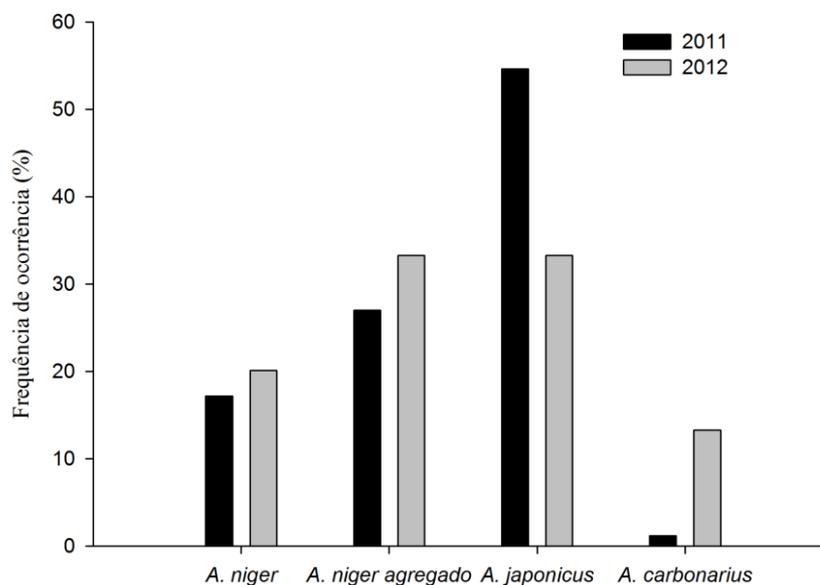


Figura 12 Frequência de ocorrência das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* na variedade Syrah coletada em Pernambuco/Bahia nos anos de 2011 e 2012

Na variedade Cabernet Sauvignon na safra de 2011 foram isolados e identificados 22 fungos filamentosos da Seção *Nigri* e as espécies mais frequentes foram: *A. japonicus* (54,5%), *A. niger* Agregado (36,4%) e *A. niger* (9,1%). No ano de 2012 o número de isolados identificados foram 27 fungos da Seção *Nigri* assim distribuídos: *A. japonicus* (44,4%), *A. niger* (37,1%) e *A. niger* Agregado (18,5%) (Figura 13).

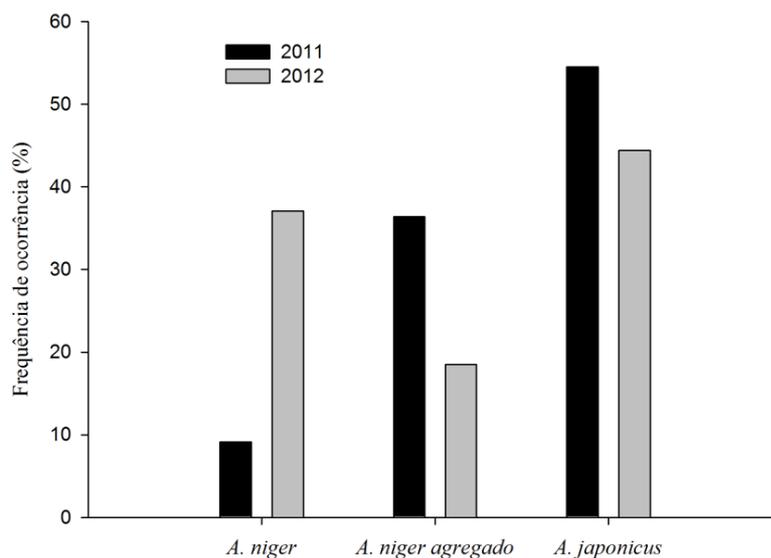


Figura 13 Frequência de ocorrência das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* na variedade Cabernet Sauvignon coletada em Pernambuco/Bahia nos anos de 2011 e 2012

Nos últimos 5 anos vários estudos foram publicados sobre a distribuição de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas e seus derivados em diferentes regiões do mundo. A maioria dos estudos foi realizado em regiões vinícolas localizadas em países mediterrâneos (Espanha, França, Portugal, Itália, Grécia e Israel), e alguns foram desenvolvidos em países da América do Sul (Brasil e Argentina) e Austrália (SOMMA; PERRONE; LOGRIECO, 2012). Em todas as regiões analisadas o grupo *Aspergillus niger* Agregado, que inclui as espécies *A. tubingensis* e *A. foetidus*, representaram entre 50 e 100% da frequência de ocorrência das espécies identificadas. Nos países mediterrâneos (PERRONE et al., 2006b; BATTILANI et al., 2006; BEJAOUI et al., 2006; BELLI et al., 2006; SERRA et al., 2006; TJAMOS et al., 2006) e na Austrália (Leong et al., 2006), com exceção de Israel (GUZEV et al., 2006) e Portugal (SERRA et al., 2006), o

A. carbonarius apresentou valores entre 30 e 50% da frequência de ocorrência, seguido por *Aspergillus* unisseriados (*A. japonicus*, *A. aculeatus* e *A. uvarum*) com valores entre 0 e 30% da frequência de ocorrência. Na Argentina, os estudos indicam valores menores (0-10%) para a distribuição de *A. carbonarius* (PONSONE et al., 2007; MAGNOLI et al., 2003; MAGNOLI et al., 2004), e no Brasil, estudo realizado por Rosa et al. (2002) observou um valor de 20% de frequência de ocorrência para *A. carbonarius* em uvas produzidas na região sul do país. Os resultados obtidos nessa região do Brasil diferem dos resultados deste estudo. Na região de Pernambuco foi observado 13% de frequência de ocorrência de *A. carbonarius* e nas regiões de São Paulo e Minas Gerais não foi isolado nenhum *A. carbonarius*. Isto demonstra o baixo risco de contaminação por OTA nos vinhos elaborados a partir das amostras estudadas. De forma contrária, em regiões de clima temperado, o *Aspergillus carbonarius* apresenta uma alta frequência de ocorrência em frutas maduras, particularmente em uvas (KHALESIA; KHATIB, 2011).

Segundo Chiotta et al. (2010) e Battilani et al. (2006), a ocorrência de *Aspergillus carbonarius* está relacionado as condições climáticas de temperaturas mais elevadas durante todo o ano, não somente na época de cultivo. Desta maneira, a ausência dessa espécie nas regiões de São Paulo e Minas Gerais podem ser explicadas pelas condições climáticas das regiões, classificados como clima subtropical, com temperatura média de 16°C e inverno rigoroso (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, 2013).

A presença do *A. carbonarius*, mesmo que em pequena quantidade (1,3% em 2011 e 13% em 2012), na região do Vale do Submédio do São Francisco, Nordeste do Brasil, poderia estar relacionado às temperaturas elevadas observadas durante todo o ano. O clima dessa região é classificado como Tropical Semi-árido, com média anual de temperatura de 26°C, e temperatura máxima podendo atingir os 33°C (TEIXEIRA, 2001).

Os resultados obtidos demonstram que apesar das espécies de *Aspergillus carbonarius* serem consideradas cosmopolitas e crescerem em diferentes tipos de clima e substratos (JORGENSEN, 2005), a localização e as condições climáticas da região vinícola parecem influenciar na ocorrência e frequência dessas espécies ocratoxigênicas.

Os fungos *Aspergillus* não são considerados patógenos primários e a sua infecção nas uvas está associada a lesões provocadas por danos mecânicos ou pela infecção por outras espécies fúngicas. É interessante observar que a vinificação de frutos contaminados em áreas, onde já foi detectado o fungo potencialmente ocratoxigênico, devem ser evitados para minimizar o risco da presença da ocratoxina A no produto final, ou seja, no vinho (Serra et al., 2006)

4.5 Potencial ocratoxigênico de *Aspergillus carbonarius* e *A. niger*

As análises de cromatografia em camada delgada mostraram que do total de fungos *Aspergillus niger* isolados e identificados nas duas variedades analisadas, nenhum isolado foi potencial produtor de ocratoxina A.

Devido às suas características fisiológicas essa espécie se torna predominante em regiões ou em determinadas estações do ano onde as temperaturas atingem os 40°C. Essa temperatura favorece o crescimento do fungo no campo. No entanto, apenas uma baixa porcentagem (5 a 10%) de cepas de *A. niger* são produtoras de OTA (PERRONE et al., 2008), isto explica a elevada ocorrência dessa espécie nas vinícolas avaliadas e a não produção de OTA por esses isolados.

As espécies de *Aspergillus carbonarius* isolados somente nas vinícolas localizadas no Vale do Submédio do São Francisco apresentaram fator de retenção e spot de fluorescência semelhante ao encontrado para o padrão da OTA, o que significa que os fungos são considerados produtores desta toxina, ou

seja, 100% dos isolados neste estudo são potenciais produtores de OTA. Segundo Klich (2002), uma alta porcentagem de isolados pertencentes a essa espécie (98 – 100%) são consideradas produtoras de ocratoxina A.

No entanto, vale ressaltar que a presença do fungo produtor de OTA nas uvas viníferas não significa contaminação do vinho elaborado a partir dessas uvas, pois as condições ambientais para o crescimento do fungo diferem das condições ótimas para a produção da toxina (MAGAN; MEDINA; ALDRED, 2011).

5 CONCLUSÃO

As regiões vinícolas situadas no norte de São Paulo, sul de Minas Gerais e no Vale do Submédio do São Francisco, mesmo que cultivando as mesmas variedades de uvas, apresentaram diferenças quanto ao percentual de contaminação por *Aspergillus* Seção *Nigri* nas bagas e sementes. Essas diferenças podem estar relacionadas às práticas agrícolas adotadas pelas vinícolas e às condições climáticas da região.

A região do Vale Submédio do São Francisco foi a que apresentou o maior percentual de contaminação por esse grupo de fungos e esses valores podem estar associados à posição geográfica, próxima à linha do Equador e à temperatura média anual que é de 26°C, temperatura considerada ótima para o crescimento do fungo. Esta região foi a única, dentre as estudadas, que apresentou ocorrência de *Aspergillus carbonarius* produtor de ocratoxina A (OTA).

REFERÊNCIAS

- BATILLANI, 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, n. 13, p. 1736-1740, Oct. 2004.
- 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, supl. 1, p. 72-82, Sept. 2006.
- BATTILANI, P. et al. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in grapes grown in Italy. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 66, n. 4, p. 633-636, Apr. 2003.
- BAU, M. et al. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.98, n. 2, p. 125–130, Feb. 2005.
- BEJAOU, H. et al. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.111, supl. 1, p. 46–52, Sept. 2006.
- BELLÍ, N. et al. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* Section *Nigri* obtained from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 19–27, Oct. 2004b.
- BELLÍ, N. et al. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, supl. 1, p. 40–45, Sept 2006.
- BELLÍ, N. et al. Occurrence of ochratoxin A and potential producers on grapes from Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 541–546, 2004a.

