



MICHELLE FERREIRA TERRA

**FUNGOS TOXIGÊNICOS EM SOLOS DE
VINHAS, UVAS E MOSTOS E OCRATOXINA A
EM VINHOS E SUCOS DO VALE DO
SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO**

LAVRAS - MG

2011

MICHELLE FERREIRA TERRA

**FUNGOS TOXIGÊNICOS EM SOLOS DE VINHAS, UVAS E MOSTOS E
OCRATOXINA A EM VINHOS E SUCOS DO VALE DO SUBMÉDIO
SÃO FRANCISCO**

Dissertação 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 Mestre.

Orientador

Dr. Luís Roberto Batista

Coorientadores

Dr. Giuliano Elias Pereira

Dr. Guilherme Prado

LAVRAS - MG

2011

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

Terra, Michelle Ferreira.

Fungos toxigênicos em solos de vinhas, uvas e mostos e Ocratoxina A em vinhos e sucos do Vale do Submédio São Francisco. / Michelle Ferreira Terra. – Lavras : UFLA, 2011.

151 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Luis Roberto Batista.

Bibliografia.

1. *Aspergillus*. 2. Micotoxinas. 3. Seção *Nigri*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

MICHELLE FERREIRA TERRA

**FUNGOS TOXIGÊNICOS EM SOLOS DE VINHAS, UVAS E MOSTOS E
OCRATOXINA A EM VINHOS E SUCOS DO VALE DO SUBMÉDIO
SÃO FRANCISCO**

Dissertação 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 Mestre.

APROVADA em 22 de fevereiro de 2011.

Dr. Giuliano Elias Pereira EMBRAPA SEMIÁRIDO

Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima UFLA

Dr. Luís Roberto Batista

Orientador

LAVRAS – MG

2011

*A Deus, pela força, luz e proteção em todos os momentos da minha vida.
Aos meus pais, Evandro e Dalila, pelo constante incentivo, exemplo e imenso
amor.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora, por cada momento de vida, pelas oportunidades que tenho, pela proteção, amparo e força para vencer cada etapa e superar as adversidades da vida.

Ao meu orientador, Dr. Luís Roberto Batista, pela grande oportunidade, paciência de escutar e ensinar, disponibilidade de sempre me atender, amizade e confiança na minha capacidade de conduzir este estudo. Obrigado!

Ao Dr. Guilherme Prado, pela coorientação e pela disposição para me ajudar, e à Fundação Ezequiel Dias (FUNED) pela oportunidade e cooperação.

Ao Dr. Giuliano Elias Pereira e a Embrapa Semiárido pela oportunidade, disponibilidade e apoio.

Aos meus pais, pela presença fundamental em todos os momentos da minha vida, por acreditarem no meu potencial, incentivarem os meus estudos e por serem estímulos que me impulsionam a lutar pelos meus sonhos e objetivos, torcendo sempre pela minha felicidade. Amo vocês!

A minha irmã Mariana, por todo carinho e amizade. Desejo-te todo sucesso!

A todos os meus familiares, especialmente os meus avôs, que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso e felicidade. Obrigado pelo carinho, ensinamentos e exemplos de vida!

Ao Hugo, meu namorado, companheiro e amigo. Obrigado pelo apoio, carinho, amor, compreensão, paciência e pensamentos positivos diante dos problemas da vida. E muitos momentos de felicidade! Você contribuiu muito para a concretização desta etapa. Agradeço por estar comigo nos momentos mais difíceis...

Às amigas do Laboratório de Micologia e Micotoxinas do DCA, Daiani, Fabiana Passamani, Ábiah, Fabiana Couto, Mônica, Elizângela, Josi, Taís,

Gislaine, Érika, Camila, Mariana, Luiza, Rafaela, Eloá, Taiani e Tamara. Obrigado pelo carinho, ajuda no experimento, amizade e muitos momentos de descontração.

A minha amiga de infância, Letícia, pela grande amizade, companheirismo, conselhos, momentos de estudo e de diversão.

À Andréia e Márcia, amigas e companheiras de República. Obrigada pelo carinho, conselhos, ajudas e amizade.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Biologia, e ao Laboratório de Micologia e Micotoxinas, que permitiram a realização deste trabalho.

E a todos que durante esse tempo contribuíram direta ou indiretamente para esta conquista, que Deus retribua todo o bem que me foi desejado!

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

A ocratoxina A (OTA) tem sido freqüentemente encontrada como contaminante de uvas, vinhos e suco de uva, sendo considerada uma das micotoxinas mais prejudiciais para a saúde humana. Neste contexto, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a ocorrência de fungos ocratoxigênicos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* em solos cultivados com videiras, uvas e mostos do Nordeste brasileiro, bem como verificar os níveis de Ocratoxina A em vinhos e sucos de uva elaborados com variedades cultivadas nesta região. O isolamento de fungos das uvas e sementes foi realizado por Plaqueamento Direto no meio Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). Para as amostras de solo e de mosto utilizou-se a técnica de espalhamento superficial a partir de diluições seriadas. Selecionou-se para obtenção de culturas puras apenas os fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* que foram identificados por características morfológicas. Todos os isolados obtidos foram testados quanto ao potencial de produção de OTA pelo método Plug Agar. A quantificação de OTA das amostras de vinhos e sucos de uva foi realizada pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detecção por fluorescência. Do total de isolados obtidos (281), a maioria (61,2%) foi identificado nas espécies *A. niger*, *A. foetidus* e *A. tubingensis*, e 11% foram produtores de OTA. A espécie *A. niger* foi a mais detectada nas vinhas, entretanto apenas 5,3% dos seus isolados foram ocratoxigênicos. Todos os isolados de *A. carbonarius* obtidos (22) foram produtores desta toxina, o que realça a importância desta espécie como a principal fonte de OTA para as uvas cultivadas no Nordeste brasileiro. A OTA foi detectada em 13 (38,24%) amostras analisadas, em concentrações entre 0,03 a 0,62 µg/L. A maioria das amostras de vinho tinto apresentou-se contaminada com esta toxina (75%), e em apenas uma amostra de vinho branco, obtido da variedade Verdejo, esta toxina foi detectada. Não foi detectado OTA em nenhuma amostra de suco de uva. Os níveis de OTA detectados foram inferiores ao limite máximo tolerável para esta toxina em vinho e suco de uva estabelecido pela União Européia (EC 123/2005).

