



DAIANI MARIA DA SILVA

**FUNGOS FILAMENTOSOS E MICOTOXINAS
EM UVAS, SUCOS, MOSTOS E VINHOS DAS
REGIÕES SUDESTE E NORDESTE DO BRASIL**

LAVRAS – MG

2013

DAIANI MARIA DA SILVA

**FUNGOS FILAMENTOSOS E MICOTOXINAS EM UVAS, SUCOS,
MOSTOS E VINHOS DAS REGIÕES SUDESTE E NORDESTE DO
BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador
Dr. Luís Roberto Batista

Coorientador
Dr. Giuliano Elias Pereira

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Silva, Daiani Maria da.

Fungos filamentosos e micotoxinas em uvas, sucos, mostos e
vinhos das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil / Daiani Maria da
Silva. – Lavras : UFLA, 2013.

184 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. Biodiversidade. 2. Ocratoxina A. 3. *Vitis vinifera* L. 4. *Vitis
labrusca*. 5. *Aspergillus*. 6. *Penicillium*. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 589.23

DAIANI MARIA DA SILVA

**FUNGOS FILAMENTOSOS E MICOTOXINAS EM UVAS, SUCOS,
MOSTOS E VINHOS DAS REGIÕES SUDESTE E NORDESTE DO
BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 20 de dezembro de 2012.

Dra. Sara Maria Chalfoun EPAMIG

Dra. Renata Vieira Mota EPAMIG

Dr. Disney Ribeiro Dias UFLA

Dra. Deila Magna dos Santos Botelho UFLA

Dr. Luís Carlos de Oliveira Lima
Presidente

LAVRAS – MG

2012

Aos meus pais, Conceição e José Afonso;

Ao meu irmão Cristian;

Ao meu marido Willian;

Pela compreensão, dedicação, incentivo, e imenso amor...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao Mestre Jesus, pelo dom da Vida e da sabedoria, pela força, luz, amparo e proteção permitindo-me chegar ao final da realização deste trabalho;

Aos meus queridos pais, Conceição e José Afonso, pelo imenso amor e sacrifício, por abrirem mão de suas realizações e sonhos para que eu pudesse chegar até aqui. Pelas palavras de conforto e incentivo de minha mãe, que ajudaram-me a continuar sempre... Por acreditarem em mim. Que Deus os recompense por tudo... Amo vocês!

Ao meu irmão Cristian, pelo carinho. Amo você!

Ao meu marido Willian, pela compreensão nos momentos de minha ausência, pelo companheirismo, paciência, pelo amor e por estar sempre ao meu lado. Amo você!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Roberto Batista, pela confiança na condução deste trabalho, pela orientação, esclarecimentos, pelos ensinamentos, pelos puxões de orelha. Obrigada!

Ao Dr. Giuliano Elias Pereira e à Embrapa Uva e Vinho/Semiárido, pela oportunidade, apoio e concessão das amostras.

Ao Dr. Guilherme Prado e a Fundação Ezequiel Dias (FUNED), pela colaboração neste trabalho.

A Dr^a. Prof^a. Sara Chalfoun pelas contribuições, orientações e disponibilidade

Ao Dr. Prof. Luiz Carlos de Oliveira Lima pelo apoio, contribuições e orientações.

À Dra. Renata Vieira da Mota e ao Núcleo Tecnológico EPAMIG Uva e Vinho de Caldas (MG), pelo apoio e concessão das amostras.

Às colegas de trabalho do Laboratório de Micologia e Micotoxinas do DCA, Luisa, Priscilla, Gislaine, Elisângela, Mônica, Bibiane, Abiah, Fabiana Couto e Michelle, pelos momentos de descontração.

Em especial a Fabiana Passamani e Thaís Otero, pela amizade e ajuda na condução do trabalho. Obrigada!

À Universidade Federal de Lavras e aos Departamentos de Biologia e Ciência dos Alimentos que permitiram a utilização de materiais, reagentes e equipamentos.

À CAPES, pelo apoio financeiro através da concessão da Bolsa de Estudos durante o curso.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

Os conflitos da existência são aqueles que ainda permanecem dentro de cada coração. Aonde está e o que ele carrega de bom é que é o seu tesouro.

Monsenhor Paulo.

RESUMO GERAL

Diversas espécies de fungos podem se desenvolver durante os diferentes estágios de maturação das uvas nos vinhedos entretanto, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são considerados os principais produtores de ocratoxina A (OTA) em uvas e seus derivados, principalmente nas tradicionais regiões vinícolas do mundo. Neste contexto, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a biodiversidade de fungos filamentosos, na superfície de uvas saudáveis, sementes e mosto destinadas a elaboração de vinho (*Vitis vinifera*) e suco (*Vitis labrusca*) obtidas em áreas de vitivinicultura do Brasil e, verificar a incidência de espécies produtoras de OTA durante a elaboração de vinhos e correlacionar com o teor de ocratoxina A nos produtos finais. O isolamento dos fungos das bagas de uvas e sementes foi realizado por Plaqueamento Direto em meio Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). Para as amostras de mosto utilizou-se a técnica de plaqueamento em superfície a partir de diluições seriadas. Os fungos isolados foram purificados e identificados com o auxílio de manuais de identificação. A produção de OTA por fungos foi determinada pelo método Plug Agar. A quantificação de Ocratoxina A (OTA) das amostras de vinhos e sucos de uva foi realizada pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detecção por fluorescência. Das amostras analisadas de bagas, sementes e mosto de uva um total de 2949 fungos e 16 gêneros foram isolados e identificados. As espécies de *Aspergillus* foram mais frequentes na região de clima mais quente, enquanto que as espécies de *Penicillium* nas regiões com temperaturas mais baixas. As espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* mais frequentes foram: *A.japonicus*, *A. niger* e *A. tubingensis*. As espécies ocratoxigênicas identificadas foram *A.niger* e *A.carbonarius*. Todos os isolados de *A.carbonarius* foram produtores de OTA, demonstrando que esta espécie é a principal fonte desta toxina em uvas. No gênero *Penicillium* as espécies mais frequentes foram: *P.brevicompectum*, *P.glabrum*, *P.pinophilum* e *P.crustosum*. Os demais gêneros identificados neste estudo foram: *Acremonium* sp, *Alternaria* sp, *Cladosporium* sp, *Curvularia* sp, *Dreschelera* sp, *Fusarium* sp, *Gliocladium* sp, *Oidiodendron* sp, *Rhizopus* sp, *Trichoderma* sp, *Ulocladium* sp, *Xilaria* sp. A OTA foi detectada em seis amostras correspondendo a 42,6% das amostras analisadas, em concentrações entre 0,02 a 0,78 µg/L. O nível mais elevado da OTA foi encontrado na amostra de vinho elaborado a partir da variedade Petit verdot cultivada no Vale do Submédio São Francisco. Apenas na amostra de suco de uva elaborado a partir da variedade BRS Violeta foi detectada a presença da OTA na concentração de 0,03µg/L. Os níveis de OTA detectados foram inferiores ao limite máximo tolerável para esta toxina em vinho e suco de uva estabelecido pela Legislação Brasileira de 2,0µg/L.

Palavras-chave: Biodiversidade. Ocratoxina A. *Vitis vinifera* L. *Vitis labrusca*.

GENERAL ABSTRACT

Various species of fungi may develop during the different maturation stages of grapes in the vineyards, however, the genus *Aspergillus* and *Penicillium* are considered the main producers of Ochratoxin A (OTA) in grapes and their derived, mainly in the traditional vineyard regions of the world. In this context, this study was performed with the objective of evaluating filamentous fungi biodiversity, in the surface of healthy grapes, seeds and must destined for the production of wine (*Vitis vinifera*) and juice (*Vitis labrusca*) obtained in vitiviniculture areas in Brazil, and also verifying the incidence of OTA producing species during wine production and at correlating with the OTA content in the final products. The isolation of the fungi from the grape berries and seeds was done by direct plating technique in a mycological media dichloran rose bengal chloranphenicol (DRBC). For the must samples, a surface plating of serially diluted samples technique was used. The isolated fungi were purified and identified with the aid of identification manuals. The production of OTA by fungi was determined by the Agar Plug method. The quantification of Ochratoxin A (OTA) from the wine and grape juice samples was performed by the High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) method, with detection by fluorescence. Of the berry, seed and must samples analyzed a total of 2949 fungi and 16 genus were isolated and identified. The *Aspergillus* species were more frequent in warmer climate regions, while the *Penicillium* species in the lower temperature regions. The most frequent *Aspergillus nigri* section species were: *A. japonicas*, *A. niger* and *A. tubingensis*. The identified ochratoxigenic species were *A. niger* and *A. carbonarius*. All the *A. carbonarius* isolates were OTA producers, demonstrating that this species is the main source of this toxin in grapes. In the *Penicillium* genus, the most frequent species were: *P. brevicompactum*, *P. glabrum*, *P. pinophilum* and *P. crustosum*. The remaining genus identified in this study were: *Acremonium* sp, *Alternaria* sp, *Cladosporium* sp, *Curvularia* sp, *Dreschelera* sp, *Fusarium* sp, *Gliocladium* sp, *Oidiodendron* sp, *Rhizopus* sp, *Trichoderma* sp, *Ulocladium* sp and *Xilaria* sp. The OTA was detected in six samples, correspondent to 42.6% of the analyzed samples, in concentration between 0.02 and 0.78 µg/L. The most elevated level of OTA was found in the wine sample produced from the Petit verdot variety in the Vale Submédio São Francisco. Only in the grape juice sample produced from the Violet BRS variety the presence of OTA was detected in the concentration of 0.03µg/L). The OTA levels detected were inferior to the maximum limit tolerable for this toxin in wine and grape juice of 2.0 µg/L, established by the Brazilian Legislation.

Key-words: Biodiversity. Ochratoxin A. *Vitis vinifera*. *Vitis labrusca*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Principais Regiões Brasileiras produtoras de Vinho | 26 |
| Figura 2 | Vinhedos no município de Caldas (região Sul de Minas Gerais)..... | 28 |
| Figura 3 | Vinhedos na região do Vale Submédio São Francisco (Nordeste do Brasil)..... | 30 |
| Figura 4 | Estrutura Química da Ocratoxina A (OTA) | 35 |
| Figura 5 | Biossíntese da Ocratoxina A | 37 |

CAPÍTULO 2

| | | |
|----------|---|-----|
| Figura 1 | Distribuição de fungos filamentosos nas três regiões analisadas: região R1 (Minas Gerais), R2 (São Paulo) e R3 (Vale Submédio São Francisco)..... | 90 |
| Figura 2 | Incidência de espécies de <i>Penicillium</i> nas amostras de bagas, semente e mosto isolados nas três regiões estudadas (região Sul de Minas Gerais (R1), região Sudeste de São Paulo (R2) e região do Vale Submédio São Francisco (R3) | 93 |
| Figura 3 | Gráfico de pesos da PCA para as variáveis bagas, sementes, mosto e contaminação fúngica nas variedades de uva estudadas | 97 |
| Figura 4 | Gráfico de pesos da PCA para as variáveis bagas (A), sementes (B), mosto (C) e contaminação fúngica dos gêneros nas variedades <i>Vitis labrusca</i> e <i>Vitis vinífera</i> | 101 |
| Figura 5 | Gráfico de pesos da PCA para as variáveis bagas (A), sementes (B), mosto (C) e contaminação fúngica dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> nas variedades de uva <i>Vitis labrusca</i> | 104 |
| Figura 6 | Estrutura interna e posição das sementes em bagas de uva | 107 |

| | | |
|----------|---|-----|
| Figura 7 | Gráfico de pesos da PCA para as variáveis bagas (A), sementes (B), mosto (C) e contaminação fúngica dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> nas variedades de uva <i>Vitis vinífera</i> | 109 |
|----------|---|-----|

CAPÍTULO 3

| | | |
|----------|---|-----|
| Figura 1 | Distribuição das espécies de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> nas três regiões analisadas: região R1 (Sul de Minas Gerais), R2 (São Paulo) e R3 (Vale do Submédio São Francisco) | 132 |
| Figura 2 | Frequência de ocorrência de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> isolados das amostras de baga, semente e mosto nas três regiões estudadas..... | 133 |
| Figura 3 | Incidência de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> nas amostras de bagas, semente e mosto isolados nas três regiões estudadas (região 1 (R1), região 2 (R2) e região 3 (R3) | 135 |

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 4

- Gráfico 1 Cromatograma da amostra de vinho tinto elaborado a partir da variedade Petit Verdot (1), obtida na região do Vale do Submédio São Francisco (Nordeste) 166
- Gráfico 2 Cromatograma da amostra de suco de uva elaborado a partir da variedade BRS Violeta (2), obtida na região do Vale do Submédio São Francisco (Nordeste) 168
- Gráfico 3 Cromatograma da amostra de vinho tinto elaborado a partir da variedade Syrah (2), obtida na região Sul de Minas Gerais 170

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Produção de uvas no Brasil (em toneladas)..... | 23 |
| Tabela 2 | Produção de uvas para o processamento e para consumo <i>in natura</i> , no Brasil (em toneladas) | 24 |

CAPÍTULO 2

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Localização e coordenadas geográficas dos municípios onde foram coletadas as variedades de uvas analisadas..... | 81 |
| Tabela 2 | Dados referentes às amostras analisadas (variedades, mês de colheita, temperatura (média °C), precipitação (mm) e umidade relativa (U.R %), durante o período de amostragem)..... | 82 |
| Tabela 3 | Frequência de ocorrência das espécies encontradas nas amostras de baga (B), semente (S) e mosto (M) nas três regiões avaliadas | 87 |
| Tabela 4 | Índice de Biodiversidade (Índice Shannon Wiener) em função das amostras nas três regiões estudadas | 91 |

CAPÍTULO 3

| | | |
|----------|---|-----|
| Tabela 1 | Localização geográfica dos municípios onde foram coletadas as variedades de uvas analisadas | 123 |
| Tabela 2 | Dados referentes as amostras analisadas (variedades, mês de colheita, temperatura (média °C), precipitação (mm) e umidade relativa (U.R %), durante o período de coleta)..... | 125 |
| Tabela 3 | Espécies de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> isolados de bagas (B), sementes (S) e mostos (M) das três regiões analisadas | 130 |

CAPÍTULO 4

| | | |
|----------|---|-----|
| Tabela 1 | Amostras de vinho tinto e suco de uva analisadas | 160 |
| Tabela 2 | Valores de recuperação de Ocratoxina A das amostras de vinho (n=5)..... | 164 |
| Tabela 3 | Valores de recuperação de Ocratoxina A das amostras de suco de uva (n=2) | 165 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|----|
| | CAPÍTULO 1 Introdução Geral..... | 18 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 20 |
| 2.1 | Viticultura Brasileira | 20 |
| 2.2 | Produção nacional de uvas e derivados | 22 |
| 2.3 | Principais regiões brasileiras produtoras de vinho | 25 |
| 2.3.1 | Região Sudeste (Sul de Minas Gerais) | 27 |
| 2.3.2 | Região Nordeste (Vale do Submédio São Francisco) | 29 |
| 2.3.3 | Região Sudeste (São Paulo) | 31 |
| 2.3.4 | Região Sul – Serra Gaúcha | 32 |
| 3 | BIOSSÍNTESE DA OCRATOXINA A (OTA) | 34 |
| 4 | FATORES RELACIONADOS AO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE OTA POR FUNGOS | 42 |
| 5 | FUNGOS FILAMENTOSOS TOXIGÊNICOS E OTA EM UVAS E DERIVADOS | 46 |
| 6 | OCRATOXINA A EM UVAS, VINHOS E SUCOS DE UVA | 49 |
| 7 | MEDIDAS DE CONTROLE DA PRODUÇÃO DE OTA EM UVAS | 53 |
| | REFERÊNCIAS | 59 |
| | CAPÍTULO 2 Fungos filamentosos presentes nas bagas, sementes e mostos de três regiões produtoras de uva..... | 76 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 78 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 80 |
| 2.1 | Áreas de Estudo | 80 |
| 2.2 | Amostragem | 81 |
| 2.2.1 | Amostras Estudadas | 81 |
| 2.2.2 | Mostos | 83 |
| 2.3 | Isolamento dos Fungos | 83 |
| 2.4 | Identificação dos fungos filamentosos | 84 |
| 2.4.1 | Identificação de espécies dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> ... | 84 |
| 2.4.2 | Identificação de espécies do gênero <i>Fusarium</i> sp | 84 |
| 2.4.3 | Identificação das espécies dos gêneros <i>Rhizopus</i> sp, <i>Cladosporium</i> sp, <i>Curvularia</i> sp, <i>Acremonium</i> sp, <i>Dreschlera</i> sp, <i>Trichoderma</i> sp | 85 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 2.4.4 | Identificação das espécies dos gêneros <i>Alternaria</i> sp | 85 |
| 2.4.5 | Identificação das espécies dos gêneros <i>Coletrochium</i> sp, <i>Aureobasidium</i> sp, <i>Gliocladium</i> sp, <i>Xilaria</i> sp, <i>Oidiodendron</i> sp e <i>Ulocladium</i> sp..... | 85 |
| 2.5 | Cálculo do Índice de biodiversidade..... | 86 |
| 2.6 | Análise de componentes principais..... | 86 |
| 3 | Resultados e Discussão..... | 87 |
| 3.1 | Diversidade de fungos filamentosos em bagas, sementes e mostos de uvas..... | 87 |
| 3.2 | Análise de componentes principais (PCA)..... | 96 |
| 4 | CONCLUSÃO | 112 |
| | REFERÊNCIAS..... | 113 |
| | CAPÍTULO 3 Incidência de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> e de espécies ocratoxigênicas em bagas, sementes e mostos de uvas cultivadas em três regiões do Brasil | 118 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 120 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 123 |
| 2.1 | Áreas de Estudo..... | 123 |
| 2.2 | Amostragem..... | 124 |
| 2.2.1 | Uvas | 124 |
| 2.2.2 | Mostos | 126 |
| 2.3 | Isolamento dos Fungos | 126 |
| 2.4 | Determinação da produção de ocratoxina A por fungos pelo método Plug Agar | 127 |
| 2.4.1 | Cálculo dos índices de biodiversidade..... | 127 |
| 3 | ANÁLISE DE CORRESPONDÊNCIA | 129 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 130 |
| 4.1 | Distribuição de espécies de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> e de espécies ocratoxigênicas em bagas, sementes e mostos de uvas cultivadas em três regiões vitivinícolas do Brasil..... | 130 |
| 4.1.1 | Associação de espécies de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> e as variedades de uva <i>Vitis vinifera</i> e <i>Vitis labrusca</i> | 142 |
| 5 | CONCLUSÃO | 146 |
| | REFERÊNCIAS..... | 147 |
| | CAPÍTULO 4 Incidência de Ocratoxina A (OTA) em vinhos tintos e sucos de uva elaborados em três regiões brasileiras | 155 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 157 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 159 |
| 2.1 | Regiões avaliadas | 159 |
| 2.2 | Amostras | 159 |
| 2.3 | Análise de OTA | 161 |
| 2.3.1 | Soluções e reagentes | 161 |
| 2.3.2 | Preparo das amostras e purificação em coluna de imunoafinidade | 162 |
| 2.3.3 | Quantificação por CLAE | 162 |
| 2.3.4 | Eficiência da metodologia analítica | 163 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 164 |
| 3.1 | Padronização da metodologia analítica | 164 |
| 3.2 | Incidência de Ocratoxina A (OTA) em vinhos experimentais e sucos de uva obtidos nas regiões do Sul de Minas Gerais e Vale do Submédio São Francisco | 165 |
| 4 | CONCLUSÃO | 173 |
| | REFERÊNCIAS | 174 |
| | CONSIDERAÇÕES GERAIS | 181 |
| | REFERÊNCIAS | 184 |

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

O estudo da diversidade de fungos filamentosos presentes em regiões vitivinícolas do Brasil, faz-se importante para que se possa obter mais informações sobre a microbiota presentes nas bagas de uva e sua influência no processo de vinificação, bem como sobre a ocorrência de espécies ocratoxigênicas em uvas e os teores de ocratoxina A (OTA) em vinhos e sucos de uva, visto que as regiões vitícolas do Brasil vêm alcançando um crescente desenvolvimento.

A incidência de fungos filamentosos em produtos agrícolas está relacionada com a qualidade e a segurança dos alimentos e bebidas. Diversos fungos filamentosos podem estar presentes na microbiota das uvas, entretanto, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais comumente encontrados. Esses fungos podem causar deterioração nas uvas e/ou contaminá-las com metabólitos secundários tóxicos, denominados de micotoxinas. Em países de clima tropical, as principais espécies produtoras de OTA pertencem ao gênero *Aspergillus*. As espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* são as mais frequentemente relacionadas como contaminantes de uvas e seus derivados. Dentre estas espécies, *A.carbonarius* é considerada a maior fonte de OTA em vinhos, uvas e derivados, em função das espécies ocratoxigênicas detectadas e os níveis da toxina produzidos.

A OTA têm demonstrado efeitos carcinogênicos, nefrotóxicos, teratogênicos e imunotóxicos em animais e, acredita-se que esteja relacionada a Nefropatia Endêmica dos Balcãs e com tumores no trato urinário dos seres humanos. Recentemente, no Brasil foi regulamentado e aprovado, os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Esse regulamento foi criado

com o objetivo de estabelecer os limites máximos admissíveis de micotoxinas em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas, incluindo a ocratoxina A (OTA) em uvas e derivados ($2\mu\text{g/L}$).

A ocorrência da OTA em uvas, sucos e vinhos está relacionada principalmente aos fatores abióticos tais como a temperatura, atividade de água e o substrato, e as condições fitossanitárias das áreas de cultivo. Entretanto, a interação destes fatores ecológicos que afetam o crescimento e a produção da OTA por fungos micotoxigênicos. É importante salientar que o desenvolvimento dos fungos não está necessariamente associado com a produção de micotoxinas. O potencial micotoxigênico do fungo depende de alguns fatores como, a composição física e química da uva, de fatores ambientais e do fungo.

Com o presente trabalho objetivou-se estudar a diversidade de fungos filamentosos, na superfície de uvas sadias, sementes e mosto destinadas a elaboração de vinho (*Vitis vinifera*) e suco (*Vitis labrusca*) obtidas nos municípios de Caldas e Três Corações (região Sul de Minas Gerais), Espírito Santo do Pinhal (Sudeste do estado de São Paulo) e nos municípios de Santa Maria da Boa Vista e Lagoa Grande (Petrolina) (PE), e Casa Nova (BA), situados no Vale Submédio São Francisco, e verificar a incidência de espécies produtoras de OTA durante a elaboração de vinhos e correlacionar com o teor de ocratoxina A nos produtos finais.

Esta pesquisa foi realizada em parceria com o projeto Desenvolvimento de novos vinhos tropicais, com alta qualidade e tipicidade, para fortalecer e dar sustentabilidade ao setor vitivinícola do Vale Submédio São Francisco CNPq/MAPA/SDA N°064/2008. E com o apoio do Núcleo Tecnológico EPAMIG Uva e Vinho de Caldas/MG, que nos forneceu as amostras.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Viticultura Brasileira

A viticultura brasileira nasceu com a chegada dos colonizadores portugueses no ano de 1532, no Estado de São Paulo. Permaneceu como cultura doméstica até o final do século XIX, tornando-se uma atividade comercial a partir do início do século XX, por iniciativa dos imigrantes italianos estabelecidos no Sul do país, em 1875. Desde seu início até a década de 60, a viticultura brasileira ficou restrita às regiões Sul e Sudeste, mantendo as características de clima temperado, com ciclo vegetativo anual e período de repouso definido pela ocorrência das baixas temperaturas dos meses de inverno. Neste mesmo período, o cultivo da videira foi introduzido na região semiárida do Vale Submédio São Francisco, dando início a viticultura tropical no Brasil (LEÃO; SOARES, 2000; PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006).

Na década de 70, a viticultura tropical expandiu-se rapidamente, consolidando-se um pólo no Norte do Paraná e na década de 80 nos pólos do Noroeste de São Paulo e de Pirapora no Norte de Minas Gerais. Devido à diversidade ambiental é possível observar diferentes condições bioclimáticas entre as regiões vitivinícolas do Brasil, sendo possível encontrar áreas produtivas característica de regiões temperadas, com um período de repouso hibernal; áreas subtropicais, onde a videira é cultivada em dois ciclos anuais e áreas de viticultura tropical, onde é possível a realização de um, dois até três ciclos vegetativos por ano (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006).

A partir da década de 80, houve uma maior intensidade e investimentos com a implantação e modernização das vinícolas (setor industrial), incentivado pelo mercado interno, com forte base tecnológica focada na produção de uvas de

variedades *Vitis vinifera* para a elaboração de vinhos finos de qualidade (GÓES, 2005; PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006).

Como consequência deste cenário, os vinhos finos nacionais têm apresentado uma grande evolução qualitativa, reconhecida nacional e internacionalmente, incorporando notáveis melhorias, principalmente no que diz respeito ao emprego de cultivares finas e às técnicas enológicas. No entanto, o mesmo não ocorre para os vinhos de consumo corrente, devido ao menor potencial enológico da matéria-prima utilizada (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2001, 2006; TONIETTO, 2002). A qualidade da matéria-prima nacional (uvas para processamento) entretanto, ainda apresenta potencial enológico inferior ao dos principais concorrentes (Chile, Argentina, Itália, França, Portugal, entre outros), o que afeta a capacidade competitiva do setor no segmento de vinhos finos, que se ressentem, principalmente no atual contexto de mercado globalizado.

A legislação brasileira define vinho como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples da uva sã, fresca e madura (BRASIL, 1990). A denominação de vinhos finos é utilizada para designar os vinhos elaborados a partir de uvas européias da espécie *Vitis vinifera* L. Ao contrário destes, vinhos que são produzidos de uvas americanas como a *Vitis labrusca* e seus híbridos são classificados como vinhos comuns. Essa classificação é empregada pela diferenciação entre as espécies de uva utilizadas na elaboração do vinho, o que não implica na qualidade das mesmas (AMORIM et al., 2006).

De acordo com Protas, Camargo e Mello (2001), a partir da década de 70 observou-se também o desenvolvimento da agroindústria de suco de uva, que conseguiu se destacar principalmente pela qualidade e singularidade do produto, conquistando mercados internacionais exigentes.

A produção brasileira de suco está concentrada principalmente no Rio Grande do Sul, embora nas últimas décadas, tenha-se observado uma forte

tendência para outras regiões de Goiás (Santa Helena), Mato Grosso do Sul (Nova Mutum) e no Vale do Submédio São Francisco. As principais cultivares utilizadas para a elaboração de suco nestas regiões são Isabel, Isabel Precoce, BRS Rúbea, BRS Cora, Concord e Bordô. Para a agroindústria e produtores de uvas para suco, o elevado teor glucométrico, a cor, o aroma e o sabor das uvas são características importantes, bem como o desenvolvimento de cultivares precoces e tardias que permitam a ampliação do período de colheita nas regiões produtoras (RITSCHER; CAMARGO, 2007).

Atualmente, o suco de uva tem-se mostrado um produto com futuro promissor, de acordo com levantamento realizado pela União Brasileira de Viticultura - UVIBRA (2012), a comercialização do suco de uva tem aumentado gradativamente, sendo que no ano de 2011 (janeiro a junho) houve um acréscimo de 18,3% na produção deste produto em relação ao ano anterior. Isso tem levado as empresas a fazerem grandes investimentos em estrutura e tecnologia, buscando atender a demanda e atingir altos padrões de qualidade.

2.2 Produção nacional de uvas e derivados

A cadeia produtiva da uva no Brasil é bastante complexa, incluindo diversos setores como o segmento de uva para mesa, finas e comuns; o segmento de vinhos, finos e comuns; e o segmento de sucos, que vem mostrando clara tendência de crescimento nos últimos anos (RITSCHER; CAMARGO, 2007).

No cenário internacional a vitivinicultura brasileira ocupou em 2009, o 19º lugar em área cultivada com uvas e o 14º em produção. No que se refere as exportações de uvas, o Brasil foi o 17º, e o 10º maior exportador de suco de uvas, em quantidade e em valor (MELLO, 2011).

A produção de uvas no Brasil, entre os anos (2007-2010), é descrita na Tabela 1. No ano de 2010, ocorreram problemas climáticos que resultaram em

uma queda de 3,74% da produção de uvas para processamento em relação ao ano de 2009 na maioria dos Estados brasileiros, em especial no Rio Grande do Sul.

Embora seja possível observar um forte crescimento em outras regiões vitivinícolas do Brasil, nesses últimos anos, o estado do Rio Grande do Sul continua sendo o principal produtor de uvas e vinhos do país. No Rio Grande do Sul e Santa Catarina, 81% dos produtos processados são de vinhos de consumo corrente e sucos de uva, elaborados a partir de uvas da espécie *Vitis labrusca* e, apenas 10% são vinhos finos, elaborados a partir de *Vitis vinifera* (MELLO, 2006; SATO, 2000).

Tabela 1 Produção de uvas no Brasil (em toneladas)

| Estado/Ano | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 |
|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Pernambuco | 170.326 | 162.977 | 158.515 | 168.225 |
| Bahia | 120.654 | 101.787 | 90.508 | 78.283 |
| Minas Gerais | 11.995 | 13.711 | 11.773 | 10.590 |
| São Paulo | 193.023 | 184.930 | 177.934 | 177.538 |
| Paraná | 99.180 | 101.500 | 102.080 | 101.900 |
| Santa Catarina | 54.554 | 58.330 | 67.546 | 66.214 |
| Rio Grande do Sul | 705.228 | 776.027 | 737.363 | 692.692 |
| Total Brasil | 1.354.960 | 1.399.262 | 1.345.719 | 1.295.442 |

Fonte: Mello (2006)

A maior parte da produção de uva no Brasil é destinada ao mercado interno. O principal produto de exportação é o suco de uva, representado por 30% da produção. Apenas 5% das uvas *in natura* e menos de 1% dos vinhos são comercializados fora do país. O Brasil tem todas as condições de se tornar um dos maiores exportadores de suco de uva, pelas características das cultivares utilizadas e pela possibilidade de diversificação do produto, dadas as características regionais, com surgimento de novos pólos vitícolas (MELLO, 2006; PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006).

A produção de vinhos no Brasil foi maior nos anos de 2004 e 2008, com um total de 356 e 334 milhões de litros, respectivamente. Em 2009 a produção de vinhos no Brasil foi de apenas 245 milhões de litros, concentrada no Estado do Rio Grande do Sul, e em pequena parte representados nos Estados de Santa Catarina, Pernambuco, São Paulo e Minas Gerais, sendo 84% de vinhos comuns elaborados a partir de uvas americanas (*Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e híbridos) e, apenas 16% voltados a produção de vinhos finos, elaborados a partir de variedades *Vitis vinífera*. Devido a essa baixa produção no ano de 2009, a maior parte dos vinhos finos consumidos pelos brasileiros foram importados (76%), principalmente do Chile e da Argentina (UVIBRA, 2012).

Segundo Camargo, Tonietto e Hoffmann (2011), no ano de 2010, aproximadamente 43,07% da uva produzida no Brasil foi destinada ao processamento para elaboração de vinhos, suco de uva e derivados, sendo o restante destinado ao mercado de uva *in natura* (Tabela 2).

Tabela 2 Produção de uvas para o processamento e para consumo *in natura*, no Brasil (em toneladas)

| Ano | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 |
|--------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Processamento | 637.125 | 708.042 | 678.169 | 557.888 |
| Consumo <i>in natura</i> | 717.835 | 691.220 | 667.550 | 737.554 |
| Total | 1.354.960 | 1.399.262 | 1.345.719 | 1.295.442 |

Fonte: Mello (2006)

2.3 Principais regiões brasileiras produtoras de vinho

A viticultura brasileira ocupa uma área de, aproximadamente, 71 mil ha distribuídos basicamente pelos Estados do Rio Grande do Sul (zona temperada), São Paulo, Santa Catarina, Paraná (Subtropical), Pernambuco (zona tropical), Bahia (zona tropical) e Minas Gerais (zona subtropical), sendo base de sustentação da exploração agroindustrial de algumas dessas regiões, não somente pela produção de uvas de mesa, mas também de matéria-prima para a elaboração de vinhos, suco e derivados (AGRIANUAL, 2006; INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO - IBRAVIN, 2012). As regiões tradicionais e os principais pólos emergentes da vitivinicultura brasileira são apresentados no mapa (Figura 1).

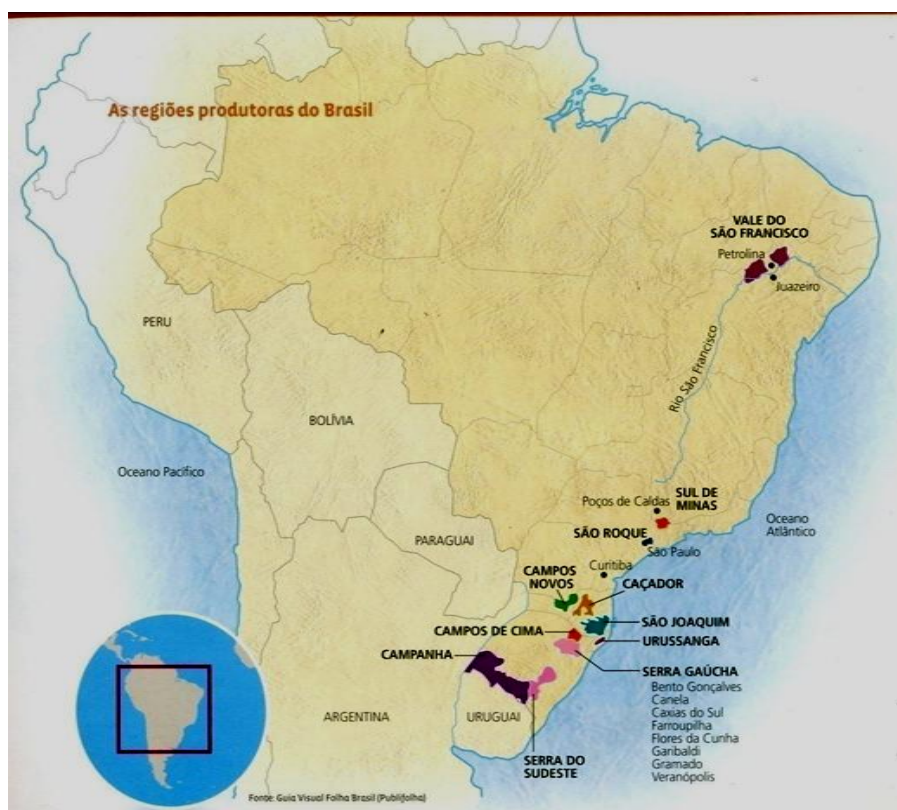


Figura 1 Principais Regiões Brasileiras produtoras de Vinho

Fonte: Viotti (2010), modificada.