CABAÑES, F. J. et al. What is the source of ochratoxin A in wine? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 79, n. 3, p. 213–215, Dec. 2002.

CHIOTTA, M. L. et al. Influence of *Planococcus ficus* on *Aspergillus* section *Nigri* and ochratoxin A incidence in vineyards from Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 212–218, Aug. 2010.

COZZI, G. et al. Epidemiology of ochratoxina A production fungi in Apulian vineyards. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 12., 2007, Istanbul. **Proceedings...**Istanbul: IUPAC, 2007. p. 21-25.

EINLOFT, T. C. **Caracterização micotoxicológica de uvas viníferas produzidas no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2012. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ESTEBAN, A. et al. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, n. 10, p. 861–866, Dec. 2004.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 13, n. 2, p. 128-130, 1980.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1-2, p. 101-117, Sept. 1999.

FLEET, G. H. Wine. In: BEUCHAT, L. R.; MONVILLE, T. J.; DOYLE, M. P. **Food microbiology fundamentals and frontiers**. 2. ed. Washington: ASM Press. 2001. p. 747-772.

GUZEV, L. et al. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in wine and table grapes in Israel. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.111, supl. 1, p. 67-71, Sept. 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=noticia/listarNoticias&offset=4>>. Acesso em: 14 abr. 2013.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins: volume 56**. Lyon: World Health Organization, 1993.

JORGENSEN, K. Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food: a review of EU occurrence data. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, supl. 1, p. 26-30, 2005.

KHALESIA, M.; KHATIB, N. The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. **Environmental toxicology and pharmacology**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 113-121, Sept. 2011.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002.

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, Mar. 2007.

LEONG, S. L. et al. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.111, supl. 1, p. 10-17, Sept 2006.

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* Section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 10, n. 1, p. 83–88, 2004.

MAGAN, N.; MEDINA, A.; ALDRED, D. Possible climate-change effects on mycotoxin contaminant of food crops pre and postharvest. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 150-163, Feb. 2011.

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, n. 2, p. 179-184, 2004.

MAGNOLI, C. et al. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 326–331, 2003.

MENDONÇA, C. et al. Contaminação fúngica das uvas e ocratoxina A em vinhos. In: Cerdeira, A. et al. (Ed.). **Impacto da contaminação fúngica sobre a competitividade de vinhos – ocratoxina A**. Braga: Micoteca da Universidade do Minho, 2003. p. 9-27.

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, 2003.

PERRONE, G. et al. *Aspergillus* in grapes: ecology, biodiversity and genomics. In: VARGA, J.; SAMSOM, R. **Aspergillus in the genomic era**. Wageningen: Wageningen Academic, 2008. p. 179-203.

PERRONE, G. et al. Ochratoxin A production and AFLP analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, n. 1, p. 680–685, Jan. 2006b.

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

PONSONE, M. L. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinian wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 131-135, 2007.

ROSA, C. A. da R. et al. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 4, p. 408-414, Apr. 2002.

SAGE, L. et al. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts in France. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 5, p. 1306-1311, Feb. 2002.

SERRA, R. et al. *Aspergillus ibericus*: a new species of the Section *Nigri* isolated from grapes. **Mycologia**, Lancaster, v. 98, n. 2, p. 295-306, Mar./Apr. 2006.

SERRA, R. et al. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.88, n. 1, p. 63-68, Nov. 2003.

SOMMA, S.; PERRONE, G.; LOGRIECO, A. F. Diversity of black *Aspergilli* and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 51, n. 1, p. 131-147, 2012.

TEIXEIRA, A. H. C. **Informações agrometeorológicas do pólo Petrolina/PE Juazeiro/BA**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2001. (Documentos, 168).

TJAMOS, S. E. et al. Antoniou and E.C. Tjamos,. *Aspergillus* spp. Distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.111, supl. 1, p. 61-66, Sept. 2006.

VALERO, A.; FARRE, J. R.; SANCHIS, V. Survey: ochratoxin A in European special wines. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 2, p. 593-599, May 2008.

VAR, I.; KABAK, B. Occurrence of ochratoxin A in Turkish wines. **Microchemical Journal**, New York, v. 86, n. 2, p. 241-247, Aug. 2007.

VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, London, v. 69, n. 1, p. 1-17, June 2011.

VISCONTI, A. et al. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 25, n. 2, p. 193-202, Feb. 2008.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 6, p. 655-668, Aug./Sept. 1996.

CAPÍTULO 3

Efeito de fatores abióticos no crescimento e produção de Ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* isolados de uvas viníferas cultivadas no Brasil

RESUMO

O crescimento dos fungos ocratoxigênicos e a presença de ocratoxina A (OTA) nas uvas e seus derivados podem ser influenciados por fatores físicos, químicos e biológicos. Determinar a influência desses fatores no crescimento e produção de OTA por essas espécies de fungos, isolados de diferentes regiões geográficas, é muito importante para o desenvolvimento de modelos que auxiliem a minimizar o risco da presença de OTA nesses produtos. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da temperatura, atividade de água (aw) e pH no desenvolvimento e produção de OTA em um meio de cultura de uva semi-sintético por *Aspergillus carbonarius* e *A. niger*. Para otimizar as condições de cultivo foi realizado um delineamento experimental com superfície de resposta como uma ferramenta para avaliar os efeitos dessas variáveis abióticas sobre o comportamento dos fungos. *A. carbonarius* mostrou o maior crescimento nas condições de cultivo, com temperaturas que variam de 20°C a 33°C, de aw entre 0,95 e 0,98 e valores de pH entre 5 e 6,5. Do mesmo modo, as condições ótimas de crescimento para *A. niger* foram temperaturas entre 24°C e 37°C, aw maior do que 0,95 e pH níveis entre 4 e 6,5. As maiores concentrações de toxina para *A. carbonarius* e *A. niger* (10 µg/g e 7,0 µg/g, respectivamente) foram encontrados em condições de stress que foram influenciados pela temperatura e não foram observados nas condições de crescimento ótimas. Verificou-se que o pH mais baixo contribuiu para uma maior produção de OTA. Estes resultados mostram que os fungos avaliados são capazes de crescer e produzir a micotoxina em uma ampla gama de temperatura, atividade da água e pH. No entanto, as condições ótimas para a produção da toxina são geralmente diferentes daquelas para o crescimento do fungo. Conhecer as condições ótimas para o crescimento e produção de OTA pelo fungo e em que etapas do cultivo estas condições são ótimas, é possível avaliar com mais precisão o potencial risco para a saúde pelo consumo de produtos derivados da uva produzidos em diferentes regiões vitícolas do Brasil.

Palavras-chave: Fatores abióticos. Crescimento. Ocratoxina A. *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger*.

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são um grupo de diferentes compostos químicos, com propriedades tóxicas, causando problemas agudos e crônicos para a saúde humana e de animais. A Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina nefrotóxica com propriedades carcinogênicas, imunossupressoras e teratogênicas (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993). Em humanos, a ingestão de quantidade elevada de OTA está associada à Nefropatia Endêmica dos Balcãs, um tipo de doença encontrada em áreas rurais da Bulgária, Romênia, Sérvia, Croácia e Bósnia (MARQUARDT; FROLICH, 1992).

OTA foi primeiramente associada com cereais (VILA; MARKAKI, 2009), entretanto, nas décadas recentes, esta toxina tem sido observada em uvas e seus derivados (ZIMMERLI; DICK, 1996; SERRA et al., 2003; BATTILANI et. al, 2006; LEONG et. al, 2006; VAR; KABAK, 2007; VALERO; FARRE; SANCHIS, 2008). Na Europa, depois dos cereais, o vinho é considerado a maior fonte de OTA ingerida pela população (MIRAGLIA; BRERA, 2002).

Para proteger os consumidores dos riscos de ingestão desta toxina, muitos países adotaram regulamentos com limites de exposição. De acordo com Duarte, Lino e Pena (2010), 77 países definiram regulamentos, enquanto que 13 não apresentam nenhuma legislação específica. No Brasil, o limite máximo permitido para micotoxinas em alimentos e bebidas foi recentemente estabelecido e o limite máximo para OTA em vinho é de $2 \mu\text{g/L}$ (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGIÂNCIA SANITÁRIA, 2011).

Aspergillus carbonarius é considerado a principal espécie responsável pela contaminação por OTA quando comparado com outras espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*, especialmente *A. niger* (CABAÑES et al., 2002). Temperatura e atividade de água são os dois fatores abióticos mais importantes

na definição de pontos críticos de contaminação por essas espécies micotoxigênicas. Esses fatores afetam o crescimento do fungo, a esporulação e a produção de micotoxina (MAGAN, 2007; GARCIA et al., 2011).

Dados sobre a ecofisiologia dessas espécies isoladas de diferentes regiões e condições climáticas são a chave para o desenvolvimento de modelos realísticos que predizam os riscos de colonização e produção de OTA por *A. carbonarius* e *A. niger* (MITCHELL et al., 2003).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da temperatura, atividade de água e pH, assim como a interação entre essas variáveis, no crescimento e produção de OTA por *A. carbonarius* e *A. niger* isolados de regiões vinícolas localizadas no Nordeste do Brasil.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a influência da temperatura, atividade de água e pH e a interação entre essas variáveis abióticas no crescimento e produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* e *A. niger* em meio de cultura semi-sintético de uva.

2.1 Objetivos Específicos

- a) utilizar o delineamento composto central rotacional como ferramenta para avaliar o efeito dos fatores abióticos que mais influenciam na fisiologia do crescimento e produção de toxina pelo fungo;
- b) obter as condições ótimas para o crescimento e produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* e *A. niger* isolados do Nordeste do Brasil;
- c) desenvolver um modelo preditivo que melhor se ajuste às condições de crescimento e produção de OTA pelas duas espécies avaliadas;
- d) utilizar o modelo para estimar a produção de OTA em algumas regiões vinícolas do Brasil;
- e) utilizar o modelo para prever a produção de OTA considerando as projeções de cenário otimista (+1,15°C) e pessimista (+3,7°C) de aumento da temperatura da superfície terrestre.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos Isolados

Nos anos de 2011 e 2012 foram coletadas 18 amostras de uvas (*Vitis vinifera*), do Nordeste do Brasil, destinadas à produção de vinhos tintos finos, em relação à presença de fungos toxigênicos pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*. Em uma das vinícolas foi isolado e identificado *A. carbonarius* (CCDCA110), produtor de OTA. Como não foi isolado *A. niger* produtor de OTA neste estudo, foi então utilizado um isolado de *A. niger* (CCDCA101) que já se encontrava depositado na Coleção de Cultura de Microorganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (CCDCA).