Palavras-chave: Ocratoxina A. *Aspergillus*. Uva. Vinho. Suco de uva.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a frequent contaminant in grapes, wines and grape juices. This toxin is considered to be one of the most hazardous mycotoxins for humans. This study was performed with the objective of evaluating the occurrence of ochratoxigenic fungi of the genus *Aspergillus* Section *Nigri* in grapes, grape must, and soil of wineries of Northeastern Brazil, as well as verify the levels of Ochratoxin A of the wines, grape juices made with the varieties present in the region. The isolation of berries and seeds was performed by the Direct Plating method in the Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol media (DRBC). For the grape must samples, the serial dilution with superficial spreading technique was used. We selected only the specimens of the genus *Aspergillus* Section *Nigri* to produce pure cultures, which were identified through their morphologic characteristics. All the isolates obtained were tested for the potential of OTA production through the Pug Agar method. The quantification of OTA in the samples of wine and grape juices was obtained through the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detection method. Of all the isolates obtained (281), the majority (61.2%) was identified as *A. niger*, *A. foetidus* and *A. tubingensis*, and 11% of these isolates were OTA producers. *A. niger* was the most detected species in the wineries. However, only 5.3% of these isolates were ochratoxigenic. All the isolates of *A. carbonarius* obtained (22) produced the toxin, which highlights the importance of this species as the main source of OTA in grapes cultivated in Northeastern Brazil. OTA was detected in 13 (38.24%) samples analyzed with concentrations varying from 30.2 to 622.0 ng l⁻¹. One white wine (obtained from the Vedejo variety) and Most of the red wine samples (75%) were contaminated by this toxin. OTA was not detected in any of the grape juice samples. The levels of OTA were below the maximum limit permitted in wine and juice according to the European Union (EU 123/2005).

Keywords: Ochratoxin A. *Aspergillus*. Grape. Wine. Grape juice.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Áreas vitícolas do Brasil, com destaque para os pólos tradicionais e emergentes 21
- Figura 2 Vinhedos comerciais na região do Vale do Submédio São Francisco 26
- Figura 3 Vinhedos no Vale do Submédio São Francisco em diferentes estádios fenológicos (brotação, floração e maturação)..... 26
- Figura 4 Estrutura da Ocratoxina A 29
- Gráfico 1 Produção de vinhos no Brasil, em litros, no período de 1998 a 2009 .24

CAPÍTULO 2

- Gráfico 1 Bagas das variedades de uva infectadas com *Aspergillus* Seção *Nigri* e as respectivas proporções médias de colonização. Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. O número 2 de algumas variedades corresponde à segunda época de coleta das mesmas, sendo: Syrah 2 (jun/2010); Sauvignon Blanc 2 (jun/2010); Isabel 2 (ago/2010); Petit Verdot 2 (set/2010)..... 85
- Gráfico 2 Sementes das variedades de uva infectadas com *Aspergillus* Seção *Nigri* e as respectivas proporções médias de colonização. Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Os números 1 e 2 de algumas variedades correspondem às diferentes épocas de coleta das mesmas, sendo: Syrah 2 (jun/2010); Petit Verdot 1 (mar/2010); Sauvignon Blanc 2 (jun/2010); Isabel 1 (mar/2010)..... 86
- Gráfico 3 Incidência de fungos *Aspergillus* Seção *Nigri*, em UFC/g x 10³, nas amostras de solo de cultivo das variedades viníferas e de suco estudadas. Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$ 89

CAPÍTULO 3

- Gráfico 1 Cromatograma da amostra de vinho tinto elaborada a partir da variedade Syrah Clone 525 PE: IAC-313 115
- Gráfico 2 Concentração média de OTA detectada nas amostras positivas (> LQ) (amostras são identificadas pelas variedades de uvas utilizadas na elaboração dos vinhos). Letras diferentes mostram

diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Scott e Knott (1974) a $p < 0,05$ 116

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Produção de Uvas no Brasil, em toneladas	22
Tabela 2	Produção de uvas para processamento e consumo <i>in natura</i> no Brasil, em toneladas	23

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Coordenadas geográficas, temperatura média e precipitação anual, e tipo de clima da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco.....	79
Tabela 2	Dados de temperatura, precipitação e umidade relativa (U.R.) durante os meses de coleta das amostras	81
Tabela 3	Resultado do Teste F para o contraste entre as amostras de baga e semente viníferas e de suco contaminadas	87
Tabela 4	Espécies do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> isoladas das amostras de baga (sadia e deteriorada), semente, mosto e solo com o respectivo número de isolados ocratoxigênicos.....	90

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Amostras de vinhos com os respectivos períodos de elaboração.....	107
Tabela 2	Valores de recuperação de Ocratoxina A das amostras de vinho	112
Tabela 3	Valores de recuperação de Ocratoxina A das amostras de suco de uva.....	113
Tabela 4	Incidência e limites médios de ocratoxina A nos vinhos tintos, brancos e sucos de uva do Nordeste do Brasil.....	114
Tabela 5	Resultado da análise de variância (ANAVA) do teor de OTA dos vinhos contaminados.....	115
Tabela 6	Resumo do contraste ortogonal entre o nível de contaminação dos vinhos tintos e dos brancos	117
Tabela 7	Níveis de Ocratoxina A detectados em vinhos elaborados em países europeus	120

CAPÍTULO 4

Tabela 1 Espécies de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> com o respectivo número de isolados produtores de OTA obtidos das amostras de baga, semente, mosto e solo, e os teores de OTA detectados nos vinhos e sucos de uva.....	141
--	-----

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral	15
1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Breve histórico: uva, vinho e suco de uva no Brasil	18
2.2	Consumo e produção nacional de uvas e derivados	20
2.3	Vitivinicultura no Vale do Submédio São Francisco	25
2.4	Ocratoxina A: contaminação e riscos	28
2.5	Espécies produtoras de ocratoxina A em uvas e derivados	33
2.6	Ocratoxina A em uvas, vinhos, sucos de uva e derivados	38
2.7	Ocratoxina A durante o processo de vinificação	44
2.8	Fatores relacionados com o crescimento e produção de OTA por fungos	46
2.9	Medidas preventivas e de descontaminação	48
	REFERÊNCIAS	54
	CAPÍTULO 2 <i>Aspergillus</i> ocratoxigênicos em solos de videiras, uvas e mostos do Nordeste do Brasil	75
1	INTRODUÇÃO	77
2	MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1	Área de estudo	79
2.2	Amostragem	79
2.2.1	Uvas	79
2.2.2	Mostos	81
2.2.3	Solos	81
2.3	Análises Micológicas	82
2.4	Screening do potencial ocratoxigênico dos isolados	83
2.5	Análises estatísticas	83
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1	Incidência dos fungos <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i>	84
3.2	Ocorrência das espécies da Seção <i>Nigri</i> e de isolados ocratoxigênicos	89
4	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	96
	CAPÍTULO 3 Ocratoxina A em vinhos e sucos de uva elaborados no Vale do Submédio São Francisco, Nordeste do Brasil	102
1	INTRODUÇÃO	104
2	MATERIAL E MÉTODOS	106
2.1	Área de estudo	106
2.2	Amostras	106