A produção de vinho concentra-se praticamente no Estado do Rio Grande do Sul, com uma pequena representação em Santa Catarina, Pernambuco, Bahia e em Minas Gerais. Desde a sua introdução no Brasil, a videira encontrou nas adversidades climáticas um forte entrave ao seu desenvolvimento. Em 1532, as variedades europeias introduzidas por Martin Afonso de Souza, plantadas no litoral do Estado de São Paulo, foram praticamente dizimadas pelos ataques de fungos, que desenvolviam com facilidade nas condições de alta umidade e temperaturas daquela região (SOUSA, 1996).

Entretanto, com a introdução de cultivares americanas, mais rústicas e adaptadas às condições tropicais e subtropicais, a viticultura brasileira experimentou um forte avanço. Este fato, aliado a colonização de diversas regiões por imigrantes italianos e portugueses, que possuíam o hábito de cultivar a videira e consumir seus produtos é que permitiu o nascimento e evolução das principais regiões vitícolas nacionais, como as da Serra Gaúcha, no Rio Grande do Sul; do Vale do Peixe, em Santa Catarina e do Planalto de Poços de Caldas em Minas Gerais (SOUSA, 1996).

2.3.1 Região Sudeste (Sul de Minas Gerais)

A região Sul de Minas Gerais situa-se a 21 °S 40 °O, altitude de 1150 m, precipitação pluviométrica anual de 1500 mm, temperatura média anual de 19 °C e umidade relativa do ar de 75%. Nesta região a latitude é compensada pela altitude, praticando-se uma viticultura de clima temperado, com poda em julho e agosto e colheita em dezembro e janeiro (IBRAVIN, 2012; PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006).

A viticultura no Estado de Minas Gerais teve o início das suas atividades no século 19, com o cultivo de videiras de origem americana (*Vitis labrusca* e *Vitis bourquina*). Ao longo da história, esta região consagrou-se como produtora de vinhos de mesa, elaborados com as variedades Bordô, localmente chamada de “Folha de Figo”, Jacquez e Niágara, tendo como principais produtores os municípios de Caldas, Andradas e Santa Rita de Caldas (PROTAS; CAMARGO, 2010).



Figura 2 Vinhedos no município de Caldas (região Sul de Minas Gerais)

Fonte: Fotos feitas pela autora, 2011

Atualmente, a produção de vinho é realizada com uvas cultivadas na própria região e também com uvas adquiridas no Rio Grande do Sul, já que a área cultivada foi bastante reduzida nos últimos anos. Embora a vitivinicultura do pólo de Caldas e Andradas seja focada na produção de vinhos de mesa e suco de uva, existem ações de empresários e da própria Empresa de Pesquisa e Agropecuária - EPAMIG, no sentido de incentivar a produção de uvas viníferas (IBRAVIN, 2012).

A partir de 2001 pesquisadores do Núcleo Tecnológico Uva e Vinho da EPAMIG começaram a estudar a possibilidade de se trabalhar com cultivares européias (*Vitis vinifera*) na região sul de Minas Gerais, com condições de clima temperado quente a uma altitude entre 800 e 900 m. Em parceria com a Fazenda Santa Fé, localizada no município de Três Corações, realizaram uma série de experimentos com cultivares européias, e, dentre as cultivares testadas, a Syrah foi a que melhor se adaptou à mudança do ciclo da planta (AMORIM; FAVERO; REGINA, 2005; IBRAVIN, 2012).

2.3.2 Região Nordeste (Vale do Submédio São Francisco)

A região do Vale do Submédio São Francisco, cujas cidades Pólos são Petrolina, em Pernambuco, e Juazeiro, na Bahia, é pioneira na produção de uva e vinho sob condições tropicais no Brasil. A região situa-se no trópico Semiárido brasileiro, a 9 °S 40 °O e altitude em torno de 350 m, média de 500 mm de precipitação, concentrada entre os meses de dezembro a março, temperatura de 26 °C e umidade relativa do ar de 50%. Neste período há maior incidência de doenças fúngicas, especialmente de míldio e de podridões dos cachos (IBRAVIN, 2012; PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006).

A produção de uvas destinadas a elaboração de vinho na região do Vale do Submédio São Francisco teve início na década de 80, quando foram introduzidas na região as cultivares Syrah e Cabernet Sauvignon (tintas) e Chenin Blanc (brancas), trazidas do Sul do Brasil. Em meados da década de 90 e início de 2000, outras empresas instalaram-se na região, o que proporcionou um maior aumento do volume de vinho elaborado. O Vale é considerado a segunda região produtora de vinhos finos do Brasil, sendo responsável por 15% da produção nacional, com oito milhões de litros por ano (PEREIRA, 2012). Este fato ocorreu em função do sucesso no cultivo das variedades *Vitis vinífera* que adaptam-se melhor em áreas de verão longo e seco e invernos brandos (TONIETTO; CAMARGO, 2006).

A área da região irrigada compreende aproximadamente 120 mil hectares, sendo 12,2 mil hectares cultivados com videira. Cerca de 95% da área plantada é destinada à produção de uvas para consumo *in natura*, tanto para o mercado interno como para exportação. Para a produção de vinhos estima-se que exista uma área de 500 hectares de parreiras que dão origem a 6 milhões de litros de vinho/ano, sendo 80% de vinho tinto e o restante de vinho branco (SOARES; LEÃO, 2009). Os principais municípios produtores de vinho desta

região são Santa Maria da Boa Vista e Lagoa Grande em Pernambuco, e Casa Nova na Bahia (ANUÁRIO..., 2006).



Figura 3 Vinhedos na região do Vale Submédio São Francisco (Nordeste do Brasil)

Fonte: Fotos feitas pela autora, 2011

A região do Vale do Submédio São Francisco é considerada como um dos pólos mais dinâmicos do país e a única região do mundo que produz uvas durante todo o ano. Este fato ocorre em função de algumas vantagens características da região, como o clima e a irrigação a partir do Rio São Francisco, além de outras práticas de manejo que faz com que o ciclo fenológico da videira seja mais curto. Além disso, é possível realizar o escalonamento da produção ao longo do ano, sendo possível reduzir os investimentos em termos de infraestrutura para a elaboração dos vinhos, possibilitando escolher os períodos ao longo do ano favoráveis para a obtenção de uvas e vinhos de qualidade e com tipicidades (PEREIRA, 2006).

O Vale do Submédio São Francisco também produz suco de uva, embora ainda em pequena escala. O suco de uva é um produto de grande aceitação comercial no Brasil, principalmente pelos seus benefícios à saúde (SANTOS; FERRAZ, 2006).

As variedades cultivadas na região, para a elaboração de vinhos tintos são Syrah, Tempranillo, Touriga, Petit Verdot, Cabernet Sauvignon, Ruby e Cabernet Franc. A cultivar Syrah apreciadora de calor e sol, adapta-se bem a esta região. Na elaboração de vinhos brancos são utilizados as cultivares Chenin Blanc, Moscato Canneli, Verdejo, Viognier e Sauvignon Blanc. Já para a elaboração de suco as variedades utilizadas são Isabel precoce e BRS Cora (VIOTTI, 2010).

2.3.3 Região Sudeste (São Paulo)

A vitivinicultura paulista nasceu na região Leste, nos arredores das cidades de São Paulo e de Campinas. Nas primeiras décadas do século XX ganhou expressão no município de São Roque, como produtor de vinhos de mesa e, na sequência, expandiu-se ganhando expressão na região de Jundiaí, neste caso tanto na produção de uvas para vinho quanto na produção da variedade Niágara Rosada, destinada ao mercado de uva de mesa. Nessa região de São Paulo, o cultivo de uvas finas de mesa desenvolveu-se nos municípios de São Miguel Arcanjo e Pilar do Sul, tendo como base da matriz produtiva, principalmente as variedades Itália e Rubi. Mais tarde, na década de 1980, o cultivo da uva fina de mesa também ganhou expressão na região Noroeste do Estado (com polo de referência no município de Jales), cujo sistema de produção contempla dois ciclos e uma colheita/ano, no período de entressafra das demais regiões do estado, entre os meses de julho e outubro (PROTAS; CAMARGO, 2010).

Como novidade no setor vitivinícola de São Paulo registra-se algumas 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 finos e

vinhos espumantes de qualidade. O sistema/modelo de produção prevê a realização de dois ciclos vegetativos e uma colheita por ano, realizada no período entre os meses de julho à outubro, quando as condições climáticas apresentam baixa incidência de chuvas, muita insolação e temperaturas amenas, favoráveis à maturação da uva (PROTAS; CAMARGO, 2010). O município de Espírito Santo do Pinhal localiza-se a uma latitude 22°11'00" sul e a uma longitude 46°42'00" oeste, estando a uma altitude de 870 metros, apresenta indicadores climáticos médios de 1500 mm de precipitação, temperatura média anual de 19 °C e umidade em torno de 50%. As principais cultivares que vem sendo implantadas na região de Espírito Santo do Pinhal são Syrah, Cabernet Sauvignon, Merlot, Sauvignon Blanc e Chardonnay.

2.3.4 Região Sul – Serra Gaúcha

No Estado do Rio Grande do Sul a principal região produtora é a da Serra Gaúcha, situada a 29 °S 51 °O, com altitude entre 600-800 m, apresenta características climáticas próximas a das regiões temperadas, com precipitação média anual de 1700 mm distribuídos ao longo do ano, temperatura média de 17,2 °C e umidade relativa do ar de 76% (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006).

Apresenta, aproximadamente, 32 mil hectares de vinhedos, sendo considerada a maior região vitivinícola do País. Trata-se de uma viticultura de pequenas propriedades, pouco mecanizada, onde predomina o uso da mão de obra familiar. A colheita ocorre nos meses de janeiro e fevereiro e a maior parte das uvas colhidas é utilizada para elaboração de sucos e vinho de mesa. Situada no nordeste do estado, destacam-se os municípios de Bento Gonçalves, Caxias do Sul e Garibaldi pelo volume e pela qualidade dos vinhos que produzem (VIOTTI, 2010). Mais de 80% da produção de uvas da região origina-se de

cultivares americanas (*Vitis labrusca*, *Vitis bourquina*) e híbridas interespecíficas, Isabel, Bordô, Niágara Branca, Concord, Niágara Rosada, Jacquez e Seibel 1077. Referente às castas de *Vitis vinifera*, destacam-se as cultivares de uvas brancas Moscato Branco, Riesling Itálico, Chardonnay e Trebbiano (Ugni Blanc); entre as tintas as principais são Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc, Tannat, Ancellota e Pinotage (IBRAVIN, 2012).

A maior parte da uva colhida é destinada à elaboração de vinhos, sucos e outros derivados. As uvas de origem americana são utilizadas sobretudo para a elaboração de suco e de vinho de mesa. No que se refere aos vinhos finos, merece destaque a produção de vinhos espumantes de alta qualidade, além dos vinhos tranquilos, brancos e tintos. Detentora de alta tecnologia enológica, sobretudo no segmento de vinhos finos, esta região vem crescendo como produtora de vinhos de qualidade. Nos últimos três anos, a vitivinicultura começou a ser estimulada nos municípios de Bagé e Candiota, na região da Campanha Meridional, e Pinheiro Machado e Encruzilhada do Sul, na região da Serra do Sudeste. Em 2011, o estado do Rio Grande do Sul apresentou uma produção de 258,73 milhões litros de vinho de mesa e de 52,20 milhões de litros de vinho fino (IBRAVIN, 2012).

3 BIOSÍNTESE DA OCRATOXINA A (OTA)

As micotoxinas podem ser definidas como produtos naturais de baixo peso molecular produzidas por fungos filamentosos. Em pequenas concentrações as micotoxinas são tóxicas para os vertebrados e outros animais e, apesar de todas as micotoxinas serem de origem fúngica, nem todos os compostos tóxicos produzidos pelos fungos são considerados micotoxinas (BENNET; KLICH, 2003).

A ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário de origem fúngica que foi descoberto na África por Merwe, Stein e Fourie (1965) em linhagens de *Aspergillus ochraceus* como sendo um dos grupos de metabólitos prejudiciais para os seres humanos e animais. Mais tarde outras espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram descritas como produtoras desta toxina (VARGA et al., 1996).

No gênero *Penicillium*, *P. verrucosum* e *P. nordicum* são as únicas espécies que demonstraram ser capazes de produzir esta toxina (GEISEN et al., 2004). Enquanto estas espécies são responsáveis pela produção de ocratoxina A em cereais, espécies de *Aspergillus* são relatadas como as principais contribuintes para a presença de ocratoxina A em café e uvas (LUND; FRISVAD, 2003; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

A ocratoxina A (OTA) é uma molécula moderadamente instável ao calor, permanecendo intacta durante a maioria das operações de processamento de alimentos e, portanto, pode estar presente nos produtos finais (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

A estrutura da ocratoxina A (OTA) é caracterizada quimicamente por ser um derivado isocumarínico ligado através do seu grupo 7-carboxílico a L-β-fenilalanina por um grupo amida (Fig. 12). A ocratoxina A é considerada a mais tóxica, em função da presença do átomo de cloro na posição C5, exercendo um

efeito direto na dissociação do grupo hidroxil fenólico na ocratoxina A e ocratoxina C, promovendo um efeito tóxico à molécula (BELLÍ et al., 2002).

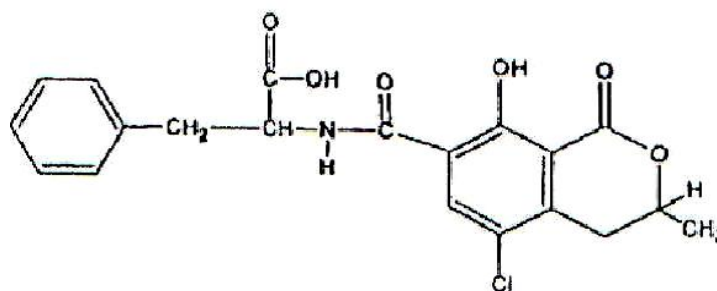


Figura 4 Estrutura Química da Ocratoxina A (OTA)

Fonte: Merwe, Stein e Fourie (1965)

O grupo das ocratoxinas inclui também, a ocratoxina C (OTC), 4-hidroxiocratoxina A (4-OH OTA), ocratoxina α (OT α , sendo a fenilalanina ausente), e a ocratoxina B (átomo de cloro no 5C da diidro-metil-isocumarina está ausente) (DUARTE; PENA; LINO, 2010; SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005). A substituição do átomo de cloro transformando a ocratoxina B em ocratoxina A promove, não só a proteção da toxina contra as carboxilpeptidases em animais monogástricos, mas também parece dar uma importante expressão na toxicidade em animais (HARRIS; MANTLE, 2001). Essas micotoxinas são compostas por dois agrupamentos, uma di-hidroxi isocumarina, ligada por meio do grupo 7-carboxi à amida do grupamento L- β -fenilalanina (ligação estável a hidrólise e a temperatura), com exceção da OT α em que o grupamento fenilalanina está ausente (RINGOT et al., 2006).

A OTA é pouco solúvel em água e solúvel em solução aquosa de bicarbonato de sódio. É caracterizada como um composto branco cristalino, quimicamente denominada (R) -N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopiran-7-il) carbonil] - L-fenilalanina. Sua fórmula empírica é

$C_{20}H_{18}O_6NC1$ e peso molecular $403,82 \text{ g mol}^{-1}$. Em relação a emissão de fluorescência, o máximo pode ocorrer a 467 nm em etanol a 96% e 428 nm em etanol absoluto (ANLI; ALKIS, 2010).

Apesar de existirem informações sobre sua estrutura química, a via biossintética da ocratoxina A não esta completamente estabelecida. No entanto, estudos com carbono 14 como marcadores biológicos mostraram que a metade da fenilalanina origina-se da via do Shiquimato (a partir do ácido Shiquímico) e a metade dihidro-isocumarina vem da via de um pentacetídeo (Figura 13) (ANLI; BAYRAM, 2009; HARRIS; MANTLE, 2001; HUFF; HAMILTON, 1979; RINGOT et al., 2006).

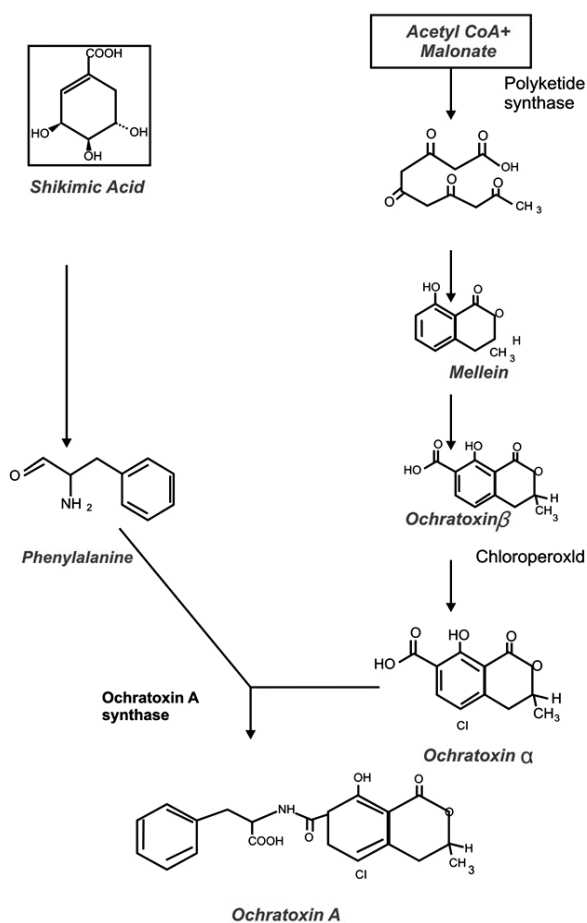


Figura 5 Biossíntese da Ocratoxina A

Fonte: Ringot et al. (2006)

O primeiro passo da síntese de policetídeo de isocumarina consiste da condensação de uma unidade de acetato (acetil-COA) para 4 unidades de malonato (MOSS, 1996, 1998). A enzima envolvida nesta atividade é a policetídeo sintetase. As condições que permitem a expressão desta enzima pelos genes de fungos produtores ocorrem somente durante o início da produção da micotoxina. Quando formado, na sequência, o policetídeo é modificado pela

formação de um anel de lactona (síntese de mellein, isocumarina com propriedades similares as da OTA) e a adição de um grupo carboxílico, formando ocratoxina β . A seguir um átomo de cloro responsável pelo seu caráter tóxico, é incorporado a molécula pela ação da cloroperoxidase, sintetizando a ocratoxina α . Na última etapa, a enzima ocratoxina A sintetase catalisa a ligação entre a OT α com a fenilalanina (ANLI; BAYRAM, 2009; EDWARDS; O'CALLAGHAN; DOBSON, 2002; HARRIS; MANTLE, 2001; RINGOT et al., 2006).

Huff e Hamilton (1979) propuseram uma via hipotética baseada na estrutura da molécula de ocratoxina A. Nesta via, a meleína e a hidroximeleína seriam os prováveis precursores desta toxina. Entretanto, Harris e Mantle (2001) descreveram experimentos com precursores marcados da ocratoxina A. De acordo com estes autores, a meleína, que foi proposta como um precursor da ocratoxina A não desempenha papel na via biossintética da toxina.

Além da via primária da biossíntese de fenilalanina, necessária para a síntese da OTA, outras enzimas são necessárias para este processo, como uma policetideo sintase, responsável pela síntese do policetideo dihidroisocumarina, uma metilase para a formação do grupo carboxil, uma ocratoxina A sintase (peptídeo sintase) para a ligação do aminoácido fenilalanina ao policetideo, e finalmente uma cloroperoxidase ou halogenase para a introdução do átomo de cloro (FARBER; GEISEN, 2004).

A principal etapa da via de biossíntese da ocratoxina A é a formação do policetideo. Esta formação, que é catalizada pela policetideo sintase, constitui de condensações descaboxilativas sucessivas de unidades de acetato (unidade iniciadora) e malonato (unidade adicionada), em um processo análogo a síntese de ácidos graxos (VARGA et al., 2003). As policetídeos sintases representam uma classe de enzimas com multidomínios que utilizam uma estratégia interativa para a construção do policetideo. Estas são requeridas para a biossíntese de

várias toxinas, antibióticos e outros componentes biologicamente ativos produzidos por fungos (BROWN et al., 2007; FUJII et al., 1998).

Alguns estudos tem demonstrado a identificação de genes envolvidos com a biossíntese da ocratoxina A, sendo a maioria destes estudos realizados em espécies de *Penicillium* (GEISEN et al., 2004; SCHMIDT-HEYDT et al., 2007) e *Aspergillus ochraceus* (O'CALLAGHAN; CADDICK; DOBSON, 2003). E recentemente, em *A. carbonarius* (CRESPO-SEMPERE et al., 2010; GALLO et al., 2009) e *Aspergillus westerdijkiae* (BACHA et al., 2009).

Para *A. ochraceus* foi descrito parte de um gene, denominado *pks*, que codifica uma policetídeo sintase similar a policetideos sintases fúngicas envolvidas na biossíntese de micotoxinas, como as fumonisinas e aflatoxinas. Através da técnica de RT-PCR em tempo real, verificou-se que existe uma forte relação entre a expressão deste gene e a produção de ocratoxina A por *A. ochraceus* (O'CALLAGHAN; STAPLETON; DOBSON, 2006).

Gallo et al. (2009) identificaram e caracterizaram parte do gene *ACpks* que codifica uma policetídeo sintase em *A. carbonarius* possivelmente envolvido com a produção de ocratoxina A. A transcrição do gene foi diferencialmente regulada, sendo os transcritos observados em meio permissivo e ausentes em meio restritivo para a produção da toxina. Estes autores avaliaram também a expressão do gene *ACpks* de *A. carbonarius* em diferentes faixas de pH. Os níveis de expressão do gene monitorado por RT-PCR nos dias 3 e 4 não apresentaram mudanças sob as diferentes condições de pH testados, entretanto observou-se um aumento na produção da OTA. Apesar disto, nenhuma destas sequências foi provada estar envolvida com a biossíntese de ocratoxina A. Ou seja, para *A. carbonarius* a caracterização de novos genes e a comprovação de sua participação na via biossintética desta toxina ainda faz-se necessária.

Apesar dos avanços em estudos que objetivam identificar os genes envolvidos diretamente na via de biossíntese da ocratoxina A, pouco se conhece

sobre os mecanismos regulatórios desta via. Muitos dos genes que participam da regulação foram descritos para outras micotoxinas.

Nos últimos anos a ocratoxina A tem recebido atenção da comunidade científica por possuir propriedades nefrotóxicas, genotóxicas, teratogênica e imunossupressora (FOOD SAFETY AND QUALITY - JECFA, 2001), e está relacionada com a Nefropatia Endêmica de Balcãs, doença degenerativa dos rins que afeta exclusivamente a população adulta rural. Mais recentemente foram descritos evidências de uma possível correlação entre OTA e desenvolvimento de tumores do trato urinário de seres humanos (PITT et al., 2000). Segundo a International Agency for Research on Cancer - IARC (1993), a OTA é classificada como possível carcinogênico para humanos (grupo 2B). Os efeitos imunotóxicos das micotoxinas não são facilmente detectados nas populações, mas são de extrema importância, pois suscetibilizam a defesa do organismo contra micro-organismos e células tumorais. Assim tornou-se um problema de saúde pública mundial (SILVA et al., 2007).

A ocratoxina A (OTA) ocorre em diversos gêneros alimentícios e bebidas, incluindo, cevada, trigo, centeio, milho, cerveja, arroz, feijão, grãos de café (verde e torrado), amendoim, soja, carne suína e aves, castanha-do-Brasil, pão, nozes, vegetação em decomposição, frutas secas, suco de maçã, solo, condimentos, uva e derivados, entre outros (ABRUNHOSA; SERRA; VENÂNCIO, 2002; ASTORECA et al., 2009; BATISTA et al., 2009; CECI et al., 2007; DUARTE; PENA; LINO, 2010; LASRAM et al., 2010; PERRONE et al., 2007; PRADO et al., 2008; VARGA; SAMSON, 2008).

De acordo com estudos, a ocorrência da OTA pode ser favorecida por uma série de fatores ambientais como umidade, temperatura, tempo de incubação e tipo de substrato e pelos procedimentos realizados durante a colheita, armazenamento e transporte dos produtos (PALACIOS-CABRERA et al., 2001; PETZINGER; WEIDENBACH, 2002; ROMANI et al., 2000).

Em decorrência da presença da OTA relatada em diversos alimentos, a Comissão Européia adotou o regulamento (EC) nº 472/2002, estabelecendo limites máximos toleráveis para esta toxina nos alimentos. Segundo Monaci e Palmisano (2004), alguns países como a Itália estabeleceram seus próprios limites para a concentração de OTA em carne suína de 0,001 µg/L e em café torrado instantâneo de 0,004 µg/L.

No Brasil, devido a vários fatores como: crescimento da área e práticas vitivinícolas, exigência de alguns países para exportação e aos vários efeitos tóxicos da Ocratoxina A à saúde humana, foi aprovada recentemente a Legislação Nacional (Resolução RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011) que estabelece os Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, onde fica estabelecido o Limite Máximo de 2 µg/L para suco de uva, polpa de uva, vinho e seus derivados (BRASIL, 2011).

4 FATORES RELACIONADOS AO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE OTA POR FUNGOS

O crescimento fúngico e a produção de micotoxinas depende de uma complexa interação entre diversos fatores, tais como, temperatura, atividade de água (a_w), pH, fatores nutricionais, tipos de produtos, tempo de armazenamento, dentre outros (ANLI; ALKIS, 2010; GARCIA et al., 2011; LASRAM et al., 2010; PATERSON; LIMA, 2010).

Dentre os parâmetros ambientais, os mais importantes são a temperatura e a atividade de água (a_w), por serem mais restritivos a produção de micotoxinas do que para o crescimento fúngico (KHALESIA; KHATIB, 2011; MAGNOLI et al., 2007; ROMERO et al., 2010). A a_w pode ser o fator mais crítico que influencia no crescimento, germinação e no estabelecimento dos fungos em substratos ricos em nutrientes (BOURAS; KIM; STRELKOV, 2009).

De acordo com Hocking et al. (2007), a importância da temperatura e da a_w sobre a taxa de crescimento de fungos e da produção de OTA na baga da uva é difícil de ser avaliada, pois, devido ao aumento do teor de açúcar que ocorre da fase pintor até a colheita, a a_w diminui para a faixa ideal favorecendo a produção da toxina.

Esteban et al. (2006) avaliaram o efeito da atividade de água (0,82-0,99 a_w) sobre o crescimento e produção de OTA em isolados de *A. niger* Agregado, cultivados em CYA (Czapeck Yeast Agar) e YES (Yeast Extract Sucrose agar), durante 30 dias de incubação. Estes autores observaram que a a_w foi mais restritiva para a produção da OTA que para o crescimento destes isolados.

A temperatura ideal para o crescimento de *A.niger* foi relatada entre 30-37 °C (BELLÍ et al., 2004b; LEONG; HOCKING; PITT, 2004), enquanto que para a produção de OTA a faixa ideal é de 20-25 °C (ESTEBAN et al., 2004).

O efeito da temperatura e da atividade de água no crescimento e produção de OTA por espécies de *A.carbonarius* isolados de vinhedos da Europa e Austrália foi avaliado em diversos estudos (BELLÍ et al., 2007; CABRERA-PALACIOS et al., 2005; ESTEBAN et al., 2006; LEONG et al., 2006c; OUESLATI et al., 2010; VALERO et al., 2007). Nestes estudos, observou-se em geral que as condições favoráveis para o crescimento desta espécie ocorrem nas faixas de 25-35 °C e em a_w entre 0,95-0,99, e a condição ótima para a produção da OTA ocorre no intervalo de 15 a 20 °C e 0,95-0,98 a_w .

Tassou et al. (2007) avaliaram o efeito da atividade de água (a_w) e da temperatura na taxa de crescimento e produção de OTA in vitro de dois isolados de *Aspergillus carbonarius*, na Grécia. Os dois isolados cresceram a 30–35°C e 0,96 de a_w , enquanto que a produção máxima de OTA ocorreu em condições subótimas de crescimento (15–20 °C e 0,93 – 0,96 a_w). Foi observado crescimento a 0,85 de a_w e a 25 °C. A produção máxima de ocratoxina A foi detectada após 25 dias de incubação a 20 °C e 0.96 a_w e esse valor foi de 3,14 e 2,67 µg/g para as cepas analisadas. É importante observar que os isolados da Grécia são mais xerotolerantes que dos outros estudos realizados nos países mediterrâneos, demonstrando assim a influência das condições climáticas da região produtora na produção da micotoxina. Esses dados fornecem informações sobre a capacidade de crescimento e produção de OTA de *Aspergillus carbonarius* sob diferentes condições ecológicas, contribuindo para o desenvolvimento de modelos que previnam o risco de contaminação por ocratoxina A na produção do vinho.

Leong et al. (2006c) analisaram o efeito de diferentes a_w (0,92-0,98) e temperaturas (15-35 °C) na produção de OTA por cinco isolados de *A. carbonarius* e dois de *A. niger* obtidos a partir de vinhas australianas. Estes autores observaram que a temperatura ótima para a produção da OTA foi registrada a 15 °C, enquanto a a_w ótima para a produção da toxina foi 0,95-0,98

para *A.carbonarius* e 0,95 para *A. niger*. Bellí et al. (2004b) observaram que a produção de OTA em uvas pode chegar a quantidade máxima a 25 °C e a_w acima de 0,98 após cinco dias de incubação.

Além dos fatores ambientais, a presença de microflora competitiva e a composição do substrato, são fatores importantes para a contaminação por espécies de *Aspergillus* e a produção de OTA (KHALESIA; KHATIB, 2011; RAMOS et al., 1998). Algumas espécies de micro-organismos detectados na microbiota de uvas, como por exemplo, *Aspergillus japonicus*, *A.wentii*, *A.ochraceus*, *A.versicolor*, *A.clavatus* e as espécies de leveduras epífitas *Candida guilliermondii* e *Acremonium cephalosporium* são capazes de competir por espaço e nutrientes com fungos toxigênicos, reduzindo a concentração de OTA em uvas e vinhos (ABRUNHOSA et al., 2001; PONSONE et al., 2012).

Os danos na superfície das bagas causados por insetos, aves e outros agentes primários de infecção, tais como a presença de *Botrytis cinerea* também facilitam o desenvolvimento de fungos produtores de OTA (LEONG et al., 2006a). *Botrytis cinerea* é um patógeno causador do mofo cinza em uvas e sua infecção leva à abertura de feridas na película das bagas, favorecendo a infecção de fungos oportunistas como as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*.

Várias pesquisas têm demonstrado que as condições climáticas afetam a intensidade de contaminação fúngica, dependendo do ano da colheita e da localização do vinhedo (BATTILANI et al., 2006; BELLÍ et al., 2005; LEONG et al., 2006c). Períodos de chuva durante a colheita por exemplo, podem causar o rompimento das bagas, o que pode favorecer a infecção por espécies de *Aspergillus* e conseqüentemente a produção de OTA (COZZI et al., 2007; HOCKING et al., 2007).

O efeito dos fatores climáticos, da região geográfica e latitude, tem sido demonstrado em diversos estudos, por sua influência na contaminação fúngica e na produção de OTA em uvas e vinhos. A maior ocorrência da OTA é

encontrada em latitudes mais baixas (ROSARI; ARZOUYAN; ESTIENNE, 2000; STEFANAKI et al., 2003; ZIMMERLI; DICK, 1996).

5 FUNGOS FILAMENTOSOS TOXIGÊNICOS E OTA EM UVAS E DERIVADOS

As principais espécies produtoras de ocratoxina A em alimentos são do gênero *Aspergillus*, pertencentes às Seções *Circumdati* e *Nigri*. Em regiões de clima quente a OTA é produzida pelas espécies *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e raramente por *A. niger* e, em regiões de clima temperado pelas espécies *Penicillium nordicum* e *P. verrucosum* (PITT et al., 2000). Os fungos da Seção *Nigri* possuem esporos de coloração preta que conferem proteção à luz solar e a radiação UV, fornecendo uma vantagem competitiva em regiões de clima quente (PITT; HOCKING, 1997).

Os fungos responsáveis pela contaminação de uvas e derivados com OTA são os *Aspergillus* Seção *Nigri* (BATTILANI et al., 2006; CHIOTTA et al., 2009; LASRAM et al., 2010, 2012; PONSONE et al., 2011; WELKE; HOELTZ; NOLL, 2009). As espécies mais frequentemente detectadas em uvas são *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis* e *A. japonicus*. As espécies *A. foetidus*, *A. ibericus* e *A. brasiliensis*, ocasionalmente podem ser encontradas em uvas (OLIVER; TORTA; CATARA, 2008).

Dentre as espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*, *A. carbonarius* é considerada a principal fonte de contaminação com OTA em uvas e vinhos (BAU et al., 2005; LASRAM et al., 2008, 2012; SERRA et al., 2003; VALERO et al., 2007). Embora *A. niger* seja a espécie mais comum do gênero *Aspergillus* presente em uvas, poucos isolados são ocratoxigênicos (LEONG et al., 2006b; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

Os *Aspergillus* Seção *Nigri* têm sido considerados como a micobiota predominante de uvas durante o momento da colheita, embora possam ser detectados também em todas as fases de maturação (BAU et al., 2005; LUCCHETTA et al., 2010; SAGE et al., 2002; SERRA et al., 2003; SERRA;

MENDONÇA; VENÂNCIO, 2006). Durante a fase de maturação das uvas ocorre o aumento no teor de açúcar e o amolecimento da película das bagas, tornando-as mais susceptíveis à infecção por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente os da Seção *Nigri* (LEONG et al., 2006a).