A reativação dos fungos foi realizada inoculando-se uma alíquota de cada cultura estoque em placas contendo 20 mL de meio de cultura Agar Czapeck Levedura (CYA) e incubados a 25°C por 7 dias. Após esse procedimento foi obtida uma suspensão de esporos, adicionando-se 40 mL de água destilada estéril com 0,5% de Tween 80 e filtrada em gaze estéril. A determinação da concentração final de esporos da suspensão foi realizada em câmara de Neubauer. Foi padronizada para todos os tratamentos a concentração de 10⁶ esporos/ml.

3.2 Preparo do meio de cultura semi-sintético de uva com diferentes pH e aw

Os estudos foram realizados *in vitro* utilizando um meio de cultura semi-sintético à base de uva. O suco de uva foi obtido a partir do esmagamento de bagas sadias da variedade Syrah, coletadas em uma vinícola da Região do Vale

do Submédio do São Francisco, no ponto ideal de maturação para a elaboração de vinho tinto. O meio de uva foi preparado adicionando-se 175 mL de suco de uva em 825 mL de água destilada e 20 g de ágar (Merck).

Para a obtenção dos tratamentos, o pH do meio foi ajustado para 3,62; 4,2; 5,35; 6,2 e 6,78 com adição de NaOH (2N). Os valores de pH foram verificados através de um pH metro digital (Digimed)

A atividade de água do meio de uva foi 0.99 e, então ajustada para 0.96; 0.93 e 0.91 adicionando-se diferentes quantidades de glicerol conforme Belli et al (2004a). A atividade de água do meio de cultura foi verificada com o auxílio de um Aqua-lab CX-2 (Decagon Devices, inc.).

Foram vertidos 20 mL do meio de uva em placas de Petri. Em seguida foi inoculada uma alíquota de 0,1 mL de suspensão de esporos do isolado contendo uma contagem de 10^6 esporos/ml. As placas foram incubadas nas temperaturas de 6,5°C, 15°C, 27,5°C 40°C e 48,5°C, segundo delineamento experimental utilizado.

3.3 Delineamento Experimental

A influência da temperatura, atividade de água e pH e a interação desses fatores no crescimento e produção de OTA pelos fungos *Aspergillus carbonarius* e *A. niger* foi avaliado por meio do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), segundo Rodrigues e Iemma (2005), para três variáveis independentes em um esquema fatorial 2^3 , com as seguintes concentrações: 6,5 a 48,5°C de temperatura, 0,91 a 0,99 de atividade de água e 3,92 a 6,78 de pH. Os resultados foram analisados através de superfície de resposta. Foram estudadas três variáveis em cinco níveis. As variáveis independentes avaliadas foram: Temperatura (X1), Atividade de água (X2) e pH

(X3). Como variável resposta ou dependente foram determinadas o crescimento do fungo (mm) e a produção de ocratoxina A ($\mu\text{g/g}$).

As placas de petri, contendo o meio semi-sintético de uva, foram incubadas sob diferentes condições, conforme os ensaios do planejamento experimental realizado no software Chemoface (NUNES et al., 2012). O planejamento experimental constituiu de 17 ensaios, sendo três repetições no ponto central e cada ensaio foi conduzido em triplicata (Tabela 1)

Tabela 1 Matriz do delineamento experimental com os 17 ensaios com diferentes combinações entre as variáveis temperatura ($T^{\circ}\text{C}$), atividade de água (aw) e pH realizado em laboratório

Ensaio	$T^{\circ}\text{C}$	Aw	pH
1	40,0	0.93	4,50
2	40,0	0.93	6,20
3	40,0	0.99	4,50
4	40,0	0.99	6,20
5	15,0	0.93	4,50
6	15,0	0.93	6,20
7	15,0	0.99	4,50
8	15,0	0.99	6,20
9	6,5	0.96	5,35
10	48,5	0.96	5,35
11	27,5	0.91	5,35
12	27,5	0.99	5,35
13	27,5	0.96	5,35
14	27,5	0.96	5,35
15	27,5	0.96	5,35
16	27,5	0.96	3,92
17	27,5	0.96	6,78

A Tabela 2 mostra as variáveis reais e codificadas, bem como os seus respectivos níveis.

Tabela 2 Variáveis experimentais com valores reais e codificados

Variáveis		-1,68	-1	0	+1	+1,68
T°C	X1	6,5	15,0	27,5	40,0	48,5
Aw	X2	0,91	0,93	0,96	0,99	1,01
pH	X3	3,92	4,5	5,35	6,5	6,78

A análise estatística dos resultados também foi realizada através do software Chemoface (Nunes et al., 2012).

3.4 Avaliação do crescimento de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger*

O meio semi-sintético de uva foi distribuído em placas de petri (20 ml), e inoculado no centro da placa com 10µl da suspensão de esporos dos fungos avaliados. As placas de petri foram examinadas no 5°, 7° e 10° dia de incubação e o diâmetro da colônia foi medido em duas direções perpendiculares, com o auxílio de um paquímetro digital.

3.5 Determinação da concentração da solução estoque e preparo da curva padrão para a OTA

A curva padrão foi preparada baseando-se no método descrito pelo comitê de normalização para a análise de OTA em vinho e cerveja (COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALIZATION, 2001).

Para o preparo da curva utilizou-se uma solução estoque previamente preparada, dissolvendo-se o padrão comercial de OTA (O1877, Sigma) em

tolueno/ácido acético (99:1, v/v). A concentração da solução estoque foi determinada por medição da absorbância UV a 333 nm e calculada segundo AOAC (HORWITZ, 2002) em 136% de OTA.

Após a determinação da concentração da solução estoque, foram preparadas, por diluição, soluções padrão com concentrações de 0,001; 0,01; 0,025; 0,1 e 0,15 µg/g, que foram analisadas por HPLC.

3.6 Ensaio de recuperação

Para garantir a qualidade analítica dos resultados foram realizados ensaios de recuperação. O meio de cultura semi-sintético de uva foi fortificado em três níveis com concentrações iguais a 1,0µg/g; 3,0 µg/g e 6,0 µg/g, em triplicata. Foram extraídos com metanol e analisadas conforme método descrito no item 3.7.

3.7 Extração da OTA das culturas fúngicas

A ocratoxina A foi extraída de acordo com o método de Bragulat, Abarca e Cabañes (2001) modificado. De uma maneira sucinta, três plugs da colônia foram removidos da área interna, meio e borda de cada colônia no 10º dia do período de incubação (Figura 1). Esses plugs foram pesados e depois adicionado ao tubo 1 ml de metanol. Os tubos foram homogeneizados vigorosamente por 5 segundos e mantidos a 25°C por 60 minutos. Os extratos foram filtrados em unidades filtrantes de PTFE (0.22 µm) (Millipore) e, então, analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) no Laboratório de Análises Físico-Químicas de Aguardente de Cana do Departamento de Química da UFLA.



Figura 1 Plugs retirados da área interna, meio e borda de cada colônia no 10º dia do período de incubação para a extração da OTA

O equipamento utilizado foi um HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU 20A₃, interface modelo CBM-20A injetor automático modelo SIL-10AF e detector de fluorescência RF-10 A_{XL}. A coluna usada foi a Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5µm) conectada a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5mm, 5µm).

Foram seguidas as condições cromatográficas de comprimentos de onda: excitação de 332 nm e emissão de 476 nm. O fluxo utilizado em toda a análise foi de 0,8 mL min⁻¹ e o volume injetado das amostras e do padrão foi de 20 µL. A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (Metanol: Acetonitrila: Água: Ácido Acético). O tempo de retenção médio obtido para OTA foi de 11 ± 0,1 min (Figura 2). A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ($y = 1,11756 \times 10^7 x = 2592,1485$; onde, 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 0,9999. 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 $LQ = 10DP/m$ (onde, DP = estimativa do desvio padrão da linha de regressão e m = coeficiente angular da linha de calibração) (HARRIS, 2008). Para estes, foram encontrados os valores de 0,0004 e 0,0016 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, enquanto as soluções padrão de OTA foram injetadas em triplicata.

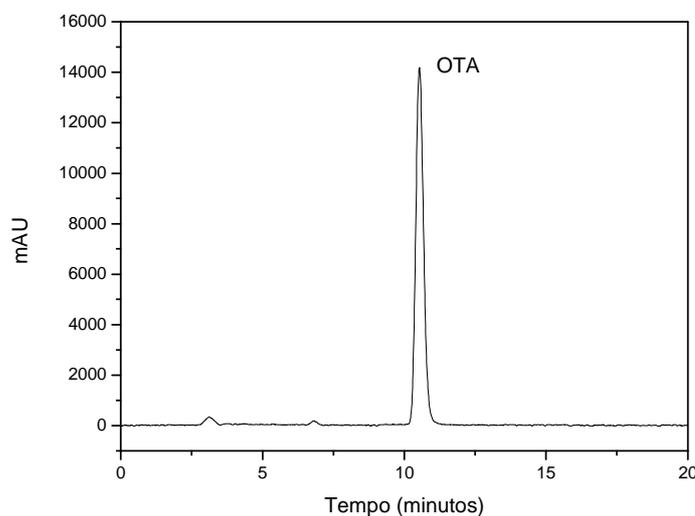


Figura 2 Cromatograma padrão de Ocratoxina A

3.8 Quantificação da produção da OTA por *Aspergillus carbonarius* e *A. niger*

A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear correlacionando a área do pico versus a concentração da respectiva solução padrão. Durante a

realização dos testes outras curvas foram feitas para a verificação do coeficiente de correlação (r^2) aceitável de 0,99, recomendados pela ANVISA.

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 $LQ = 10DP/m$ (onde, DP = estimativa do desvio padrão da linha de regressão e m = coeficiente angular da linha de calibração) (HARRIS, 2008).

3.9 Uso do modelo predito para estimar a produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* nas regiões vinícolas do Brasil

Para estimar e prever a produção de OTA por *A. carbonarius* em algumas regiões vinícolas do Brasil foi utilizado o modelo predito obtido neste estudo, em condições laboratoriais, que relaciona temperatura do ambiente, atividade de água e pH do substrato.

A Tabela3 abaixo mostra o modelo predito e o coeficiente de determinação (R^2) para a produção de OTA por *A. carbonarius*, que mostrou ser satisfatória para as respostas do estudo.

Tabela 3 Modelo predito e o coeficiente de determinação (R^2) a partir das variáveis obtidas neste estudo

Fungo	Modelo Predito	R^2
<i>A. carbonarius</i> ($\mu\text{g/g}$)	$+ 1,27 + 4,17 X_1 - 44,27 X_2 - 2,57 X_3 - 0,09 X_1 X_2 - 3,91 X_1 X_3 + 48,77 X_2 X_3 + 1,56 X_1^2 + 0,07 X_2^2 + 1,28 X_3^2$	0.827

Onde: X_1 é a variável temperatura média mensal da região; X_2 é a variável atividade de água e X_3 a variável pH

As temperaturas médias mensais do ambiente foram obtidas no site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMETRO) e os valores de atividade da água e pH utilizado na equação do modelo foi o encontrado para as variedades de uvas analisadas neste estudo, onde padronizou-se o valor de 0.99 de a_w e 3,5 para o pH.