2.3	Análise de OTA.....	108
2.3.1	Soluções e reagentes	108
2.3.2	Preparo das amostras e purificação em coluna de imunoafinidade	109
2.3.3	Quantificação por CLAE.....	109
2.3.4	Eficiência da metodologia analítica	110
2.4	Análises estatísticas	110
3	RESULTADOS	112
3.1	Padronização da metodologia analítica	112
3.2	Ocorrência e níveis de Ocratoxina A em vinhos e sucos de uva....	113
4	DISCUSSÃO	118
5	CONCLUSÃO	123
	REFERÊNCIAS	124
	CAPÍTULO 4: <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> em solos, uvas e mostos e Ocratoxina A em vinhos e sucos tropicais do Brasil	131
1	INTRODUÇÃO	133
2	MATERIAL E MÉTODOS	135
2.1	Área de estudo	135
2.2	Amostragem	135
2.2.1	Uvas, mostos e solos.....	135
2.2.2	Vinhos e sucos de uva.....	136
2.4	Screening do potencial ocratoxigênico dos isolados	137
2.5	Análise de OTA.....	138
2.5.1	Soluções e reagentes	138
2.5.2	Preparo das amostras e purificação em coluna de imunoafinidade	139
2.5.3	Quantificação por CLAE.....	139
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	141
4	CONCLUSÃO	145
	REFERÊNCIAS	146
	APÊNDICES	150

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A incidência de fungos filamentosos em produtos agrícolas está diretamente relacionada com a qualidade e a segurança dos alimentos e bebidas. Dentre os produtos susceptíveis a esta contaminação estão às frutas.

Os fungos filamentosos podem causar a deterioração de frutas e/ou contaminá-las com metabólitos secundários tóxicos, denominados de micotoxinas. Dentre elas, a Ocratoxina A (OTA) é hoje a principal micotoxina encontrada como contaminante das uvas e seus derivados, como os vinhos e sucos, sendo considerada uma das mais prejudiciais para a saúde humana.

Em países de clima tropical, as principais espécies produtoras de OTA em alimentos pertencem ao gênero *Aspergillus*. Dentro deste gênero, as espécies pertencentes à Seção *Nigri* são as mais frequentemente encontradas como contaminante de uvas. *Aspergillus carbonarius* é considerada a maior fonte de OTA para vinho, uva e derivados da uva, em função dos níveis desta toxina produzidos e do número de isolados ocratoxigênicos.

A ocorrência de OTA nas uvas e posteriormente nos mostos, vinhos e sucos de uva deve-se, principalmente, as condições fitossanitárias da lavoura, uma vez que esta micotoxina é produzida principalmente por espécies de *Aspergillus* que aumentam sua incidência de colonização quando os frutos apresentam algum rompimento da sua película, e nos estágios finais de maturação.

Sabe-se que altos níveis de OTA em uvas representam um elevado risco de contaminação no vinho e também no suco. Portanto, a identificação dos

fungos ocratoxigênicos é de grande importância, visto que os perfis de toxina de cada espécie variam e os fungos que estão presentes nas uvas podem limitar e definir o potencial risco toxicológico.

No Brasil, há necessidade de mais estudos sobre a ocorrência de fungos produtores de OTA em uvas e os teores desta toxina nos vinhos e sucos de uva, principalmente em regiões em crescente desenvolvimento no setor vitícola, como no Vale do Submédio São Francisco.

Assim, neste estudo, objetivou-se avaliar a incidência de espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* e de isolados ocratoxigênicos em solos cultivados com videiras, uvas e mostos do Nordeste brasileiro, bem como verificar os níveis de Ocratoxina A dos vinhos e sucos de uva elaborados com variedades cultivadas nesta região.

Esta dissertação apresenta-se dividida em quatro capítulos, sendo o Capítulo 1, uma revisão de literatura abordando os seguintes temas: Histórico do vinho e suco de uva no Brasil; Consumo e produção Nacional de uvas e derivados; Vitivinicultura do Vale do Submédio São Francisco; Ocratoxina A: contaminação e riscos; Ocratoxina A em uvas, vinhos, sucos de uva e derivados; Espécies produtoras de ocratoxina A em uvas e derivados; Fatores relacionados com o crescimento e produção de OTA por fungos; e Medidas preventivas e de descontaminação.

Os Capítulos 2, 3 e 4 foram redigidos em formato de artigo científico. No Capítulo 2 avalia-se a ocorrência de fungos ocratoxigênicos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas, mostos e nos solos de cultivo de variedades utilizadas para elaboração de vinhos e sucos no Vale do Submédio São Francisco, Nordeste brasileiro. No Capítulo 3 apresenta-se a incidência e níveis de OTA em vinhos tintos, brancos e sucos de uva desta região, e no Capítulo 4, faz-se uma associação entre a ocorrência de fungos potencialmente

ocratoxigênicos nas amostras de uva, semente, mosto e solo e a contaminação dos vinhos e sucos com OTA.

Este é o primeiro estudo realizado no Brasil, em que analisa-se a presença de fungos produtores de Ocratoxina A na vinha (uvas, sementes e solos), durante a elaboração dos vinhos (mostos), e que também relata sobre a presença desta toxina nos produtos finais (vinhos e sucos).

Esta pesquisa faz parte do projeto “Desenvolvimento de novos vinhos tropicais, com alta qualidade e tipicidade, para fortalecer e dar sustentabilidade ao setor vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco” da CNPq/MAPA/SDA N° 064/2008.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Breve histórico: uva, vinho e suco de uva no Brasil

A cultura da videira tem um grande valor, não apenas por representar a maior produção mundial do setor de horticultura, mas também por trazer conexões históricas com o desenvolvimento da humanidade. O produto principal, o vinho, foi considerado pelos povos antigos como a bebida dos deuses, sendo acessível apenas aos poderosos da época (THIS; LACOMBE; THOMAS, 2006).

Não se pode situar com precisão o local e a data em que fabricou-se vinho pela primeira vez. As sementes de uva mais antigas foram encontradas na Geórgia e há indícios de que sejam da variedade *Vitis vinifera sativa*. Sabe-se que cultivavam videiras e, provavelmente, produziam vinho na região ao sul das montanhas do Cáucaso, há pelo menos sete mil anos (JONHSON, 2001).

No Brasil, a uva foi introduzida no ano de 1.532 no Estado de São Paulo. Por algum tempo, o cultivo das variedades de *Vitis vinifera* procedentes de Portugal e da Espanha ficou restrito a pequenas áreas dispersas pelo território nacional (CALDAS et al., 2008). Permaneceu como cultura doméstica até o final do século 19, tornando-se uma atividade comercial a partir do início do século 20 por iniciativa dos imigrantes italianos estabelecidos no Sul do país (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006).

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 nos meses de inverno. A partir da década de 60, o cultivo da videira foi introduzido com sucesso na região semiárida do Vale do São Francisco, o que marcou o início da viticultura tropical no Brasil. Na década de

70 consolidou-se um pólo no Norte do Paraná e na década seguinte no Nordeste de São Paulo e Norte de Minas Gerais. Devido à diversidade ambiental é possível observar diferentes características bioclimáticas entre as regiões vitivinícolas do Brasil, sendo possível encontrar videiras com um, dois ou três ciclos anuais (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006).

De acordo com Protas, Camargo e Mello (2001) foi a partir dos anos 70 que se observou o desenvolvimento da agroindústria de suco de uva, a qual conseguiu se destacar pela qualidade e singularidade do produto, conquistando mercados internacionais exigentes. Este fato evidenciou o potencial de expansão deste mercado e a tendência de diversificação da cadeia vitivinícola.