Chiotta et al. (2009) avaliaram a presença de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas de diferentes regiões da Argentina. *A. niger* Agregado (81%) foi a principal espécie isolada em todas as regiões estudadas, seguido por *A. carbonarius* (11% dos isolados) e espécies unisseriadas (8%). O maior produtor de OTA foi *A. carbonarius* (28 de 31, equivalente a 90%) com níveis variando entre 1,2 a 1285 ng/g).

De acordo com Lasram et al. (2012), dentre as espécies de *Aspergillus Nigri* obtidas de uvas, *A. carbonarius* foi o produtor de OTA predominante, com 99,5%, contra apenas 3,2% dos isolados de *A. niger* Agregado ocratoxigênicos.

Diversos estudos confirmam que a espécie *A. carbonarius* é predominantemente responsável pela contaminação de OTA em uvas cultivadas em países da Europa (BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2004b; BENJAOUI et al., 2006; BRERA et al., 2008; RATOLA; MARTINS; ALVES, 2004; SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005; SERRA; MENDONÇA; VENÂNCIO, 2006; SOUFLEROS; TRICARD; BOLOUMPASI, 2003; TJAMOS; ANTONIOU; TJAMOS, 2006), na Tunísia (LASRAM et al., 2007, 2012) e na Austrália (LEONG; HOCKING; SCOTT, 2006). Entretanto, estudos realizados na América do Sul, demonstraram que isolados de *A. niger* Agregado foram os principais produtores de OTA em uvas originárias da Argentina e do Brasil (MAGNOLI et al., 2003; PONSONE et al., 2007; ROSA et al., 2002).

Khoury et al. (2008), ao avaliarem a contaminação por *Aspergillus Nigri* em uvas e mostos originários da Líbia, detectaram que *A. niger* Agregado foram mais frequentes (52,2%), seguido por *A. japonicus* (2,9%) e *A. carbonarius* (1,8%). Segundo os autores, embora os isolados de *A. niger* Agregado sejam

mais frequentes, estas espécies não foram as responsáveis pela produção de OTA. Ao contrário de *A. niger* Agregado, 100% dos isolados de *A. carbonarius* foram produtores de OTA.

Em Portugal e Espanha, os únicos isolados identificados como *A. carbonarius* que não produziram a micotoxina (ABARCA et al., 2003; SERRA et al., 2003) foram posteriormente caracterizados e associados a uma nova espécie, *Aspergillus ibericus* (SERRA; MENDONÇA; VENÂNCIO, 2006). Estudos confirmam a produção de OTA por isolados de *A. tubingensis*, originários de uvas (LASRAM et al., 2012; MEDINA et al., 2005).

6 OCRATOXINA A EM UVAS, VINHOS E SUCOS DE UVA

Dentre as micotoxinas a ocratoxina A (OTA) é frequentemente encontrada como contaminante de uvas, vinhos, mostos e sucos de uva (BELLÍ et al., 2004b; CLOUVEL et al., 2008). A presença da OTA em suco de uva e vinho foi relatada pela primeira vez por Zimmerli e Dick (1995). Posteriormente, diversos estudos foram realizados para avaliar os níveis desta toxina em sucos de uva e vinhos da Europa e da África do Sul (KOZAKIEWICZ et al., 2003; OTTENEDER; MAJERUS, 2000; PIETRI et al., 2001; SAGE et al., 2002).

Em um estudo realizado na Europa sobre a contribuição de cada gênero alimentício para a média total de ingestão alimentar de OTA, o vinho foi considerado a segunda fonte mais relevante, contribuindo com 13% e os cereais foram considerados os contribuintes mais importantes (50%) (MIRAGLIA; BRERA, 2002).

Os primeiros dados sobre a ocorrência de OTA em vinho comercializado na Espanha foram apresentados em estudos de Burdaspal e Legarda (1999). A maior incidência e teor desta toxina foi detectada em vinhos de sobremesa (73%), seguido dos vinhos rosé, tinto e branco, em concentrações de 0,01 a 4,63 µg/L.

Quintela et al. (2011) analisaram vinhos originários da Espanha e detectaram OTA em 57% das amostras estudadas. Todas as amostras mostraram um baixo nível de contaminação de OTA (0,004-0,179 µg/L), com concentração média de 0,035 µg/L. O número de amostras positivas foi maior na área semiárida (71%) do que na área seca (43%). Segundo os autores, as diferenças detectadas podem ser atribuídas a baixa precipitação e temperaturas elevadas na área semiárida, condições que favorecem o crescimento de fungos que produzem a OTA.

Rosa et al. (2004) avaliaram o teor de OTA em sucos de uva e vinhos de mesa nacionais e importados comercializados no Rio de Janeiro, Brasil. Nas amostras de suco foi detectada uma baixa porcentagem de OTA (29%), sendo a concentração máxima obtida de 0,1 µg/L. Nos vinhos, a concentração de OTA obtida foi de 0,034 µg/L, sendo a maior porcentagem e nível de contaminação detectados nas amostras de vinho tinto. Segundo estes autores, os vinhos e sucos brasileiros apresentaram baixo teor de OTA, sendo o maior nível da toxina detectado nas amostras de suco de uva tinta.

Shundo et al. (2006) analisaram vinhos de diferentes regiões do Brasil, e detectaram OTA em 31% das amostras estudadas. O nível mais elevado da OTA (1,33 µg/L), foi detectado no vinho produzido na região do Vale do Submédio São Francisco (Nordeste do Brasil), onde todas as amostras analisadas estavam contaminadas em concentrações variando de 0,36 a 1,33 µg/L. No entanto, no estado do Rio Grande do Sul, apenas duas das 22 amostras apresentaram concentrações de OTA de 0,10 e 0,24 µg/L.

A contaminação da OTA nos vinhos originários do Brasil pode ser considerada baixa quando comparada com outros países, principalmente do Sul e Oeste da Europa e Norte e Sul da África. Nestas regiões, uma elevada incidência de OTA em vinhos tintos tem sido observada (OTTENEDER; MAJERUS, 2000).

Ratola et al. (2005), ao analisarem 340 vinhos portugueses revelaram que 69 amostras continham níveis detectáveis de OTA. Destas, três excederam 0,5 µg/L de OTA, sendo a concentração máxima detectada de 2,1 µg/L.

Estudos demonstram que os vinhos elaborados no Sul da Europa e Norte da África, com clima mediterrâneo, apresentam maior contaminação com OTA do que os vinhos de regiões mais temperadas da Europa Central (OTTENEDER; MAJERUS, 2000; ZIMMERLI; DICK, 1996).

Flajs et al. (2009) utilizaram o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para análise de OTA em amostras de mosto e vinho elaborados na Croácia. Os resultados revelaram que as concentrações de OTA no mosto (0,019-0,05 µg/L) foram maiores que nos vinhos (0-0,021 µg/L).

Quintela et al. (2012) analisaram o teor de OTA de 30 amostras de vinhos tintos importados. Os autores mostraram que a OTA foi detectada em 88% dos vinhos importados da Alemanha e Reino Unido, 100% dos vinhos da Suíça e 67% dos vinhos importados dos Estados Unidos. A maior concentração da toxina foi detectada nos vinhos tintos da Suíça (0,149 µg/L) e dos Estados Unidos (0,125 µg/L).

Na Alemanha, uma pesquisa realizada entre 1995 e 1998 detectou, entre 90 amostras de suco de uva, um valor máximo de 5,26 µg/ kg e um valor médio de 0,74 µg/ kg (MIRAGLIA; BRERA, 2002). Na Austrália, Bellí et al. (2004a) não encontraram OTA em 10 amostras de suco de uva analisadas. Da mesma forma, no Brasil 70,8% das amostras de suco de uva avaliadas foram negativas quanto a presença de OTA, enquanto que as demais amostras (29,2%) de suco de uva tinta continham OTA em um intervalo de contaminação de 0,02-0,1 µg/L (ROSA et al., 2004). A maior concentração de OTA foi detectada em uma amostra de suco de uva tinta (0,1 µg/ kg).

De acordo com Varga e Kozakiewicz (2006) são necessários mais dados sobre a ocorrência de OTA em sucos de uva, já que crianças são um dos principais consumidores e o consumo de suco é maior que o do vinho. Em geral, estudos demonstram que o suco de uva é mais contaminado com OTA do que o vinho (BATTILANI et al., 2006; BAU et al., 2005; LASRAM et al., 2007; SERRA et al., 2003).

Majerus, Bresch e Otteneder (2000) determinaram uma maior taxa de contaminação em amostras de suco de uva (85%) do que nas amostras de vinho

analisadas (40%). Os maiores níveis de contaminação observados nos sucos de uva em relação aos vinhos, ocorrem devido à ausência do processo de fermentação, que contribui para a redução do teor de OTA durante a vinificação (OTTENEDER; MAJERUS, 2000).

7 MEDIDAS DE CONTROLE DA PRODUÇÃO DE OTA EM UVAS

Diversas medidas têm sido testadas para reduzir a ocorrência da OTA em uvas e para a remoção da toxina durante e após o processo de vinificação (SOUFRIZZO et al., 2010). Durante o processo de vinificação, a maceração das uvas contribui significativamente para o aumento dos níveis de OTA nos vinhos tintos (FERNANDES et al., 2003). Devido à alta toxicidade desta micotoxina, várias pesquisas vêm sendo realizadas para encontrar processos pelos quais os alimentos venham a ser descontaminados da OTA.

As estratégias mais aplicadas envolvem métodos físicos, químicos e biológicos (HUWING et al., 2001). Estes métodos têm como objetivo reduzir ou eliminar o efeito tóxico da OTA por destruição, modificação ou adsorção desta toxina (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION - EC, 2003).

Estudos têm demonstrado possíveis mecanismos de degradação e descontaminação da OTA em mostos e vinhos (BEJAOUI et al., 2004; CASTELLARI et al., 2001; DUMEAU; TRIONE, 2002; FERNANDES et al., 2007; GARCIA et al., 2011). Algumas estratégias preventivas, como a utilização de agentes biocontroladores, fungicidas, antioxidantes e melhorias nas práticas vitivinícolas e de elaboração do vinho são necessárias para controlar e reduzir a contaminação da OTA (BELLÍ et al., 2007; COZZI et al., 2009; JORGENSEN, 2005; PONSONE et al., 2012).

De acordo com estudos, deve-se observar as possíveis vias que favoreçam a infecção fúngica da baga, como por exemplo, danos mecânicos, ataque de insetos e a ação de fungos causadores de podridão das uvas como *Botrytis cinerea* (COZZI et al., 2006; PARK; NJAPAU; BOUTRIF, 1999), além da utilização de tratamentos químicos com fungicidas para o controle de espécies de *Aspergillus* responsáveis pela podridão preta nas uvas (PONSONE et al., 2012; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

Medidas de controle biológico, como o uso de leveduras epífitas tem sido bastante utilizado na redução da OTA. Entretanto, as medidas preventivas não impedem completamente a contaminação por OTA, sendo necessário adotar medidas corretivas, como a utilização de agentes capazes de remover a toxina de mostos e vinhos contaminados (SOUFRIZZO et al., 2010).

Vários métodos químicos e físicos, como o tratamento com hipoclorito, amonização e tratamento térmico foram desenvolvidos para desintoxicar OTA na alimentação animal ou bebidas alcoólicas. Entretanto, os tratamentos térmicos não são capazes de eliminar completamente a OTA dos alimentos (BOUDRA; LE-BARS; LE-BARS, 1995).

Outra estratégia para reduzir o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas é a utilização de antioxidantes tais como ácido vanílico ou ácido 4-hidroxibenzóico (PALUMBO; O'KEEFFE; MAHONEY, 2007) e óleos essenciais extraídos de plantas como *Thymus vulgaris* ou *Aframomum danielli*, capaz de afetar o crescimento fúngico e a síntese de OTA (AROYEUN; ADEGOKE, 2007; KABAK; DOBSON, 2009).

Outros métodos de desintoxicação sugerem o uso de ozônio, carvão ativado, silicato de alumínio, cálcio, tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, bentonita e irradiação gama em cereais e derivados (JANOS; RIGOA; TERENB, 2000). Castellari et al. (2001) demonstraram que o carbono ativado e caseinato de potássio apresentaram alta capacidade de adsorção para a OTA.

A estabilização de mostos pela adição de sulfito é comumente utilizada durante o início do processamento da uva e elaboração do vinho, como medida preventiva para impedir o crescimento de micro-organismos indesejáveis. No entanto, este composto não atua na redução ou degradação da OTA (HOCKING et al., 2007; ROSET, 2003).

Agentes clarificantes que contêm carbono, como o carvão enológico, tem sido utilizado como prática na redução do teor de OTA em vinhos

contaminados. No entanto, a eficácia do carvão na remoção da toxina está relacionada com a alteração da qualidade do vinho, como o conteúdo dos polifenóis (LEONG et al., 2007; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

A biodegradação é considerada a melhor solução para a descontaminação da OTA. Vários trabalhos foram realizados utilizando microorganismos ou culturas celulares, como fungos filamentosos, protozoários, bactérias, leveduras ou culturas celulares de plantas (ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006; ÖZPINAR et al., 2002; PIOTROWSKA; ZAKOWSKA, 2000; RUHLAND; ENGELHARDT; WALLNOFER, 1996; SCHATZMAYR et al., 2003).

A ação das bactérias do ácido láctico sobre a OTA durante o processo da fermentação malolática varia de acordo com a cepa. Certas cepas parecem remover a toxina somente por meio do mecanismo de adsorção, como observado para as leveduras (BEJAOUÏ et al., 2004; CECCHINI et al., 2006; FERNANDES et al., 2003, 2007). Outras exibem diferentes capacidades de diminuição do teor de OTA no vinho (SILVA et al., 2003). As estirpes mais eficazes são capazes de degradar a OTA em ocratoxina α , e podem diminuir a concentração da toxina no vinho em até 80% (FUMI et al., 2007).

A degradação da OTA por algumas espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*, em meio de cultura, ocorre através da clivagem da molécula na porção isocumarina, ocratoxina α e fenilalanina (LEONG et al., 2007). Esta degradação pode ser benéfica para o fungo que a utiliza como fonte de nitrogênio orgânico para o seu crescimento (HOCKING et al., 2007).

Segundo Merwe, Stein e Fourie (1965), espécies de *A.niger* não toxigênicas são capazes de produzir enzimas tais como carboxipeptidases A que degradam eficientemente a OTA. Outras enzimas obtidas por esta espécie que também podem degradar a toxina são lipases, proteases e metaloenzima

(ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006; ABRUNHOSA; VENÂNCIO, 2007).

Bejaoui et al. (2006a, 2006b) avaliaram a descontaminação do suco de uva por espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*. Os autores mostraram que *A.niger* foi capaz de degradar totalmente a OTA, enquanto que *A.japonicus* parcialmente. A utilização de espécies de *A.niger* na eliminação biológica da OTA em sucos de uva e mostos, é sugerido por se tratar de um fungo reconhecido por sua baixa toxicidade.

Abrunhosa, Serra e Venâncio (2002) avaliaram a capacidade de degradação da ocratoxina A por fungos filamentosos isolados de uvas portuguesas. Os autores observaram que 51 das 76 linhagens testadas, predominantemente espécies de *Aspergillus*, foram capazes de degradar mais de 80% da ocratoxina adicionada à cultura. As espécies com maior potencial de degradação (95%) foram os *Aspergillus* Seção *Nigri*. Outros fungos frequentemente isolados de uvas, tais como, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium* e *Penicillium*, também mostraram significativa capacidade de degradação.

As leveduras são considerados um dos mais potentes agentes de controle biológico, devido à sua biologia e propriedades não tóxicas (PONSONE et al., 2012). O mecanismo provavelmente envolvidos no controle biológico de fungos filamentosos pela levedura é a competição. Esses micro-organismos, de fato, podem ser agentes de controle biológico eficazes devido à sua capacidade de colonizar uvas e competir por espaço e nutrientes com outros micro-organismos (MCLAUGHLIN et al., 1990).

Recentemente, Ponsone et al. (2011) descreveram duas linhagens de leveduras epifítas *Lanchancea thermotolerans* que foram capazes de controlar o crescimento e acúmulo de fungos ocratoxigênicos tanto "in vitro" e "in situ". Os dados apresentados até agora indicam que as leveduras que ocorrem naturalmente nas uvas são promissoras fungicidas ecológicas porque elas podem

sobreviver e colonizar as bagas de uvas nas vinhas e também manter o equilíbrio natural do ambiente.

Meca, Blaiotta e Ritiene (2010) avaliaram a capacidade de remoção da OTA por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em vinho tinto italiano. Os autores observaram que todas as linhagens analisadas foram capazes de reduzir significativamente o conteúdo de OTA durante o processo de fermentação do vinho, através do mecanismo de adsorção celular e não de degradação.

A adsorção da OTA ocorre possivelmente, por meio de parede celular da levedura formada por dois constituintes principais: os β -glucanos e as manoproteínas. As manoproteínas são compostos presentes na parte exterior da parede celular, capazes de se ligar a micotoxinas, como por exemplo o mananoglicosacarídeo modificado derivado da célula de *Saccharomyces*. A resistência mecânica da parede celular é principalmente devido a presença do β 1,3-glucano (MECA; BLAIOTTA; RITIENE, 2010).

O composto trans-resveratrol (fitoalexina natural presente em uvas), possui a capacidade de inibir a biossíntese de algumas micotoxinas (FANELLI et al., 2003), e controlar a contaminação de espécies micotoxigênicas produtoras de OTA (ALDRED et al., 2008). Além disso, devido às suas propriedades antioxidantes, o trans-resveratrol também pode ter efeitos positivos sobre a conservação do fruto durante o armazenamento (PONSONE et al., 2012).

Recentemente, Rossi et al. (2011) avaliaram a capacidade do trans-resveratrol presente em diferentes variedades de uvas na indução do crescimento de *A.carbonarius* e na biossíntese da OTA. Estes autores observaram que o aumento da quantidade de trans-resveratrol nas bagas de uva logo após a infecção fúngica, promove a inibição do crescimento de *A.carbonarius* e o controle na síntese da OTA.

As medidas preventivas não impedem completamente a contaminação por OTA, sendo necessário a adoção de programas de Boas Práticas Agrícolas

de colheita e pós-colheita que poderão exercer destacada importância na redução dos riscos de contaminação das uvas por fungos toxigênicos e, conseqüentemente dos vinhos obtidos a partir dessa matéria-prima.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L. et al. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 3, p. 504-506, Mar. 2003.
- ABRUNHOSA, L. et al. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, Easton, v. 32, n. 4, p. 240-242, Apr. 2001.
- ABRUNHOSA, L.; SANTOS, L.; VENÂNCIO, A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, New York, v. 20, n. 3, p. 231-242, Sept. 2006.
- ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 25, p. 7493-7496, July 2002.
- ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 29, n. 12, p. 1909-1914, July 2007.
- AGRIANUAL. Uva. In: _____. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2006. p. 493-504.
- ALDRED, D. et al. Environmental factors affect efficacy of some essential oils and resveratrol to control growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijkiae* on wheat grain. **Journal of Stored Product Research**, Bedford, v. 44, n. 4, p. 341-346, Aug. 2008.
- AMORIM, D. A. et al. Elaboração de vinho tinto fino. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 234, p. 65-67, set./out. 2006.
- AMORIM, D. A.; FAVERO, A. C.; REGINA, M. A. Produção extemporânea da videira, cv. Syrah, nas condições do Sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 327-331, ago. 2005.
- ANLI, E.; ALKIS, I. M. Ochratoxin A and brewing technology: a review. **Journal of Institute Brewing**, London, v. 116, n. 1, p. 23-32, Jan. 2010.
- ANLI, E.; BAYRAM, M. Ochratoxin A in wines. **Food Reviews International**, New York, v. 25, n. 1, p. 214-232, 2009.

ANUÁRIO brasileiro da uva e do vinho: uva, panorama. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2006. 25 p.

AROYEUN, S. O.; ADEGOKE, G. O. Reduction of ochratoxin A (OTA) in spiked cocoa powder and beverage using aqueous extracts and essential oils of *Aframomum danielli*. **African Journal Biotechnology**, Nigeria, v. 6, n. 5, p. 612-616, Mar. 2007.

ASTORECA, A. et al. Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and Ochratoxin A production by *Aspergillus niger* Aggregate strains on irradiated peanut seeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 131-135, Feb. 2009.

BACHA, N. et al. *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene “*aoksI*” is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, n. 1, p. 77-84, Jan. 2009.

BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2009.

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

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. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 255, n. 6, p. 203-208, June 2006a.

_____. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 46-52, Sept. 2006b.

_____. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* stains. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 1, p. 1038-1044, Apr. 2004.

BELLÍ, N. et al. Effect of chemical treatments on ochratoxigenic fungi and common mycobiota of grapes (*Vitis vinifera*). **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 1, p. 157-163, Jan. 2007.

_____. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 6, p. 541-546, Apr. 2004a.

_____. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 6, p. 591-594, Apr. 2004b.

_____. 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. 2005.

_____. Review: ochratoxin A (OTA) in wines, musts and grape juices: occurrence, regulations and methods of analysis. **Food Science and Technology International**, London, v. 8, n. 6, p. 325-335, Dec. 2002.

BENJAOUI, H. et al. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 255, n. 6, p. 203-208, June 2006.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497-516, July 2003.

BOUDRA, H.; LE-BARS, P.; LE-BARS, J. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 1156-1158, Mar. 1995.

BOURAS, N.; KIM, Y. M.; STRELKOV, S. E. Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from wheat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131, n. 1, p. 251-255, May 2009.

BRASIL. Decreto nº 990.066, de 8 de março de 1990. Regulamenta a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados do vinho e da uva. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 9 mar. 1990. Seção 1, p. 4755.

BRASIL. **Resolução RDC n° 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

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

BROWN, D. W. et al. The *Fusarium verticillioides* *FUM* gene cluster encodes a Zn(II)2Cys6 protein that affects *FUM* gene expression and fumonisin production. **Eukaryot Cell**, Lawrence, v. 6, n. 7, p. 1210-1218, July 2007.

BULLERMANI, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1/2, p. 140-146, Oct. 2007.

BURDASPAL, P. A.; LEGARDA, T. M. Ochratoxin A in wines and grape musts and juices produced in Spain and other European countries. **Alimentaria**, Bogotá, v. 299, n. 8, p. 107-113, Nov. 1999.

CABRERA-PALACIOS, H. et al. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A.carbonarius* and *A.niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 24-28, Feb. 2005.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, p. 144-149, out. 2011. Volume especial.

CASTELLARI, M. et al. Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 8, p. 3917-3921, Aug. 2001.

CECCHINI, F. et al. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 2, p. 411-417, Feb. 2006.

CECI, E. et al. Ochratoxin A detection by HPLC in target tissues of swine and cytological and histological analysis. **Food Chemistry**, Barking, v. 105, n. 1, p. 364-368, Mar. 2007.

CHIOTTA, M. L. et al. *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 2, p. 137-141, Aug. 2009.

CLOUVEL, P. et al. Wine contamination by ochratoxin A in relation to vine environment. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 74-80, Mar. 2008.

COZZI, G. et al. Effect of *Lobesia botrana* damages on Black *Aspergillus* rot and ochratoxin A content in grapes. **International of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 88-92, Sept. 2006.

_____. _____. **International of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 72, n. 4, p. 894-897, Apr. 2009.

_____. Epidemiology of ochratoxin A producing fungi in Apulian vineyards. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 12., 2007, Istanbul. **Proceedings...** Istanbul: IUPAC, 2007. p. 21-25.

CRESPO-SEMPERE, A. et al. Genes differentially expressed by *Aspergillus carbonarius* strains under ochratoxin A producing conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 142, n. 1/2, p. 170-179, Aug. 2010.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Microchemical Journal**, London, v. 27, n. 2, p. 187-198, Feb. 2010.

DUMEAU, F.; TRIONE, D. Influence de differents traitements sur la concentration en ochratoxine A des vins rouges. **Les Extraits de la Revue des Enologues**, Bordeaux, v. 95, n. 2, p. 37-38, Sept. 2002.

EDWARDS, S. G.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, A. D. W. PCR-detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research**, New York, v. 106, n. 9, p. 1005-1025, Nov. 2002.

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. 1, p. 861-866, 2004.

ESTEBAN, A. et al. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 1, p. 634-640, Feb. 2006.

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

FANELLI, C. et al. Use of resveratrol and BHA to control fungal growth and mycotoxin production in wheat and maize seeds. **Aspects of Applied Biology**, London, v. 68, n. 1, p. 63-71, Aug. 2003.

FARBER, P.; GEISEN, R. Analysis of differentially-expressed ochratoxin A biosynthesis gene of *Penicillium nordicum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 661-669, 2004.

FERNANDES, A. et al. Change in ochratoxin A concentration during winemaking. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 58, n. 1, p. 92-96, Mar. 2007.

_____. Fate of ochratoxin A during a vinification trial. **Applied Biology**, London, v. 68, n. 4, p. 73-80, Oct./Dec. 2003.

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

FOOD SAFETY AND QUALITY. **Joint FAO/WHO expert committee on food additives**: safety evaluations on certain mycotoxins in food 2001.

Disponível em:

<<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>>. Acesso em: 22 set. 2010.

FUJII, I. et al. Structures and functional analyses of fungal polyketide synthase genes. **Actinomycetologica**, Tokyo, v. 12, n. 4, p. 1-14, Feb. 1998.

FUMI, M. D. et al. Ochratoxin A reduction by lactic acid bacteria. In: HOCKING, A. D. et al. (Ed.). **Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products**. North Ryde: [s.n.], 2007. p. 84-88.

GALLO, A. et al. Characterisation of a pks gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **International Journal of Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 8-15, Jan. 2009.

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.

GEISEN, R. et al. Development of a real time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production by targeting the ochratoxin A polyketide synthase gene. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, n. 4, p. 501-507, Aug. 2004.

GÓES, F. J. **Desenvolvimento e otimização do processo fermentativo para a produção e vinho branco a partir da uva Itália**. 2005. 158 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

HARRIS, J. P.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 58, n. 5, p. 709-716, Nov. 2001.

HOCKING, A. D. et al. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1, p. 84-88, Feb. 2007.

HUFF, W. E.; HAMILTON, P. B. Micotoxins: their biosynthesis in fungi: ochratoxins: metabolites of combined pathways. **Journal of Food Protection**, Easton, v. 42, p. 815-820, 1979.

HUWING, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbent. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 179-188, June 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. **Regiões produtoras**. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php>>. Acesso em: 29 mar. 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon, 1993. 521 p. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans, 56).

JANOS, V.; RIGOA, K.; TERENB, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 1/2, p. 1-7, July 2000.

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

KABAK, B.; DOBSON, A. D. W. Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins. **Journal of Food Protection**, Turkey, v. 72, n. 9, p. 2006-2016, Sept. 2009.

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

KHOURY, A. et al. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 2244-2250, 2008.

KOZAKIEWICZ, Z. et al. Making wine safer: the case of ochratoxin A. In: _____. **Meeting the mycotoxin menace**. Wageningen: Academic, 2003. p. 133-142.

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

_____. 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.

_____. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 2, p. 75-80, Feb. 2012.

_____. Water activity and temperature effects on fungal growth and Ochratoxin A production by ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* isolated from Tunisian grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 2, p. 89-97, Apr. 2010.

LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. **A viticultura no semiárido brasileiro**. Petrolina: EMBRAPA Semiárido, 2000. 44 p.

LEONG, S.; 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**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 83-88, Apr. 2004.

LEONG, S. L. et al. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. S1, p. S10-S17, 2006a.

_____. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A.niger* isolates on a simulated grape juice medium. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 110, n. 2, p. 209-216, Apr. 2006b.

_____. Fate of ochratoxin A during vinification of Semillon and Shiraz grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 17, p. 6460-6464, Aug. 2006c.

_____. Fungi in wine: implications of vineyard infections. In: DJKSTERHUIS, J.; SAMSON, R. A. (Ed.). **Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food**. Boca Raton: CRC, 2007. p. 303-318.

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 a simulated grape juice medium. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 110, n. 3, p. 209-216, Aug. 2006.

LUCCHETTA, G. et al. Occurrence of black Aspergilli and Ochratoxin A on grapes in Italy. **Toxins**, New York, v. 2, n. 2, p. 840-855, Apr. 2010.

LUND, F.; FRISVAD, J. C. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 95, n. 5, p. 1117-1123, 2003.

MAGNOLI, C. E. et al. Mycoflora and ochratoxin-A producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 179-184, Apr. 2003.

_____. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based food and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 163, n. 5, p. 249-260, May 2007.

MAJERUS, P.; BRESCH, H.; OTTENEDER, H. Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. **Archives Lebensmittel**, Berlin, v. 51, n. 4/5, p. 95-97, Jan. 2000.

MCLAUGHLIN, R. J. et al. Effects of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, n. 5, p. 456-461, 1990.

MECA, G.; BLAIOTTA, G.; RITIENI, A. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. **Food Control**, London, v. 21, n. 1, p. 579-583, Jan. 2010.

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

MELLO, L. M. R. **Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial: panorama 2011: comunicado técnico**. Brasília: EMBRAPA, 2011. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio>>. Acesso em: 12 jul. 2011.

_____. **Produção e comercialização de uvas e vinhos: panorama 2005**. Brasília: EMBRAPA, 2006. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama2005-produção.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2010.

MERWE, K. J. van der; STEIN, P. S.; FOURIE, L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. **Nature**, London, v. 205, p. 1112-1113, 1965.

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

MONACI, L.; PALMISANO, F. Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 378, n. 1, p. 96-103, Jan. 2004.

MOSS, M. O. Mode of formation of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, p. 5-9, 1996. Supplement.

_____. Recent studies of mycotoxins. **Symposium Series. Society for Applied Microbiology**, London, v. 27, p. 62S-76S, 1998. Supplement.

O'CALLAGHAN, J.; STAPLETON, P. C.; DOBSON, A. D. W. Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, n. 4, p. 213-221, Apr. 2006.

OLIVER, C.; TORTA, L.; CATARA, V. A polyphasic approach to the identification of ochratoxin A-producing black *Aspergillus* isolates from vineyards in Sicily. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 127, n. 3, p. 147-154, Mar. 2008.

OTTENEDER, H.; MAJERUS, P. Occurrence of ochratoxin A (OA) in wines: influence of the type of wine and its geographic origin. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 2, p. 793-798, Jan. 2000.

OUESLATI, S. et al. Alternating temperatures and photoperiod effects on fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* isolated from Tunisian grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 139, n. 3, p. 210-213, Feb. 2010.

ÖZPINAR, H. et al. Degradation of ochratoxin A in rumen fluid in vitro. **Medicine and Biology**, New York, v. 9, n. 1, p. 66-69, 2002.

PALACIOS-CABRERA, H. A. et al. Optimisation of the inoculation of *Aspergillus ochraceus* in coffee for isothermal studies simulating storage and marine transport of raw coffee. In: ASIC COFFEE CONFERENCE, 19., 2001, Trieste. **Proceedings...** Trieste: ASIC, 2001. p. 14-18.

PALUMBO, J. D.; O'KEEFFE, T. L.; MAHONEY, N. E. Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 164, n. 5, p. 241-248, Sept. 2007.

PARK, D. L.; NJAPAU, H.; BOUTRIF, E. Minimising risks posed by mycotoxins utilising the HACCP concept. In: JOINT FAO/WHO/UNEP INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYCOTOXINS, 3., 1999, Tunis. **Proceedings...** Tunis: FAO, 1999. p. 3-6.

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

PEREIRA, G. E. **Notas técnicas**. Curitiba: CODEVASF, 2006. Disponível em: <<http://www.vinhovasf.com.br/site/arquivos/NotasTecnicas.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2012.

_____. _____. Disponível em: <<http://www.vinhovasf.com.br/site/internas/valetecnico.php>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Micology**, Wageningen, v. 59, n. 1, p. 53-66, Feb. 2007.

PETZINGER, E.; WEIDENBACH, A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. **Livestock Production Science**, Philadelphia, v. 76, n. 3, p. 245-250, Sept. 2002.

PIETRI, A. et al. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 7, p. 647-654, Nov. 2001.

PIOTROWSKA, M.; ZAKOWSKA, Z. The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. **Food Biotechnology**, New York, v. 17, p. 307-310, Sept. 2000.

PITT, J. I. et al. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 41-46, Apr. 2000.

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

PONSONE, M. L. et al. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 151, n. 2, p. 70-77, Aug. 2011.

_____. Control of ochratoxin A production in grapes. **Toxins**, London, v. 4, n. 1, p. 364-372, Apr. 2012.

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

PRADO, G. et al. Ocorrência de ocratoxina A em café torrado e moído comercializado em Minas Gerais: 2003/2005. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 10, p. 24-28, mar. 2008. Edição especial.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. **Vitivinicultura brasileira**: panorama setorial. Brasília: EMBRAPA, 2010. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/>>. Acesso em: 13 jul. 2011.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. **A viticultura brasileira**: realidade e perspectiva. Brasília: EMBRAPA, 2001. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/>>. Acesso em: 27 ago. 2011.

_____. Vitivinicultura 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**, Easton, v. 126, n. 1, p. 302-305, Mar. 2011.

_____. Ochratoxin A in Spanish exportation wine market. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 2, p. 501-504, Jan. 2012.

RAMOS, A. J. et al. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n. 1/2, p. 133-140, Oct. 1998.

RATOLA, N.; MARTINS, L.; ALVES, A. Ochratoxin A in wines-assessing global uncertainty associated with the results. **Analytica Chimica Acta**, Heidelberg, v. 513, n. 1, p. 319-324, June 2004.

RATOLA, N. et al. Evolution of ochratoxin A content from must to wine in Port Wine microvibification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 382, n. 2, p. 405-411, Mar. 2005.

RINGOT, D. et al. Toxicokinetics and toxicodynamics A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 159, n. 1, p. 18-46, Jan. 2006.

RITSCHER, P.; CAMARGO, U. A. **O programa de melhoramento de uva e o segmento e sucos**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2007.

Disponível em:

<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/melhoramento_suco.pdf>.

Acesso em: 10 jul. 2012.

ROMANI, S. et al. Screening on the occurrence of ochratoxin A in Green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 9, p. 3616-3619, Sept. 2000.