A concentração da OTA foi obtida pela equação descrita na tabela 3, onde X1 foi substituído pelo valor da temperatura média mensal da região de cultivo, X2 e X3 foram substituídos pelos valores médios de atividade de água e pH do substrato, ou seja, o valor médio encontrado para as variedades de uvas analisadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio de recuperação da OTA em meio de cultura semi-sintético de uva

Foram obtidas as seguintes recuperações 82%, 87% e 91%, respectivamente. Tais recuperações comprovaram a excelente reprodutibilidade do método e atende a determinação do CODEX, nos critérios de desempenho de métodos analíticos, entre 70 e 110% de recuperação (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 1995).

4.2 Crescimento e produção de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger*

Foram observadas diferenças no crescimento e na produção da toxina com as alterações nas condições de cultivo (Figuras 3 e 4).

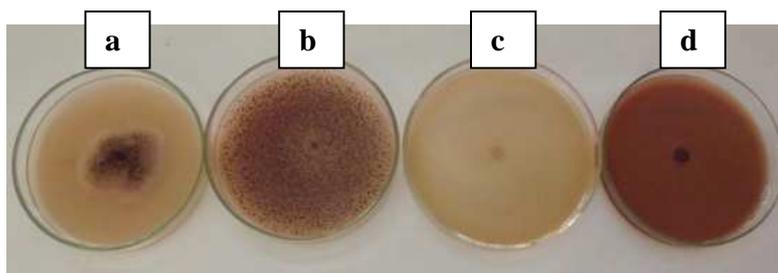


Figura 3 Colônias de *Aspergillus carbonarius* cultivada em meio semi-sintético de uva com 0,99 de aw; 4,5 de pH e incubados a 15°C (**a**); 0,99 de aw; 5,35 de pH e incubados a 27,5°C (**b**); 0,99 de aw, 4,5 de pH e incubados a 40°C (**c**); 0,99 de aw, 6,2 de pH e incubados a 40°C (**d**)

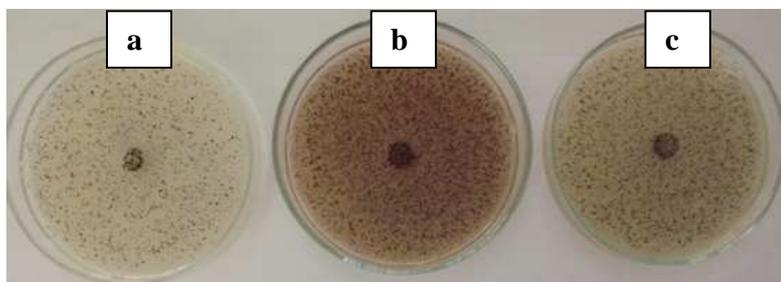


Figura 4 Colônias de *Aspergillus carbonarius* cultivada em meio sintético de uva com 0,96 de aw, pH 3,92 e incubados a 27,5°C (a); 0,96 de aw, 5,35 de pH e incubados a 27,5°C (b); 0,96 de aw, 6,78 de pH e incubados a 27,5°C (c)

Tabela 4 Matriz do delineamento com as variáveis reais e codificadas (-1,68, -1,0, 0, +1, +1,68) e os resultados obtidos nos ensaios de avaliação do crescimento e produção de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* e *A. niger*

Ensaio	T°C	Aw	pH	Ac (mm)	An (mm)	Ac (µg/g)	An (µg/g)
1	+1 (40,0)	-1 (0,93)	-1 (4,50)	8,81	73,21	0,00	0,00
2	+1 (40,0)	-1 (0,93)	+1 (6,20)	9,02	87,73	0,005	0,00
3	+1 (40,0)	+1 (0,99)	-1 (4,50)	7,13	99,15	0,01	0,05
4	+1 (40,0)	+1 (0,99)	+1 (6,20)	8,64	90,01	0,005	0,01
5	-1 (15,0)	-1 (0,93)	-1 (4,50)	51,52	18,23	1,17	0,005
6	-1 (15,0)	-1 (0,93)	+1 (6,20)	34,26	31,81	0,23	0,17
7	-1 (15,0)	+1 (0,99)	-1 (4,50)	53,22	58,56	2,10	9,96
8	-1 (15,0)	+1 (0,99)	+1 (6,20)	63,09	67,36	11,08	5,17
9	-1,68 (6,5)	0 (0,96)	0 (5,35)	0,00	0,00	0,00	0,00
10	+1,68 (48,5)	0 (0,96)	0 (5,35)	0,00	0,00	0,00	0,00
11	0 (27,5)	-1,68 (0,91)	0 (5,35)	35,99	33,45	0,02	0,00
12	0 (27,5)	+1 (0,99)	0 (5,35)	25,87	90,12	3,12	0,84
13	0 (27,5)	0 (0,96)	0 (5,35)	93,46	90,15	0,29	0,69
14	0 (27,5)	0 (0,96)	0 (5,35)	93,21	88,90	0,39	1,47
15	0 (27,5)	0 (0,96)	0 (5,35)	93,14	89,98	0,41	0,10
16	0 (27,5)	0 (0,96)	-1,68 (3,92)	93,69	90,00	0,05	0,82
17	0 (27,5)	0 (0,96)	+1,68 (6,78)	90,19	90,15	0,11	0,68

Através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão e ajustar um modelo quadrático que relaciona temperatura, atividade de água e o pH do meio de cultura de uva, com o crescimento e a produção de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger*. Para todos os casos, o modelo quadrático foi o que melhor descreveu as relações entre as condições de cultivo, o crescimento e produção da toxina. A Tabela 5 mostra os modelos preditos e os coeficientes de determinação (R^2) para o crescimento e produção de Ocratoxina A por *A. carbonarius* e *A. niger*. A porcentagem de variância explicada (R^2) pelos modelos foi satisfatória para todas as respostas do estudo. A partir destes modelos foram construídas as curvas de contorno para a visualização das condições ótimas de temperatura, aw e pH para o crescimento e produção de OTA pelos fungos avaliados.

Tabela 5 Modelos preditos para o crescimento (mm) e produção de ocratoxina A ($\mu\text{g/g}$) pelos fungos avaliados

Fungo	Modelo Predito	R^2
<i>A. carbonarius</i> (mm)	- 1,52 + 17,01 X1 - 135,91 X2 + 3,18 X3 - 0,14 X1 X2 - 4,02 X1 X3 + 237,34 X2 X3 - 0,24 X1 ² - 8,14 X2 ² - 1,70 X3 ²	0.997
<i>A. carbonarius</i> ($\mu\text{g/g}$)	+ 1,27 + 4,17 X1 - 44,27 X2 - 2,57 X3 - 0,09 X1 X2 - 3,91 X1 X3 + 48,77 X2 X3 + 1,56 X1 ² + 0,07 X2 ² + 1,28 X3 ²	0.827
<i>A. niger</i> (mm)	- 7,68 + 27,13 X1 + 82,1 X2 + 1,44 X3 - 0,2 X1 X2 - 15,89 X1 X3 - 139,41 X2 X3 - 0,18 X1 ² + 5,57 X2 ² - 6,64 X3 ²	0.858
<i>A. niger</i> ($\mu\text{g/g}$)	- 6,03 + 27,04 X1 + 77,34 X2 + 1,10 X3 - 0,2 X1 X2 - 15,89 X1 X3 - 139,41 X2 X3 - 0,18 X1 ² + 6,02 X2 ² - 4,84 X3 ²	0.706

O Diagrama de Pareto (Figura 5a) foi usado para avaliar a significância e o tipo dos efeitos (sinérgico ou antagônico) sobre o crescimento do *Aspergillus carbonarius*. De acordo com a Figura 5a, apenas a temperatura e a atividade de água, e a interação entre a atividade de água e o pH foram significativos ($p > 0,05$) para o crescimento do *A. carbonarius*. A variável que mais influenciou no crescimento do *Aspergillus carbonarius* foi a temperatura. O efeito principal desta variável foi antagônico, ou seja, quanto maior a temperatura menor o crescimento do fungo. A atividade de água apresentou um efeito sinérgico, portanto, quanto maior essa variável maior o crescimento do fungo. O pH não apresentou efeito significativo no crescimento do *Aspergillus carbonarius*, mas a interação entre essa variável e a atividade de água apresentou efeito sinérgico. Uma melhor interpretação das condições ótimas de cultivo, considerando a interação entre as três variáveis, é apresentada através das curvas de contorno (Figura 5b, 5c e 5d). De acordo com as curvas de contorno, as condições de cultivo onde o *Aspergillus carbonarius* apresentou maior crescimento (90mm) foram no intervalo de temperatura entre 20 a 33°C; atividade de água entre 0,95 e 0,98 e pH entre 5 e 6,5. Não foi observado crescimento do fungo em temperatura inferior a 5°C e superior a 44°C.