A partir de meados da década de 80 ocorreu com maior intensidade, investimentos, tanto na implantação e modernização das vinícolas localizadas nas regiões tradicionais quanto nos novos pólos produtores. Como consequência deste cenário, verifica-se nos últimos anos, nos pólos emergentes e parcialmente nos tradicionais, o surgimento de uma nova viticultura com forte base tecnológica e focada na produção de uvas de variedades *Vitis vinifera* para elaboração de vinhos finos de qualidade. Como exemplos têm-se as regiões da metade Sul do Rio Grande do Sul, as de altitude de Santa Catarina e o Vale do Submédio São Francisco (GÓES, 2005).

A produção brasileira de suco de uva está concentrada no Rio Grande do Sul, mas observa-se, em anos recentes, uma forte tendência de expansão para outras regiões como Mato Grosso, Goiás e também para o Vale do Submédio São Francisco. As principais cultivares utilizadas são Isabel, 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).

A legislação brasileira define vinho como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples da uva sã, fresca e madura. 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. Esta 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).

2.2 Consumo e 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).

As áreas vitícolas do Brasil, que incluem o cultivo de uvas para a produção de sucos e/ou elaboração de vinhos, estão ilustradas na Figura 1, destacando-se os pólos tradicionais e alguns emergentes. Estas áreas podem ser classificadas em duas zonas: viticultura temperada, que está concentrada nos Estados do Sul e do Sudeste, representando cerca de 90 % da área de vinhedos e mais de 98 % da uva utilizada para processamento (vinhos, sucos e outros derivados) do país; e viticultura tropical, em que se destacam os Estados de Pernambuco e Bahia na região do Vale do Submédio São Francisco (INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO - IBRAVIN, 2010).

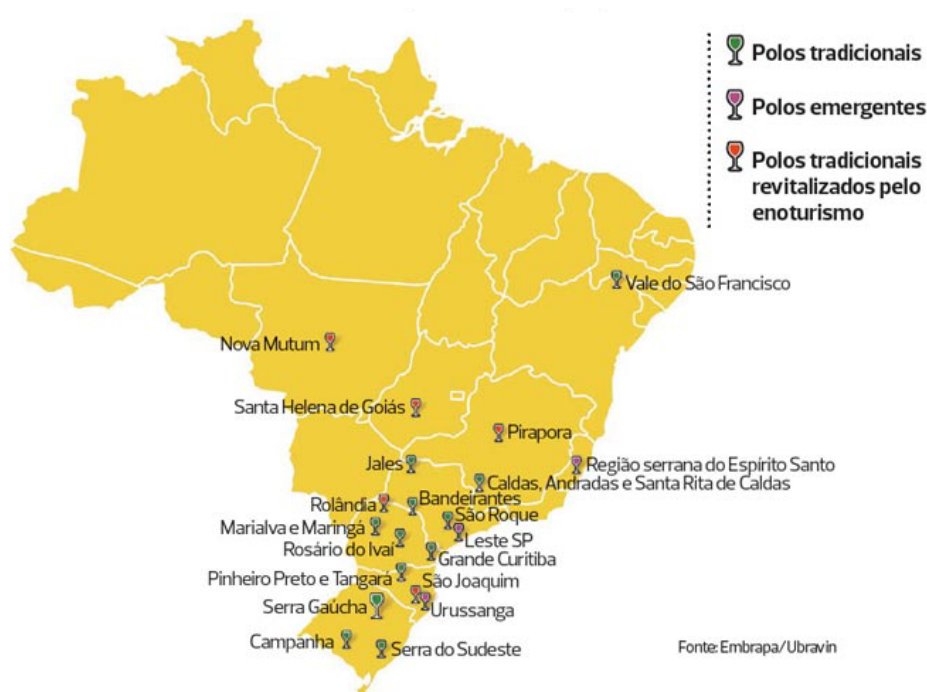


Figura 1 Áreas vitícolas do Brasil, com destaque para os pólos tradicionais e emergentes

Fonte: IBRAVIN (2010), modificada

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2010), a produção de uvas no Brasil cresceu cerca de 9 % no período de 2002-2005, tendo como principal produtora a região Sul, também destacando-se em crescimento a região Nordeste, que no mesmo período apresentou um crescimento produtivo de aproximadamente 48%, principalmente com participação dos Estados de Pernambuco e Bahia.

No cenário internacional a vitivinicultura brasileira ocupou em 2007, o 17º lugar em área cultivada com uvas e o 19º em produção. Com relação às exportações, o Brasil foi o 10º maior exportador de suco de uvas em quantidade e em valor (MELLO, 2010a).

A produção de uvas no Brasil, durante os últimos quatro anos (2006-2009), está descrita na Tabela 1. Neste período os Estados que se destacaram foram Rio Grande do Sul, São Paulo e Pernambuco. O Rio Grande do Sul continua sendo o principal Estado produtor de uvas e vinhos, embora seja possível observar uma forte tendência de crescimento em outras regiões vitivinícolas do país, nos últimos anos. Em 2009, praticamente metade da uva produzida no país foi destinada ao processamento para elaboração de vinhos, suco de uva e derivados, sendo o restante destinado ao mercado de uvas para consumo in natura (Tabela 2). O Estado do Rio Grande do Sul é responsável por cerca de 90 % da produção nacional de uvas, vinhos e derivados (MELLO, 2010b).

Tabela 1 Produção de Uvas no Brasil, em toneladas

Estado/Ano	2006	2007	2008	2009
Rio Grande do Sul	623.847	705.228	776.027	737.363
São Paulo	195.357	193.023	192.976	177.934
Pernambuco	155.783	170.326	162.977	158.515
Paraná	95.357	99.180	101.500	102.080
Bahia	89.738	120.654	97.481	90.508
Santa Catarina	47.787	54.554	58.330	67.546
Minas Gerais	12.318	11.995	13.711	11.773
Total/Brasil	1.220.187	1.354.960	1.403.002	1.345.719

Fonte: Mello (2010b)

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

Finalidade da produção/Ano	2006	2007	2008	2009
Processamento	470.705	637.125	708.042	678.169
Consumo in natura	757.685	717.835	691.220	667.550
Total	1.228.390	1.354.960	1.399.262	1.345.719

Fonte: Mello (2010b)

Dentro do período de 1998 a 2009, a produção de vinhos no Brasil foi maior nos anos de 2004 e 2008, com 356 e 334 milhões de litros, respectivamente (Gráfico 1). No ano de 2009, o total de vinhos produzidos foi de 245 milhões de litros, sendo 84% de vinhos comuns elaborados a partir de uvas americanas, especialmente cultivares de *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e híbridos diversos. Deste total, apenas 16% corresponderam aos vinhos finos, elaborados com castas de *Vitis vinifera*. Neste mesmo ano, cerca de 70% da quantidade de produtos elaborados com uvas foram de vinhos e 30% dos demais derivados, incluindo o suco de uva. Em 1998, os derivados de uvas corresponderam a apenas 13%, menos da metade do que ocorreu em 2009, o que mostra um significativo aumento na quantidade destes produtos (UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA - UVIBRA, 2010).