ROMERO, S. M. et al. Ochratoxin A production by a mixed inoculum of *Aspergillus carbonarius* at different conditions of water activity and temperature. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 2, p. 277-281, Apr. 2010.

ROSA, R. C. A. et al. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 21, n. 4, p. 358-364, Apr. 2004.

_____. 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.

ROSARI, R.; ARZOUYAN, C.; ESTIENNE, J. Données récentes sur la contamination des vins en France par l'ochratoxine A. **Annales des Falsifications, de L' Expertise Chimique et toxicologique**, Paris, v. 93, n. 953, p. 401-408, 2000.

ROSET, M. Survey on ochratoxin A in grape juice. **Fruit Processing**, Schönborn, v. 13, n. 2, p. 167-172, Nov. 2003.

ROSSI, P. de et al. Early detection of ochratoxigenic fungi in wine grapes and of ochratoxin A in wine. **Analytical Microbiology**, Easton, v. 61, n. 1, p. 11-15, Aug. 2011.

RUHLAND, M.; ENGELHARDT, G.; WALLNÖFER, P. R. Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in artificially contaminated vegetables and cereals. **Mycotoxin Research**, New York, v. 13, n. 1, p. 54-60, June 1996.

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

SANTOS, E. O.; FERRAZ, Z. M. L. O bom desempenho da fruticultura baiana: agrossíntese. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 7, n. 2, p. 3-10, abr. 2006.

SATO, G. S. Panorama da viticultura no Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 30, n. 11, p. 7-15, nov. 2000.

SCHATZMAYR, G. et al. Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. **Mycotoxin Research**, New York, v. 19, n. 2, p. 124-128, June 2003.

SCHMIDT-HEYDT, M. et al. Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and *otapksPV* gene expression by *Penicillium verrucosum*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 277-283, Nov. 2007.

SERRA, R.; BRAGA, A.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin producing and other fungi isolated from grapes for wine production with particular emphasis on ochratoxin A. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 4, p. 515-521, May 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.

SERRA, R.; MENDONÇA, C.; VENÂNCIO, A. Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 42-47, Jan. 2006.

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

SILVA, A. et al. Inquiry on the consumption of meals susceptible to contamination by mycotoxins in alimentary ingesta of scholars of the city of Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 439-447, mar./abr. 2007.

_____. Metodi di riduzione di residui di ocratossina A nei vini. **Industrie Delle Bevande**, Pinerolo, v. 32, n. 187, p. 467-472, 2003.

SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. S. **A vitivinicultura no semiárido brasileiro**. Petrolina: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2009. 756 p.

SOUFRIZZO, M. et al. Removal of ochratoxin A from contaminated red wines by repassage over grape pomaces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 1, p. 317-323, Jan. 2010.

SOUFLEROS, E. H.; TRICARD, C.; BOULOUMPASI, E. C. Occurrence of ochratoxin A in Greek wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 83, n. 3, p. 173-179, Jan. 2003.

SOUSA, J. S. I. **Uvas para o Brasil**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1996. 424 p.

STEFANAKI, I. et al. Ochratoxin A concentration in Greek domestic wines and dried vine fruits. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 20, n. 1, p. 74-83, Jan. 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**, Des Moines, v. 70, n. 12, p. 2884-2888, Dec. 2007.

TJAMOS, S. E.; ANTONIOU, P. P.; TJAMOS, E. C. *Aspergillus* spp, distribution, population, composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 61-66, Sept. 2006.

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

TONIETTO, J.; CAMARGO, U. A. Vinhos tropicais no Brasil e no mundo. **Bon Vivant**, Flores da Cunha, v. 8, n. 94, p. 15-17, dez. 2006.

UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA. **Comercialização de vinhos e derivados elaborados no RS - 2006 à 2011 - mercado interno e externo, em litros**. Disponível em: <<http://www.uvibra.com.br/>>. Acesso em: 29 mar. 2012.

VALERO, A. et al. Effect of intra and interspecific interaction on OTA production by A. section *Nigri* in grapes during dehydration. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 2, p. 254-259, Aug. 2007.

VARGA, J. et al. Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus* species. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, n. 8, p. 593-600, Oct. 2003.

_____. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4461-4464, Dec. 1996.

VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 72-81, Feb. 2006.

VARGA, J.; SAMSON, R. A. *Aspergillus in the genomic era*. Wageningen: Academic, 2008. 336 p.

VIOTTI, E. **O vinho tinto**. São Paulo: Moderna, 2010. 59 p. (Coleção Folha o Mundo do Vinho, 1).

WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; NOLL, I. B. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e ocratoxina A em vinhos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2567-2575, dez. 2009.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column clean-up: methodology and Swiss data. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 666, n. 1, p. 85-99, Apr. 1995.

_____. 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 2 Fungos filamentosos presentes nas bagas, sementes e mostos de três regiões produtoras de uva

RESUMO

O presente trabalho fornece informações sobre a diversidade de fungos filamentosos presentes na superfície das bagas, sementes e mostos de uvas e a influência geográfica de cultivo nas regiões Sudeste (Sul de Minas Gerais e São Paulo) e Nordeste (Vale do Submédio São Francisco) do Brasil. Foram analisadas um total de 26 amostras de uvas das cultivares *Vitis vinífera* e *Vitis labrusca*. Para o isolamento dos fungos das bagas e sementes foi utilizada a técnica do plaqueamento direto em meio Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). Para a análise do mosto foi realizado o espalhamento a partir de diluições seriadas. A identificação das espécies foi realizada com base nas características macro e micro morfológicas. A Análise de Componentes Principais (PCA) avaliou o comportamento das variedades e dos fungos isolados. Foi utilizado o Índice de diversidade de Shannon-Weiner para avaliar e comparar a diversidade de fungos. A partir das amostras analisadas um total de 2949 fungos e 16 gêneros foram isolados e identificados. Os principais gêneros detectados foram: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Colletrochium*, *Dreschelera*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Oidiodendron*, *Penicillium*, *Rhizophus*, *Trichoderma*, *Ulocladium* e *Xilaria*. Destes, *Aspergillus* e *Penicillium* foram mais frequentes. A região geográfica e as condições climáticas influenciaram na diversidade fúngica presente nas amostras. *Aspergillus* foi mais frequente na região semiárida, enquanto que as espécies de *Penicillium* sobressairam na região subtropical. A diversidade das espécies de *Penicillium* foi maior que de *Aspergillus* em todas as regiões. As espécies de *Penicillium* mais frequentes foram: *P. brevicompactum*, *P. glabrum*, *P. pinophilum* e *P. crustosum*. Este é o primeiro trabalho realizado em vinhedos do Brasil que relata a diversidade fúngica presente em diferentes regiões, além de demonstrar a diversidade na região do Vale do Submédio São Francisco, que apresenta particularidades, sendo a única zona produtora de vinho em condição tropical semiárida do mundo.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. *Vitis vinífera*. *Vitis labrusca*. Diversidade.

ABSTRACT

The present work provides information on the diversity of filamentous fungi present in the surface of grape berries, seeds and musts, and the geographical influence on the cultivation in the Southeastern (South of Minas Gerais and São Paulo) and Northeastern (Vale do Submédio São Francisco) regions of Brazil. A total of 26 grape samples of the cultivars *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* were analyzed. For the isolation of the fungi from the berries and seeds, a direct plating technique was used in the mycological media Dicholoran Rose Bengal Chloranphenicol (DRBC). For the analysis of the must, a spreading from serially diluted samples was performed. The identification of the species was based on macro and micro morphometric characteristics. The Principal Component Analysis (PCA) evaluated the behavior of the varieties and of the isolated fungi. The Shannon-Wiener diversity index was used to evaluate and compare the diversity of the fungi. From the analyzed samples, a total of 2949 fungi and 16 genera were isolated and identified. The main genera detected were: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Colletotrichum*, *Dreschlera*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Oidiodendron*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Ulocladium* and *Xylaria*. Of these, *Aspergillus* and *Penicillium* were the most frequent. The geographical region and weather conditions seem to have influenced fungal diversity present in the samples. *Aspergillus* was the most frequent in the semi-arid region, while the *Penicillium* species, in the subtropical region. The diversity of *Penicillium* species was larger than of the *Aspergillus* in all regions. The most frequent *Penicillium* species were: *P. brevicompactum*, *P. glabrum*, *P. pinophilum* and *P. crustosum*. This is the first work performed in Brazilian vineyards which reports the fungal diversity present in different regions, in addition to demonstrating the diversity in the Vale do Submédio São Francisco region, which presents particularities, being the sole wine producing zone in semi-arid tropical conditions in the world.

Key-words: Filamentous fungi. *Vitis vinifera*. *Vitis labrusca*. Diversity.

1 INTRODUÇÃO

A presença de fungos filamentosos em vinhedos tem sido relacionada à deterioração das uvas que pode ocorrer em diferentes estágios de maturação (MAGNOLI et al., 2003). *Botrytis cinerea* é considerado o principal agente causador da podridão em uvas, promovendo um efeito prejudicial sobre as propriedades organolépticas, afetando a qualidade do produto final. Este patógeno é capaz de danificar as bagas permitindo a colonização por outros fungos acelerando a podridão e produzindo metabólitos tóxicos, como a ocratoxina A. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os principais responsáveis pela produção de ocratoxina A (OTA) em uvas (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; PITT; HOCKING, 1997; ZIMMERLI; DICK, 1996). As principais espécies de fungos responsáveis pela contaminação de OTA em uvas pertencem ao *Aspergillus* Seção *Nigri*, entre os quais *A. carbonarius* é o maior produtor (BATTILANI et al., 2003; BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006; LASRAM et al., 2012; LEONG et al., 2006).

A contaminação de uvas e seus derivados com micotoxinas, em particular a ocratoxina A (OTA), tem impulsionado estudos sobre a microbiota fúngica de uvas em diversos países como Itália (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003), Argentina e Brasil (CHIOTTA, 2009; ROSA et al., 2002), Tunísia (LASRAM, 2010; LASRAM et al., 2012) Portugal (SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005; SERRA et al., 2003), Espanha (BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2006), Austrália (LEONG; HOCKING; PITT, 2004), Grécia (MAGAN; MEDINA; ALDRED, 2011).

Os gêneros *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Oidium*, *Uncinula*, *Rhizopus* e *Eurotium* são considerados como os principais contaminantes naturais em uvas e seus derivados (FLEET, 2001; MAGNOLI et al., 2003; SAGE et al., 2002). Espécies de fungos capazes de causar podridão

nas uvas (por exemplo, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus*) podem ser comumente encontrados na superfície das bagas (SERRA et al., 2006).

A presença desses fungos filamentosos em diferentes regiões vinícolas pode ser influenciada por diferentes fatores, tais como o período de colheita, tipos de variedades de uva, área geográfica, condições climáticas e as práticas vitícolas aplicadas (SAGE; GARON; SEIGLE-MURANDI, 2004; SERRA et al., 2006).

Este estudo teve como objetivo avaliar a diversidade de fungos filamentosos presentes na microbiota de bagas de uvas, sementes e mostos, além de comparar as diferenças devido à origem geográfica das variedades analisadas, de vinhedos localizados nos municípios de Caldas e Três Corações, no Sul de Minas Gerais (Região R1), Espírito Santo do Pinhal, Norte de São Paulo (Região R2) e Santa Maria da Boa Vista, Petrolina, Lagoa Grande (Pernambuco) e Casa Nova (Bahia) (Região R3), localizados no Vale do Submédio São Francisco.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de Estudo

Para avaliar a distribuição dos fungos filamentosos, foram coletadas nas safras de 2010 e 2011, 26 amostras de uvas de variedades *Vitis labrusca* (Bôrdó, BRS Cora, Isabel Precoce e Violeta) e *Vitis vinifera* (Cabernet Sauvignon, Grenache, Petit Verdot e Syrah) (Tabela 2), de vinhedos localizados nos municípios de Caldas e Três Corações, no Sul de Minas Gerais (Região R1), Espírito Santo do Pinhal, Norte de São Paulo (Região R2), Santa Maria da Boa Vista, Petrolina, Lagoa Grande (Estado do Pernambuco) e Casa Nova (Bahia) (Região R3), localizados no Vale do Submédio São Francisco. Alguns dados das regiões, como coordenadas geográficas, tipo de clima, temperatura média e precipitação anual estão descritas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 Localização e coordenadas geográficas dos municípios onde foram coletadas as variedades de uvas analisadas

| | Municípios | Localização | | | Clima |
|---|--------------------------|-------------|-----------|----------|--------------------|
| | | Latitude | Longitude | Altitude | |
| Minas Gerais (R1) | Caldas | 21°00' | 46°00' | 1150 m | SubTropical |
| | Três Corações | 21°41' | 45°15' | 900 m | SubTropical |
| São Paulo (R2) | Espírito Santo do Pinhal | 22°11' | 46°45' | 1210 m | Tropical |
| Vale Submédio São Francisco (R3) | Casa Nova | 09° 15' | 40° 51' | 360 m | Tropical Semiárido |
| | Santa Maria da Boa Vista | 09° 04' | 40° 08' | 361 m | Tropical Semiárido |
| | Petrolina | 09° 02' | 40° 11' | 350 m | Tropical Semiárido |
| | Lagoa Grande | 09° 04' | 40° 08' | 345 m | Tropical Semiárido |

Fonte: Amorim, Favero e Regina (2005) e Protas, Camargo e Mello (2006)

2.2 Amostragem

2.2.1 Amostras Estudadas

Para a análise da diversidade de fungos filamentosos foram coletadas amostras de uvas tintas viníferas (*Vitis vinifera* L.) utilizadas para a elaboração de vinhos finos (n=15) e de uvas tintas para a elaboração de suco (*Vitis labrusca*) (n=11), no estágio final de maturação (colheita), totalizando 26 amostras (Tabela 2).

Tabela 2 Dados referentes às amostras analisadas (variedades, mês de colheita, temperatura (média °C), precipitação (mm) e umidade relativa (U.R %), durante o período de amostragem)

| Variedade | Região | Mês de coleta | Temp. (°C) | (mm)* | (U.R)* |
|------------------------------|--------|---------------|------------|-------|--------|
| <i>Vitis vinifera</i> | | | | | |
| Syrah (1) | R2 | Jul/2010 | 18,1 | 25,8 | 70 |
| Syrah (2) | R2 | Jul/2010 | 19,9 | 49,9 | 60 |
| Syrah (3) | R1 | Jul/2010 | 14,8 | 13,6 | 75 |
| Cabernet Sauvignon (4) | R1 | Jul/2010 | 14,8 | 13,6 | 75 |
| Syrah (5) | R1 | Jul/2010 | 14,8 | 13,6 | 75 |
| Grenache (7) | R3 | Agosto/2010 | 23,5 | 0,0 | 72 |
| Petit Verdot (8) | R3 | Set/2010 | 25,7 | 2,7 | 51 |
| Syrah (10) | R3 | Jul/2010 | 23,3 | 41,1 | 80 |
| Syrah (11) | R3 | Dez/2010 | 26,3 | 174,9 | 76 |
| Petit Verdot (17) | R3 | Mar/2010 | 27,6 | 91,0 | 66 |
| Syrah (20) | R3 | Agosto/2011 | 19,7 | 71,0 | 52 |
| Syrah (21) | R3 | Mai/2011 | 26,4 | 68,2 | 71 |
| Syrah (24) | R3 | Mai/2011 | 24,8 | 69,2 | 78 |
| Cabernet Sauvignon (25) | R3 | Mai/2011 | 26,4 | 68,2 | 71 |
| Syrah (26) | R3 | Mai/2011 | 26,4 | 68,2 | 71 |
| <i>Vitis Labrusca</i> | | | | | |
| Violeta (6) | R1 | Dez/2010 | 22,1 | 401,1 | 80 |
| Isabel Precoce (9) | R3 | Agosto/2010 | 24,4 | 0,0 | 56 |
| Violeta (12) | R3 | Dez/2010 | 26,3 | 164,5 | 68 |
| Isabel Precoce (13) | R3 | Dez/2010 | 26,3 | 164,5 | 68 |
| Isabel Precoce (14) | R3 | Out/2010 | 27,8 | 18,2 | 54 |
| BRS Cora 572 (15) | R3 | Mar/2010 | 27,6 | 91,0 | 66 |
| Isabel Precoce (16) | R3 | Mar/2010 | 27,6 | 91,0 | 66 |
| Bôrdo (18) | R1 | Jan/2011 | 21,6 | 312,1 | 83 |
| Bôrdo (19) | R1 | Jan/2011 | 21,6 | 312,1 | 83 |
| BRS Cora 572 (22) | R3 | Mai/2011 | 26,4 | 68,2 | 71 |
| Isabel Precoce (23) | R3 | Mai/2011 | 26,4 | 68,2 | 71 |

*Dados médios mensais obtidos nas Estações Agrometeorológicas de Bebedouro (Petrolina/PE)/Embrapa Semiárido, Mandacaru (Juazeiro/BA), Núcleo Tecnológico Epamig Uva e Vinho/EPAMIG (Caldas – MG), Monitoramento Climatológico: Espírito Santo do Pinhal e CEPAGRI (Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura/Campinas

Foram colhidos aproximadamente 2 kg de cachos de uvas aparentemente sãs, de cada variedade, de forma aleatória no vinhedo de cada região (R1, R2 e

R3). As uvas foram transportadas para o laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA/UFLA).

2.2.2 Mostos

O mosto foi obtido pelo esmagamento das bagas (escolhidas aleatoriamente dos cachos das 26 amostras coletadas). Um volume aproximado de 200 mL foi obtido após o filtrado e analisado imediatamente quanto a presença de fungos filamentosos.

2.3 Isolamento dos Fungos

Para o isolamento dos fungos filamentosos contaminantes das bagas e sementes, foi utilizada a Técnica de Plaqueamento Direto. De cada amostra selecionou-se 100 bagas ao acaso e as demais foram utilizadas para a extração das sementes. As bagas e as sementes foram submetidas ao procedimento de desinfecção superficial com álcool 70% e hipoclorito a 1%. Um total de 100 bagas e sementes foram plaqueadas em meio Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (glicose 10,0 g, peptona bacteriológica 5,0 g, KH_2PO_4 1,0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, Agar 15,0 g, Rosa de Begala 25 mg, Dicloran 2 mg, cloranfenicol 0,100 mg, água destilada 1 L), e incubadas em BOD à 25 °C por 5-7 dias, conforme Samson, Hoekstra e Frisvad (2000).

Para a análise dos mostos, 25 mL de cada amostra foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada 0,1% estéril, seguido da agitação em stomacher por 2 min. Em seguida, 0,1 mL de cada diluição (1:10, 1:100 e 1:1000), por espalhamento, foi transferido para placas de Petri estéreis

contendo meio DRBC. As placas foram incubadas à 25 °C por 5-7 dias, conforme Samson, Hoekstra e Frisvad (2000).

2.4 Identificação dos fungos filamentosos

2.4.1 Identificação de espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*

As culturas foram purificadas em Malt Agar 2% (MA) (extrato de malte 20,0 g, Agar 20,0 g, água destilada 1 L) a 25 °C, logo após os isolados foram inoculados em placa de Petri contendo os meios de cultura padronizados conforme os manuais de identificação, Czapeck Yeast Agar (CYA) (K₂PO₄ 1,0 g, Czapeck concentrado 10 mL, extrato de levedura 5,0 g, sacarose 30,0 g, Agar 15,0 g, solução metálica de Czapeck 1 mL, água destilada 1 L), incubados às temperaturas de 25 °C e 37 °C por 7 dias e Malt Extract Agar (MEA) (extrato de malte 20,0 g, peptona bacteriológica 1,0 g, glicose 20,0 g, Agar 20,0 g, água destilada 1 L), a 25 °C por 7 dias. Após o crescimento, foram observadas as características morfológicas (macroscópicas e microscópicas) descritas conforme Klich (2002).

Os isolados de *Aspergillus* foram identificados conforme Klich (2002) e as espécies de *Penicillium* de acordo com Pitt (2000), sendo essas identificações amparadas por Pitt e Hocking (1997) e Samson, Hoekstra e Frisvad (2000).

2.4.2 Identificação de espécies do gênero *Fusarium* sp

A identificação dos isolados foi realizada de acordo com o protocolo de Nelson, Toussoun e Marasas (1983). Os isolados foram cultivados em placas de Petri estéreis contendo meio SNA (KH₂PO₄ 1g; KNO₃ 1g; MgSO₄. 7H₂O; KCl

0,5g; glicose 0,2g; sacarose 0,2g; Agar 20g e água destilada 1L). Para analisar as características microscópicas os isolados foram cultivados em meio MA e para a coloração em meio Batata Dextrose Agar (BDA). As placas foram incubadas em BOD, com fotoperíodo a 21 °C, por 10 dias.

2.4.3 Identificação das espécies dos gêneros *Rhizopus* sp, *Cladosporium* sp, *Curvularia* sp, *Acremonium* sp, *Dreschelera* sp, *Trichoderma* sp

Após a confirmação destes gêneros, estes foram cultivados em meio Extrato de Malte (MEA), a 25 °C, por 7 dias e a identificação das espécies realizada de acordo com Samson, Hoekstra e Frisvad (2000).

2.4.4 Identificação das espécies dos gêneros *Alternaria* sp

Os isolados pertencentes ao gênero *Alternaria* foram cultivados em meio Aveia Agar (aveia 30g; agar 15g; água destilada 1L), por 7 dias, a 25 °C e identificados conforme Ellis (1971).

2.4.5 Identificação das espécies dos gêneros *Coletrochium* sp, *Aureobasidium* sp, *Gliocladium* sp, *Xilaria* sp, *Oidiodendron* sp e *Ulocladium* sp

Os isolados foram cultivados em meio MA, por 7 dias, a 25 °C e identificados conforme Ellis (1971).

2.5 Cálculo do Índice de biodiversidade

Para avaliar e comparar a diversidade de fungos filamentosos presentes nas bagas, sementes e mostos de diferentes variedades de uvas cultivadas nas regiões R1, R2 e R3, foi utilizado o Índice de diversidade de Shannon-Weiner ('H): que considera a riqueza e o número de indivíduos de cada espécie (MAGURRAN, 1988).

$$H' = -\sum (p_i \cdot \ln p_i)$$

em que p_i é a proporção de indivíduos de cada espécie i em relação ao número total de indivíduos.

2.6 Análise de componentes principais

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada para avaliar o comportamento das variedades de uvas *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca* e a presença de fungos nos substratos baga, semente e mosto. A matriz de dados foi construída usando as variáveis em estudo e os dados passaram por pré-processamento usando autoescalamento. Os cálculos foram executados usando o programa Matlab versão 7.5.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diversidade de fungos filamentosos em bagas, sementes e mostos de uvas

Das três regiões analisadas, um total de 2949 fungos foram isolados e identificados neste estudo. Deste total 1180 foram isolados das bagas, 713 das sementes e 1056 do mosto. Estes isolados apresentam-se distribuídos em dezesseis (16) gêneros (Tabela 3).

Tabela 3 Frequência de ocorrência das espécies encontradas nas amostras de baga (B), semente (S) e mosto (M) nas três regiões avaliadas

| Gênero/Espécie | Região 1 | | | Região 2 | | | Região 3 | | |
|-----------------------------|----------|----|----|----------|---|----|----------|----|-----|
| | B | S | M | B | S | M | B | S | M |
| <i>Acremonium</i> | | | | | | | | | |
| <i>A. alternatum</i> | - | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 |
| <i>Aureobasidium</i> | | | | | | | | | |
| <i>A. pullulans</i> | - | - | - | - | - | - | 9 | - | - |
| <i>Alternaria</i> | | | | | | | | | |
| <i>A. alternata</i> | - | - | - | 17 | - | - | 14 | 7 | - |
| <i>Aspergillus</i> | | | | | | | | | |
| <i>A. aculeatus</i> | 4 | 1 | - | - | - | - | 22 | 13 | 16 |
| <i>A. carbonarius</i> | - | - | - | - | - | - | 16 | 8 | - |
| <i>A. flavus</i> | 1 | 11 | 42 | - | 1 | 1 | 8 | 34 | 32 |
| <i>A. foetidus</i> | 1 | 3 | 12 | 7 | 5 | 2 | 68 | 32 | 15 |
| <i>A. fumigatus</i> | - | 18 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>A. japonicus</i> | 7 | 14 | 18 | 4 | 2 | 26 | 233 | 97 | 175 |
| <i>A. niger</i> | 2 | 3 | 14 | 21 | 1 | 24 | 162 | 49 | 52 |
| <i>A. niger</i> Agregado | - | - | 9 | 11 | - | 14 | 37 | 12 | 26 |
| <i>A. niveus</i> | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| <i>A. ochraceus</i> | 1 | 5 | 2 | - | 1 | - | - | 4 | 29 |
| <i>A. oryzae</i> | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 4 |
| <i>A. tubingensis</i> | 1 | 5 | 21 | 30 | - | 18 | 74 | 53 | 37 |

“Tabela 3, continuação”

| Gênero/Espécie | Região 1 | | | Região 2 | | | Região 3 | | |
|---------------------------|----------|----|----|----------|----|----|----------|----|----|
| | B | S | M | B | S | M | B | S | M |
| Cladosporium | | | | | | | | | |
| <i>C. cladosporioides</i> | 4 | 4 | 20 | 20 | 4 | 22 | 49 | 9 | 71 |
| Curvularia | | | | | | | | | |
| <i>C. lunata</i> | 2 | 1 | 6 | - | - | - | 34 | 1 | 11 |
| Coletrochium sp | 3 | - | - | - | - | - | 8 | - | - |
| Dreschlera | | | | | | | | | |
| <i>D. spicifera</i> | - | - | - | - | 8 | - | 10 | 2 | - |
| Fusarium | | | | | | | | | |
| <i>F. semitectum</i> | - | - | 9 | - | - | - | - | - | - |
| Gliocadium | | | | | | | | | |
| <i>G. catelunatum</i> | - | - | - | 6 | - | - | 5 | 1 | - |
| Oidiodendron sp | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 |
| Penicillium sp | | | | | | | | | |
| <i>P. aurantiogriseum</i> | - | 5 | - | - | - | - | 1 | - | 8 |
| <i>P. brevicompactum</i> | 1 | 11 | 19 | 25 | 10 | 3 | 11 | 13 | 4 |
| <i>P. citrinum</i> | - | - | 8 | - | 3 | 1 | 1 | 2 | 3 |
| <i>P. crustosum</i> | 55 | 50 | 66 | - | 8 | 1 | 2 | 8 | 9 |
| <i>P. decumbens</i> | 2 | 1 | 13 | 4 | 5 | 1 | - | - | - |
| <i>P. expansum</i> | - | - | 2 | - | - | - | - | - | 1 |
| <i>P. funiculosum</i> | 2 | 11 | 5 | 1 | - | - | - | 17 | 5 |
| <i>P. glabrum</i> | 18 | 39 | 13 | 20 | 19 | 5 | 42 | 20 | 49 |
| <i>P. griseofulvum</i> | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| <i>P. implicatum</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| <i>P. islandicum</i> | - | - | - | - | 2 | 2 | - | - | 3 |
| <i>P. lividum</i> | 2 | - | - | 5 | 1 | - | - | - | - |
| <i>P. minioluteum</i> | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - |
| <i>P. paxillii</i> | 2 | - | - | - | - | - | - | 2 | - |
| <i>P. pinophilum</i> | 11 | 8 | 22 | 2 | - | 1 | 10 | 4 | 8 |
| <i>P. purpurogenum</i> | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - |
| <i>P. rugulosum</i> | - | - | - | - | 18 | - | - | - | - |
| <i>P. sclerotiorum</i> | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - |
| <i>P. solitum</i> | 10 | 9 | 17 | 13 | 2 | 1 | - | - | 1 |
| <i>P. thomii</i> | - | 8 | 12 | 1 | - | - | 3 | 3 | - |
| <i>P. variabile</i> | 2 | 3 | 3 | 1 | - | 1 | - | 1 | 18 |
| <i>P. viridicatum</i> | 8 | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>P. chrysogenum</i> | - | - | - | - | - | - | 8 | 2 | 6 |
| <i>Penicillium</i> sp | 14 | 11 | - | - | - | - | - | - | 3 |

“Tabela 3, conclusão”

| Gênero/Espécie | Região 1 | | | Região 2 | | | Região 3 | | |
|----------------------|----------|-----|-----|----------|----|-----|----------|-----|-----|
| | B | S | M | B | S | M | B | S | M |
| Rhizopus | | | | | | | | | |
| <i>R. stolonifer</i> | 1 | - | - | - | - | - | 1 | - | 4 |
| Trichoderma | | | | | | | | | |
| <i>T. harzianum</i> | - | - | 1 | - | 1 | - | 6 | - | 2 |
| Ulocladium | | | | | | | | | |
| <i>U. chartarum</i> | - | - | - | - | 2 | - | - | - | - |
| <i>Xilaria</i> sp | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - |
| Total | 154 | 223 | 337 | 191 | 94 | 123 | 835 | 396 | 596 |

Nota: Região R1 (Sul de Minas Gerais), Região R2 (São Paulo) e Região R3 Vale do Submédio São Francisco.

Os resultados obtidos demonstram que os gêneros mais frequentes nas três regiões, foram *Aspergillus* e *Penicillium* com um total de 54,2% e 30,3% de isolados, respectivamente. Portanto, estes fungos identificados, representam uma parte importante e significativa da microbiota fúngica entre todos os fungos isolados nas regiões avaliadas. O gênero *Aspergillus* foi mais frequente nas regiões R2 e R3. Enquanto, que os *Penicillium* foram mais frequentes na região R1 (Fig. 1).

A diversidade de espécies avaliada pelo índice de Shannon-Wiener revelou que a região R1 apresentou a maior diversidade de espécies ($H' = 1,24$) e que a menor diversidade foi observada na região R3 ($H' = 1,13$) (Tabela 4). O gênero *Penicillium* foi o que apresentou maior riqueza com 24 espécies, enquanto que o gênero *Aspergillus* apresentou uma menor riqueza, com 12 espécies.

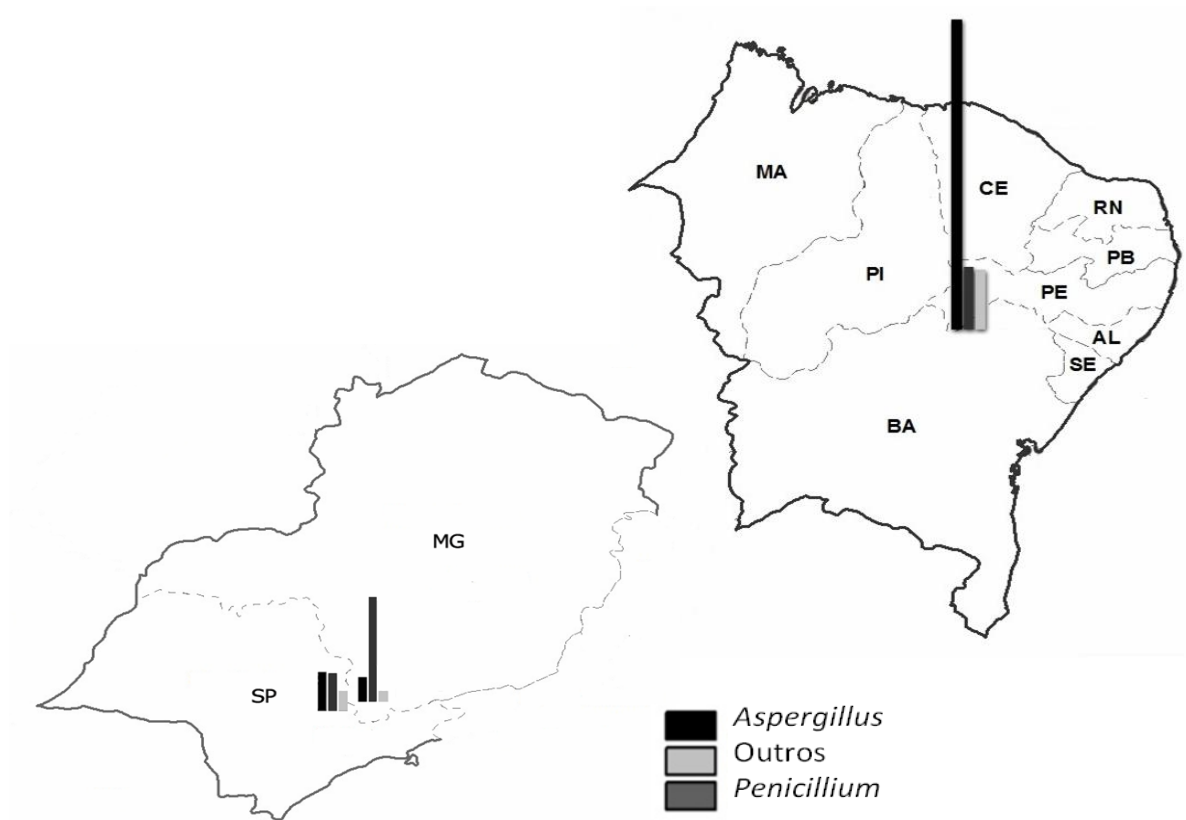


Figura 1 Distribuição de fungos filamentosos nas três regiões analisadas: região R1 (Minas Gerais), R2 (São Paulo) e R3 (Vale Submédio São Francisco)

Tabela 4 Índice de Biodiversidade (Índice Shannon Wiener) em função das amostras nas três regiões estudadas

| Região | Índice Shannon Wiener |
|--------|-----------------------|
| R1 | 1,242 |
| R2 | 1,211 |
| R3 | 1,131 |

Nota: Região R1 (Minas Gerais), R2 (São Paulo) e R3 (Vale Submédio São Francisco)

Dos 1597 isolados de *Aspergillus* identificados, o maior número de espécies pertence a Seção *Nigri*, sendo representados por (57,2%) de espécies bisseriadas e (42,8%) unisseriadas. Os *Aspergillus* Seção *Nigri* são considerados como a microbiota predominante de uvas, principalmente na época de colheita (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; ROSA et al., 2002; SAGE et al., 2002; SERRA et al., 2003). A maior frequência de ocorrência destas espécies ocorreu principalmente na região R3, que possui clima quente observado durante todo o ano, com temperatura máxima podendo atingir os 33 °C. Durante o período de colheita das uvas a temperatura média observada atingiu os 27,8 °C.