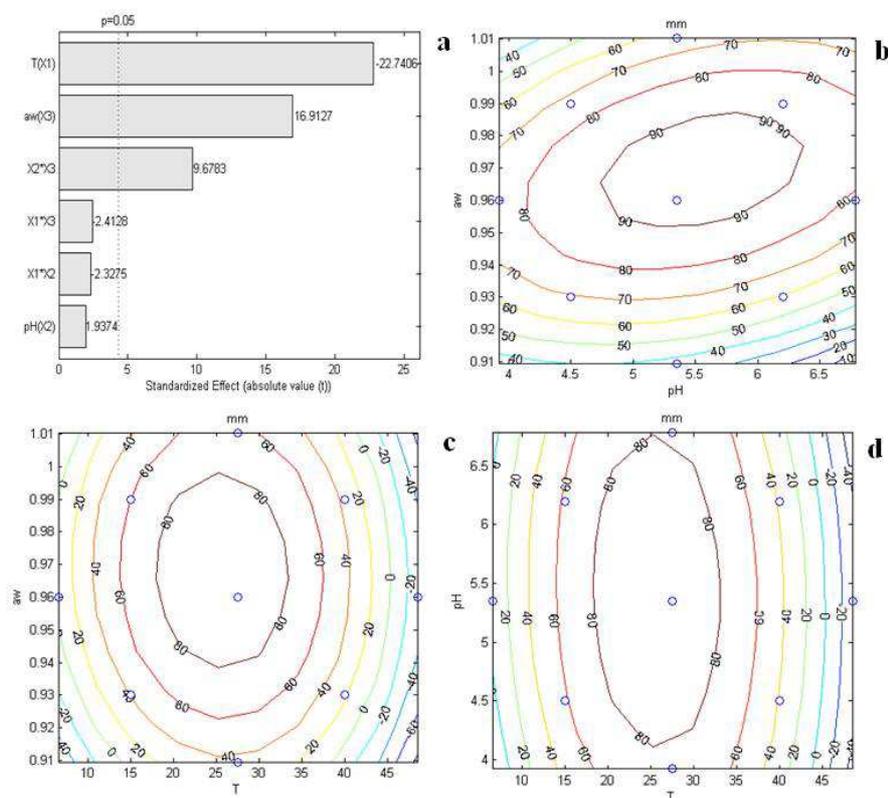


Figura 5 Diagrama de Pareto (a) com efeito da temperatura (X1), atividade de água (X2) e pH (X3) e suas interações sobre o crescimento de *Aspergillus carbonarius* e curva de contorno (b, c, d) para o crescimento do fungo em função das interações entre as variáveis

Em relação ao crescimento do *Aspergillus niger*, o Diagrama de Pareto mostra que todas as variáveis estudadas, e as suas interações, são significativas ($p > 0,05$) (Figura 6a). A variável que mais influenciou no crescimento desse fungo foi a atividade de água, seguida da temperatura, ambas com efeito isolado positivo, ou seja, quanto maior a atividade de água e a temperatura maior o crescimento do fungo. De acordo com as curvas de contorno (Figuras 6b, 6c e 6d), a condição de cultivo ótima para o crescimento do *Aspergillus niger* foi no intervalo de temperatura entre 24 e 37°C, atividade de água superior a 0.95 e pH

entre 4 e 6,5. Nestas condições de cultivo, o crescimento da *Aspergillus niger* foi de 90 mm, após 10 dias de incubação. Observou-se que em níveis ótimos de temperatura e aw, o fungo cresceu em toda a faixa de pH estudada. Para se obter um menor crescimento de *Aspergillus niger* em meio de cultivo natural de uva, deve-se reduzir a temperatura para valores inferiores a 24°C e aw menor que 0.95.

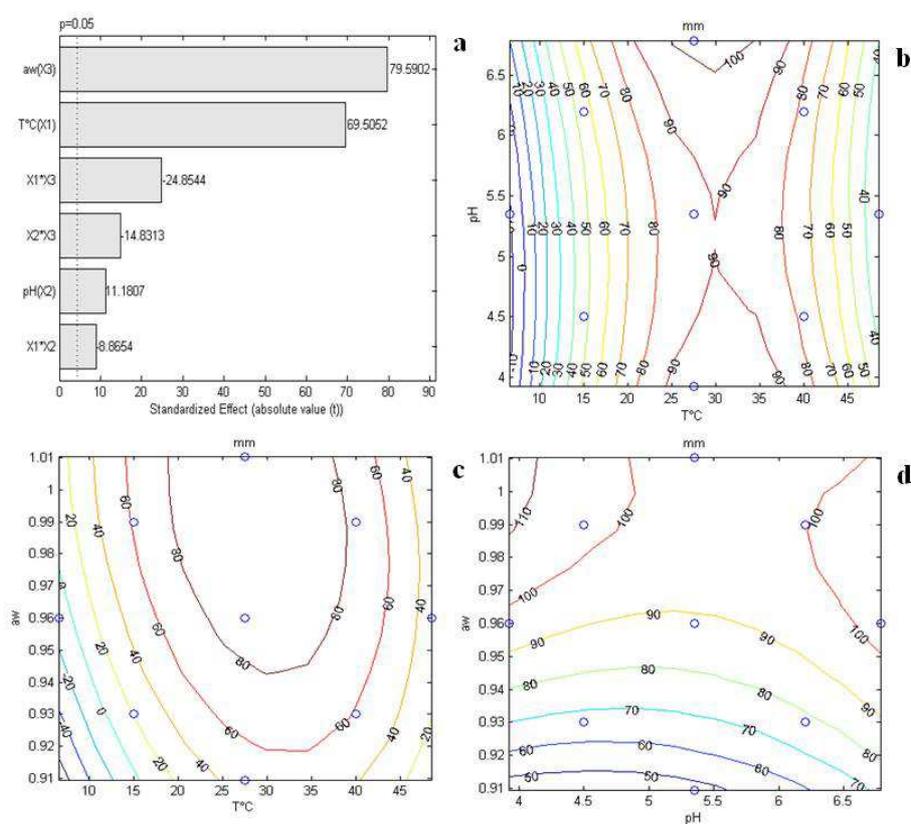


Figura 6 Diagrama de Pareto (a) com efeito da temperatura (X1), atividade de água (X2) e pH (X3) e suas interações sobre o crescimento de *Aspergillus niger* e curva de contorno (b, c, d) para o crescimento do fungo em função das interações entre as variáveis

As condições de cultivo testadas *in vitro*, pela primeira vez, para *Aspergillus carbonarius* e *A. niger* isolados de uvas viníferas da região Nordeste do Brasil, mostraram que a temperatura e a atividade de água e a interação entre essas variáveis influenciaram significativamente o crescimento do fungo. Estudos realizados com isolados de *A. carbonarius* de diferentes regiões vinícolas da Europa, em meio sintético de uva, também mostraram que as variáveis temperatura e atividade de água influenciaram o crescimento do fungo, no entanto, não foram avaliados a influência do pH. Esses isolados cresceram otimamente no intervalo de temperatura entre 30 e 35°C e atividade de água entre 0.95 e 0.98 (BELLI et al., 2004a; MITCHELL et al., 2004; LEONG; HOCKING; SCOTT, 2006; PERRONE et al., 2008). Diferente das condições ótimas de crescimento observadas neste trabalho para a variável temperatura, onde o maior crescimento foi observado no intervalo de 20 a 35°C, maior do que o relatado nos outros estudos. A tolerância de *A. carbonarius* para baixas atividades de água também foi confirmada neste estudo.

Leong, Hocking e Scott (2006), avaliando o crescimento de *Aspergillus niger* em meio sintético de uva, demonstraram que o fungo apresentou crescimento ótimo a temperaturas entre 30 e 35°C e atividade de água entre 0.93 e 0.98. Resultados semelhantes foram obtidos neste estudo para a variável atividade de água (0.94-0.99), entretanto, o intervalo de temperatura onde o fungo apresentou o maior crescimento foi entre 25 e 40°C. Essas diferenças podem estar relacionadas ao meio de cultura utilizado para o crescimento do fungo. Além disso, o clima do Vale do São Francisco é classificado como Tropical Semiárido, com média anual de temperatura de 26°C, com temperatura máxima podendo atingir os 33°C, condições propícias ao crescimento de *A. niger* e *A. carbonarius*.

Em relação à produção de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius*, o Diagrama de Pareto (Figura 7a) mostra que todas as variáveis avaliadas e suas

interações foram significativas ($p > 0,05$). A variável que mais influenciou na produção de OTA, foi a atividade de água, seguida da temperatura e, por último, o pH. A atividade de água (aw) e o pH tiveram um efeito isolado sinérgico, enquanto a temperatura teve um efeito isolado antagônico.

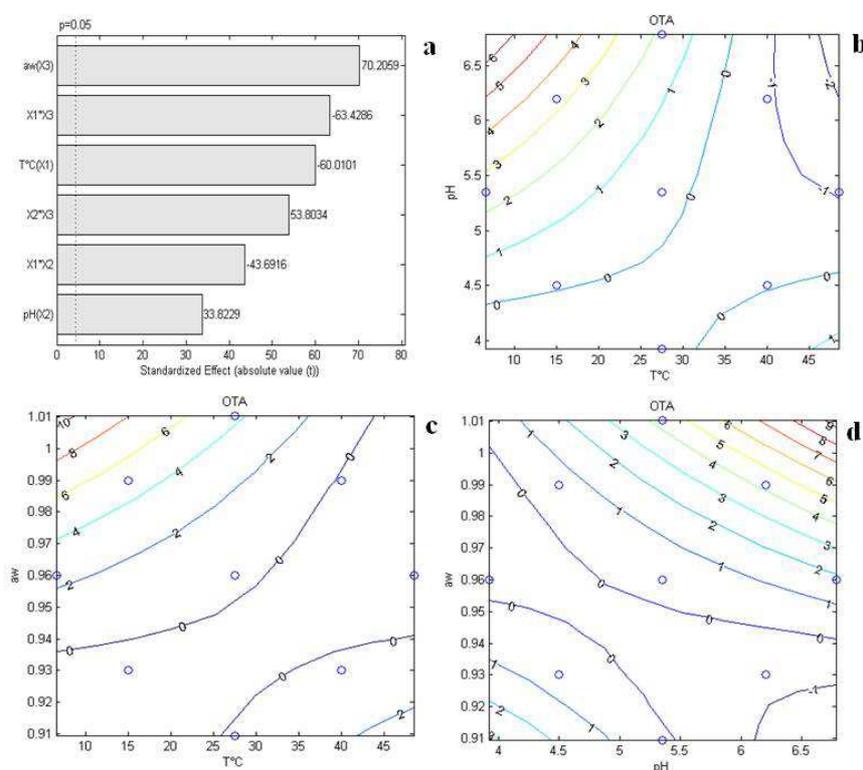


Figura 7 Diagrama de Pareto (a) com efeito da temperatura (X1), atividade de água (X2) e pH (X3) e suas interações sobre a produção de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* e curvas de contorno (b, c, d) para a produção de OTA pelo fungo em função das interações entre as variáveis

De acordo com as curvas de contorno (Figuras 7b, 7c e 7d) a condição de cultivo do *Aspergillus carbonarius* que resultou em maior concentração de toxina (8-10 $\mu\text{g/g}$) foi na temperatura de 15°C, pH superior a 6.0 e atividade de

água de 0,99. Níveis reduzidos de toxina (1-3 μ g/g) foram obtidos na temperatura de 25°C, pH superior a 5.0 e aw inferior a 0.95. Apesar das figuras 7b e 7c mostrarem que existe uma tendência do aumento da produção da toxina em temperaturas inferiores a 10°C, sabe-se que essa espécie não cresce nessas temperaturas.

Em relação ao *Aspergillus niger*, o Diagrama de Pareto (Figura 8a) mostra que a atividade de água e a temperatura, e a interação entre essas duas variáveis foram significativas ($p > 0,05$). A atividade de água teve um efeito isolado positivo sobre a síntese da toxina por *Aspergillus niger*, enquanto a temperatura teve um efeito isolado negativo sobre a síntese desta mesma toxina. O efeito de interação entre estas variáveis foi antagônico, portanto, a produção de OTA é maximizada em níveis superiores de aw e níveis inferiores de temperatura. Através das curvas de contorno (Figuras 8b, 8c e 8d) notou-se que a maior síntese de toxina (6-7 μ g/g) ocorreu na temperatura de 15°C e aw entre 0.98 e 0.99. Esse isolado não apresentou capacidade de produzir toxina a 20-25°C.