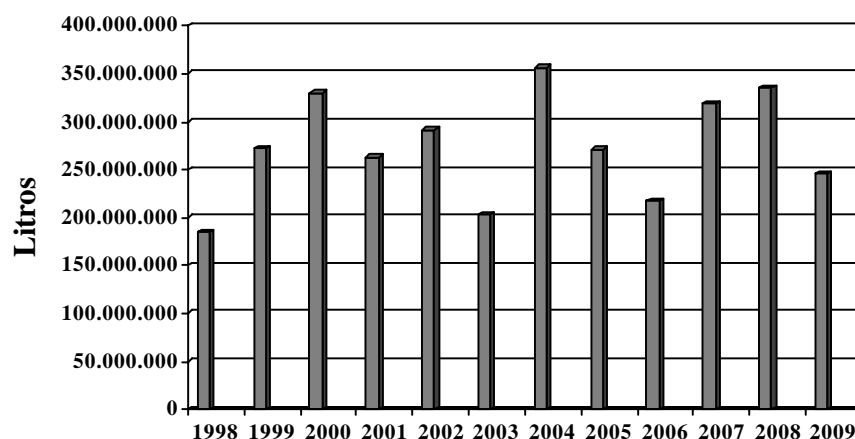


Gráfico 1 Produção de vinhos no Brasil, em litros, no período de 1998 a 2009
Fonte: UVIBRA (2010)

Segundo Protas, Camargo e Mello (2006) a maior parte da produção de uvas no Brasil é destinada ao mercado interno. O principal produto de exportação é o suco de uva, representado por 30% da produção. Até o ano de 2006, apenas 5% das uvas *in natura* e menos de 1% dos vinhos foram comercializados fora do país. Entretanto, de acordo com dados de exportação de 2009, 11% dos vinhos produzidos foram destinados ao mercado externo, evidenciando um aumento significativo na exportação deste produto. Os principais países importadores dos vinhos brasileiros são os EUA, Alemanha e Portugal (WINES FROM BRAZIL, 2010).

O consumo nacional *per capita* de vinhos vem crescendo gradativamente. Em 2005, este consumo ficou em torno de 2,01 litros, mostrando um aumento significativo em relação aos anos anteriores. Em relação ao suco de uva, o consumo aumentou significativamente nos últimos anos, mudando de 0,33 L em 2000 para 0,54 L *per capita* em 2005. Também houve

um pequeno aumento no consumo de uvas *in natura*, situando-se em 3,54 kg *per capita* no mesmo ano (MELLO, 2006).

Um dos fatores que tem contribuído para o aumento no consumo de vinhos são os benefícios desta bebida para a saúde humana, relatados em diversos estudos. Estas propriedades são atribuídas aos compostos polifenólicos presentes no vinho, destacando-se os flavonóides e o resveratrol (FLAMINI, 2003).

2.3 Vitivinicultura no Vale do Submédio São Francisco

A vitivinicultura brasileira tem avançado nos produtos elaborados com uvas, e nos últimos anos tem-se caracterizado por grandes investimentos nesta área, notadamente em regiões não-tradicionais do país, como no Vale do Submédio São Francisco (Figuras 2 e 3) (MELLO, 2006).

A produção de uvas destinadas à elaboração de vinhos iniciou-se na região do Vale do Submédio São Francisco em meados dos anos 80, com a implantação de videiras européias trazidas do Sul do Brasil. Em meados dos anos 90 e no início do ano 2000, outras empresas se instalaram na região, o que proporcionou um aumento no volume de vinho elaborado. O Vale é considerado como a segunda maior região produtora de vinhos finos do Brasil, representando cerca de 15 % do mercado nacional. Este avanço ocorreu em função do sucesso no cultivo de variedades *Vitis vinifera* que se adaptam melhor em áreas de verão longo e seco com invernos brandos, devido à alta susceptibilidade a doenças fúngicas (PEREIRA, 2006; TONIETTO; CAMARGO, 2006).



Figura 2 Vinhedos comerciais na região do Vale do Submédio São Francisco



Figura 3 Vinhedos no Vale do Submédio São Francisco em diferentes estádios fenológicos (brotação, floração e maturação)

De acordo com Moreira et al. (2004), a viticultura na região semiárida, em especial no submédio São Francisco, destaca-se pelo constante incremento no volume de produção, bem como os altos rendimentos alcançados e na qualidade da uva produzida. A região é responsável por 98 % das uvas de mesa exportadas pelo Brasil. Nos últimos anos, grandes investimentos em pesquisa e tecnologia têm permitido à região consolidar-se como importante pólo produtor de vinhos. Os principais municípios produtores de vinho são Santa Maria da Boa Vista e Lagoa Grande em Pernambuco, e Casa Nova, na Bahia (ANUÁRIO..., 2006).

O Vale do São Francisco possui características climáticas que o distingue das demais regiões produtoras de vinho no mundo. Apresenta

temperatura média anual de 27 °C (variando de 18 a 34 °C), baixos índices de precipitação anual (cerca de 540 milímetros por ano), intensidade de luz solar elevada (cerca de 3.000 horas por ano), ar relativamente seco, o que dificulta a proliferação de pragas e doenças, e uma fonte de água disponível e controlada através da irrigação, o que facilita a produção de uvas durante todo o ano (Figura 3). Em outras regiões, como o Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, a produção de uvas está restrita entre 4 e 6 meses do ano. Assim, as experiências iniciais na produção de uvas foram incentivadas pelas vantagens agro-climáticas da região (SELWYN, 2010).

Segundo Pereira (2006) é a única região do mundo que produz uvas o ano todo, sendo possível, dependendo da cultivar, colher entre duas a três safras anualmente. Este fato ocorre em função do clima e da irrigação a partir da água do Rio São Francisco, 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, o que reduz os investimentos em termos de infra-estrutura para a elaboração dos vinhos, além de possibilitar escolher os períodos do ano mais favoráveis para obtenção de uvas e vinhos de melhor qualidade e com tipicidades. Segundo o autor, estas vantagens estão situando no Vale um dos pólos vitivinícolas mais dinâmicos do país.

Atualmente, nesta região têm-se produzido tanto vinhos jovens, conhecidos como os “vinhos do sol”, que apresentam características peculiares de aromas e sabores, sendo próprios para o consumo em até dois anos após o período de produção. E também os vinhos de guarda, que são envelhecidos em barricas, o que promove uma maior complexidade de aromas e melhor estrutura dos vinhos (PROTAS, 2005).

De acordo com Santos e Ferraz (2006) além da produção de vinho, o Vale está aproveitando seu potencial para a produção de suco de uva, embora ainda seja em pequena escala. O suco de uva tem se tornado um produto de alta

aceitação nos grandes centros urbanos do Brasil, devido aos benefícios que traz à saúde, ajudando na prevenção de doenças cardiovasculares.