Apesar de estarem associadas a região de clima mais quente, as espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* também foram observadas neste estudo nas regiões R1 e R2, demonstrando que a frequência de distribuição destas espécies pode diminuir a medida que ocorre variações climáticas tais como o aumento da temperatura e diminuição do volume pluviométrico dentre as regiões estudadas.

Estudos comprovam que o aumento da frequência das espécies de *Aspergillus* da Seção *Nigri* em climas mais quentes pode estar associado à capacidade de sobrevivência prolongada destas espécies no solo, bem como a capacidade de adaptação a altas temperaturas e baixa atividade de água (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006; LEONG; HOCKING; PITT, 2004). Além disso, a coloração preta dos conídios destes fungos confere

proteção contra a luz solar e luz UV, o que representa uma vantagem competitiva para estas espécies (LEONG et al., 2006; PITT; HOCKING, 1997).

As espécies de *Penicillium* mais frequentes foram *P. brevicompactum*, *P. glabrum*, *P. pinophilum* e *P. crustosum* que, juntos, responderam por aproximadamente 66,0% dos isolados do gênero (Figura 2). As espécies de *Penicillium* mais abundantes, foram observadas na região R1. O clima da região R1 é classificado como subtropical, com temperatura média anual de 19 °C, inverno seco e verão chuvoso, umidade em torno de 70%. Estes fatores podem ter sido responsáveis pela maior frequência destas espécies nesta região.

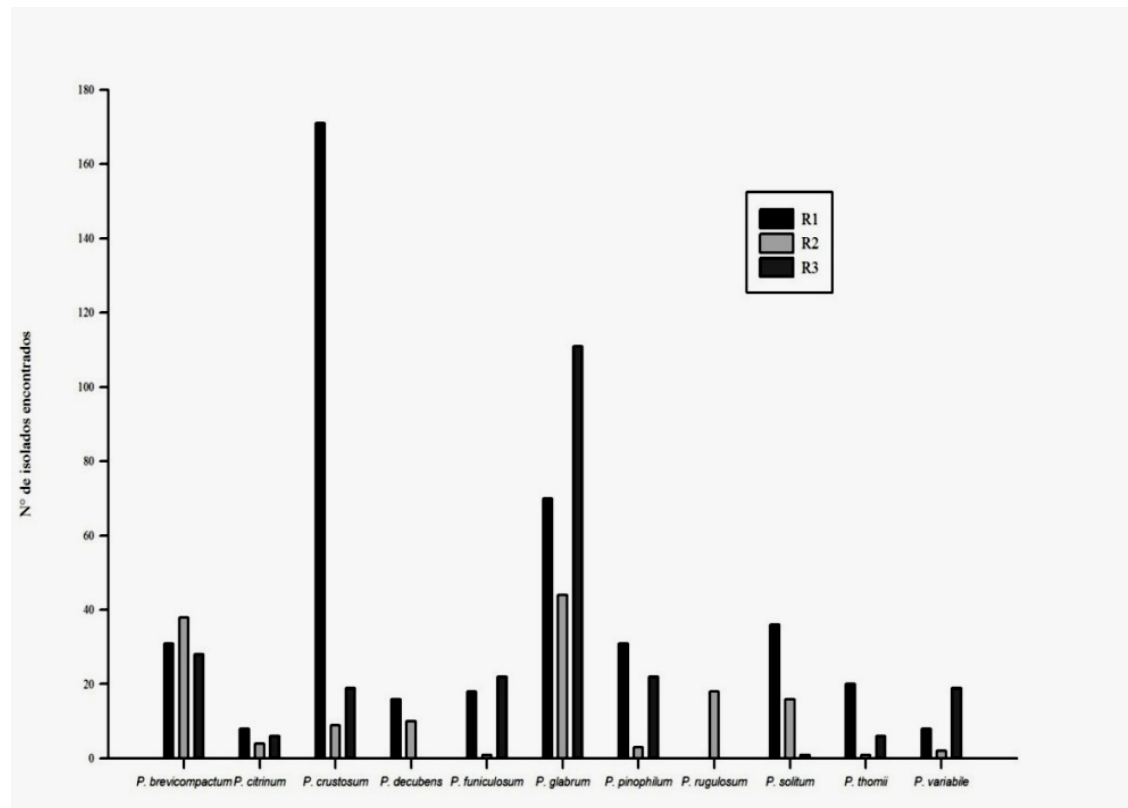


Figura 2 Incidência de espécies de *Penicillium* nas amostras de bagas, semente e mosto isolados nas três regiões estudadas (região Sul de Minas Gerais (R1), região Sudeste de São Paulo (R2) e região do Vale Submédio São Francisco (R3))

Espécies de *Penicillium* são mais comuns em climas temperados e frios, como no norte da Europa, enquanto que espécies de *Aspergillus* são comumente associados a regiões mais quentes e tropicais (PITT; HOCKING, 1997; SERRA et al., 2006; ZIMMERLI; DICK, 1996). Battilani et al. (2004) e Serra et al. (2003) atribuíram a alta porcentagem de contaminação em uvas cultivadas em Portugal e Itália ao clima quente e seco.

De acordo com Serra, Braga e Venâncio (2005), as espécies *P. brevicompactum*, *P. glabrum* / *spinulosum* e *P. thomii* estão associados com a superfície da baga de uvas desde as primeiras fases de seu desenvolvimento, sendo essas espécies encontradas em todas as fases de maturação. *P. glabrum* é uma espécie muito frequente e de crescimento rápido (SERRA et al., 2006). De acordo com Mikusová et al. (2011), essas espécies também foram isoladas em uvas originárias de vinhedos localizados na Eslováquia, em regiões onde os níveis de precipitação e umidade são mais elevados. O gênero *Penicillium* foi dominante em uvas originárias da região de Borgonha no entanto, os autores não detectaram nenhuma espécie do gênero *Aspergillus* nas amostras analisadas (DIGUTA et al., 2011).

Diversos estudos relatam a presença dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em uvas, que tem sua frequência aumentada a partir do início da fase pintor da baga até a maturação (BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2006; CHULZE; MAGNOLI; DALCERO, 2006; SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005). Estes gêneros são considerados saprófitos onipresentes, comumente encontrados na microbiota de uvas, pois seus conídios são facilmente distribuídos na atmosfera (HOCKING et al., 2007; SERRA et al., 2006).

Outros fungos foram detectados em menor frequência, dentre estes, *Cladosporium* sp, *Alternaria* sp, *Curvularia* sp, *Coletrochium* sp, *Trichoderma* sp, *Aureobasidium* sp, *Gliocadium* sp, *Acremonium* sp, *Rhizopus* sp, *Xilaria* sp, *Dreschlera* sp, *Oidiodendron* sp, *Fusarium* sp, *Ulocladium* sp, representando

(15,5%) do total de fungos isolados (Tabela 3). A maioria destes fungos possuem ampla distribuição podendo ocorrer normalmente no ar, em superfícies de plantas, detritos e no solo (SERRA et al., 2006). A distribuição destes gêneros ocorreu principalmente na região R3 (Figura 1), onde os fatores climáticos, tais como altas temperaturas podem ter contribuído para a maior frequência destes fungos nesta região.

Os gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Rhizopus* têm sido relatados como a microbiota predominante em uvas colhidas na Argentina, Brasil e França (ABRUNHOSA et al., 2001; BAU et al., 2005; BEJAOU et al., 2006; BELLÍ et al., 2006; DIGUTA et al., 2011; MAGNOLI et al., 2003; ROSA et al., 2002; SAGE et al., 2002; SAGE; GARON; SEIGLE-MURANDI, 2004; SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005; SERRA et al., 2006), e também durante a maturação das uvas originárias da Espanha (BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2004). Em uvas colhidas em Portugal os gêneros mais prevalentes são *Botrytis*, *Cladosporium* e *Penicillium* (ABRUNHOSA et al., 2001). Entretanto, *Rhizopus* sp, *Trichoderma* sp e *Fusarium* sp, são considerados pouco frequentes em uvas e, geralmente ocorrem em estádios e áreas específicas (FREDJ et al., 2007). Castro et al. (1999) relatam em seu estudo que as espécies *C. herbarum*, *A. alternata*, *A. niger*, *P. expansum* e *R. stolonifer* possuem grande ocorrência em uvas produzidas na região do Vale do Submédio São Francisco (PE) e na região de Jales (SP).

Os dados observados neste trabalho indicam que a área geográfica e as condições climáticas desempenham um papel importante no desenvolvimento da microbiota fúngica. Entretanto, é importante ressaltar que outros fatores poderão influenciar na diversidade das espécies isoladas em cada região, como o tipo de solo, práticas agrícolas, sistema de condução das videiras, utilização de fungicidas entre outros. Para a confirmação da influência destes fatores sobre a

microbiota fúngica de cada região, faz-se necessário a realização de estudos específicos para cada componente.

3.2 Análise de componentes principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada com o objetivo de se obter uma visão global da relação entre as variedades de uvas *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera* e a contaminação fúngica nos substratos baga, sementes e mosto. A figura 3 demonstra que dois componentes principais foram responsáveis pela distinção entre as amostras. O primeiro componente principal (PC1) e o segundo componente principal (PC2) descrevem 56,04% e 28,69%, respectivamente, da variância total dos dados.

A figura 3 indica a formação de quatro grupos distintos. O primeiro grupo foi constituído pelas amostras Syrah (1), Syrah (5), Grenache (7), Syrah (11), Syrah (2), Syrah (20) e Syrah (26), seguidas por Syrah (24), Petit Verdot (8), Syrah (10), Cabernet Sauvignon (25), Isabel Precoce (9) e Petit Verdot (17). Estas amostras são caracterizadas pela maior contaminação fúngica no substrato baga.

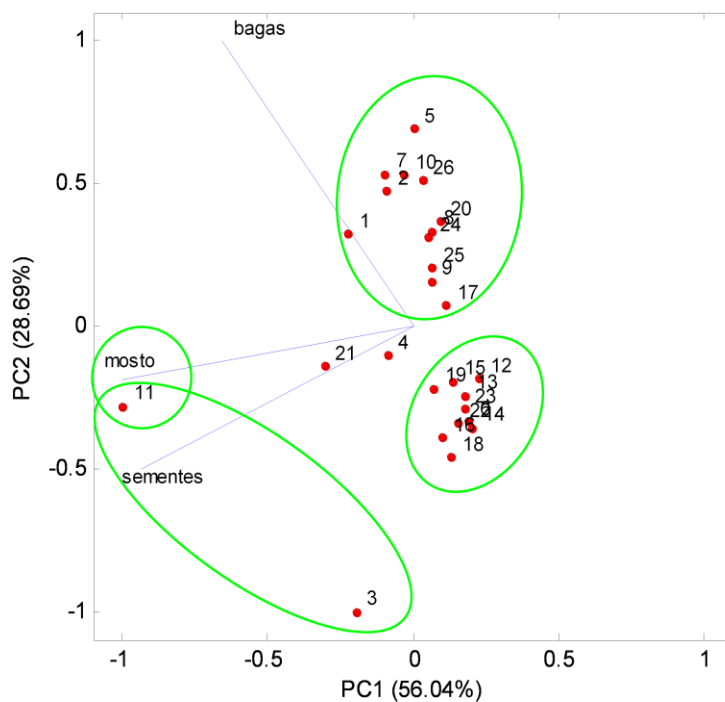


Figura 3 Gráfico de pesos da PCA para as variáveis bagas, sementes, mosto e contaminação fúngica nas variedades de uva estudadas

O segundo grupo composto por Bôrdó (19), BRS Cora (15), Violeta (12), Isabel Precoce (13), Isabel Precoce (23), Violeta (6), BRS Cora (22), Isabel Precoce (14), Isabel Precoce (16) e Bôrdó (18), apresentaram características semelhantes em relação a contaminação nos substratos semente e mosto.

Algumas variedades de uva se destacaram das demais, dentre estas, a variedade Syrah (11) que apresentou maior correlação com o mosto, sendo a cultivar com contaminação mais expressiva neste substrato. A ocorrência destes fungos no mosto deve-se provavelmente, ao contato entre cascas e sementes durante os processos de maceração em uvas utilizadas para a elaboração de

vinhos tintos e, à capacidade de se desenvolverem no mosto, antes do início do processo fermentativo.

A amostra Syrah (3) destacou-se das demais variedades particularmente devido à alta contaminação no substrato semente. A análise das bagas desta amostra, demonstrou alta contaminação por leveduras (dados não mostrados), que provavelmente pode ter limitado a colonização por fungos filamentosos. Entretanto, não interferindo na colonização destes fungos na parte interna do fruto. A presença de leveduras acidifica o meio, podendo impedir o desenvolvimento de fungos, principalmente espécies de *Aspergillus* (FREDJ et al., 2007).

As variedades Cabernet Sauvignon (4) e Syrah (21) tiveram um comportamento diferente das demais e, portanto, não foram agrupadas. Esse comportamento refere-se a baixa contaminação fúngica detectada nos três substratos analisados.

A maior parte das amostras da variedade Syrah apresentou elevada incidência fúngica (Syrah 1 (100%), Syrah 5 (100%), Syrah 11 (100%), seguidas por Syrah 10 (92%), Syrah 2 (95%), Syrah 26 (83%) e Syrah 21 (73%). Esta variedade parece ser mais propícia ao apodrecimento, sendo mais vulnerável ao ataque de fungos secundários, como os pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Segundo Westphalen e Maluf (2000), as variedades *Vitis vinifera*, são mais sensíveis a podridão e ao ataque fúngico e, conseqüentemente poderão apresentar maior probabilidade de contaminações por fungos produtores de OTA.

Os resultados obtidos por meio da análise de componentes principais (PCA) demonstraram as espécies de maior ocorrência na contaminação de sementes, bagas e mosto nas variedades de uvas *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*.

As figuras 4 (A, B e C) apresentam as três componentes principais (PCA) que foram responsáveis pelo agrupamento dos dados nas variedades avaliadas.

A figura 4A demonstra que algumas variedades de uva diferenciaram-se das demais, dentre estas Syrah (SP10), Grenache (G1) e Cabernet Sauvignon (CS2), devido a maior contaminação no substrato baga pelas espécies *Cladosporium cladosporioides* (16), *Curvularia lunata* (17) e *Dreschelera spicifera* (19), respectivamente. As demais variedades de uva ficaram agrupadas por apresentarem comportamento semelhante quanto aos fungos filamentosos contaminantes e, portanto, não podem ser caracterizadas por uma contaminação expressiva de uma única espécie no substrato baga.

Nas sementes, a figura 4B ilustra que as variedades BRS Cora (BRS1) e Syrah (SP10) destacam-se devido a presença de *C.cladosporioides* (16), seguida pelas variedades Cabernet Sauvignon (CS2), Isabel Precoce (IP4), Isabel Precoce (IP5), Syrah (7) e Petit Verdot (PV2) que apresentaram uma contaminação mais elevada pela espécie *A.alternata* (3), enquanto que Syrah (1) indica a correlação com as espécies *D.spicifera* (19) e *Ulocladium chartarum* (49). As demais variedades de uva permaneceram agrupadas devido ao comportamento semelhante quanto a presença de fungos filamentosos contaminantes portanto, não puderam ser caracterizadas por uma contaminação expressiva de uma única espécie no substrato semente.

Com relação ao substrato mosto (Fig. 4C), *Curvularia lunata* foi a espécie de maior ocorrência nas amostras da variedade Isabel Precoce (IP2) e Isabel Precoce (IP5). As variedades Syrah (SP10), Syrah (S9) e BRS Cora (BRS2) apresentaram semelhança devido a presença de *C. cladosporioides*. E a variedade Bôrdó (2) indicando sua correlação com a espécie *Fusarium semitectum* (20). As demais variedades de uva ficaram agrupadas por apresentarem comportamento semelhante quanto aos fungos filamentosos

contaminantes e, portanto, não podem ser caracterizadas por uma contaminação expressiva de uma única espécie no substrato mosto.

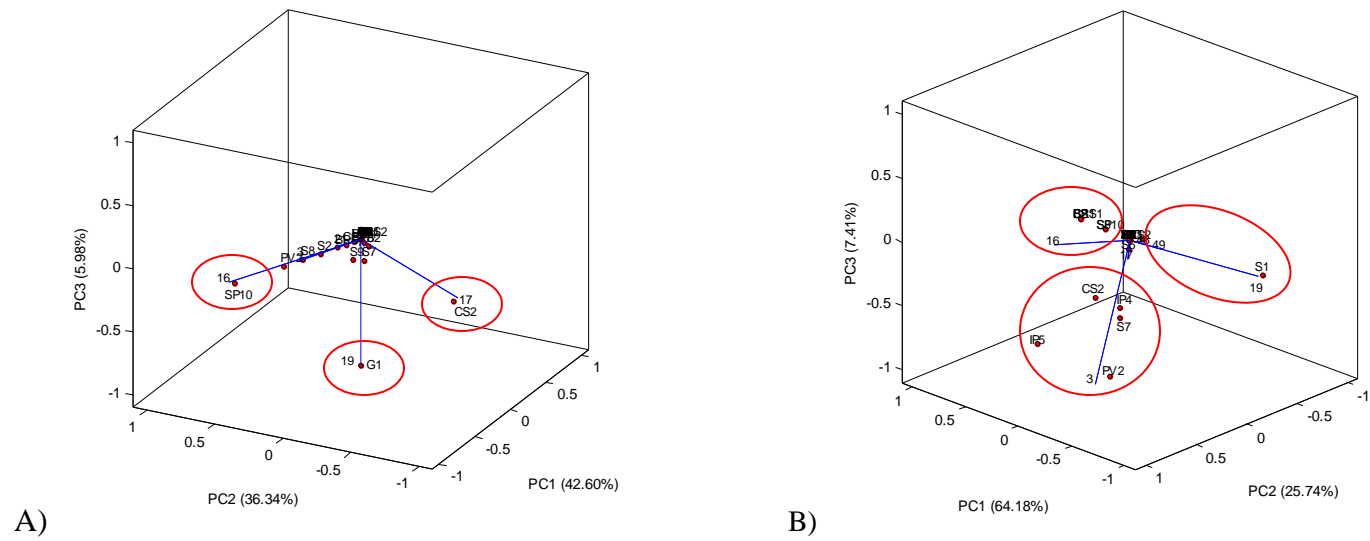
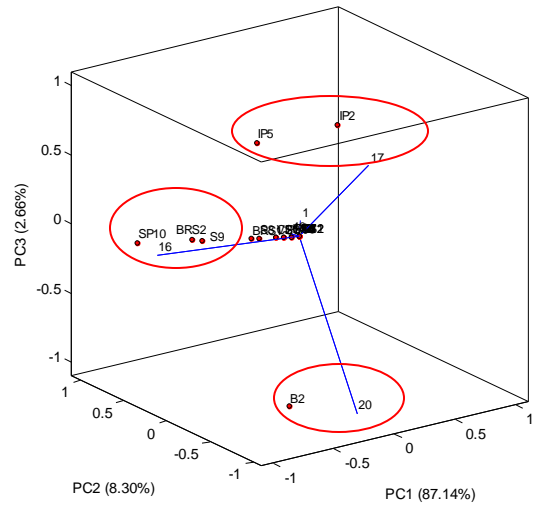


Figura 4 Gráfico de pesos da PCA para as variáveis bagas (A), sementes (B), mosto (C) e contaminação fúngica dos gêneros nas variedades *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera*

(...continua...)

1



C

Devido a maior ocorrência em todas as variedades e regiões avaliadas, foi feito o agrupamento entre as espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e as variedades de uva *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera* foram submetidos a Análise de Componentes Principais (PCA) (Figs. 5 e 7).

A figura 5A demonstra que as espécies *A. japonicus* (9) e *A. niger* (10) foram detectadas em maior ocorrência nas bagas das variedades Isabel Precoce (IP5) e Violeta (V1), tal fato pode ter destacada importância quando se considera a atuação competitiva dessas espécies em relação às espécies de *Aspergillus* produtoras de OTA. De acordo com Battilani et al. (2004) *A.niger* e *A.japonicus* são espécies predominantes em uvas. Nas variedades Bordô (B2), Isabel Precoce (IP4) e Violeta (V2), *Penicillium glabrum* foi a espécie mais detectada. *P.glabrum* é uma espécie muito frequente e de crescimento rápido (PITT, 2000; SERRA et al., 2006). As variedades Isabel Precoce (IP2) e BRS Cora (BRS1) destacam-se devido a maior contaminação por *A.niger* (10). As demais variedades de uva ficaram agrupadas por apresentarem comportamento semelhante quanto a presença de fungos filamentosos contaminantes e, portanto, não puderam ser caracterizadas por uma contaminação expressiva de uma única espécie no substrato baga.

No substrato semente (Fig. 5B), as variedades Isabel Precoce (IP1 e IP3) e BRS Cora (BRS1 e BRS2) destacam-se pela contaminação por *A.carbonarius* (5), *A.niger* (10), *A.tubingensis* (15); Bordô (B1) Isabel Precoce (IP2) por *A.flavus* (6) e *P.crustosum* (26) e Bôrdô (B2) por *A.fumigatus* (8). As demais variedades de uva ficaram agrupadas por apresentarem comportamento semelhante quanto a presença de fungos filamentosos contaminantes e, portanto, não puderam ser caracterizadas por uma contaminação expressiva de uma única espécie no substrato semente.

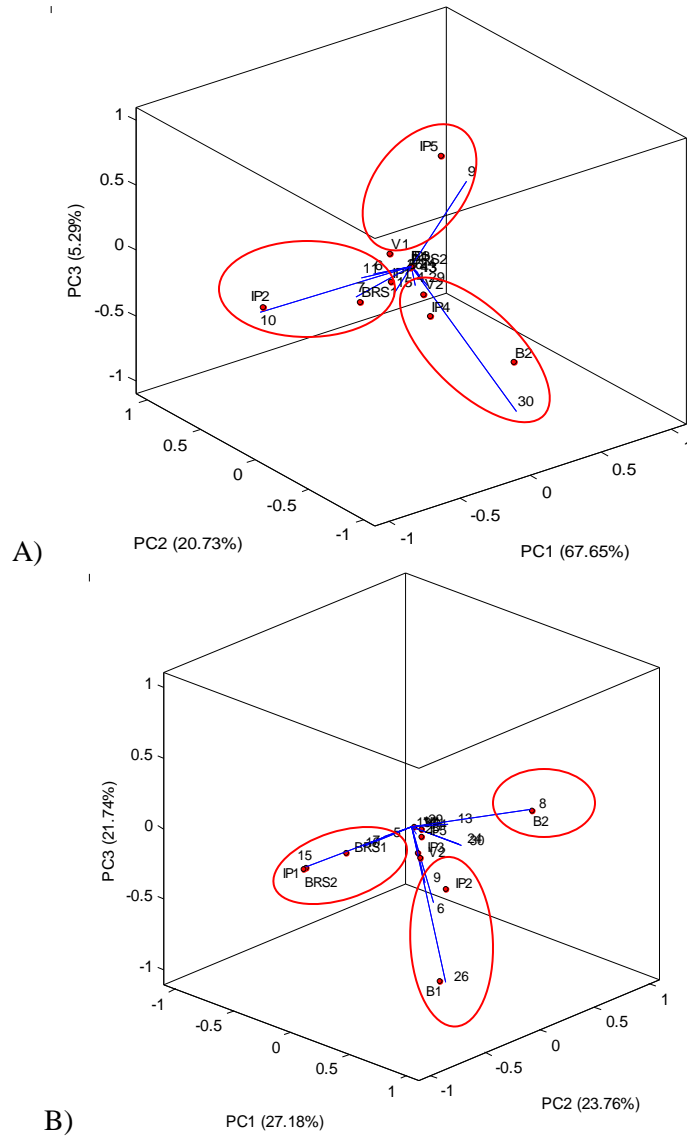
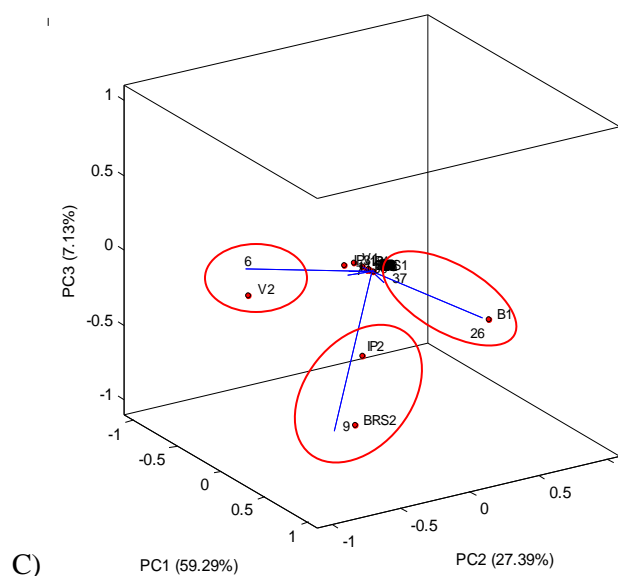


Figura 5 Gráfico de pesos da PCA para as variáveis bagas (A), sementes (B), mosto (C) e contaminação fúngica dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* nas variedades de uva *Vitis labrusca*

(...continua...)



Bau et al. (2005) descrevem *A.fumigatus* como pertencente a microbiota de uvas, no entanto, não há estudos que comprovem a presença desta espécie em sementes de uva. Bellí et al. (2004) descrevem *A.fumigatus* como sendo uma das principais responsáveis pela produção de micotoxinas em uvas.

No substrato mosto, a figura (5C) ilustra que algumas variedades de uva se diferenciaram das demais, dentre estas pode-se destacar a variedade Violeta (V2) devido a contaminação por *A.flavus* (6); Isabel Precoce (IP2) e BRS Cora (BRS2) por *A.japonicus* (9); e Bôrdo (B1) devido a maior contaminação pelas espécies *P.crustosum* (26) e *P.pinophilum* (37). As demais variedades de uva tiveram um comportamento semelhante, caracterizado pela contaminação por diferentes espécies.

A.flavus foi isolado nos vinhedos das três regiões estudadas, com taxa de isolamento de (7,7 %) do total de *Aspergillus* detectados. Esta espécie é considerada pouco frequente na microbiota de uvas (MARTINEZ-CULEBRAS; RAMON, 2007; MEDINA et al., 2005; MELKI BEN FREDJ et al., 2007).

Neste estudo, (65,3%) dos isolados de *A.flavus* foram produtores de Aflatoxina B1. É importante ressaltar que *A.flavus* foi isolado em maior frequência nas amostras obtidas nas região R3, demonstrando que foram capazes de desenvolver-se e produzir a micotoxina em clima mais quente e com baixa umidade. *A.flavus* é capaz de se desenvolver em condições secas (0,73 a_w), e é tolerante a uma ampla faixa de temperatura (19-35 °C), sendo 28 °C ideal para o crescimento e 28 a 30 °C com a_w para a produção da aflatoxina (SANCHIS; MAGAN, 2004). No entanto, são necessários mais estudos sobre as condições ambientais que favoreçam o crescimento e a produção de Aflatoxinas, bem como as estratégias de controle que possam reduzir a taxa de contaminação por estas espécies em uvas.

A presença de fungos detectados nas sementes, não parece estar relacionada somente a danos causados por agentes físicos, fisiológicos ou microbiológicos nas bagas, já que as bagas analisadas neste estudo aparentemente não apresentavam nenhum dano externo. Uma vez que estes fungos surgem na parte externa das bagas, possivelmente podem penetrar através do pedúnculo (fruto) e funículo (semente) (Fig. 6), promovendo a infecção nas sementes.

Como não se trata de fitopatógenos, estes fungos não seriam capazes de infectar os tecidos dos frutos, como faz por exemplo, *Botrytis* e *Colletotrichum*, agindo então, como agentes secundários de deterioração. Outra hipótese seria que estes fungos presentes no solo através dos vasos condutores de seiva poderiam chegar até a parte interna do fruto e infectar a semente.

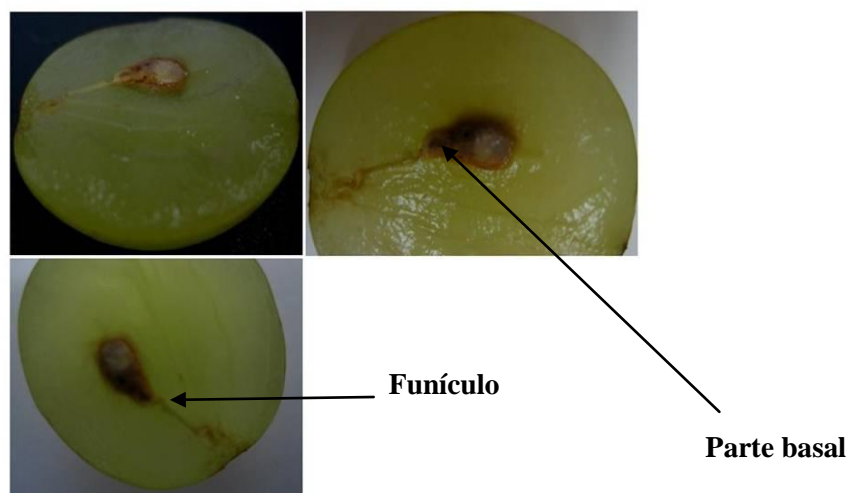


Figura 6 Estrutura interna e posição das sementes em bagas de uva

Através da análise de componentes principais (PCA) (Fig. 7 A, B e C), foi possível estabelecer as espécies de maior ocorrência pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* nas variedades de uva *Vitis vinifera*.

As variedades Syrah (S1, S3, S4, S9), Petit Verdot (PV1 e PV2), Grenache (G1) apresentaram um comportamento semelhante devido a maior contaminação por *A.niger* (10), *A.tubingensis* (15); Cabernet Sauvignon (CS2) e Syrah (S7, S8 e S10) por *A.foetidus* (7) , *A.japonicus* (9), *P.glabrum* (30) e *P.pinophilum* (37); Syrah 6 por *P.crustosum* (26) na superfície das bagas(Fig. 7A).

A variedade Cabernet Sauvignon (CS1) diferenciou-se das demais devido a maior ocorrência das espécies *P.crustosum* (26), *P.solitum* (41) e *Penicillium* sp (46); Syrah (S1 e S5) por *P.glabrum* (30); e Syrah (S3 e S7) por *A.japonicus* (9) e *A.niger* (10) no substrato semente (Fig. 7B).

Observa-se na Figura 7C que as variedades apresentaram contaminação por diferentes espécies de fungos, no entanto, algumas variedades de uva diferenciaram-se das demais, com destaque para Cabernet Sauvignon (CS1), Syrah (S2, S3, S5, S7, S8 e S9) e Petit Verdot (PV1 e PV2) devido a maior contaminação pelas espécies *A. ochraceus* (13), *A. japonicus* (9), *A. niger* (10) e *P. brevicompactum* (24) no substrato mosto.

As demais variedades presentes nos substratos baga, semente e mostos (Fig. 7A, B e C) tiveram um comportamento semelhante, caracterizado pela contaminação por diferentes espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Neste estudo, nenhum isolado de *A. ochraceus* apresentou capacidade para a produção de OTA. Esta espécie foi isolada na variedade de uva Cabernet Sauvignon (CS2), obtida na região R1, onde as condições são propícias para o seu desenvolvimento entretanto, não favoreceram a produção da ocratoxina A.

De acordo com estudos, *A. ochraceus* é capaz de se desenvolver em uma grande faixa de temperatura de 8 a 30 °C, sendo que a temperatura ideal de crescimento varia de 25 a 30 °C e, umidade 80-90% (PARDO et al., 2005; PITT; HOCKING, 1997). No entanto, as condições ideais para a produção da toxina é 31 °C e atividade de água mínima 0,85 com faixa ótima variando entre 0,95-0,99 a_w (PALACIOS-CABRERA et al., 2005).

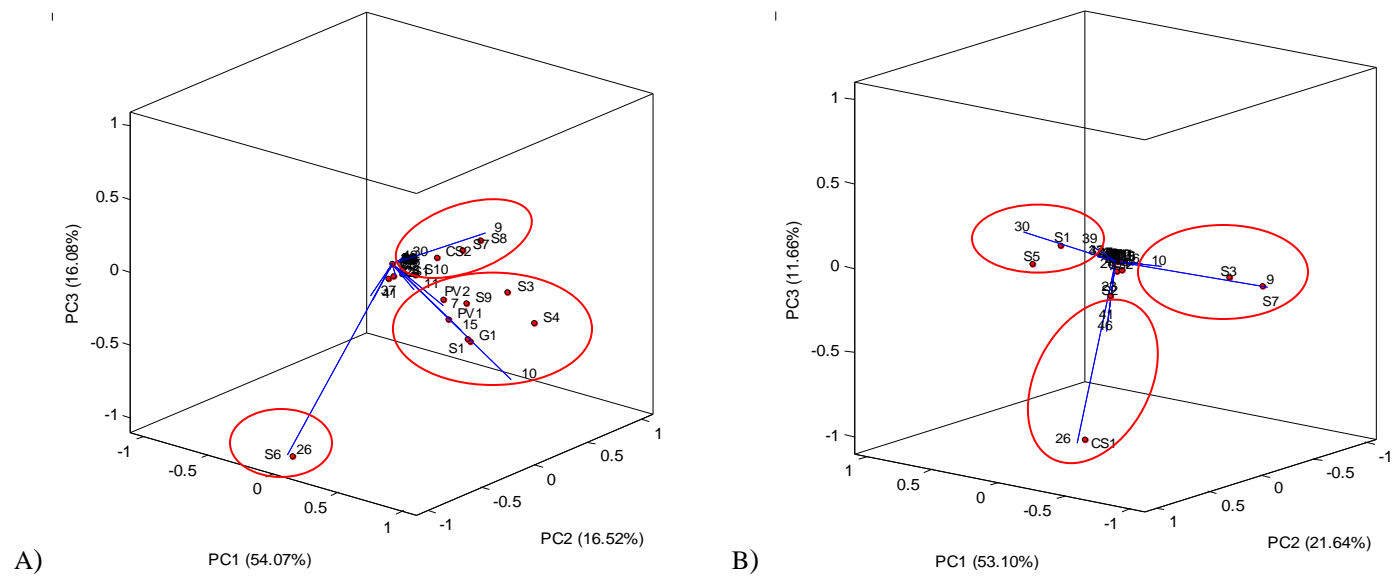
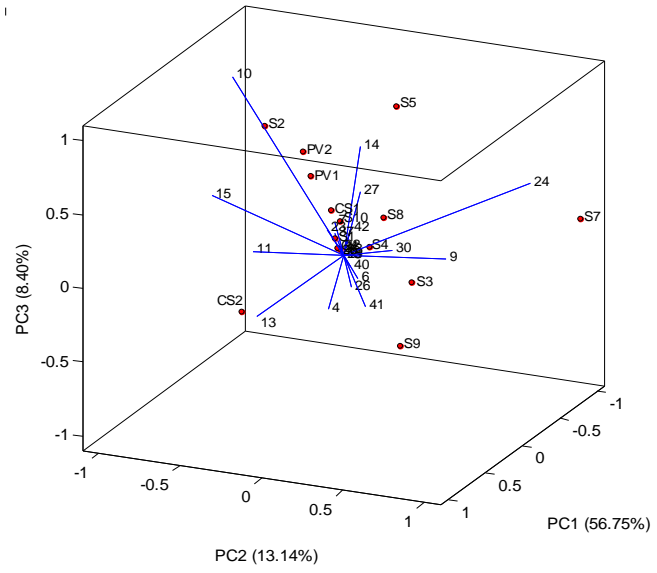


Figura 7 Gráfico de pesos da PCA para as variáveis bagas (A), sementes (B), mosto (C) e contaminação fúngica dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* nas variedades de uva *Vitis vinífera*

(...continua...)