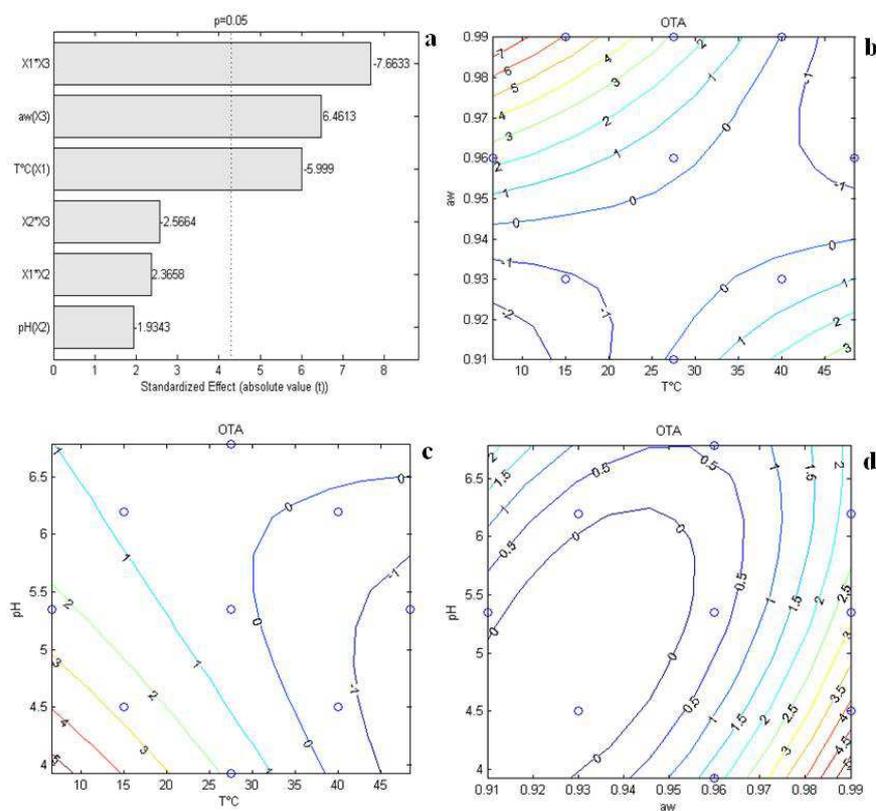


Figura 8 Diagrama de Pareto (a) com efeito da temperatura (X1), atividade de água (X2) e pH (X3) e suas interações sobre a produção de ocratoxina A por *Aspergillus niger* e curvas de contorno (b, c e d) para a produção de OTA pelo fungo em função das interações entre as variáveis

A produção de OTA por *A. carbonarius* foi influenciada pelas variáveis avaliadas e as condições de cultivo onde ocorreu a máxima produção da toxina difere dos outros estudos realizados. Os isolados da Grécia apresentaram máxima produção de OTA na temperatura de 20°C e 0.96 de aw e esse valor foi de 3.14 e 2.67 µg/g para as cepas analisadas (TASSOU et al., 2007). Dos isolados da Itália, Espanha e Portugal a produção máxima de OTA por *A. carbonarius* ocorreu a 20°C e entre 0.95 e 0.98 de atividade de água (BELLI et al., 2005; MITCHELL et al., 2003). Os isolados da Austrália apresentaram

máxima produção de OTA (21 µg/g) na temperatura de 15°C e 0.965 de aw. Apesar da produção de toxina do *A. carbonarius* isolado da região vinícola do Brasil ter sido menor, quando comparado com os isolados da Austrália, a temperatura onde se obteve a maior concentração de OTA (10 µg/g) também foi a 15°C, mas na atividade de água de 0.99. No entanto, foi observado que na temperatura de 25°C e aw de 0.99, o fungo apresentou a capacidade de produzir a toxina, demonstrando que o isolado do Brasil apresenta capacidade de produzir toxina em outras temperaturas, mas somente com atividade de água elevada.

Para a produção de OTA por *A. niger*, as maiores concentrações (7 µg/g) foram obtidas na temperatura de 15° e 0.99 de aw, semelhante ao encontrado por Leong, Hocking e Scott (2006) e Belli et. al.(2004b). Esteban et al. (2004), observou a produção máxima de OTA em temperaturas mais elevadas (20 – 25°C) e 0.95 – 0.98 de atividade de água.

Analisando as duas espécies isoladas da região vitivinícola do Brasil, pode-se dizer que na temperatura de 40°C e em todas as atividades de água avaliadas, o *A. niger* apresentou maior crescimento quando comparado com o *A. carbonarius*. No entanto, na temperatura de 15°C e em todas as aw testadas, o *A. carbonarius* apresentou maior crescimento que o *A. niger*. O *A. carbonarius*, nas condições ótimas de temperatura e atividade de água, produziu maior quantidade de OTA (10 µg/g) quando comparado com o *A. niger* (7 µg/g). Outros estudos também obtiveram maiores valores da toxina por *A. carbonarius* (MITCHELL et al., 2003; BELLI et al., 2004a; BELLI et al., 2005b; LEONG;HOCKING;SCOTT,2006). Essas diferenças de comportamento dos isolados testados de diferentes localidades podem explicar as diferenças adaptativas às condições climáticas de cada região vinícola, contribuindo para o desenvolvimento de modelos que previnam o risco de contaminação por OTA na produção de vinho de diferentes regiões produtoras (BATTILANI et al., 2006a; BATTILANI et al., 2006b; TASSOU et al., 2007; TERRA et al., 2012).

Dessa forma, os resultados obtidos mostram que os isolados das duas espécies, obtidos de uvas cultivadas em regiões diferentes, produzem maiores ou menores concentrações da toxina, quando são cultivados *in vitro*, em meio de cultura de uva, sob influência de diferentes temperaturas, atividades de água e pH. Essas condições no campo antes do período de colheita das uvas podem favorecer a produção da toxina pelo fungo. No entanto, segundo Esteban et al. (2004), outros fatores como situação da vinícola, condições meteorológicas extremas, flutuações de fatores ambientais entre o dia e a noite também podem influenciar nessa produção.

4.3 Uso do modelo predito para estimar a produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* nas regiões vinícolas do Brasil

Avaliando cada região vinícola, onde foi realizado parte deste estudo, os resultados obtidos demonstram que existe uma variação na concentração de OTA nas regiões de São Paulo e Minas Gerais dependendo do mês do ano. No município de Três Corações (MG) pode-se observar que a concentração da OTA é favorecida pelas temperaturas mais baixas ($\approx 19,5^{\circ}\text{C}$) que são encontradas nos meses de abril a outubro. O maior valor estimado foi no mês de julho, mês que antecede a colheita da uva nessa região (Figura 9). O mesmo comportamento foi observado para o município de Espírito Santo de Pinhal (SP) (Figura 10).

Isto pode ser considerado um fator de risco de contaminação de OTA nos vinhos elaborados com as uvas produzidas nestas regiões, já que valores acima de $2\mu\text{g/L}$ estão em desacordo com a legislação brasileira para vinho, sucos de uvas e derivados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGIÂNCIA SANITÁRIA, 2011). Mas, considerando as projeções de aumento da temperatura ambiental, as condições para a produção da OTA vão se tornando

desfavoráveis, pois o aumento da temperatura influenciaria negativamente nessa produção.

Além disso, as condições ótimas, onde o fungo obteve o máximo de produção de OTA foi na temperatura de 15°C, conforme resultados apresentados. No entanto, para haver produção de OTA, o fungo deve estar presente na região e encontrar condições para colonizar as uvas. Entretanto, de acordo com os resultados apresentados no capítulo 2, não foi isolado nenhum *A. carbonarius* nas uvas Syrah e Cabernet Sauvignon cultivadas na safra do ano de 2011 no Sul de Minas Gerais e nas safras de 2011 e 2012 no Norte de São Paulo.

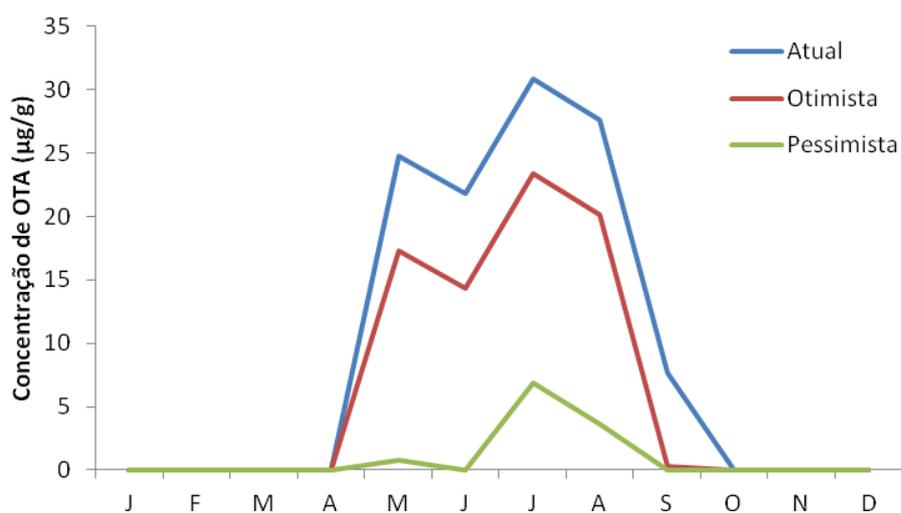


Figura 9 Concentração de OTA ($\mu\text{g/g}$) na temperatura média mensal atual do município de Três Corações(MG) e considerando as projeções do aumento da temperatura ambiental em 1,15°C (cenário otimista) e em 3,7°C (cenário pessimista), segundo o quinto relatório do IPCC sobre mudanças climáticas