2.4 Ocratoxina A: contaminação e riscos

Micotoxinas são produtos naturais de baixo peso molecular produzidos como metabólitos secundários por fungos filamentosos. São tóxicas para os vertebrados e outros grupos de animais em pequenas concentrações, e apesar de todas as micotoxinas serem de origem fúngica, nem todos os compostos tóxicos produzidos pelos fungos são considerados micotoxinas (BENNETT; KLICH, 2003).

O aumento do número de estudos sobre micotoxinas reflete a preocupação dos cientistas e da população em relação a sua presença nos insumos, principalmente por serem responsáveis por vários efeitos tóxicos (BELLÍ et al., 2004b). São, em geral, consideradas compostos estáveis e a Ocratoxina A (OTA), em particular, é uma molécula moderadamente estável ao calor que permanece intacta durante a maioria das operações de processamento dos alimentos e, portanto, pode aparecer nos produtos finais (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

Ocratoxinas são um grupo de micotoxinas estruturalmente relacionadas, e dentro deste grupo, a OTA é considerada a mais tóxica, em função da presença do átomo de cloro na posição C5 adicionado a presença de um OH fenólico (Figura 4). O grupo também inclui a ocratoxina C (OTC), 4-hidroxiocratoxina A (4-OH OTA), ocratoxina B (não contém o átomo de cloro no 5C da diidro-metil-isocumarina) e a ocratoxina α (OT α , onde a fenilalanina está ausente) (DUARTE; PENA; LINO, 2010). Essas micotoxinas são compostas basicamente de 2 grupamentos: uma di-hidroxi isocumarina, ligada através do seu grupo 7-carboxi à amida do grupamento L- β -fenilalanina (essa ligação é muito estável

em relação à hidrólise e temperatura), com exceção da OT α em que o grupamento fenilalanina está ausente (RINGOT et al., 2006).

A OTA é um composto branco cristalino cujo nome químico é (R)-N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirran-7-il) carbonil] – L-fenilalanina. É pouco solúvel em água e solúvel em solução aquosa de bicarbonato de sódio. Sua fórmula empírica é C₂₀H₁₈O₆NCl (Figura 4) e o peso molecular é de 403,82 g mol⁻¹ (ANLI; ALKIS, 2010). O máximo de emissão de fluorescência ocorre a 467 nm em etanol 96% e a 428 nm em etanol absoluto (RINGOT et al., 2006).

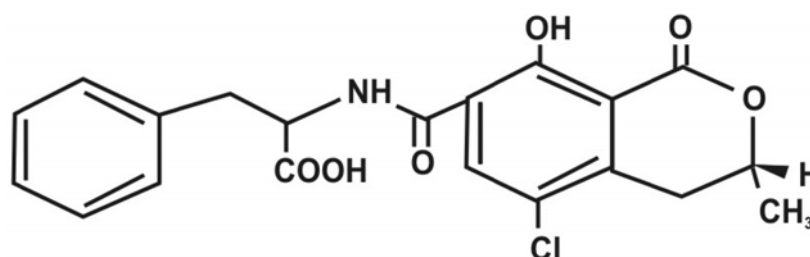


Figura 4 Estrutura da Ocratoxina A
Fonte: Anli e Alkis (2010), modificada

A ocorrência da OTA tem sido relatada em uma grande variedade de alimentos e substratos, como por exemplo, carne suína e de aves, cerveja, trigo, cevada, aveia, centeio, milho, feijão, amendoim, soja, arroz, sorgo, castanha-do-pará, superfície de presunto, suco de maçã, pão, nozes, vegetação em decomposição, solo, ervilha, condimentos, uva, vinho, suco de uva, grãos de café verde, torrado e moído, solúvel e bebidas de café (ABRUNHOSA; SERRA; VENÂNCIO, 2002; BELLÍ et al., 2002; LASRAM et al., 2010; LEONI; SOARES; OLIVEIRA, 2000; PERRONE et al., 2007; PRADO; OLIVEIRA; ABRANTES, 2000; SHUNDO et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Em decorrência dos dados disponíveis sobre a incidência de OTA em vários alimentos, a Comissão Européia adotou o regulamento (EC) N° 472/2002

estabelecendo os limites para a presença desta toxina em certos alimentos. Alguns países europeus estabeleceram os seus próprios limites (MONACI; PALMISANO, 2004), por exemplo, a Itália limitou o conteúdo de OTA em carne suína e em produtos derivados para 0,001 µg/L, e em café torrado e instantâneo para 0,004 µg/L.

Desde 2005, a Comissão Europeia estabeleceu o limite máximo para a OTA em vinho e suco de uva de 2,0 µg/L (COMMISSION REGULATION, 2005). No entanto, muitos acordos comerciais exigem limites inferiores ao adotado neste Regulamento (SOLFRIZZO et al., 2010).

De acordo com estudos, a dose diária tolerável de OTA é muito baixa, e varia de 300-890 µg/dia para uma pessoa de 60 kg. A ingestão de 12000-3000000 µg por uma pessoa de 60 kg pode causar toxicidade aguda (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ; CARRASCOSA, 2009). Com relação aos humanos, a OTA foi encontrada no plasma de pacientes com insuficiência renal crônica em concentrações de 0-11,7 µg/L, e em indivíduos saudáveis em concentrações 0-4 µg/L. Esses valores são semelhantes aos relatados em outros países europeus (PÉREZ-DE-OBANOS et al., 2001).

Mais de 300 micotoxinas já foram isoladas e descritas (DUARTE; PENA; LINO, 2010) e dentre elas, a OTA é uma das mais estudadas, devido aos seus efeitos teratogênicos, embriotóxicos, genotóxicos, neurotóxicos, imunossupressores, carcinogênicos e nefrotóxicos em animais (CHIOTTA et al., 2009; JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES - JECFA, 2001). Foi classificada em 1993 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer como um potencial carcinogênico humano (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 1993).

Embora não tenha sido totalmente comprovado, acredita-se que a OTA seja um dos principais agentes etiológicos da Nefropatia Endêmica dos Balcãs (NEB) (KROGH, 1978). Esta patologia fatal de humanos foi descrita no final

dos anos cinquenta em áreas dos Balcãs, no Sudeste da Europa, onde alimentos contaminados com OTA foram freqüentemente detectados (DUARTE; PENA; LINO, 2010). A doença NEB é muito semelhante à nefropatia endêmica suína, que foi claramente relacionada à ingestão de OTA por suínos, como descrito na Dinamarca (GROSSO et al., 2003). Ficou também conhecida por estar relacionada com o desenvolvimento de tumores no trato urinário em seres humanos (BENFORD et al., 2001). Mais recentemente, a OTA foi considerada como o agente causal da Nefropatia Intersticial Crônica (NIC), doença de etiologia desconhecida, descoberta na Tunísia (ABID et al., 2003; BACHA et al., 1993; MAAROUFI et al., 1996).