C)

A presença de *A.ochraceus* ocratoxigênicos em uvas pode contribuir para a contaminação com OTA em vinhos e sucos de uva. Bellí et al. (2004) e Rosa et al. (2002) relataram a presença de isolados de *Aspergillus ochraceus* produtores de OTA em uvas originárias da Espanha e Brasil. Estes estudos mostraram que os isolados de *A. ochraceus* foram capazes de produzir maior quantidade de OTA que os isolados pertencentes a Seção *Nigri*.

A comparação da microbiota de uvas em diferentes regiões vinícolas muitas vezes pode tornar-se difícil devido a fatores variáveis, tais como, o ano de colheita, as variedades de uva, a fase de maturação, as práticas vitícolas aplicadas e as condições edafoclimáticas da região, que podem seletivamente promover o crescimento de determinadas espécies de fungos, capazes de causarem apodrecimento e deterioração das bagas antes da colheita. A presença de fungos patogênicos por exemplo, pode levar ao desenvolvimento de fungos oportunistas que podem produzir micotoxinas nas uvas e causar a contaminação do vinho.

4 CONCLUSÃO

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram importantes componentes da microbiota das uvas, sementes e mostos, entretanto, a distribuição de *Aspergillus* ocorreu principalmente na região do Vale do Submédio São Francisco (região R3). O índice de diversidade foi maior na região Sul de Minas Gerais (R1), devido a riqueza de espécies do gênero *Penicillium*. Os gêneros *Acremonium* sp, *Alternaria* sp, *Cladosporium* sp, *Curvularia* sp, *Dreschelera* sp, *Fusarium* sp, *Gliocladium* sp, *Oidiodendron* sp, *Rhizopus* sp, *Trichoderma* sp, *Ulocladium* sp, *Xilaria* sp foram isolados em menor frequência nas três regiões estudadas. Os fungos concentraram-se principalmente nas bagas na maioria dos cultivares avaliados.

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, L. et al. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, Easton, v. 32, n. 2, p. 240-242, Apr. 2001.
- AMORIM, D. A.; FAVERO, A. C.; REGINA, M. A. Produção extemporânea da videira, cv. Syrah, nas condições do Sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 327-331, ago. 2005.
- BATILLANI, P. et al. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 4, p. 633-636, Apr. 2003.
- _____. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. **Journal of the Science Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 1, p. 1736-1740, Aug. 2004.
- BATILLANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. Special Issue “Black aspergilli and ochratoxin A in grapes and wine, in Europe”. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. S1, p. S1-98, 2006. Supplement.
- 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. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 255, n. 6, p. 203-208, June 2006.
- BELLÍ, N. et al. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 40-45, Sept. 2006.
- _____. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 6, p. 541-546, Apr. 2004.
- CASTRO, J. V. de et al. Emprego de embalagens para conservação pós-colheita de uvas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 3, n. 1, p. 35-40, 1999.

CHIOTTA, M. L. et al. *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 1, p. 137-141, Aug. 2009.

CHULZE, S. N.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. S5-S9, May 2006.

DIGUTA, C. F. et al. PCR ITS-RFLP: a useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. **Food Microbiology**, London, v. 28, n. 6, p. 1145-1154, 2011.

ELLIS, M. B. *Dematiaceous hyphomycetes*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608 p.

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

FREDJ, S. M. et al. Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyards. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, p. 245-250, May/July 2007.

HOCKING, A. D. et al. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1/2, p. 84-88, Feb. 2007.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Wageningen: Centraalbureau voor Schimmelcultuur, 2002. 116 p.

LASRAM, S. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 1, p. 75-80, May 2012.

_____. Water activity and temperature effects on fungal growth and Ochratoxin A production by ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* isolated from Tunisian grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 2, p. M89-M97, Mar. 2010.

- LEONG, S.; 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**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 83-88, Apr. 2004.
- LEONG, S. L. et al. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 10-17, Sept. 2006.
- MAGAN, N.; MEDINA, A.; ALDRED, D. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre-and postharvest. **Plant Pathology**, Washington, v. 60, n. 1, p. 150-163, Jan. 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, Apr. 2003.
- MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurements**. Sydney: Croom Helm, 1988. 179 p.
- MARTINEZ-CULEBRAS, P. V.; RAMON, D. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 147-153, July 2007.
- MEDINA, A. et al. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4696-4702, Aug. 2005.
- MELKI BEN FREDJ, S. et al. Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyards. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 3, p. 245-250, Feb. 2007.
- MIKUSOVÁ, P. et al. Berries contamination by microfungi in Slovakia vineyard regions: impact of climate conditions on microfungi biodiversity. **Revista Iberoamericana de Micología**, Buenos Aires, v. 9, n. 1, p. 823-845, 2011.
- NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species and illustrated manual for identification**. Pennsylvania: Pennsylvania State University, 1983. 193 p.

PALACIOS-CABRERA, H. et al. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A.carbonarius* and *A.niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 24-28, Jan./Mar. 2005.

PARDO, E. et al. Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. **Food Microbiology**, London, v. 22, p. 383-389, Nov. 2005.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. Melbourne: Food Science, 2000. 197 p.

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

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

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, Aug. 2002.

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

SAGE, L.; GARON, D.; SEIGLE-MURANDI, F. Fungal microflora and ochratoxin A risk in French Vineyards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 18, p. 5764-5768, Aug. 2004.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food and airborne fungi**. 7th ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 389 p.

SANCHIS, V.; MAGAN, N. Environmental profiles for growth and mycotoxin production. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. (Ed.). **Mycotoxins in food: detection and control**. Cambridge: Woodhead, 2004. p. 174-189.

SERRA, R.; BRAGA, A.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin producing and other fungi isolated from grapes for wine production with particular emphasis on ochratoxin A. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 4, p. 515-521, May 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.

_____. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Mycological Research**, Barcelona, v. 110, n. 1, p. 971-978, Aug. 2006.

WESTPHALEN, S. L.; MALUF, J. R. T. **Caracterização das áreas bioclimáticas para o cultivo de *Vitis vinifera* L.:** regiões da Serra do Nordeste e Planalto do Estado do Rio Grande do Sul. Brasília: EMBRAPA, 2000. 55 p.

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 Incidência de *Aspergillus* Seção *Nigri* e de espécies ocratoxigênicas em bagas, sementes e mostos de uvas cultivadas em três regiões do Brasil

RESUMO

Com o presente trabalho, objetivou-se pesquisar a incidência de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* em bagas, sementes e mosto de uva cultivadas nas regiões Sudeste (Sul de Minas Gerais e São Paulo) e Nordeste (Vale do Submédio São Francisco) do Brasil. Foram analisadas um total de 26 amostras de uvas das cultivares *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*. Para o isolamento dos fungos das bagas e sementes foi utilizada a técnica do plaqueamento direto em meio Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). Para a análise dos mostos foi realizado o espalhamento a partir de diluições seriadas. A identificação das espécies foi realizada com base nas características macro e micro morfológicas e o potencial toxigênico pelo método do Plug Agar. Das amostras analisadas isolou-se um total de 1477 fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*. As espécies *A. foetidus*, *A. niger*, *A. tubingensis* e *A. japonicus* foram detectados em maior frequência nas três regiões estudadas, e em menor frequência, as espécies *A. aculeatus* e *A. carbonarius*. Estas espécies estão naturalmente presentes nas bagas, sementes e mostos das regiões estudadas. Os resultados de frequência de ocorrência mostram que as espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* foram isoladas mais frequentemente na região do Vale do Submédio São Francisco (81%). A fonte primária da espécie *A. carbonarius* foram as bagas. Todos os isolados de *A. carbonarius* obtidos neste estudo foram produtores de OTA. Esta espécie foi isolada somente na região do Vale do Submédio São Francisco, o que demonstra a importância de estudos nesta região, já que *A. carbonarius* é a principal fonte desta toxina em uvas e seus derivados. A espécie *A. niger* foi detectada nas três regiões estudadas, entretanto somente na região R3, foram isoladas espécies ocratoxigênicas (7,9%). As cultivares *Vitis vinifera* apresentaram maior incidência de contaminação com espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*, quando comparada com as variedades *Vitis labrusca* e essa diferença foi estatisticamente significativa.

Palavras-chave: *Aspergillus*. Seção *Nigri*. Uvas. Sementes. Mosto. Ocratoxina A.

ABSTRACT

This work aimed at researching the incidence of fungi of the *Aspergillus nigri* section genus in berries, seeds and must of grapes cultivated in the Southeast (Southern Minas Gerais and São Paulo) and Northeast (Vale do Submédio São Francisco) regions of Brazil. A total of 26 grape samples of the cultivars *Vitis vinífera* and *Vitis labrusca* were analyzed. For the isolation of the fungi of berries and seeds, the direct plating technique was used in a mycological media dicholoran rose bengal chloranphenicol (DRBC). For the analysis of the must, a spreading from serially diluted samples was performed. The identification of the species was done based on macro and micro morphometric characteristics and the toxigenic potential by means of the method agar plug. Of the analyzed samples, a total of 1477 fungi of the *Aspergillus nigri* section genus were isolated. The species *A. foetidus*, *A. niger*, *A. tubingensis* and *A. japonicas* were detected more frequently in the three studies regions while *A. aculeatus* and *A. carbonarius* were less frequent. These species are naturally present in berries, seeds and must in the studied regions. The results of occurrence frequency showed that the *Aspergillus nigri* section species were more frequently isolated in the Vale do Submédio São Francisco region (81%). The primary source of the *A. carbonarius* species were the berries. All the *A. carbonarius* isolates obtained in this study were OTA producers. This species was isolated only in the Vale do Submédio São Francisco, which demonstrates the importance of studies in this region, since *A. carbonarius* is the main source of this toxin in grapes and derivatives. The species *A. niger* was detected in the three regions studied however, only in region R3, ochratoxigenic species were isolated (7.9%). The cultivars *Vitis vinífera* presented larger contamination incidence with *Aspergillus nigri* section species when compared to *Vitis lambrusca* varieties, and this difference was statistically significant.

Key-words: *Aspergillus. Nigri* section. Grapes. Seeds. Must. Ochratoxin A.

1 INTRODUÇÃO

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por algumas espécies de *Aspergillus* pertencentes as Seções *Nigri* e *Circumdati* (*A. ochraceus*, *A. sclerotiorum*, *A. niger* e *A. carbonarius*) associadas a regiões de clima tropical e subtropical, e por espécies de *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. purpurascens*, *P. commune* e *P. nordicum*) associadas com a produção de OTA em regiões de clima temperado (GEINSEN et al., 2004; GUPTA, 2007; LARSEN; SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001; PITT; HOCKING, 1997). A produção desta toxina está relacionada a fatores abióticos, principalmente temperatura e atividade de água (a_w) (ALBORCH et al., 2011; BELLÍ et al., 2004; QUINTELA et al., 2011).

OTA é considerada a micotoxina de maior importância no grupo das ocratoxinas. Os principais efeitos tóxicos demonstrados desta toxina são nefrotóxicos, hepatóxicos, imunotóxicos, teratogênicos e neurotóxicos em animais (SOLFRIZZO et al., 2010). A OTA também possui potenciais efeitos mutagênicos e carcinogênicos (PFOHL-LESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2007; PITT et al., 2001; RINGOT et al., 2006). Acredita-se que a OTA esteja relacionada com a Nefropatia Endêmica dos Balcãs e tumores no trato urinário de humanos (BENFORD et al., 2001).

As espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* pertencentes ao chamado *A. niger* Agregado e *A. carbonarius* são apontadas como as principais fontes de ocratoxina A em alimentos de clima tropical e subtropical (PITT et al., 2000). Vários estudos destacam *A. carbonarius* como uma das maiores fontes de produção de ocratoxina A em diversos alimentos como frutas secas, uvas, vinho e café (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; BAU et al., 2005; CABANES et al., 2002; LEONG et al., 2006; PARDO et al., 2004; SELMA; MARTINEZ-

CULEBRAS; AZNAR, 2008; SERRA et al., 2003; SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005; SHAH et al., 2010; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

Esta micotoxina foi detectada em vinhos pela primeira vez por Zimmerli e Dick (1995, 1996). Desde então, vários estudos buscam avaliar a presença da OTA em uvas cultivadas em países da Europa (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006a; BELLÍ et al., 2004; CABAÑES et al., 2002; MATEO et al., 2007; SAGE et al., 2002; SERRA et al., 2003; VARGA et al., 2004) na Tunísia (LASRAM et al., 2007, 2012), na Argentina (CHIOTTA et al., 2009) e na Austrália (LEONG et al., 2006).

De acordo com Cozzi (2007), a frequência destas espécies e o acúmulo de OTA sempre está associada a regiões com altas temperaturas. De acordo com estudos, dentre as espécies de *Aspergillus Nigri*, *A.niger* é mais comumente encontrado na microbiota de uvas do que *A.carbonarius*, entretanto, poucos isolados são considerados como ocratoxigênicos (LASRAM et al., 2008; LEONG; HOCKING; SCOTT, 2007; VARGA et al., 2004).

Estudos tem associado o efeito do clima sobre a ocorrência de OTA e fungos produtores de OTA em uvas (BATTILANI et al., 2006a; SERRA et al., 2006a). Em regiões de clima mediterrânico como o Sul da Europa e Norte da África, é relatado que os vinhos produzidos contêm níveis mais elevados de OTA que aqueles de regiões de clima temperado como na Europa Central (OTTENEDER; MAJERUS, 2000; ZIMMERLI; DICK, 1996).

Existem poucos estudos realizados no Brasil sobre a ocorrência de fungos produtores de OTA em uvas e sobre os possíveis fatores que podem influenciar na ocorrência destas espécies, bem como na produção de OTA. Assim, o conhecimento sobre as condições que regem a colonização de fungos produtores de ocratoxina é de extrema importância para o controle de qualidade dos alimentos, uma vez que pode contribuir para o estabelecimento de medidas preventivas de produção, garantindo a segurança do produto final. Este estudo,

teve como objetivo avaliar a ocorrência de fungos ocratoxigênicos pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, em bagas, sementes e mosto de uvas cultivadas em três regiões do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de Estudo

Para avaliar a distribuição dos fungos filamentosos, foram coletadas nas safras de 2010 e 2011, 26 amostras de uvas de variedades *Vitis labrusca* (Bordô, BRS Cora, Isabel Precoce e BRS Violeta) e *Vitis vinifera* L. (Cabernet Sauvignon, Grenache, Petit Verdot e Syrah) (Tabela 1), de vinhedos localizados nos municípios de Caldas e Três Corações, no Sul de Minas Gerais (Região R1), Espírito Santo do Pinhal, Sudeste do estado de São Paulo (Região R2) e Santa Maria da Boa Vista (PE), Petrolina (PE), Lagoa Grande (PE) e Casa Nova (BA) (Região R3), localizados no Vale do Submédio São Francisco. Alguns dados das regiões, como coordenadas geográficas, tipo de clima, temperatura média e precipitação anual estão descritas nas tabelas (1 e 2).

Tabela 1 Localização geográfica dos municípios onde foram coletadas as variedades de uvas analisadas

| | Municípios | Localização | | | Clima |
|--|--------------------------|-------------|-------------|----------|--------------------|
| | | Latitude S | Longitude O | Altitude | |
| Minas Gerais (R1) | Caldas | 21°00' | 46°00' | 1150 m | SubTropical |
| | Três Corações | 21°41' | 45°15' | 900 m | SubTropical |
| São Paulo (R2) | Espírito Santo do Pinhal | 22°11' | 46°45' | 1210 m | Tropical |
| Vale do Submédio São Francisco (R3) | Casa Nova | 09° 15' | 40° 51' | 360 m | Tropical Semiárido |

“Tabela 1, conclusão”

| Municípios | Localização | | | Clima |
|--------------------------|-------------|-------------|----------|--------------------|
| | Latitude S | Longitude W | Altitude | |
| Santa Maria da Boa Vista | 09° 04' | 40° 08' | 361 m | Tropical Semiárido |
| Petrolina | 09° 02' | 40° 11' | 350 m | Tropical Semiárido |
| Lagoa Grande | 09° 04' | 40° 08' | 345 m | Tropical Semiárido |

2.2 Amostragem

2.2.1 Uvas

Para as análises foram coletadas amostras de uvas tintas viníferas utilizadas para a elaboração de vinhos finos (n=15) e, uvas tintas para a elaboração de suco (n=11), no estágio final de maturação (colheita), totalizando 25 amostras. As variedades de uvas, o período da safra (colheita) e os dados climáticos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 Dados referentes as amostras analisadas (variedades, mês de colheita, temperatura (média °C), precipitação (mm) e umidade relativa (U.R %), durante o período de coleta)

| Variedade | Região | Mês de colheita | Temp. | (mm)* | (U.R)* |
|------------------------------|--------|-----------------|-------|-------|--------|
| <i>Vitis vinifera</i> | | | | | |
| Syrah (1) | R2 | Jul/2010 | 18,1 | 25,8 | 70 |
| Syrah (2) | R2 | Jul/2010 | 19,9 | 49,9 | 60 |
| Syrah (3) | R1 | Jul/2010 | 14,8 | 13,6 | 75 |
| Cabernet Sauvignon (4) | R1 | Jul/2010 | 14,8 | 13,6 | 75 |
| Syrah (5) | R1 | Jul/2010 | 14,8 | 13,6 | 75 |
| Syrah (10) | R3 | Jul/2010 | 23,3 | 41,1 | 80 |
| Petit Verdot (17) | R3 | Mar/2010 | 27,6 | 91,0 | 66 |
| Grenache (7) | R3 | Agosto/2010 | 23,5 | 0,0 | 72 |
| Petit Verdot (8) | R3 | Set/2010 | 25,7 | 2,7 | 51 |
| Syrah (11) | R3 | Dez/2010 | 26,3 | 174,9 | 76 |
| Syrah (20) | R3 | Agosto/2011 | 19,7 | 71,0 | 52 |
| Syrah (21) | R3 | Maio/2011 | 26,4 | 68,2 | 71 |
| Syrah (24) | R3 | Maio/2011 | 24,8 | 69,2 | 78 |
| Cabernet Sauvignon (25) | R3 | Maio/2011 | 26,4 | 68,2 | 71 |
| Syrah (26) | R3 | Maio/2011 | 26,4 | 68,2 | 71 |
| <i>Vitis Labrusca</i> | | | | | |
| BRS Cora 572 (15) | R3 | Mar/2010 | 27,6 | 91,0 | 66 |
| Isabel Precoce (16) | R3 | Mar/2010 | 27,6 | 91,0 | 66 |
| Isabel Precoce (9) | R3 | Agosto/2010 | 24,4 | 0,0 | 56 |
| Isabel Precoce (14) | R3 | Out/2010 | 27,8 | 18,2 | 54 |
| Violeta (6) | R1 | Dez/2010 | 22,1 | 401,1 | 80 |
| Violeta (12) | R3 | Dez/2010 | 26,3 | 164,5 | 68 |
| Isabel Precoce (13) | R3 | Dez/2010 | 26,3 | 164,5 | 68 |
| Bôrdo (18) | R1 | Jan/2011 | 21,6 | 312,1 | 83 |
| Bôrdo (19) | R1 | Jan/2011 | 21,6 | 312,1 | 83 |
| BRS Cora 572 (22) | R3 | Maio/2011 | 26,4 | 68,2 | 71 |
| Isabel Precoce (23) | R3 | Maio/2011 | 26,4 | 68,2 | 71 |

*Dados médios mensais obtidos nas Estações Agrometeorológicas de Bebedouro (Petrolina/PE)/Embrapa Semiárido, Mandacaru (Juazeiro/BA), Núcleo Tecnológico Epamig Uva e Vinho/EPAMIG (Caldas – MG), Monitoramento Climatológico: Espírito Santo do Pinhal e CEPAGRI (Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura/Campinas

2.2.2 Mostos

O mosto foi obtido pelo esmagamento das bagas (escolhidas aleatoriamente dos cachos das 26 amostras coletadas). Um volume aproximado de 200 mL foi obtido após o filtrado e analisado imediatamente quanto a presença de fungos filamentosos.

2.3 Isolamento dos Fungos

Para o isolamento dos fungos filamentosos contaminantes das bagas e sementes, foi utilizada a Técnica de Plaqueamento Direto. De cada amostra selecionou-se 100 bagas ao acaso e as demais foram utilizadas para a extração das sementes. As bagas e as sementes foram submetidas ao procedimento de desinfecção superficial com álcool 70% e hipoclorito a 1%. Um total de 100 bagas e sementes foram plaqueadas em meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), e incubadas em BOD a 25 °C por 5-7 dias, conforme Samson, Hoekstra e Frisvad (2000).

Para a análise dos mostos, 25 mL de cada amostra foram homogeneizados em 225 ml de água peptonada 0,1% estéril, seguido da agitação em stomacher por 2 min. Em seguida, 0,1 mL de cada diluição (1:10, 1:100 e 1:1000), por espalhamento, foi transferido para placas de Petri estéreis contendo meio DRBC. As placas foram incubadas à 25 °C por 5-7 dias.

As placas de Petri foram incubadas por um período de 5-7 dias a 25 °C. Em seguida, os fungos foram identificados de acordo com seus caracteres morfológicos por estereomicroscopia, como pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*. As colônias foram purificadas em meio Malt Agar. Após e

crescimento em cultura pura, os isolados foram incubados em meios específicos e temperaturas padronizadas e, identificados de acordo com Klich (2002).

2.4 Determinação da produção de ocratoxina A por fungos pelo método

Plug Agar

Os isolados foram testados quanto ao potencial de produção de OTA pelo método Plug Agar, conforme descrito por Filtenborg e Frisvad (1980). Os isolados foram inoculados em meio Czapeck Yeast Agar (CYA), e, incubados à 25 °C, por 5-7 dias. Foram utilizadas placas de Cromatografia de Camada Delgada (Merck –Sílica Gel 60, 20x20), solução de OTA (Sigma – Aldrick) e Fase móvel TEF-Toleno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (60:30:10). A confirmação da produção de OTA foi obtida através de luz ultravioleta (366 nm) em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados como produtores de OTA apresentaram um RF (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao padrão da micotoxina.

2.4.1 Cálculo dos índices de biodiversidade

Para avaliar a diversidade de fungos filamentosos presentes nas bagas, sementes e mostos de diferentes variedades de uvas, foi utilizado o seguinte índice:

Índice de diversidade de Shannon-Weiner ('H): leva em conta a riqueza e o número de indivíduos de cada espécie, sendo comumente utilizado em estudos de ecologia de comunidades (MAGURRAN, 1988).

$$H = -\sum(p_i \cdot \ln p_i)$$

em que p_i é a proporção de indivíduos de cada espécie i em relação ao número total de indivíduos.

3 ANÁLISE DE CORRESPONDÊNCIA

Com o propósito de identificar a associação entre as espécies dos gêneros *Aspergillus* Seção *Nigri* e as variedades *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*, por meio da formação de agrupamentos, utilizou-se a técnica de correspondência simples, conforme a metodologia descrita por Guedes et al. (1999).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Distribuição de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* e de espécies ocratoxigênicas em bagas, sementes e mostos de uvas cultivadas em três regiões vitivinícolas do Brasil

Das três regiões analisadas, um total de 1477 fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* foram isolados e identificados neste estudo. Deste total 700 foram isolados das bagas, 298 das sementes e 479 do mosto (Tabela 3).

Tabela 3 Espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* isolados de bagas (B), sementes (S) e mostos (M) das três regiões analisadas

| Espécie | Região 1 | | | Região 2 | | | Região 3 | | |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | B | S | M | B | S | M | B | S | M |
| <i>A.aculeatus</i> | 4 | 1 | - | - | - | - | 22 | 13 | 16 |
| <i>A.carbonarius</i> | - | - | - | - | - | - | 16 (16) | 8 (8) | - |
| <i>A.foetidus</i> | 1 | 3 | 12 | 7 | 5 | 2 | 68 | 32 | 15 |
| <i>A.japonicus</i> | 7 | 14 | 18 | 4 | 2 | 26 | 233 | 97 | 175 |
| <i>A.niger</i> | 2 | 3 | 14 | 21 | 1 | 24 | 162 (13) | 49 (2) | 52 (11) |
| <i>A.niger</i> Agregado | - | - | 9 | 11 | - | 14 | 37 | 12 | 26 |
| <i>A.tubingensis</i> | 1 | 5 | 21 | 30 | - | 18 | 74 | 53 | 37 |
| Total | 15 | 26 | 74 | 73 | 8 | 84 | 612 (29) | 264 (10) | 321 (11) |

(*) Número de isolados ocratoxigênicos

A frequência de ocorrência de *Aspergillus* Seção *Nigri* variou de acordo com a região estudada (Figura 1). Estudos anteriores, demonstram que as condições climáticas e a área geográfica podem contribuir para a variação na incidência de fungos e contaminação de uvas com OTA (BATTILANI et al., 2006a, 2006b; BELLÍ et al., 2006; SAGE; GARON; SEIGLE-MURANDI, 2004; SERRA et al., 2006b).



Figura 1 Distribuição das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* nas três regiões analisadas: região R1 (Sul de Minas Gerais), R2 (São Paulo) e R3 (Vale do Submédio São Francisco)

A maior frequência de isolamento destas espécies foi observado especialmente na região R3, onde representaram 81,0% dos isolados da Seção *Nigri* (Figura 2). O clima desta região é semiárido, com baixa umidade na maior parte do ano e forte radiação solar; a temperatura máxima no verão pode atingir 32 °C. Estudos comprovam que o aumento da frequência das espécies de *Aspergillus* da Seção *Nigri* em climas mais quentes, pode estar associado a capacidade de sobrevivência prolongada destas espécies no solo, bem como a capacidade de adaptação à altas temperaturas e baixa atividade de água (BATILLANI et al., 2006b; KAZÍ et al., 2004; LEONG; HOCKING; SCOTT, 2004). Outro fator importante que pode contribuir para a incidência destas espécies, são os esporos negros que fornecem proteção da luz solar e luz UV, proporcionando uma vantagem competitiva principalmente em regiões onde o clima é mais quente (PITT; HOCKING, 1997).

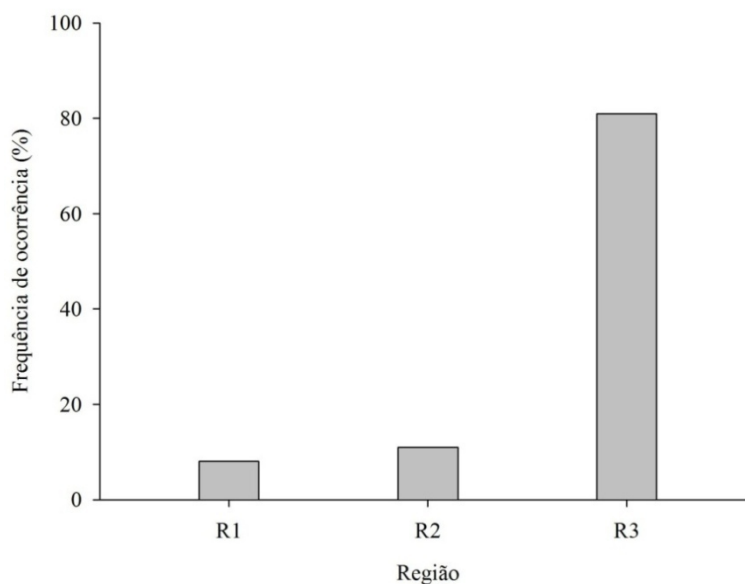


Figura 2 Frequência de ocorrência de *Aspergillus* Seção *Nigri* isolados das amostras de baga, semente e mosto nas três regiões estudadas

De acordo com nossos resultados, pode-se observar que os *Aspergillus* Seção *Nigri* foram predominantes na microbiota de uvas durante a época de colheita. Entretanto, estes fungos podem ser encontrados também na superfície de bagas de uvas saudáveis em todas as fases de maturação da uva (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2004; CABAÑES et al., 2002; ROSA et al., 2002; SERRA et al., 2003), embora sua incidência seja mais relevante na fase pintor das bagas (LUCCHETA et al., 2010).

A diversidade das espécies encontradas pouco variou entre as regiões estudadas, demonstrando que estas foram capazes de se desenvolver nas três regiões. Porém, sua frequência de distribuição pode diminuir a medida que ocorre variações climáticas dentre estas regiões. Na região R3 (Índice de Shannon Weiner = 0,68), *A. carbonarius* foi a única espécie detectada apenas nesta região, as demais espécies tiveram sua distribuição confirmada nas três regiões estudadas (Figura 3). As condições climáticas e a área geográfica dos parreirais podem influenciar na variação da contaminação e na incidência de *Aspergillus* Seção *Nigri* (BATTILANI et al., 2006b; BELLÍ et al., 2006; SERRA et al., 2006a).

Segundo Lasram et al. (2007), a diversidade de fungos em uvas diminui da fase pintor (fase inicial de maturação das bagas) até a fase de maturação. Estes autores observaram um índice de diversidade (Shannon-Wiener) entre 0,71 e 0,77 na fase pintor das bagas, e, 0,59 e 0,61 na maturidade. Bellí et al. (2006) avaliaram a microbiota de *Aspergillus Nigri* em uvas de diferentes regiões da Espanha, concluindo que estes fungos foram os mais frequentes durante a fase de maturação (Índice de Shannon-Wiener = 0,72).

Os *Aspergillus* Seção *Nigri* (*A. foetidus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. japonicus*) foram detectados em maior frequência nas três regiões estudadas (Figura 3), constituindo 87% dos 1477 isolados (Tabela 3). Destes, *A. japonicus*

(39%) foi a espécie mais detectada nas amostras analisadas, principalmente na região R3 (Figura 3).

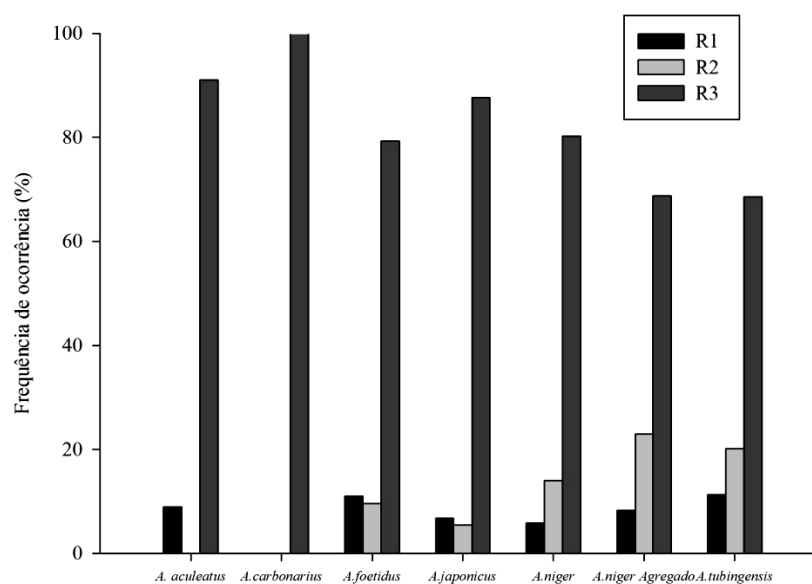


Figura 3 Incidência de *Aspergillus* Seção *Nigri* nas amostras de bagas, semente e mosto isolados nas três regiões estudadas (região 1 (R1), região 2 (R2) e região 3 (R3))

A maioria das pesquisas no cultivo de uvas em diferentes regiões do mundo, principalmente do Mediterrâneo, Austrália e América do Sul, indicam que as espécies bisseriadas *A. carbonarius* e *A. niger* "Agregado" e as espécies unisseriadas *A. aculeatus* e *A. japonicus* são as principais espécies encontradas (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006a; BELLÍ et al., 2006; LASRAM et al., 2012; LUCCHETTA et al., 2010).

As espécies isoladas em menor frequência foram *A. aculeatus* (4%) e *A. carbonarius* (2%). *A. carbonarius* foi detectado nas sementes e bagas das variedades Grenache (1) e Isabel Precoce (1) e nas bagas da variedade Petit

Verdot (1), obtidas na safra de 2010 da região R3. Nenhum isolado de *A.carbonarius* foi detectado nas variedades analisadas da safra de 2011.

Tjamos, Antoniou e Tjamos (2006) observaram que a variedade Grenache, mostrou-se altamente contaminada por *A. carbonarius*, o que pode ter ocorrido devido às práticas de cultivo, onde os cachos foram cultivados próximos do nível do solo. Leong et al. (2006) observaram em vinícolas da Austrália, que o solo e os restos de videira sob o solo foram as fontes primárias de *Aspergillus* Seção *Nigri*.

Baú et al. (2005) relatam que não houve crescimento fúngico a partir de sementes removidas de bagas de uvas. De acordo com estes autores, a contaminação por espécies ocratoxigênicas tem origem da superfície e não do interior das bagas. No entanto, neste estudo espécies de *A.carbonarius* ocratoxigênicas foram capazes de infectar a parte interna do fruto, o que indica que algum agente (físico, fisiológico ou microbiológico) promoveu danos nas bagas, favorecendo a colonização por esta espécie.