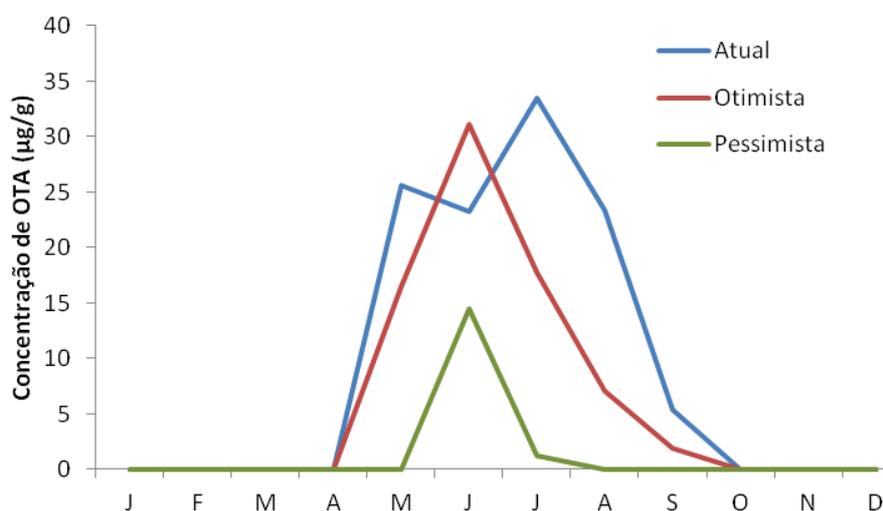


Figura 10 Concentração de OTA ($\mu\text{g/g}$) na temperatura média mensal atual do município de Espírito Santo do Pinhal (SP) e considerando as projeções do aumento da temperatura ambiental em $1,15^{\circ}\text{C}$ (cenário otimista) e em $3,7^{\circ}\text{C}$ (cenário pessimista), segundo o quinto relatório do IPCC sobre mudanças climáticas

Em relação à região do Vale do Submédio do São Francisco, aplicando-se o modelo predito e utilizando-se as temperaturas médias mensais e as projeções de aumento da temperatura, não foram encontrados valores positivos para a concentração da OTA. Isto significa que nos dias atuais as condições ambientais de temperatura do ambiente e a atividade de água e pH da uva não propiciam a produção da OTA por *A. carbonarius*. Ou seja, mesmo que o fungo esteja presente nas uvas desta região, o mesmo não encontra condições favoráveis para a sua produção, o que assegura a produção dos vinhos tropicais elaborados nesta região.

As condições climáticas da região vinícola podem apresentar influência tanto na colonização do fungo como na produção de OTA nas uvas. O aumento de temperatura e da pluviosidade pode causar um impacto na presença e no

comportamento do fungo (PATERSON; LIMA, 2010). Segundo Tirado et al. (2010), para estimar e prever o impacto das mudanças climáticas na contaminação por OTA nas uvas e em seus derivados, como o vinho, é necessário desenvolver modelos capazes de prever os níveis de micotoxina relacionando-os com os parâmetros climáticos.

Nas últimas décadas muito tem se ouvido falar sobre as mudanças climáticas que estão ocorrendo em nosso Planeta e de como essas mudanças podem comprometer não só a quantidade, mas a qualidade dos alimentos produzidos, principalmente em relação à segurança alimentar. O Quinto Relatório de Avaliação do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (INTERNATIONAL PAINEL CLIMATIC CHANGE, 2012) mostra intensificação das mudanças climáticas, com aumento da temperatura média global. O alerta foi feito pelos cientistas do IPCC com base na revisão de milhares de pesquisas realizadas nos últimos cinco anos. O documento apresenta as bases científicas da mudança climática global e foram simulados quatro diferentes cenários, possíveis de acontecer até o ano de 2100 – os chamados “Representative Concentration Pathways (RCPs)”.

O cenário mais otimista prevê que o sistema terrestre armazenará 2,6 watts por metro quadrado (W/m²) adicionais. Nesse caso, o aumento da temperatura terrestre poderia variar entre 0,3 °C e 1,7 °C de 2010 até 2100. Já o pior cenário, no qual as emissões continuam a crescer em ritmo acelerado, prevê um armazenamento adicional de 8,5 W/m². Em tal situação, segundo o IPCC, a superfície da Terra poderia aquecer entre 2,6 °C e 4,8 °C ao longo deste século.

Paterson e Lima (2010) acreditam que as mudanças climáticas terão um elevado impacto na presença e produção desses metabólitos tóxicos por alguns fungos filamentosos, mas ainda são poucos os estudos realizados. No Brasil, este é o primeiro estudo sobre a influência da temperatura do ambiente e a

disponibilidade de água no substrato (meio de uva) na produção de OTA, pela principal espécie ocratoxigênica, isolada de uma região vinícola tropical.

O que tem se observado é que os vinhos produzidos em algumas regiões vinícolas consideradas tradicionais e localizadas nas zonas temperadas têm apresentado valores de OTA acima do limite estabelecido pela comunidade européia. Ou seja, o aumento da temperatura para essas regiões podem se tornar um problema para a contaminação por essa toxina, que é considerada nefrotóxica e com efeito cumulativo (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993)

5 CONCLUSÃO

As condições de cultivo *in vitro*, usando o meio semi-sintético de uva, mostraram que as variáveis temperatura e atividade de água influenciaram no crescimento e produção de OTA por *A. carbonarius* e *A. niger*, e que as condições ótimas de crescimento diferem das ideais para a produção de toxina.

Usando o modelo predito obtido nas condições laboratoriais para estimar a concentração de OTA nestas regiões, foi observado que o Vale do Submédio do São Francisco não apresenta condições de temperatura que favoreça a produção de OTA, ou seja, mesmo que o fungo colonize as bagas e sementes das uvas cultivadas, o fungo não encontra as condições de temperatura para a produção da toxina. Diferente do encontrado para as regiões do Sudeste, onde apesar do fungo não ter sido isolado, se ele estiver presente, as condições de temperatura média mensal favorecem a produção da OTA nos meses de abril a outubro. A maior concentração observada foi em julho, mês que antecede a colheita da uva, um fator de risco para a produção dos vinhos. No entanto, nas projeções de aumento de temperatura para o próximo século, tanto nos cenários considerados otimista e pessimista, esse aumento diminuiria a concentração da OTA, diminuindo os riscos da produção dessa toxina pelo fungo nesta região.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGIÂNCIA SANITÁRIA. Resolução **No. 7 de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília: ANVISA, 2011.

BATTILANI, P. et al. Black aspergilla and ochratoxin in grapes in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, supl. 1, p. 53-60, Sept. 2006.

BELLI, N. et al. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a sythetic grape medium in relation to environmental factors. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 4, p. 839-844, 2005b.

BELLI, N. et al. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v. 38, n. 1, p. 72-77, 2004b.

BELLÍ, N. et al. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* Section *Nigri* obtained from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 19-27, Oct. 2004a.

BELLI, 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, n. 3, p. 233-239, Nov. 2005a.

BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 2-3, p. 139-144, Dec. 2001.

CABAÑES, F. J. et al. What is the source of ochratoxin A in wine? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 79, n. 3, p. 213–215, Dec. 2002.

COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALIZATION. **Foodstuffs**: determination of ochratoxin A in wine and beer – HPLC method with clean-up on a immunoaffinity column. Brussels: Draft PfEN, 2001.

DUARTE, S. C.; LINO, C. M.; PENA, A. Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin A: a review of the worldwide status. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 27, n. 10, p. 1440-1450, Oct. 2010.

ESTEBAN, A. et al. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, n. 10, p. 861–866, Dec. 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Codex general standard for contaminants and toxins on food and feed**. Rome: WORLD Health Organization, 1995.

GARCÍA, D. et al. Optimising the number of isolates to be used to estimate growth parameters of mycotoxigenic species. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 235-242, Dec. 2011.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HORWITZ, W. **Official methods of analysis**. 17. ed. Washington: AOAC, 2002.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some naturally occurring substances**: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins: volume 56. Lyon: World Health Organization, 1993.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some naturally occurring substances:** food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins: volume 56. Lyon: World Health Organization, 1993.

INTERNATIONAL PANEL CLIMATIC CHANGE. **Climate change 2012:** the physical science. Switzerland: IPCC, 2012.

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; SCOTT, E. S. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on simulated grape juice medium. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 110, n. 3, p. 209-216, Aug. 2006.

MAGAN, N. Fungi in extreme environmental. In: WICKLOW, D. T.; SODERSTROM, B. (Ed.). **Mycota IV:** environmental and ecological relationships. Berlin: Springer Verlag, 2007. p. 99-114.

MARQUARDT, R. R.; FROLICH, A. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 12, p. 3968-3988, Dec. 1992.

MIRAGLIA, M.; BRERA, C. **Task 3.2.7 'assessment of dietary intake of ochratoxin a by the population of EU Member States'**. Brussels: European Commission, 2002.

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, 2003.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, Nov. 2012.

PASSAMANI, F. R. F. et al. *Aspergillus* Section *Nigri* in grapes cultivated in the tropical Winery Region of Brazil. **Food and Public Health**, Rosemead, v. 2, n. 6, p. 276-280, Nov. 2012.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food. **Food Research International**, Davis, v. 43, n. 7, p. 1902-1914, Aug. 2010.

PERRONE, G. et al. *Aspergillus* in grapes: ecology, biodiversity and genomics. In: VARGA, J.; SAMSOM, R. **Aspergillus in the genomic era**. Wageningen: Wageningen Academic, 2008. p. 179-203.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimento e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão, 2005.

SERRA, R. et al. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 63-68, Nov. 2003.

TASSOU, C. C. et al. Impact of water activity and temperature on growth and ochratoxin A production of two *Aspergillus carbonarius* isolates from wine grapes in Greece. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 70 n. 12, p. 2884-2888, Dec. 2007.

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, Mar. 2012.

TIRADO, M. C. et al. Climate change and food safety: a review. **Food Research International**, Davis, v. 43, n. 7, p. 1745-1765, Aug. 2010.

VALERO, A.; FARRE, J. R.; SANCHIS, V. Survey: ochratoxin A in European special wines. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 2, p. 593-599, May 2008.

VAR, I.; KABAK, B. Occurrence of ochratoxin A in Turkish wines.

Microchemical Journal, New York, v. 86, n. 2, p. 241-247, Aug. 2007.

VILA, P.; MARKAKI, P. Aflatoxina B1 and ochatoxina A in breakfast cereals from Athens market: occurrence and risk assessment. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 455-461, 2009.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 6, p. 655-668, Aug./Sept. 1996.