Ainda há poucos relatos sobre a farmacocinética da OTA em seres humanos, mas sabe-se que é metabolizada de forma lenta e tem uma meia-vida de 35,5 dias (STUDER-ROHR; DIETRICH; SCHLATTER, 2000). Isto indica que uma vez ingerida nos alimentos, esta micotoxina permanece no organismo por um longo tempo, aumentando a probabilidade de produzir toxicidade. Liga-se principalmente às proteínas plasmáticas e se acumula no fígado e nos rins (STOJKOVIC; GANULIN; PLESTINA, 1984).

OTA foi originalmente descrita como um metabólito secundário de *Aspergillus ochraceus* (MERWE et al., 1965). Atualmente, sabe-se que é produzida por várias espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (LASRAM et al., 2008) que ocorrem como contaminantes em vários alimentos antes da colheita ou, mais comumente, durante o armazenamento (SOLFRIZZO et al., 2010).

Estudos indicam que *P. verrucosum* é a principal espécie associada com a produção de OTA em alimentos e rações de regiões frias e de clima temperado (CHULZE; MAGNOLI; DALCERO, 2006). Esta espécie apresenta crescimento ótimo em temperaturas inferiores a 30 °C e em baixa atividade de água (JECFA, 2008). Recentemente, isolados de *P. nordicum* também foram considerados

ocratogênicos. Dentro do gênero *Penicillium*, apenas estas duas espécies são conhecidas como produtoras de OTA, sendo a espécie *P. verrucosum* mais preocupante em relação à contaminação de alimentos com esta micotoxina (CABAÑAS et al., 2008; JECFA, 2008).

As espécies ocratoxigênicas do gênero *Aspergillus* predominam em regiões mais quentes e em países tropicais, e pertencem às Seções *Circumdati* e *Nigri* (BELLÍ et al., 2004b; CHULZE; MAGNOLI; DALCERO, 2006; SERRA et al., 2003). Dentro da Seção *Nigri*, *A. carbonarius* e *A. niger* são consideradas como as principais espécies produtoras de OTA em alimentos, principalmente em frutos em maturação, como as uvas. São espécies resistentes a temperaturas relativamente altas, tolerantes à acidez e preferem uma atividade de água (Aa) um pouco mais baixa (CABANES et al., 2002; JECFA, 2008; LOGRIECO et al., 2003).

A espécie *A. carbonarius* produz esporos maiores, cresce em temperaturas mais baixas do que *A. niger*, com temperatura ótima de 30 °C, e sua capacidade de crescer em baixa atividade de água (Aa) é mais restrita. Já a espécie *A. niger* é xerofílica, com germinação relatada em Aa de 0,77 a 35 °C (DUARTE; PENA; LINO, 2010).

Recentemente, Samson et al. (2004) isolaram duas novas espécies do gênero *Aspergillus* de grãos de café, capazes de produzir OTA. Estas espécies, *A. lacticoffeatus* e *A. sclerotioniger*, necessitam de mais estudos e estão provisoriamente incluídas na Seção *Nigri*.

Atualmente, os métodos utilizados para a quantificação de Ocratoxina A em alimentos baseiam-se em uma etapa de extração, seguida de purificação utilizando colunas de imunoafinidade (IAC) que contém anticorpos específicos, com posterior análise por CLAE (VISCONTI; PASCALE; CENTONZE, 2001). Segundo a World Health Organization - WHO (2002), a cromatografia de

camada delgada e o método ELISA também podem ser utilizados para a detecção de OTA.

Rossi et al. (2010) apresentaram e caracterizaram um sistema alternativo para detectar e quantificar esta micotoxina baseado na medição da fotocorrente induzida em um fotodiodo a-Si:H p-i-n através da fluorescência da toxina excitada pela radiação UV a 254 nm. Neste estudo, o fotodetector apresentou uma resposta com linearidade satisfatória para várias concentrações avaliadas. Segundo os autores, o desempenho deste sistema é comparável com o de equipamentos comerciais, sendo portanto, um método alternativo para a rápida detecção de OTA em amostras de alimentos.

2.5 Espécies produtoras de ocratoxina A em uvas e derivados

Em países de clima tropical, as principais espécies produtoras de OTA em alimentos são do gênero *Aspergillus*, e pertencem às Seções *Nigri* e *Circumdati*. Os *Aspergillus* estão entre os fungos mais comuns que causam deterioração em alimentos e outros materiais (SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006). Os fungos da Seção *Nigri* apresentam esporos de cor preta que conferem proteção à luz solar e a radiação UV, atuando como uma vantagem competitiva em regiões de clima quente (PITT; HOCKING, 1997).

Os fungos responsáveis pela contaminação de uvas com OTA são os *Aspergillus* Seção *Nigri* (FRISVAD et al., 2007; LASRAM et al., 2010). As espécies *A. brasiliensis*, *A. ibericus* e *A. foetidus* são ocasionalmente encontradas em uvas, e as mais frequentes são: *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. japonicus* e *A. carbonarius* (OLIVER; TORTA; CATARA, 2008).

Os fungos da Seção *Nigri* têm sido considerados como sendo a microbiota predominante de uvas no momento da colheita, embora possam ser detectados na superfície de uvas saudáveis em todas as fases de maturação

(BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2004b; CABAÑES et al., 2002; ROSA et al., 2002; SAGE et al., 2002; SERRA et al., 2003).

A predominância de espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas nos estágios finais de maturação é relatada em vários estudos (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; BEJAOUÍ et al., 2006a; BELLÍ et al., 2004b, 2006; LASRAM et al., 2007; ROSA et al., 2002; SAGE et al., 2002; SERRA et al., 2003).

Durante a maturação das uvas ocorre um aumento no teor de açúcar e amolecimento da película da baga, e até a colheita as uvas tornam-se mais susceptíveis à infecção por fungos do gênero *Aspergillus* (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006; LEONG; HOCKING; SCOTT, 2006b, 2007). O retardamento da colheita de uvas pode aumentar o risco de contaminação com OTA (GAMBUTI et al., 2005; ROSET, 2003).

Dentro da Seção *Nigri*, a espécie *Aspergillus carbonarius* é considerada a principal fonte de OTA em uvas (HOCKING et al., 2007; LASRAM et al., 2008), e os níveis da toxina variam em função do tipo de vinho, da região vitivinícola e da safra (SOLFRIZZO et al., 2010). *A. niger* é a espécie mais comum do gênero *Aspergillus* presente em uvas, mas poucos isolados são ocratoxigênicos, o que a difere de *A. carbonarius* (CHULZE; MAGNOLI; DALCERO, 2006; LEONG, 2007; LEONG et al., 2006a; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

Em estudos de Serra, Mendonça e Venâncio (2006) ao avaliarem a contaminação por fungos produtores de OTA em uvas sadias utilizadas para elaboração de vinhos portugueses, detectaram que das três espécies de *Aspergillus* isoladas, a mais freqüente foi *A. niger*. Segundo os autores, embora esta espécie seja a mais comum do gênero presente em uvas, não é a espécie responsável pela produção de OTA. Em estudos anteriores, apenas 4% das cepas

de *A. niger* isoladas a partir de uvas foram ocratoxigênicas (SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005; SERRA et al., 2003).