A presença desta espécie na região R3 pode ser atribuída ao clima semiárido com baixa umidade e a temperaturas mais quentes (variam de 20 a 32 °C) (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006). A temperatura média alcançada no período de coleta destas amostras foi de 23,5-27,6 °C e, precipitação de 0,0-91,0 mm (Tabela 2). Estas condições climáticas parecem ser favoráveis ao crescimento de *A.carbonarius*. Resultados semelhantes foram observados por Battilani et al. (2006a), em que *A.carbonarius* foi a espécie mais frequente isolada em locais de clima quente, mostrando uma correlação positiva com a temperatura. No Líbano a taxa de isolamento de *A.carbonarius* é de cerca de 1,8% em relação as demais espécies da Seção *Nigri*, enquanto que em países do Mediterrâneo, o isolamento pode atingir 48% (KHOURY et al., 2008).

A ausência dos isolados de *A.carbonarius* nas regiões R1 e R2, pode ser atribuída a temperatura na época da coleta das amostras que variou entre 14,8-

22,1 °C (Tabela 2), e que também pode ter contribuído para os níveis mais baixos de contaminação com espécies da Seção *Nigri*. Segundo Lasram et al. (2012), as condições ótimas para o crescimento de *A. carbonarius*, é a 30 °C e atividade de água (a_w) de 0,99. Enquanto, que para a produção de OTA, a temperatura ideal é em torno de 15-25 °C e a_w de 0,99. Em outros estudos, a temperatura relatada para a produção da toxina é de 15-20 °C (BELLÍ et al., 2005; ESTEBAN et al., 2004; MITCHELL et al., 2004). Isto poderia explicar porque, geralmente, as espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* são mais frequentemente isoladas em áreas quentes e secas, enquanto que *A. carbonarius* em áreas quentes e úmidas.

Outro fator que pode estar relacionado a ausência de *A. carbonarius* nas regiões R1 e R2, e a baixa incidência na região R3 é que neste estudo analisamos apenas bagas saudáveis, sem sintomas visíveis de deterioração. Segundo Serra, Braga e Venâncio (2005), a contaminação de uvas saudáveis por OTA não é significativa, embora, durante o processo de vinificação as bagas deterioradas devem ser retiradas, contribuindo para a diminuição do risco da toxina no produto final (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006a).

A. carbonarius é uma espécie muito invasiva, sendo capaz de penetrar nas bagas mesmo sem danos na película; as uvas podem ser susceptíveis à infecção pelo fungo desde os estados iniciais da maturação, antes da fase pintor (BATTILANI; PIETRI, 2002).

Segundo Chiotta et al. (2009), a variedade de uva pode afetar a incidência de *A. carbonarius*. Estes autores, avaliaram as variedades Malbec, Syrah e Cabernet Sauvignon e observaram que a maior incidência de *A. carbonarius* (50%), foi detectado na variedade Cabernet Sauvignon. Estes resultados concordam com os de Battilani et al. (2004) que mostraram, em estudos in vitro, que a variedade de uva afeta a incidência de *Aspergillus* Seção *Nigri* e os níveis de OTA, sendo Cabernet Sauvignon a variedade mais

suscetível a infecção por estas espécies. Neste estudo, não foi observado a incidência de *A. carbonarius* na variedade Cabernet Sauvignon coletadas em duas diferentes regiões.

Todos os isolados de *A. carbonarius* detectados neste estudo, foram ocratoxigênicos. *A. carbonarius* tem sido relatado em diversos estudos como a principal espécie responsável pela presença da OTA em uvas e seus derivados (ABARCA et al., 2003; BEJAOUÏ et al., 2006; BELLÍ et al., 2006; CABAÑES et al., 2002; LASRAM et al., 2012; LUCCHETTA et al., 2010; PERRONE et al., 2007; SERRA et al., 2003).

Lasram et al. (2012) observaram que a maior incidência de espécies ocratoxigênicas foi registrado para os isolados de *A. carbonarius*. Este fato confirmou que esta espécie é a principal responsável pela contaminação de OTA nas uvas cultivadas em diferentes regiões da Tunísia, tanto nas variedades de vinho quanto as de mesa. A presença de fungos ocratoxigênicos como *A. carbonarius*, pode estar relacionada a circulação do ar, que promove a dispersão dos esporos presentes no solo até a superfície das bagas (HOCKING et al., 2007; LEONG et al., 2006).

A incidência de *Aspergillus* Seção *Nigri*, normalmente aumenta do início da fase pintor das bagas até a colheita, provavelmente porque a superfície das bagas verdes e a exposição à luz UV representem um ambiente hostil para o desenvolvimento de esporos de *A. carbonarius* (LEONG; HOCKING; SCOTT, 2006, 2007). Entretanto, ao atingir o início da fase de maturação, a película da baga amolece e o teor de açúcar aumenta, deixando o fruto mais suscetível à infecção por *A. carbonarius* e, conseqüentemente, aumentando o risco de produção de OTA, principalmente quando danificado (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006b; LEONG, 2005; LEONG; HOCKING; SCOTT, 2006). A colheita tardia dos frutos maduros também aumenta o risco de contaminação com OTA (HOCKING et al., 2007).

A porcentagem de isolados *A. carbonarius* produtores de OTA é superior à de outras espécies de *A. niger* Agregado (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006b; PERRONE et al., 2007). A produção de OTA por espécies do grupo *A. niger* Agregado tem sido relatada em outros estudos, embora em níveis muito baixos. A caracterização molecular desses isolados mostrou que eles estavam representados pelas espécies de *A. niger* e *A. tubingensis*. A capacidade de *A. tubingensis* produzir OTA tem sido confirmada em diversos estudos (LASRAM et al., 2012; MEDINA et al., 2005; PERRONE et al., 2006).

Neste estudo não foi confirmado nenhum isolado de *A. tubingensis* produtor de OTA, entretanto, alguns isolados de *A. niger* (7,9%) foram confirmados como produtores de OTA. *A. niger* foi detectado nas sementes e bagas das variedades BRS Cora (1) e Petit Verdot (1) e no mosto das variedades, Isabel Precoce (3) e Petit Verdot (1) obtidas na safra de 2010 da região R3. Os isolados obtidos nas variedades coletadas na safra de 2011, não foram confirmados como ocratoxigênicos. O isolamento desta espécie ocratoxigênica em mosto, pode representar risco de contaminação de OTA no vinho, já que esta espécie apresentou capacidade de desenvolver-se na etapa inicial do processo de vinificação.

De acordo com estudos, *A. niger* foi a espécie mais frequentemente isolada em vinhas da Austrália (LEONG, 2005; LEONG; HOCKING; PITT, 2004). Neste estudo, espécies de *A. niger* também foram isoladas nas regiões R1 e R2, entretanto, nenhuma cepa apresentou capacidade para a produção de OTA.

Vários fatores podem afetar a colonização por fungos ocratoxigênicos em uvas e a contaminação com OTA, em particular as condições geográficas e climáticas. A região R3 é considerada como a principal região vitivinícola tropical brasileira, especialmente para o cultivo de uvas para consumo *in natura*. Dados sobre as características climáticas das regiões estudadas durante o período de maturação da uva (Tabela 2) mostram que a região R3 teve os maiores

valores de temperaturas médias (23,5-27,6 °C), alcançado nos meses de coleta das variedades contaminadas com *A.niger*, com temperaturas em torno dos 27,6-27,8 °C e baixa umidade relativa entre 54-66%, o que provavelmente pode ter favorecido o desenvolvimento desta espécie e a produção de OTA.

Lasram et al. (2012) afirmam que em condições onde o clima é mais quente e seco, espécies de *A. niger* e *A. carbonarius* crescem mais rapidamente. Estudos demonstram que o crescimento de *A. niger* ocorre em temperaturas em torno de 35-37 °C (LEONG; HOCKING; SCOTT, 2004) e 30-37 °C (BELLÍ et al., 2004), enquanto a produção de OTA por espécies de *A. niger* Agregado ocorre entre 20-25 °C (ESTEBAN et al., 2004).

Embora *A. niger* tenha sido detectado em maior frequência neste estudo, que os isolados de *A. carbonarius*, foi possível observar que sua presença não representa alto risco de contaminação com OTA, comparado ao *A.carbonarius* onde todos os isolados foram ocratoxigênicos.

Deve-se levar em consideração que a alta incidência de *Aspergillus* Seção *Nigri* não implica necessariamente no acúmulo de OTA nas uvas. Em primeiro lugar, entre os isolados desta Seção, *A. carbonarius* é o principal produtor de OTA, e algumas espécies do grupo *A. niger* Agregado, são capazes de produzir a toxina em concentrações mais baixas. Além disso, as condições ecológicas que favorecem o crescimento e a alta incidência, são diferentes daquelas ideais para a produção de OTA.

Bau et al. (2005) não observaram crescimento fúngico em amostras de sementes removidas das bagas, o que levou estes autores a concluírem que a contaminação por espécies produtoras de OTA procede da superfície das uvas e não do interior. Entretanto, nossos resultados demonstram que os *Aspergillus* Seção *Nigri* foram capazes de infectar a parte interna do fruto, o que pode ter ocorrido devido a danos causados na superfície das bagas, já que estes fungos são considerados agentes secundários de deterioração e geralmente não possuem

mecanismos de invasão e infecção no tecido da planta, sendo necessário a infecção por um patógeno ou que ocorra danos físicos ou fisiológicos, facilitando a colonização por estas espécies. Outro aspecto relevante é que a infecção destes isolados pode ter ocorrido através da entrada pelo pedúnculo do cacho e, conseqüentemente, chegando até a semente por meio do funículo, que se liga a parte basal da semente.

Neste estudo, detectamos a presença de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* nas amostras de mosto analisadas (Tabela 3), incluindo espécies de *A. niger* ocratoxigênicas. Estas espécies foram detectadas nas variedades Isabel Precoce (3) e Petit Verdot (1), coletadas na região R3. O desenvolvimento de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* em mostos não é comprovada em outros estudos, e, portanto, a presença de OTA no mosto e no vinho, pode ser atribuída ao desenvolvimento anterior do fungo na superfície da baga (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006b; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ; CARRASCOSA, 2009). O desenvolvimento destas espécies ocorre nas bagas e, possivelmente permanecem no mosto na fase inicial, antes do início do processo fermentativo, principalmente devido a presença de nutrientes.

Segundo Fredj, Chebil e Milik (2007), a interferência de outros fungos presentes na microbiota da uva, pode diminuir a produção de OTA em mostos. Em estudos anteriores, a presença de fungos filamentosos dos gêneros *Rhizopus* e *Mucor* foram capazes de degradar a OTA presente em mosto (VARGA et al., 2004).

A ocorrência de fungos ocratoxigênicos nas vinhas e a incidência de OTA em uvas, não estão particularmente restritos às condições climáticas, mas também depende de outros fatores relacionados com a variedade da uva e manejo de culturas, tais como, o sistema de condução, de irrigação e tratamentos fitossanitários, o que pode influenciar no ecossistema da videira. Este estudo demonstrou que as condições climáticas de três regiões vitivinícolas do Brasil,

pode influenciar na distribuição dos *Aspergillus* Seção *Nigri*, e que a presença de fungos ocratoxigênicos em uvas coletadas na região R3 demonstra os fatores de risco para a presença de OTA nestas uvas.

Apesar da presença de espécies ocratoxigênicas nas amostras de uvas deste estudo, dados da literatura indicam que os níveis de OTA detectados em vinhos e sucos de uva brasileiros tem sido considerados abaixo do limite estabelecido pela Comissão Europeia e a Legislação Brasileira (SHUNDO et al., 2006; TERRA et al., 2012).

4.1.1 Associação de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* e as variedades de uva *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*

Por meio do mapa gerado a partir da análise de correspondência, foi possível observar a relação das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* e as variedades de uva *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*. A primeira (PC1) e a segunda componente principal (PC2), explicam 59,44% e 65,78% da variância total, para as variedades labrusca e vinifera, respectivamente (Figuras 4 e 5).

Os resultados da Figura 4 mostram a formação de agrupamentos entre as variedades de uva *Vitis labrusca* e as espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*. As associações observadas foram entre as variedades Bôrdo e a espécie *A. japonicus* (A.j); *A.tubingensis* (A.t) e *A.foetidus* com BRS-Cora e as espécies *A. niger* Agregado (A.nag), *A. aculeatus* (A.a) e *A. carbonarius* (A.c), que apresentaram maior correlação com a variedade Isabel.

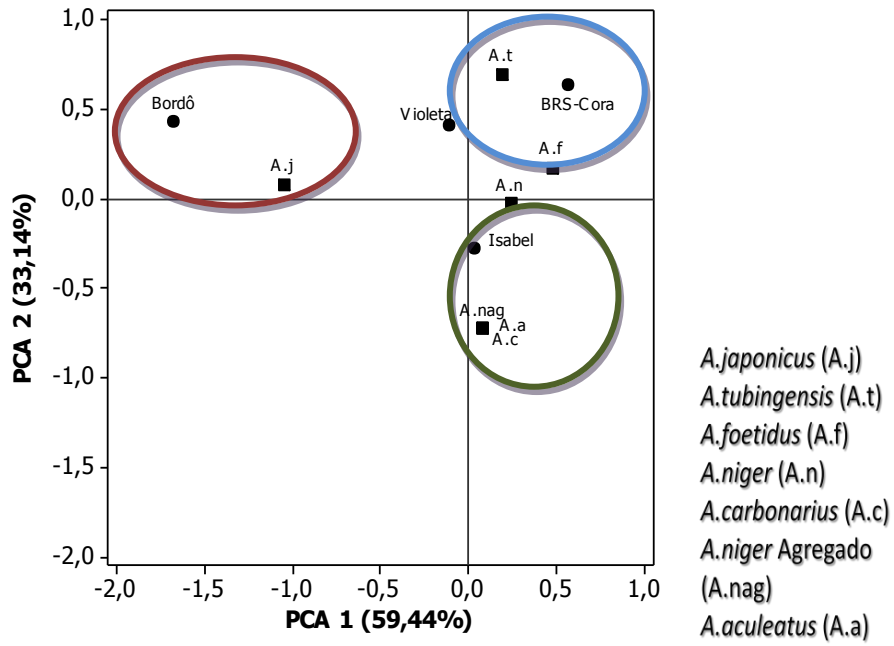


Figura 4 Mapa percentual das associações entre espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* e as variedades de uva *Vitis labrusca*

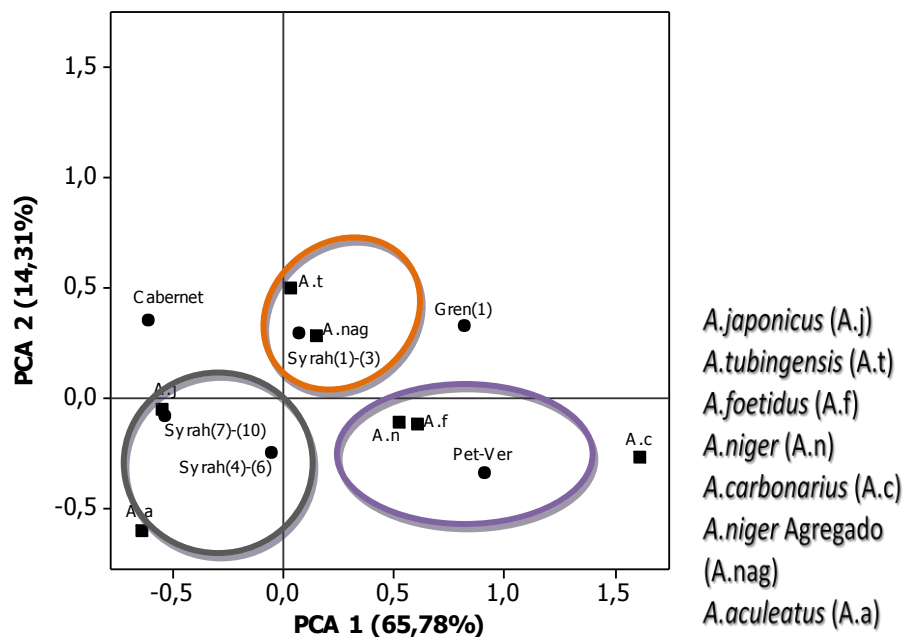


Figura 5 Mapa percentual das associações entre espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* e as variedades de uva *Vitis vinifera*

A análise mostra também a relação entre as variedades de uva *Vitis vinifera* e as espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*. Na figura 5 observa-se a formação do agrupamento entre as espécies *A. tubingensis* (A.t) e *A. niger* Agregado (A.nag) nas amostras da variedade Syrah (1) e (3).

Os resultados indicam que *A. niger* (A.n), *A. foetidus* (A.f) associaram-se a variedade Petit Verdot (Pet-Ver). As amostras da variedade Syrah (4), (6), (7) e (10) localizadas no eixo negativo do gráfico (quadrante inferior esquerdo), estiveram mais associadas com as espécies unisseriadas *A. aculeatus* e *A. japonicus*.

Estudos de frequência de ocorrência de fungos realizados em diferentes regiões produtoras de uva demonstram que as espécies bisseriadas, *A. carbonarius*, *A. niger* agregado, *A. niger*, *A. tubingensis* e *A. foetidus*, e as unisseriadas, *A. aculeatus* e *A. japonicus*, são predominantes (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; BELLÍ et al., 2004; PERRONE et al., 2007; ROSA et al., 2002; SERRA et al., 2003). Novas espécies unisseriadas e bisseriadas isoladas a partir da microbiota de uvas foram descritas na Seção *Nigri*, dentre estas, *A. ibericus* (SERRA et al., 2006a), *A. vadensis* (VRIES et al., 2007), *A. uvarum*, *A. aculeatinus* e *A. sclerotiiicarbonarius* (GEISER et al., 2007).

De acordo com Batillani et al. (2004), variedades de uvas responderam de maneira diferente quando inoculadas artificialmente com *Aspergillus carbonarius* e, das variedades estudadas, Cabernet Sauvignon foi o mais suscetível a esses fungos. Ao contrário, Leong (2005) observou que a variedade de uva não tem efeito direto sobre a incidência de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*. Contudo, algumas variedades foram mais suscetíveis ao dano e, portanto, são deterioradas por estas espécies. De acordo com estudos, a espessura da casca da uva pode ser um fator importante, contribuindo para a redução de danos, impedindo a infecção fúngica (BATTILANI et al., 2004; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

Neste estudo, verificou-se que as cultivares de *Vitis vinifera* L., demonstram maior susceptibilidade a incidência de espécies de *Aspergillus Nigri*, quando comparada com as variedades de *Vitis labrusca* e essa diferença foi estatisticamente significativa ($F=9,783$; $p=0,004$). Esta diferença pode estar relacionada com as propriedades e composição físico-químicas das uvas, bem como as práticas agrícolas utilizadas em cada região estudada, o tipo de solo, a variedade da uva, etc, entretanto, estudos mais detalhados são necessários para a confirmação destas hipóteses.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, as principais espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* isoladas foram *A.aculeatus*, *A.carbonarius*, *A.foetidus*, *A.japonicus*, *A.niger*, *A.niger* Agregado e *A.tubingensis*. Destas, *A.foetidus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A.japonicus* foram detectados em maior frequência nas três regiões estudadas (87%). Os fungos do gênero *Aspergillus* estão naturalmente presentes nas uvas, sementes e mostos das regiões vitivinícolas estudadas. As espécies produtoras de Ocratoxina A foram *A. carbonarius* e *A. niger*. Todos os isolados de *A. carbonarius* obtidos (24) foram produtores desta toxina, o que realça a importância desta espécie como a principal fonte de OTA para as uvas cultivadas na região do Vale do Submédio São Francisco. Estes resultados demonstram que as áreas de risco podem ser definidas com base na microbiota de cada região, contribuindo para o conhecimento das espécies de *Aspergillus* produtoras de ocratoxina A nas videiras em diferentes regiões do Brasil.

REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L. et al. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 1, p. 504-506, Dec. 2003.

ALBORCH, L. et al. Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 147, n. 2, p. 53-57, Mar. 2011.

BATTILANI, P. et al. Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 53-60, May 2006a.

_____. Mapping of *Aspergillus* Section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 72-82, Sept. 2006b.

_____. Ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Rome, v. 84, n. 1, p. 1736-1740, Aug. 2004.

BATTILANI, P.; GIORNI, P.; PIETRI, A. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 4, p. 633-636, Apr. 2003.

BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. S2-S4, May 2006a.

_____. Special Issue "Black aspergilli and ochratoxin A in grapes and wine, in Europe". **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. S1-98, 2006b. Supplement.

BATTILANI, P.; PIETRI, A. Ochratoxin A in grapes and wine. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 7, p. 639-643, Mar. 2002.

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. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 255, n. 6, p. 203-208, June 2006.

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

_____. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 38, n. 2, p. 72-77, Apr. 2004.

_____. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 46-52, Sept. 2006.

BENFORD, D. et al. Ochratoxin A. In: _____. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Geneva: WHO, 2001. p. 281-415. (WHO Food Additives Series, 47).

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. *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 1, p. 137-141, Mar. 2009.

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

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

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

FREDJ, S. M. B.; CHEBIL, S.; MILIK, A. Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyards. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 245-250, July 2007.

GEISER, D. M. et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Wageningen, v. 59, n. 2, p. 1-10, June 2007.

GUEDES, T. A. et al. Seleção de variáveis categóricas utilizando análise de correspondência e análise de procrustes. **Acta Scientiarum: Technology**, Maringá, v. 21, n. 1, p. 861-868, jan./dez. 1999.

GUPTA, R. C. **Ochratoxins and citrinin**. Oxford: Elsevier, 2007. 1003 p.

HOCKING, A. D. et al. Fungo and mycotoxins in vineyards and grape products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1/2, p. 84-88, Feb. 2007.

KAZÍ, B. A. et al. Incidence of *Aspergillus carbonarius* in Australia vineyards. In: OPHEL-KELLER, K.; HALL, B. (Ed.). **Australasian soil-borne disease symposium**. Melbourne: Tanunda South Australia, 2004. p. 75-76.

KHOURY, A. E. L. et al. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 46, p. 2244-2250, Feb. 2008.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Wageningen: Centraalbureau voor Schimmelcultuur, 2002. 116 p.

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of ochratoxin A: producing strains of the genus *Penicillium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 8, p. 3630-3635, Aug. 2001.

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

_____. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 376-379, Sept. 2007.

LASRAM, S. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 1, p. 1-23, Jan. 2012.

LEONG, S. L. **Black *Aspergillus* species: implications for ochratoxin A in Australian grapes and wine.** 2005. 234 p. Thesis (Ph.D. in Mycology and Mycotoxins) - University of Adelaide, Adelaide, 2005.

LEONG, S. L. et al. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. S10-S17, 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**, Melbourne, v. 10, n. 1, p. 83-88, Apr. 2004.

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; SCOTT, E. S. *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, Bedfordshire, v. 102, n. 1, p. 124-133, Jan. 2007.

_____. Ochratoxin A: from grapes to wine. In: AUSTRALIAN WINE INDUSTRY TECHNICAL CONFERENCE, 1., 2004, Melbourne. **Proceedings...** Melbourne: AWITC, 2004. p. 299.

_____. Survival and growth of *Aspergillus carbonarius* on wine grapes before harvest. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. S83-S87, 2006.

LUCCHETTA, G. et al. Occurrence of Black Aspergilli and Ochratoxin A on grapes in Italy. **Toxins**, Limerick, v. 2, n. 4, p. 840-855, Apr. 2010.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurements.** Sydney: Croom Helm, 1988. 179 p.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A. J.; CARRASCOSA, A. V. HACCP to control microbial safety hazards during winemaking: ochratoxin A. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 5, p. 469-475, Sept. 2009.

MATEO, R. et al. An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1, p. 79-83, July 2007.

MEDINA, A. et al. Study of Spanish mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4696-4072, Aug. 2005.

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**, Bedfordshire, v. 97, n. 2, p. 439-445, 2004.

OTTENEDER, H.; MAJERUS, P. Occurrence of ochratoxin A in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 2, p. 793-798, 2000.

PARDO, E. et al. Occurrence of ochratoxin fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, London, v. 10, n. 1, p. 45-49, Mar. 2004.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Micology**, Wageningen, v. 59, n. 1, p. 53-66, Feb. 2007.

_____. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, London, v. 72, n. 1, p. 680-685, Jan. 2006.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R. A. Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition and Food Research**, Toulouse, v. 51, n. 1, p. 61-99, Jan. 2007.

PITT, J. I. et al. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, North Ryde, v. 38, n. 1, p. 41-46, Apr. 2000. Supplement.

_____. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. In: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Joint FAO/WHO expert committee on food additives**. Rome, 2001. p. 281.

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

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. Vitivinicultura 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.

RINGOT, D. et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 15, n. 1, p. 18-46, 2006.

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

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

SAGE, L.; GARON, D.; SEIGLE-MURANDI, F. Fungal microflora and ochratoxin risk in French vineyards. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Grenoble, v. 52, n. 18, p. 5764-5768, Sept. 2004.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food and airborne fungi**. 7th ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 389 p.

SELMA, M. V.; MARTINEZ-CULEBRAS, P.; AZNAR, R. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 1/2, p. 126-134, Feb. 2008.

SERRA, R.; BRAGA, A.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 4, p. 515-521, Dec. 2005.

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

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

SERRA, R. et al. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. **The British Mycological Society**, Braga, v. 110, n. 2, p. 71-78, Aug. 2006b.

SHAH, H. U. et al. Mould incidence and mycotoxin contamination in maize kernels from Swat Valley, North West Frontier Province of Pakistan. **Food and Chemical Toxicology**, Easton, v. 48, n. 4, p. 1111-1116, Feb. 2010.

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

SOLFRIZZO, M. et al. Removal of Ochratoxin A from contaminated red wines by repassage over grape pomaces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 1, p. 317-323, Jan. 2010.

TERRA, M. F. et al. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal Science of Food Agriculture**, London, v. 2, n. 1, p. 1-6, July 2012.

TJAMOS, S. E.; ANTONIOU, P. P.; TJAMOS, E. C. *Aspergillus* spp, distribution, population, composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 61-66, Sept. 2006.

VARGA, J. et al. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 321-328, Dec. 2004.

VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin in grapes and grape-derived products. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 78-81, Feb. 2006.

VRIES, R. P. et al. *Aspergillus vadensis*, a new species of the group black aspergilli. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 87, n. 3, p. 195-203, Sept. 2007.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column clean-up: methodology and Swiss data. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 666, n. 1, p. 85-99, Apr. 1995.

_____. Ochratoxin A in table wine and grapejuice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 6, p. 655-668, Aug./Sept. 1996.

CAPÍTULO 4 Incidência de Ocratoxina A (OTA) em vinhos tintos e sucos de uva elaborados em três regiões brasileiras

RESUMO

A ocratoxina A é a micotoxina mais relevante e mais estudada em uvas e seus derivados, por ser comumente detectada nesses substratos e tóxica para animais e humanos. A OTA é metabólito secundário sintetizado principalmente por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Com o presente trabalho objetivou-se quantificar os níveis de ocratoxina A (OTA) em amostras de vinhos e sucos de uva obtidas experimentalmente. A quantificação da OTA das amostras foi realizada pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) estabelecidos foram de 0,01 µg/L e 0,03 µg/L, respectivamente. Foram analisados um total de 13 amostras de vinhos tinto e sucos de uva, obtidas a partir de variedades cultivadas nas regiões do Vale do Submédio São Francisco (Nordeste) e Sul de Minas Gerais. A contaminação pela OTA foi detectada em 6 (42,6%) das amostras analisadas, em concentrações que variaram de 0,02 a 0,78 µg/L. O nível mais elevado da OTA foi encontrado na amostra de vinho elaborado a partir da variedade Petit Verdot cultivada no Vale do Submédio São Francisco. Os fatores climáticos dessa região podem ter favorecido a presença de fungos ocratoxigênicos. Os níveis de OTA detectados foram inferiores ao limite máximo tolerável para esta toxina em vinho e suco de uva estabelecido pela Legislação Europeia e a Legislação Brasileira de 2,0 µg/L⁻¹.

Palavras-chave: Vinho tinto. Suco de Uva. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. *Aspergillus* Seção *Nigri*.

ABSTRACT

Ochratoxin A is the most relevant and studied mycotoxin in grapes and derivatives, for being commonly detected in this substrate and toxic for animals and humans. The OTA is a secondary metabolite mainly synthesized by species of the genus *Aspergillus* and *Penicillium*. This work aimed at quantifying the levels of ochratoxin A (OTA) in wine and grape juice samples obtained experimentally. The quantification of OTA in the samples was done by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) method with detection by fluorescence. The detection (DL) and quantification limits (QL) established were of 0.1 µg/L and 0.03 µg/L, respectively. A total of 13 samples of red wines and grape juices were analyzed, obtained from varieties cultivated in the Vale Submédio São Francisco (Northeast) and South of Minas Gerais regions. The contamination by OTA was detected in 6 (42.6%) of the analyzed samples, in concentration that varied from 0.02 to 0.78 µg/L. The most elevated level of OTA was found in the wine sample prepared from the Petit verdot variety cultivated in the Vale Submédio São Francisco. The weather factors of this region may have favored the presence of OTA producing fungi. The levels of OTA detected were inferior to the maximum limit tolerated for this toxin in wine and grape juice of 2.0 µg/L, established by European and Brazilian Legislation.

Key-words: Red wine. Grape juice. High-Performance Liquid Chromatography. *Aspergillus nigri* section.

1 INTRODUÇÃO

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. A ocratoxina A foi originalmente isolada como um metabólito secundário do fungo filamentoso *Aspergillus ochraceus* (MERWE et al., 1965). Em anos subsequentes, muitas outras espécies de *Aspergillus* como *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. sulphureus* e *A. melleus* (ABARCA et al., 1994; CIEGLER, 1972) entre outras foram descritas como produtoras de ocratoxina A.

OTA tem despertado atenção mundial pelas suas propriedades nefrotóxica, imunossupressiva, teratogênica e carcinogênica (LEA; STEIEN; STORMER, 1989; SOLFRIZZO et al., 2010), sendo classificada pela “International Agency for Research on Cancer” como um possível carcinógeno para humanos (categoria 2B) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 1993; KUIPER-GOODMAN; SCOTT, 1989; PETZINGER; ZIEGLER, 2000).

A presença de ocratoxina A em alimentos vem sendo considerada um problema mundial de saúde pública. Em uma grande variedade de produtos agrícolas em várias regiões geográficas do mundo já foi detectada a ocratoxina A (AMÉZQUETA et al., 2012; URBANO et al., 2001). Sua ocorrência tem sido relatada em uma grande variedade de alimentos e bebidas, incluindo suco de uva e vinho (MAJERUS; OTTENEDER, 1996; QUINTELA et al., 2011; ZIMMERLI; DICK, 1995, 1996).

A presença da OTA em suco de uva e vinhos foi descrita pela primeira vez por Zimmerli e Dick (1995). Desde então, várias pesquisas têm sido conduzidas em diferentes países em relação à ocorrência da OTA em vinhos (HOCKING et al., 2007; PIETRI et al., 2001; SAGE et al., 2002).

De acordo com Solfrizzo et al. (2006), os níveis de OTA podem variar em função do tipo de vinho, da safra e da região vitivinícola. Estudos realizados com sucos de uva e vinhos de origem brasileira e argentina demonstraram que os níveis de OTA são inferiores aos observados em países da Europa (CHULZE; MAGNOLI; DALCERO, 2006; TERRA et al., 2012).

Em países da Europa, vários estudos têm sido realizados para mapear áreas de risco e apontar os pontos críticos de controle, o que auxilia na prevenção e controle dos níveis de OTA em uvas, suco e vinhos (CABAÑES et al., 2002; OTTENEDER; MAJERUS, 2000; ZIMMERLI; DICK, 1996).

A presença de OTA em suco de uva é uma questão de preocupação, porque pode ser fonte principal de ingestão de OTA por crianças (ZIMMERLI; DICK, 1996). A legislação brasileira recentemente estabeleceu o limite máximo permitido de OTA em vinho e suco de uva de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ (BRASIL, 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência e os níveis de OTA em vinhos tintos experimentais e sucos elaborados na região do Vale do Submédio São Francisco (Nordeste), e em vinhos elaborados no Sul de Minas Gerais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Regiões avaliadas

As amostras de vinho tinto e suco de uva foram obtidas de cultivares *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca* nas regiões Sul de Minas Gerais (municípios de Caldas e Três Corações) e Vale do Submédio São Francisco (Casa Nova (BA) e Petrolina (PE)). A região Sul de Minas Gerais situa-se a 21°S 40°O e altitude de 1.150 m. O clima é caracterizado como subtropical, com temperatura média anual de 19 °C, precipitação média de 1.500 mm e umidade relativa do ar de 75%. O Vale do Submédio São Francisco ao contrário, situa-se no trópico Semiárido brasileiro, em latitude 9°S, longitude 40°O e altitude em torno de 350 m. Apresenta indicadores climáticos médios de 500 mm de precipitação, temperatura média de 26 °C e 50% de umidade relativa. Esta região é considerada como a principal região vitivinícola tropical brasileira, destacando-se das demais regiões e também das áreas tradicionais de uva e vinho do mundo devido a produção de uvas durante todo o ano, isso devido as condições climáticas e a disponibilidade de água para a irrigação dos vinhedos.

2.2 Amostras

Um total de 9 amostras de vinhos tintos (sendo 5 coletadas na região do Vale do Submédio São Francisco - região R3) e 4 na região Sul de Minas Gerais - região R1), e 4 amostras de suco de uva (coletadas na região do Vale do Submédio São Francisco), elaborados experimentalmente a partir de variedades de uvas *Vitis vinifera* L., utilizadas para a elaboração de vinhos finos e, *Vitis labrusca* utilizadas para a elaboração de vinho de mesa e suco de uva,

respectivamente. Os vinhos elaborados a partir das variedades Grenache (1), Syrah (1), Petit Verdot (1), Syrah (2), Petit Verdot (2), Syrah (1), BRS Violeta (1), Syrah (2) e Bôrdo (1), foram obtidos das safras de 2010 e 2011 (Tabela 1).