APÊNDICE

Cromatogramas

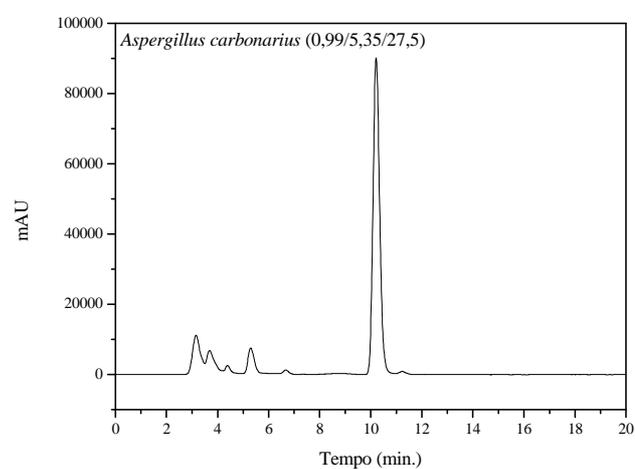


Figura 1 Cromatograma obtido do ensaio experimental n° 12 realizado com o fungo *Aspergillus carbonarius*, cultivado em meio semi-sintético de uva com 0,99 de atividade de água, 5,35 de pH e incubados a 27,5°C

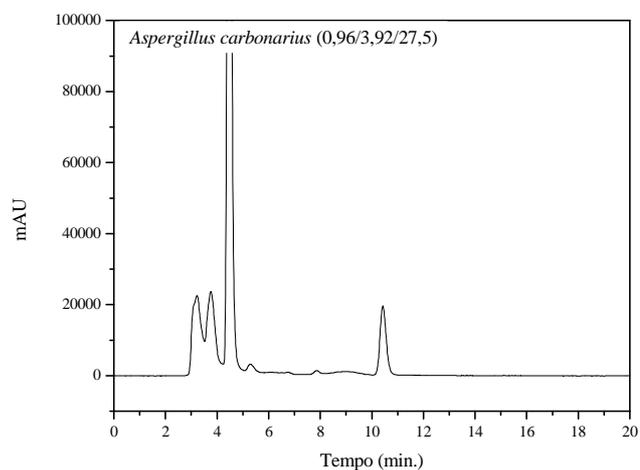


Figura 2 Cromatograma obtido do ensaio experimental n° 16 realizado com o fungo *Aspergillus carbonarius*, cultivado em meio semi-sintético de uva com 0,96 de atividade de água, 3,92 de pH e incubados a 27,5°C

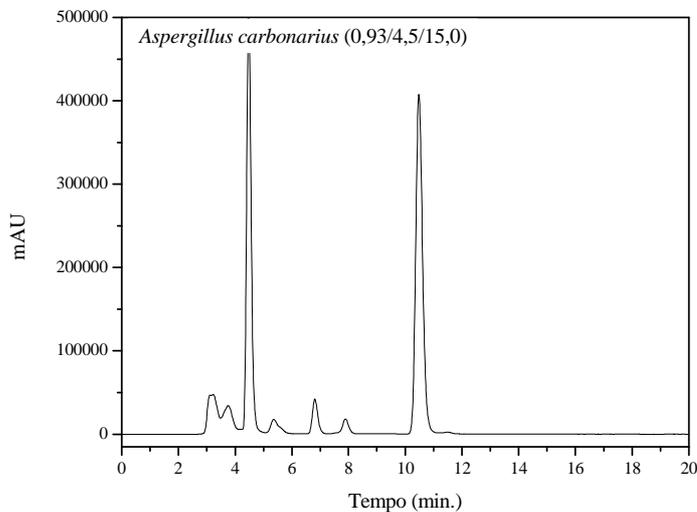


Figura 3 Cromatograma obtido do ensaio experimental n° 5 realizado com o fungo *Aspergillus carbonarius*, cultivado em meio semi-sintético de uva com 0,93 de atividade de água, 4,5 de pH e incubados a 15°C

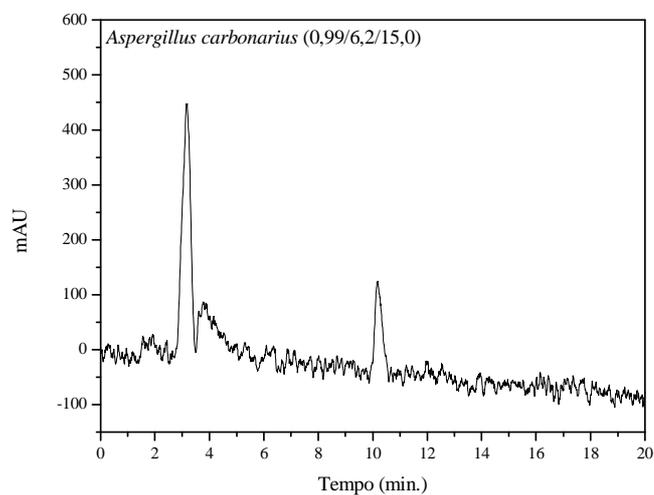


Figura 4 Cromatograma obtido do ensaio experimental n° 8 realizado com o fungo *Aspergillus carbonarius*, cultivado em meio semi-sintético de uva com 0,99 de atividade de água, 6,2 de pH e incubados a 15°C

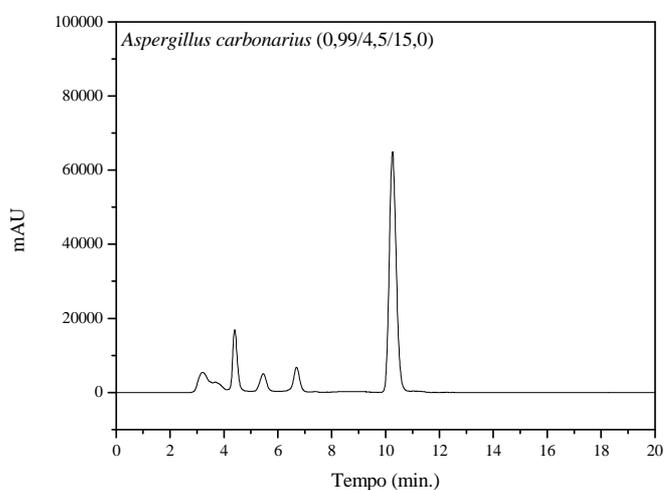


Figura 5 Cromatograma obtido do ensaio experimental n° 7 realizado com o fungo *Aspergillus carbonarius*, cultivado em meio semi-sintético de uva com 0,99 de atividade de água, 4,5 de pH e incubados a 15°C

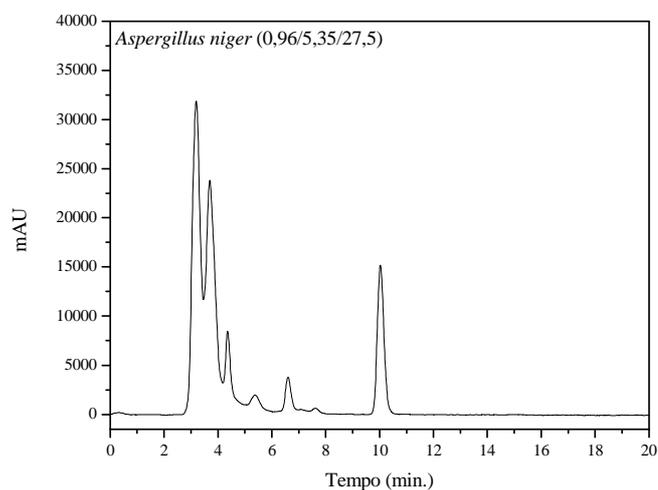


Figura 6 Cromatograma obtido do ensaio experimental n°13 realizado com o fungo *Aspergillus niger*, cultivado em meio semi-sintético de uva com 0,96 de atividade de água, 5,35 de pH e incubados a 27,5°C

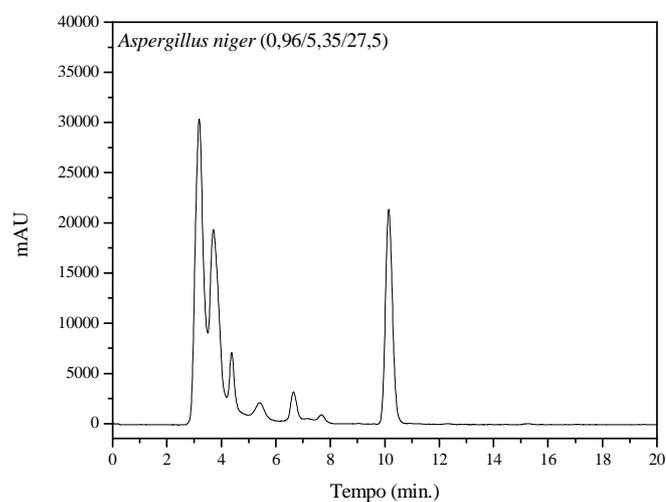


Figura 7 Cromatograma obtido do ensaio experimental n° 14 realizado com o fungo *Aspergillus niger*, cultivado em meio semi-sintético de uva com 0,96 de atividade de água, 5,35 de pH e incubados a 27,5°C

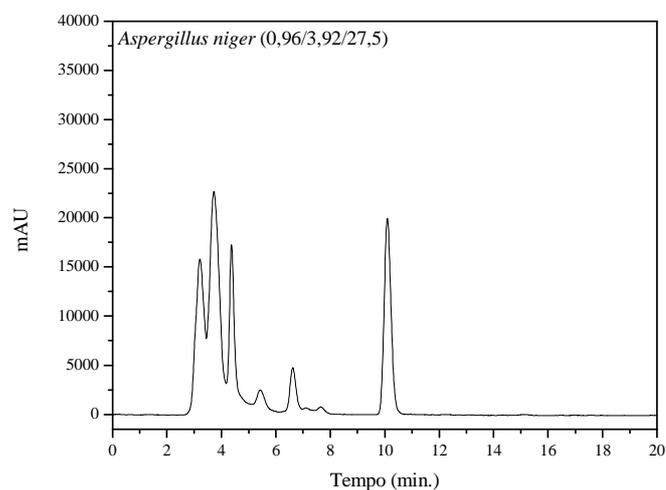


Figura 8 Cromatograma obtido do ensaio experimental n° 16 realizado com o fungo *Aspergillus niger*, cultivado em meio semi-sintético de uva com 0,96 de atividade de água, 3,92 de pH e incubados a 27,5°C

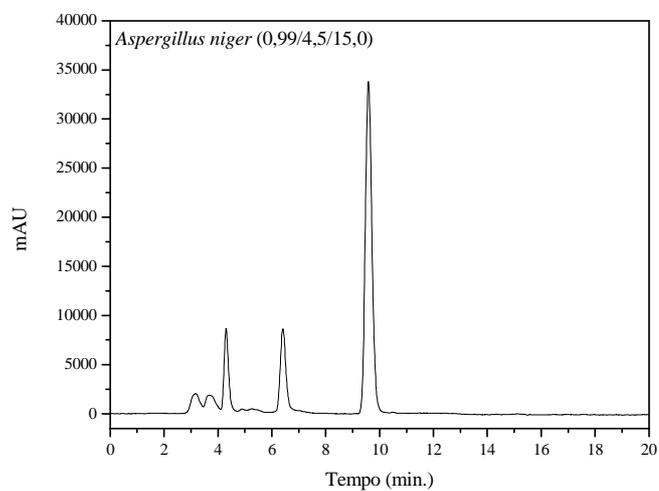


Figura 9 Cromatograma obtido do ensaio experimental n° 7 realizado com o fungo *Aspergillus niger*, cultivado em meio semi-sintético de uva com 0,99 de atividade de água, 4,5 de pH e incubados a 15°C