A vinificação experimental foi realizada através do método tradicional (PEYNAUD, 1997), em cubas de aço inox de 200 litros. As fermentações alcoólica e malolática foram realizadas a 25 °C e 18 °C. Em seguida os vinhos foram estabilizados e engarrafados.

Tabela 1 Amostras de vinho tinto e suco de uva analisadas

| Amostras de vinho tinto | Produto | Período de elaboração (mês/ano) | Local de elaboração (Região) |
|--------------------------------|----------------|--|-------------------------------------|
| Grenache (1) | Vinho Tinto | 09/2010 | PE (R3) |
| Syrah (1) | Vinho Tinto | 07/2011 | PE (R3) |
| Petit Verdot (1) | Vinho tinto | 03/2010 | PE (R3) |
| Syrah (2) | Vinho Tinto | 03/2010 | PE (R3) |
| Petit Verdot (2) | Vinho Tinto | 09/2010 | PE (R3) |
| T1R3 | | | |
| Syrah (5) | Vinho Tinto | 11/2010 | MG (R1) |
| Syrah (2) | Vinho Tinto | 11/2010 | MG (R1) |
| BRS Violeta (1) | Vinho Tinto | 12/2010 | MG (R1) |
| Bordô (1) | Vinho Tinto | 01/2011 | MG (R1) |
| BRS-Cora (1) 572 | Suco | 03/2010 | PE (R3) |
| Isabel IAC 572 (1) | Suco | 09/2010 | PE (R3) |
| BRS Violeta (2) | Suco | 08/2010 | PE (R3) |
| Isabel IAC 572 | Suco | 03/2010 | PE (R3) |

As amostras de suco de uva analisadas foram elaborados a partir das variedades BRS Cora (1) IAC 572-T3R2, Isabel Precoce (1) IAC 572, BRS Violeta (1) e Isabel Precoce (2) IAC 572 T2R1, obtidas na região Vale do Submédio São Francisco. Os sucos foram elaborados em suqueira artesanal (capacidade para 20 litros) e a extração realizada a 75 °C com resfriamento rápido, seguido do engarrafamento.

2.3 Análise de OTA

A quantificação da OTA nas amostras de vinhos tintos e sucos de uva foi realizada pelo método de Cromatografia de Camada Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e, detecção por fluorescência, de acordo com EN 14133/2003 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION - EC, 2003).

2.3.1 Soluções e reagentes

A solução de diluição do vinho foi preparada com a dissolução de 10 g de Polietilenoglicol 8000 e 50 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) em 1000 mL de água purificada (q.s.p). Para a obtenção da solução de lavagem dissolveu-se 25 g de cloreto de sódio (NaCl) e 5 g de bicarbonato de sódio em 1000 mL de água purificada (q.s.p). A solução estoque da OTA Sigma (St. Louis, MO, USA), foi preparada em tolueno: ácido acético (99:1, v/v). A concentração foi determinada através de Espectrofotômetro UV a 333 nm, com $\epsilon = 5440 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. A solução de trabalho foi preparada por diluição apropriada em tolueno: ácido acético (99:1, v/v), para os testes de recuperação e curva de calibração. Para o preparo da fase móvel foi utilizado acetonitrila:metanol:ácido acético aquoso (35:35:30), e filtrados a vácuo em membrana de celulose regenerada PTFE de 0,45 μm . O ácido acético foi preparado com solução de ácido acético glacial em água purificada (1:29, v/v). As soluções foram armazenadas de $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ no escuro.

2.3.2 Preparo das amostras e purificação em coluna de imunoafinidade

As amostras de suco e vinho foram resfriadas a 4 °C e amostrado uma alíquota de 40 mL as quais foram diluídas com 40 mL da solução de diluição e homogeneizados sob agitação mecânica em shaker, a uma velocidade média, durante 30 minutos. A solução foi submetida à filtração a vácuo (2 mL/min) em membrana GFA e 40 mL do filtrado foi transferido para a coluna de imunoafinidade (Ochraprep, R-Biopharm Rhône Ltd) adaptada ao sistema VisiprepTM SPE *Vacuum Manifold*. A coluna foi lavada com 10 mL da solução de lavagem e, em seguida, com 10 mL de água purificada para a remoção de resíduos não-específicos. Logo após foi adicionado 2 mL de metanol à coluna para a eluição da OTA vinculada ao anticorpo, sendo o procedimento realizado por três vezes. O eluato obtido foi evaporado com aquecimento (\pm 50 °C) da amostra sob atmosfera de nitrogênio. Este extrato seco foi reconstituído em 250 μ L de fase móvel. O volume injetado no cromatógrafo líquido foi de 50 μ L, tanto para as amostras quanto para os padrões.

2.3.3 Quantificação por CLAE

A quantificação foi conduzida em um sistema de cromatografia líquida Shimadzu com detector de fluorescência (Modelo LC-10AD) em comprimentos de onda de 333 e 476 nm para excitação e emissão respectivamente. Utilizou-se a coluna Shim-pack CLC-ODS RP-18 (5 μ m; 4,6 x 250 mm), precedida da pré-coluna Shim-pack G-ODS (5 μ m; 4,0 x 10 mm), com fluxo de 0,8 mL/min. A presença da OTA foi confirmada pela formação de ésteres metílicos, sendo observado um aumento no tempo de retenção das amostras devido a derivatização da OTA. A partir do cálculo da área dos picos de OTA dos

extratos das amostras e das soluções padrões foi quantificado o teor de OTA das amostras. Nas condições de análise o tempo de retenção foi de aproximadamente 11 min. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram 0,01 µg/L e 0,3 µg/L, respectivamente.

2.3.4 Eficiência da metodologia analítica

Para avaliar o desempenho da metodologia analítica utilizada, foi realizado testes de recuperação pela adição de OTA em amostras de vinho e suco de uva não contaminadas. A amostra de vinho foi fortificada em cinco repetições, com duas concentrações de OTA: 0,22 µg/L e 0,44 µg/L. A amostra de suco foi fortificada, em duas repetições, com a concentração de 2,78 µg/L de OTA. A linearidade foi calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Foi utilizado o coeficiente de correlação linear (R^2) como indicador da reta, como modelo matemático.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Padronização da metodologia analítica

A curva de calibração obtida a partir da equação de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados, foi linear na faixa de 0,6 a 111 µg/L. Os valores de R^2 obtidos foram maiores que 0,99, conforme recomendado por Green (1996).

Os valores de recuperação e os coeficientes de variação para vinho foram em média 72,5% e 26,1% e para suco 95% e 2,7 % (Tabelas 3 e 4). Estes resultados estão de acordo com os recomendados por EC 401/2006 (COMMISSION REGULATION, 2006) para concentrações inferiores a 1,0 µg/L e entre 1,0 µg/L e 10 µg/L.

Tabela 2 Valores de recuperação de Ocratoxina A das amostras de vinho (n=5)

| Concentração (µg/L) | Quantidade Recuperada (µg/L) | Média (µg/L) | Recuperação (%) | Coefficiente de Variação (%) |
|---------------------|------------------------------|--------------|-----------------|------------------------------|
| 0,22 | 0,21 | 0,16 | 71,0 | 21,07 |
| | 0,14 | | | |
| | 0,11 | | | |
| | 0,18 | | | |
| | 0,14 | | | |
| 0,44 | 0,50 | 0,33 | 74,0 | 31,18 |
| | 0,24 | | | |
| | 0,27 | | | |
| | 0,31 | | | |
| | 0,31 | | | |

n= número de repetições

Tabela 3 Valores de recuperação de Ocratoxina A das amostras de suco de uva (n=2)

| Concentração (µg/L) | Quantidade Recuperada (µg/L) | Média (µg/L) | Recuperação (%) | Coefficiente de Variação (%) |
|---------------------|------------------------------|--------------|-----------------|------------------------------|
| 2,78 | 2,70 | 2,65 | 95,0 | 2,67 |
| | 2,60 | | | |

n= número de repetições

3.2 Incidência de Ocratoxina A (OTA) em vinhos experimentais e sucos de uva obtidos nas regiões do Sul de Minas Gerais e Vale do Submédio São Francisco

A contaminação pela OTA foi detectada em 6 (42,6%) das amostras analisadas, em concentrações que variaram de 0,02 a 0,78 µg/L. O nível mais elevado da toxina foi encontrado no vinho produzido no Vale do Submédio São Francisco, localizado na região Nordeste do Brasil (latitude 9 °S, longitude 40 °O), onde das cinco amostras de vinhos tinto analisadas, quatro (80%) apresentaram contaminação.

Das amostras de vinhos tinto obtidas na região do Vale do Submédio São Francisco, a que apresentou maior nível de contaminação foi da variedade Petit Verdot (1) (0,78 µg/L) (Gráfico 1).

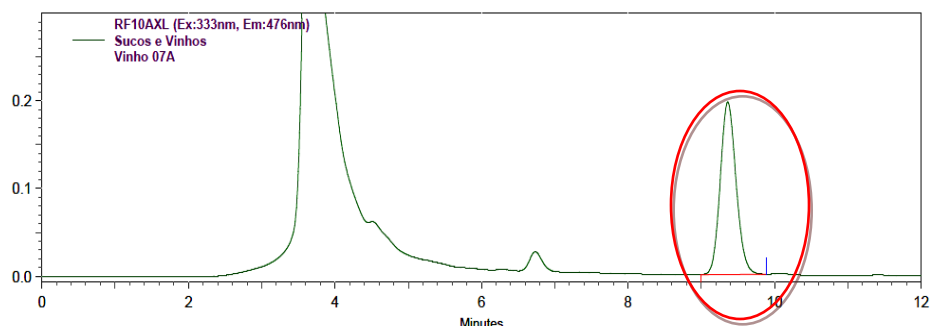


Gráfico 1 Cromatograma da amostra de vinho tinto elaborado a partir da variedade Petit Verdot (1), obtida na região do Vale do Submédio São Francisco (Nordeste)

Nas amostras de vinho tinto elaborados a partir das variedades Syrah (1), Syrah (2) e Petit Verdot (2), os níveis de OTA detectados foram (0,15; 0,03 e 0,02 $\mu\text{g/L}$), respectivamente. O vinho tinto em que a OTA não foi detectada ou que a concentração foi inferior ao LQ (30 ng l^{-1}) foi obtido na variedade Grenache (1). As concentrações de OTA detectadas nestas amostras não parece estar relacionada a variedade da uva, e sim, as condições climáticas do período de colheita.

Embora tenha sido detectada a presença de OTA nos vinhos tintos elaborados no Vale do Submédio São Francisco, os níveis detectados são considerados baixos, sendo inferiores ao limite tolerável estabelecido pela Comissão Europeia e a Legislação Brasileira (2,0 $\mu\text{g/L}$) em vinhos e sucos de uva (BRASIL, 2011; COMMISSION REGULATION, 2005).

Os baixos níveis de OTA detectados nas amostras de vinhos estudadas pode estar relacionado com o clima tropical semiárido da região do Vale do Submédio São Francisco, onde temperaturas mais elevadas são observadas ao longo de todo o ano (média de 27 $^{\circ}\text{C}$) e o clima é menos úmido. As temperaturas

mais elevadas na região podem favorecer o desenvolvimento de espécies de *A.carbonarius*, entretanto, podem inibir a produção da OTA.

De acordo com estudos, a presença de fungos ocratoxigênicos e a produção da OTA em uvas e seus produtos, são diretamente influenciados por fatores climáticos (BELLÍ et al., 2005; LASRAM et al., 2010; MAGAN; MEDINA; ALDRED, 2011). Segundo Bellí et al. (2005) e Mitchell et al. (2004), as condições ideais para que ocorra a produção de OTA é na faixa 15-20 °C e a_w 0,92-0.99, em contraste com o crescimento que ocorre a cerca de 30 °C.

Segundo Lasram et al. (2010), em países onde as temperaturas são mais baixas, são registrados níveis mais elevados de contaminação por OTA, do que em países tropicais. Isto tem sido demonstrado em alguns estudos, que demonstram que os níveis de OTA em vinhos brasileiros são baixos, quando comparados aos vinhos europeus (ANLI et al., 2005; BURDASPAL; LEGARDA, 1999; FINOLI et al., 2004; FLAJS et al., 2009; KROUGER; FERNANDES; ROSA, 2012; LOPEZ et al., 2002; MIKULIKOVÁ et al., 2012; QUINTELA et al., 2011; RATOLA et al., 2004; SHEPHARD et al., 2003; SHUNDO et al., 2006; SOUFLEROS; TRICARD; BOULOUMPASI, 2003; SPADARO et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2011; TERRA et al., 2012; VALERO et al., 2008).

Shundo et al. (2006) relataram em seus estudos que os níveis de OTA em vinhos tintos brasileiros variou 0,1-1,33 $\mu\text{g/L}^{-1}$. No entanto, os autores sugerem que, embora o conteúdo de OTA nos vinhos brasileiros seja baixo, a exposição pequena e contínua a esta micotoxina pode representar um risco para a saúde humana.

Recentemente, Terra et al. (2012) analisaram a presença de OTA em vinhos tinto e branco e suco de uva na região do Vale do Submédio São Francisco. A presença da toxina foi detectada em 13 (38,24%) das amostras analisadas, com concentrações que variam de 0,03-0,62 mg L^{-1} . Estes autores

não observaram níveis detectáveis de OTA em nenhuma das amostras de suco de uva analisadas.

Com relação as amostras de suco obtidas no Vale do Submédio São Francisco, das quatro amostras analisadas em apenas uma foi detectada a presença da OTA. A variedade BRS Violeta (2) apresentou concentração de 0,03 µg/L (Gráfico 2). Em um estudo anterior, realizado no Brasil, nenhuma das 38 amostras de suco de uva testadas apresentaram contaminação com OTA (SHUNDO et al., 2006).

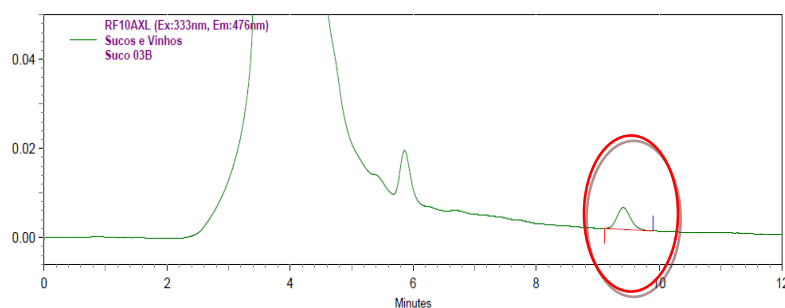


Gráfico 2 Cromatograma da amostra de suco de uva elaborado a partir da variedade BRS Violeta (2), obtida na região do Vale do Submédio São Francisco (Nordeste)

Este resultado pode ser atribuído a alguns fatores, tais como, a variedade de uva, a origem geográfica, as condições climáticas e / ou das práticas de cultivo, o que pode afetar o crescimento de fungos ocratoxigênicos e a produção de OTA. Outra hipótese é que os sucos brasileiros são elaborados a partir de variedades *Vitis labrusca*, que são mais resistentes a podridões e doenças fúngicas e o processamento na maioria dos casos ocorre de forma artesanal em extrator caseiro (suqueira), onde sofre o processo de pasteurização (± 85 °C), que possivelmente reduziria a concentração da OTA neste produto. Ao contrário dos sucos produzidos em países da Europa, onde a elaboração ocorre a partir de uvas

Vitis vinifera, relatadas como mais susceptíveis a podridão e infecção fúngica e o processo de elaboração do suco ocorre a frio.

Existem poucas informações disponíveis na literatura sobre a ocorrência de OTA em sucos de uva para confirmar estas hipóteses (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; ROSA et al., 2004).

Ao contrário do que tem sido observado em sucos de uva brasileiros, outros estudos realizados na Europa relatam que o suco de uva é mais contaminado com OTA do que o vinho, embora concentrações similares de ocratoxina A tenham sido observadas em suco de uva e vinho tinto, mostrando que a OTA não era degradada durante o processo de vinificação (DACHOUPAKAN et al., 2009; MAJERUS; BRESCH; OTTENEDER, 2000; ZIMMERLI; DICK, 1996).

Wolff et al. (2000) analisaram 73 amostras de suco de uva, observaram que apenas 8 amostras estavam livres da contaminação com OTA, enquanto que as demais continham níveis que variaram entre 10 a 5300 µg/L. O estudo sobre a ocorrência de OTA em sucos de uva é necessário, por ser um produto muito consumido pelas crianças e pelo fato do consumo de suco ser maior do que o do vinho (VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

Das quatro amostras de vinho tinto obtidas na região do Sul de Minas Gerais, apenas na variedade Syrah (2), foi detectada a presença de OTA, na concentração de 0,16 µg/L (Gráfico 3). Os vinhos tinto em que a OTA não foi detectada ou que a concentração foi inferior ao LQ (30 ng L⁻¹) foi obtido nas variedades Syrah (1), BRS Violeta (1) e Bôrdo (1).

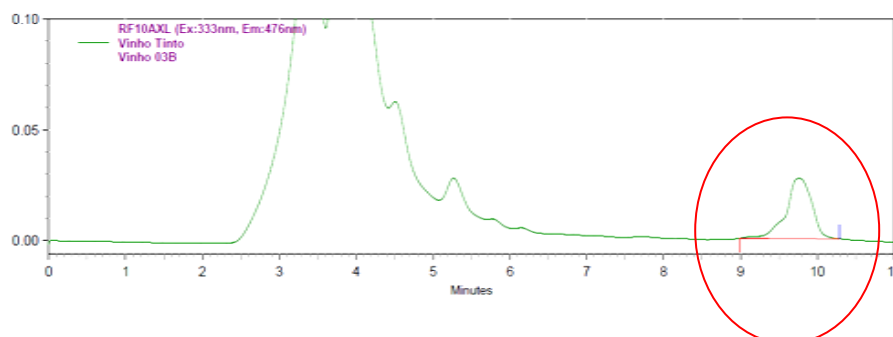


Gráfico 3 Cromatograma da amostra de vinho tinto elaborado a partir da variedade Syrah (2), obtida na região Sul de Minas Gerais

Assim como nas amostras de vinho da região do Vale do Submédio São Francisco, o nível de OTA detectado na amostra da região Sul de Minas Gerais, é considerado inferior ao estabelecido pela Comissão Europeia e pela Legislação Brasileira (2,0 µg/L) em vinhos e sucos de uva (BRASIL, 2011; COMMISSION REGULATION, 2005). Estes resultados confirmam que o clima tropical do Brasil é menos favorável a produção de OTA quando comparado com resultados obtidos para vinhos de países europeus.

A diferença na concentração da OTA detectada nas duas regiões estudadas pode estar relacionada as diferenças quanto à região de origem dos vinhos, onde a incidência de fungos produtores de OTA nas uvas parece ser maior na região do Nordeste, em que as condições semiáridas, com precipitações mais baixas e temperaturas mais elevadas favorecem principalmente o desenvolvimento de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*.

Estudos demonstram que a condição favorável para o crescimento de *A.carbonarius*, principal espécie produtora de OTA em uvas, ocorre na faixa de 25-35 °C, como a temperatura média alcançada na região Sul de Minas Gerais na época da colheita gira em torno de 19-22 °C, as condições climáticas do período de colheita destas uvas provavelmente não favoreceram o desenvolvimento de

espécies ocratoxigênicas e a produção da toxina nesta região, embora a temperatura ideal para a produção da OTA situe-se entre 15 a 20 °C (BELLÍ et al., 2004a; ESTEBAN et al., 2004, 2006; LEONG; HOCKING; SCOTT, 2006; MITCHELL; ALDRED; MAGAN, 2003).

Outra hipótese é que, nesta região, as principais espécies isoladas das amostras coletadas no período de maturação foram pertencentes ao gênero *Penicillium*. A ocorrência da OTA neste gênero é associada as espécies *P.verrucosum* (PETZINGER; ZIEGLER, 2000; SCHLATTER; STRUDER-ROHR; RASONYI, 1996) e *P.nordicum* (LARSEN; SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001). Entretanto, estas duas espécies não foram isoladas neste estudo.

De acordo com Zimmerli e Dick (1996), os vinhos tintos apresentam níveis mais elevados de OTA que os vinhos branco e rosé. O vinho tinto é mais susceptível à contaminação com OTA devido as condições de processamento, em que a temperatura elevada e as condições de aerobiose associados com a dissolução dos corantes naturais produzem contato intensivo com as potenciais toxinas que produzem os fungos (BATILLANI; GIORNI; PIETRI, 2003; BEJAOUI et al., 2006; BELLÍ et al., 2004b, 2004c; LASRAM et al., 2007; MAJERUS; BRESH; OTTENEDER, 2000; PONSONE et al., 2010).

Segundo Lasram et al. (2008), é na fase da maceração que ocorre maior extração da OTA das uvas, indicando que a casca é a principal fonte de contaminação da toxina. No vinho branco a contaminação é menor após o esmagamento as partes sólidas da uva são separadas do mosto, permitindo um tempo menor de contato entre cascas e sementes, o que provavelmente contribui para uma maior remoção da toxina nestes vinhos. Além disso, a adição de bentonita durante a clarificação do vinho branco, atua como adsorvente da OTA (HUWING et al., 2001).

A realização de novos estudos sobre a contaminação da OTA em vinhos e sucos de uva em diferentes regiões do Brasil torna-se necessário para se obter informações sobre os fatores que contribuem para a presença e os níveis da toxina nestes produtos. Além de contribuir para o desenvolvimento de métodos que ajudem a minimizar os riscos e garantir baixos níveis da OTA em uvas e derivados.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, o maior teor de OTA (0,78 µg/L) foi detectado na amostra de vinho tinto elaborado a partir da variedade de uva Petit Verdot (1) obtida na região do Vale do Submédio São Francisco. Das amostras de suco de uva analisadas nesta região apenas na cultivar BRS Violeta foi encontrada a OTA, com teor de 0,02 µg/L. Na região Sul de Minas Gerais a OTA foi encontrada no vinho tinto da variedade Syrah (2) na concentração de 0,15 µg/L. Embora tenha sido observada a presença desta micotoxina nos vinhos de ambas as regiões e no suco do Vale do Submédio São Francisco, os valores de OTA são inferiores ao limite máximo estabelecido pela Comissão Européia e pela Legislação Brasileira de (2,0µg/L).

REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L. et al. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, 1994.

AMÉZQUETA, A. et al. OTA-producing fungi in foodstuffs: a review. **Food Control**, Guildford, v. 26, n. 2, p. 259-268, Jan. 2012.

ANLI, E. et al. Ochratoxin A in Turkish wines. **Journal of Food Biochemistry**, London, v. 29, n. 6, p. 611-623, Dec. 2005.

BATTILANI, P.; GIORNI, P.; PIETRI, A. Epidemiology of toxin producing fungi and ochratoxin A occurrence em grape. **European Journal of plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 715-722, Apr. 2003.

BEJAOU, H. et al. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* Section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 255, n. 6, p. 203-208, June 2006.

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

_____. 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.

_____. Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 1, p. 541-546, Mar. 2004b.

_____. Ochratoxin A in wine, musts and grape juices from Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 6, p. 591-594, Apr. 2004c.

BRASIL. **Resolução RDC nº 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

BURDASPAL, P. A.; LEGARDA, T. M. Ocratoxina a en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en Espana y en otros paises eropeos. **Alimentaria**, Bogotá, v. 299, n. 1, p. 107-113, Feb. 1999.

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.

CHULZE, S. N.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 5-9, Sept. 2006.

CIEGLER, A. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 18, n. 5, p. 631-636, 1972.

COMMISSION REGULATION. Amending regulation (EC) n° 466/2001 as regards ochratoxin A: text with EEA relevance n° 123/2005 of 26 january 2005. **Official Journal of the European Union**, Berlin, v. 25, p. 3-5, 2005. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF>>. Acesso em: 26 jan. 2012.

_____. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs: text with EEA relevance n° 401/2006 of 23 february 2006. **Official Journal of the European Union**, Berlin, v. 70, p. 12-34, 2006. Disponível em: <<http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/es401-2006.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2012.

DACHOUPAKAN, C. et al. Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black *Aspergillus* isolated from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 132, n. 2, p. 14-23, 2009.

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

_____. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 7, p. 634-640, Oct. 2006.

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

FINOLI, C. et al. Ochratoxin A occurrence in Italian wines of different origins. **Rivista di Viticoltura e di Enologia**, La Rioja, v. 57, n. 3, p. 63-77, 2004.

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

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry News & Features**, Heidelberg, v. 68, n. 9, p. 305-309, June 1996.

HOCKING, A. D. et al. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1/2, p. 84-88, Feb. 2007.

HUWIG, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 179-188, June 2001.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some naturally occurring substances:** food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, 1993. 521 p. (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans, 56).

KRUGER, C. D.; FERNANDES, A. M.; ROSA, C. A. R. Ochratoxin A in wines from 2002 to 2008 harvest marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives and Contaminants: Part B**, London, v. 5, n. 3, p. 204-207, Sept. 2012.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P. M. Review: risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. **Biomedical and Environmental Sciences**, San Diego, v. 2, p. 179-248, 1989.

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of ochratoxin A: producing strains of the genus *Penicillium*. **Applied Environmental Microbiology**, Lyngby, v. 67, n. 8, p. 3630- 3635, Aug. 2001.

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

_____. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Amsterdam, v. 114, n. 3, p. 376-379, Mar. 2007.

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

LEA, T.; STEIEN, K.; STORMER, C. Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 107, n. 2/3, p. 153-159, Sept. 1989.

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 a simulated grape juice medium. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 110, n. 3, p. 209-216, Apr. 2006.

LOPEZ, C. A. et al. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. **Food Additives and Contaminants**, Oxford, v. 19, n. 11, p. 1058-1064, Nov. 2002.

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

MAJERUS, P.; BRESCH, H.; OTTENEDER, H. Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. **Archives Lebensmittel**, Berlin, v. 51, n. 4/5, p. 95-97, Jan. 2000.

MAJERUS, P.; OTTENEDER, H. Nachweis und Vorkommen von Ochratoxin A in Wein und Traubensaft. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, Stuttgart, v. 92, n. 1, p. 388-390, Aug. 1996.

MERWE, K. J. van der et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite. **Nature**, London, v. 65, p. 1112-1113, Mar. 1965.

MIKULÍKOVÁ, R. et al. Study of ochratoxin A content in South Moravian and foreign wines by the UPLC method with fluorescence detection. **Food Chemistry**, Easton, v. 133, n. 1, p. 55-59, Jan. 2012.

MITCHELL, D.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* from different regions of Europe. **Aspects of Applied Biology**, London, v. 68, n. 4, p. 109-116, Oct. 2003.

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**, Bedfordshire, v. 97, n. 2, p. 439-445, July 2004.

OTTENEDER, H.; MAJERUS, P. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 9, p. 793-798, Sept. 2000.

PETZINGER, E.; ZIEGLER, K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 91-98, Apr. 2000.

PEYAUD, E. **Connaissance et travail du vin**. Paris: Dunod, 1997. 341 p.

PIETRI, A. et al. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 7, p. 647-654, July 2001.

PONSONE, M. L. et al. Ochratoxina A (OTA) Y Hongos ocratoxigénicos en uvas Y vinos en Argentina. **Revista Enologia**, Mendoza, v. 1, p. 5-17, ene./feb. 2010.

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

RATOLA, N. et al. Ochratoxin A in wines: assessing global uncertainty associated with the results. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 513, n. 1, p. 319-324, June 2004.

ROSA, R. C. A. et al. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 21, n. 4, p. 358-364, Apr. 2004.

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

SCHLATTER, C. H.; STRUDER-ROHR, J.; RASONYI, T. H. Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 13, p. 43-44, 1996.

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

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

SOLFRIZZO, M. et al. Determination of ochratoxin A in grape and winery by-products by immunoaffinity column cleanup and HPLC/fluorescence detection. **American Chemical Society National Meeting & Exposition**, San Francisco, n. 140, p. 10-14, Sept. 2006.

_____. Removal of Ochratoxin A from contaminated red wines by repassage over grape pomaces. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 1, p. 317-323, Jan. 2010.

SOUFLEROS, E. H.; TRICARD, C.; BOULOUMPASI, E. C. Occurrence of ochratoxin A in Greek wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 83, n. 3, p. 173-179, Jan. 2003.

SPADARO, D. et al. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 24, p. 123-134, Mar. 2002.

TEIXEIRA, T. R. et al. Determination of ochratoxin A in wine from the southern region of Brazil by thin layer chromatography with a charge-coupled detector. **Food Additives and Contaminants: Part B**, London, v. 4, n. 4, p. 289-293, Dec. 2011.

TERRA, M. F. et al. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal Science of Food Agriculture**, London, v. 2, n. 1, p. 1-6, July 2012.

URBANO, G. R. et al. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, Aug. 2001.

VALERO, A. et al. Survey: ochratoxin A in European special wines. **Food Chemistry**, Easton, v. 108, p. 593-599, May 2008.

VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 72-81, Feb. 2006.

WOLFF, H. et al. Ochratoxin A: contamination of foods and consumer exposure. **Archived Lebensmittel**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 81-128, Apr. 2000.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by HPLC with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column clean-up methodology and Swiss data. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 666, n. 1, p. 85-89, Apr. 1995.

_____. Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 6, p. 655-668, Nov./Dec. 1996.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Brasil tem desenvolvido uma capacidade excepcional para a produção de vinhos de qualidade, visto a sua extensão territorial e regiões produtoras de vinho com características marcantes devido a sua diversidade e complexidade. Atualmente o país é considerado uma das melhores regiões no mundo para o cultivo de uvas destinadas a produção de vinhos espumantes (INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO - IBRAVIN, 2012). O Vale do Submédio São Francisco, por exemplo, tem apresentado um intenso desenvolvimento nos últimos anos. Trata-se da única região do mundo que produz uvas o ano todo e em condições semiáridas, sendo possível, dependendo da cultivar, colher de duas a três safras anualmente. Esta característica vem fazendo com que esta região tenha a devida reputação e seja conhecida com grande potencial de produção de vinhos com rentabilidade.

O desenvolvimento de pesquisas sobre a presença de fungos filamentosos produtores de micotoxinas em uvas e conseqüentemente a presença destas toxinas em vinhos e sucos, além da influência das condições ambientais na produção da toxina, no Brasil, ainda são pouco explorados, especialmente no que refere-se ao caráter tóxico das espécies ocratoxigênicas. A presença de micotoxinas além de trazerem riscos à saúde humana e animal, representam um impacto negativo considerável na economia de diversos países.

Dentre as micotoxinas a ocratoxina A (OTA) é considerada como uma das mais comuns e que vem recebendo atenção crescente por seus efeitos tóxicos e devido à alta incidência em uma ampla variedade de produtos alimentares. Uvas e seus derivados, como suco de uva, frutas secas e vinhos, são frequentemente contaminados com esta toxina em diversos países como Itália (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003), Argentina, Brasil (CHIOTTA et al., 2009; ROSA et al., 2002), Tunísia (LASRAM et al., 2010, 2012) e

Portugal (SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005; SERRA et al., 2003), Grécia (MAGAN; MEDINA; ALDRED, 2011).

Este é o primeiro estudo sobre a diversidade de fungos filamentosos identificados até espécie realizado em regiões vitivinícolas do Brasil (municípios de Caldas e Três Corações (Sul de Minas Gerais), Espírito Santo do Pinhal (Sudeste de São Paulo), Lagoa Grande e Santa Maria da Boa Vista (Petrolina – PE), e Casa Nova (Bahia – BA). Este estudo foi realizado nestas regiões porque existem poucos estudos sobre a microbiota de uvas cultivadas no Brasil, tendo sido realizado apenas na região de Campanha no Estado do Rio Grande do sul, por Rosa et al. (2002).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os níveis detectados de OTA nas amostras de suco e vinho analisadas foram considerados baixos, uma vez que estas concentrações encontram-se dentro do limite máximo tolerável para a toxina em vinho e suco de uva estabelecida pela Legislação Europeia e Brasileira ($2\mu\text{g/L}$). Este fato, indica que as condições climáticas destas regiões produtoras de uva que foram estudadas foram menos favoráveis a produção desta toxina, principalmente a região do Vale do Submédio São Francisco que devido ao clima semiárido e a altas temperaturas favorecem o desenvolvimento de espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, onde as espécies ocratoxigênicas de maior relevância para a produção de OTA em uvas e derivados estão inseridas, embora estas condições foram propícias a inibição da toxina.

Por outro lado, a presença de algumas espécies que foram isoladas neste estudo tais como, *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus japonicus*, *A.niger*, possivelmente possam ter contribuído para a menor frequência de espécies ocratoxigênicas e a produção da toxina nos produtos elaborados a partir das regiões estudadas. Alguns estudos mostram que

estas espécies foram capazes de inibir o desenvolvimento de espécies produtoras de OTA como *Aspergillus carbonarius*.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a importância da realização de novos estudos relativos a contaminação da OTA em vinho e suco de uva brasileiros necessários para obter uma melhor compreensão dos fatores que contribuem significativamente para a presença e os níveis de toxina nestes produtos. E consequentemente contribuir para que os pontos críticos de contaminação e produção de OTA ao longo da cadeia produtiva de uvas e vinhos sejam detectados, controlados ou minimizados.

REFERÊNCIAS

- BATTILANI, P.; GIORNI, P.; PIETRI, A. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 4, p. 633-636, Apr. 2003.
- CHIOTTA, M. L. et al. *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 2, p. 137-141, Aug. 2009.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. **Regiões produtoras**. Disponível em: <<http://www.ibravim.org.br/regioesprodutoras.php>>. Acesso em: 29 mar. 2012.
- LASRAM, S. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 2, p. 75-80, Feb. 2012.
- _____. Water activity and temperature effects on fungal growth and Ochratoxin A production by ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* isolated from Tunisian grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 2, p. 89-97, Apr. 2010.
- MAGAN, N.; MEDINA, A.; ALDRED, D. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre-and postharvest. **Plant Pathology**, Washington, v. 60, n. 1, p. 150-163, Jan. 2011.
- ROSA, R. C. A. 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.
- SERRA, R.; BRAGA, A.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin producing and other fungi isolated from grapes for wine production with particular emphasis on ochratoxin A. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 4, p. 515-521, May 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.