Vários estudos mostram que a espécie *A. carbonarius* é predominantemente responsável pela produção de OTA em uvas cultivadas em países da Europa (BATTILANI et al., 2003; BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006; BAU et al., 2005; BEJAOU et al., 2006a, 2006b; BELLÍ et al., 2004b, 2005b, 2006, 2007; CABAÑES et al., 2002; GOMEZ et al., 2006; SAGE et al., 2002; SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005; SERRA et al., 2003; SERRA; MENDONÇA; VENÂNCIO, 2006; TJAMOS; ANTONIOU; TJAMOS, 2006), na Austrália (LEONG; HOCKING; SCOTT, 2004, 2006a), e na Tunísia (LASRAM et al., 2007).

De acordo com Serra, Braga e Venâncio (2005) dentre as espécies de *Aspergillus* obtidas de uvas, *A. carbonarius* foi o produtor de OTA predominante, com todos os isolados sendo ocratoxigênicos. Em outros estudos, esta espécie foi detectada com elevada frequência, 41-100%, nas amostras examinadas (ABARCA et al., 2003; BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; TÉREN et al., 1996).

Ao contrário de *A. niger* Agregado, 100% das cepas de *A. carbonarius* têm a capacidade de produzir OTA (SERRA; MENDONÇA; VENÂNCIO, 2006). Em Portugal e Espanha, os únicos isolados identificados como *A. carbonarius* que não produziram esta micotoxina (ABARCA et al., 2003; SERRA et al., 2003) foram posteriormente caracterizados e associados a uma nova espécie, *Aspergillus ibericus* (SERRA et al., 2006). Outros pesquisadores afirmaram que certos isolados de *A. carbonarius* não produzem OTA, mas essa hipótese precisa ser investigada (BAU et al., 2005).

Além de *A. carbonarius*, outras espécies da Seção *Nigri* também foram encontradas em uvas como produtoras de OTA (BATTILANI; GIORNI;

PIETRI, 2003). Medina et al. (2005) observaram a produção de OTA por isolados de *A. tubingensis*, originários de uvas.

As espécies *A. niger* e *A. carbonarius* foram encontradas como produtoras de OTA em uvas destinadas à elaboração de vinhos na Itália e na Grécia (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003). No entanto, em outros países europeus, como na Espanha e França, isolados de *A. carbonarius* foram os únicos produtores de OTA da Seção *Nigri* (BAU et al., 2005; SAGE et al., 2002).

Rosa et al. (2002) analisaram amostras das variedades Chardonnay e Malbec da safra 1997/1998 da Argentina e Brasil. Dos fungos pertencentes à Seção *Nigri*, apenas *A. niger* foi isolado das uvas argentinas e destes 17% foram produtores de OTA. Das variedades brasileiras foram obtidas as espécies *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, sendo 30%, 25% e 40% dos isolados produtores de OTA, respectivamente.

A microbiota e o potencial para produção de OTA também foi avaliado por Magnoli et al. (2003) em uvas viníferas da Argentina. A partir das variedades de uvas foram identificados sete gêneros de fungos filamentosos, sendo as espécies de *Aspergillus* isoladas de 70% das amostras. A espécie predominante deste gênero foi *A. niger* (61%) e 41% dos isolados da Seção *Nigri* foram produtores de OTA. Bellí et al. (2006) também destacaram a predominância de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas de diferentes regiões da Espanha.

Em outros estudos, uvas argentinas foram analisadas durante os estágios de desenvolvimento até a colheita e observou-se um aumento na contaminação com espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*. A maioria dos isolados obtidos foi *A. niger* Agregado e apenas 24% dos isolados da Seção *Nigri* foram produtores de OTA. Embora todas as videiras estivessem contaminadas com fungos produtores

de OTA na fase de colheita das uvas, as bagas não apresentaram níveis detectáveis desta toxina (PONSONE et al., 2005).

De acordo com Tjamos et al. (2004) a espécie *A. ochraceus* raramente é isolada de uvas e, portanto, não é considerada uma espécie relevante em relação à produção da OTA nesta fruta.

As espécies do gênero *Penicillium* conhecidas como produtoras de OTA são *Penicillium verrucosum* e *Penicillium nordicum*, comum em cereais e em carne, respectivamente (LARSEN; SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001). Na maioria das pesquisas realizadas com uvas, estas espécies não foram isoladas.

De acordo com Serra, Mendonça e Venâncio (2006) as espécies do gênero *Aspergillus* não são consideradas patógenos primários, mas o dano em uvas devido a diferentes causas, como o ataque por outros fungos ou injúrias mecânicas podem aumentar dramaticamente o risco de infecção fúngica por estas espécies e a contaminação das uvas com OTA.

A diversidade de espécies de fungos encontradas na superfície das uvas depende não somente da variedade da uva, maturidade, práticas culturais, mas também das condições climáticas e geográficas (SAGE; GARON; SEIGLE-MURANDI, 2004).

Vários estudos têm demonstrado que as condições climáticas afetam a intensidade de contaminação, dependendo do ano e da localização do vinhedo (BATTILANI et al., 2006; BELLI et al., 2005c; LEONG et al., 2006a). Segundo alguns autores, a chuva antes da colheita é uma causa comum de dano nas uvas, o que favorece a infecção por fungos do gênero *Aspergillus* e a consequente produção de OTA (COZZI et al., 2007; LEONG; HOCKING; SCOTT, 2004).

Apesar da ampla ocorrência de OTA em vinhos, não há informações precisas sobre a capacidade dos fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* produzirem OTA em diferentes variedades de uvas. Battilani et al. (2004) sugerem que pesquisas visando selecionar variedades de uvas mais resistentes à

fungos produtores de OTA podem ser úteis na prevenção da contaminação com esta micotoxina.

2.6 Ocratoxina A em uvas, vinhos, sucos de uva e derivados

Durante algum tempo, os cereais e produtos animais foram considerados os principais alimentos contaminados com OTA. Na atualidade, sabe-se que esta micotoxina pode estar presente em diversos alimentos. Entre eles, o vinho é considerado uma das principais fontes de OTA para os seres humanos devido à elevada incidência desta micotoxina neste produto (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST, 2003; VISCONTI; PASCALE; CENTONZE, 1999).

A presença de OTA em suco de uva e vinho foi relatada primeiramente por Zimmerli e Dick (1995). Posteriormente, vários estudos foram realizados para avaliar os níveis desta toxina em sucos de uva e vinhos da Europa e da África do Sul. Dados sobre a ocorrência de OTA em vinho apresentaram níveis de até 7,0 µg/L, sendo os níveis mais elevados detectados nos vinhos tintos elaborados na Europa (KOZAKIEWICZ et al., 2003; LO CURTO et al., 2004; OSPITAL et al., 1998; OTTENEDER; MAJERUS, 2000; PIETRI et al., 2001; SAGE et al., 2002; STEFANAKI et al., 2003; VISCONTI; PASCALE; CENTONZE, 1999) e na África do Sul (SHEPHARD et al., 2003).

Os primeiros dados sobre a ocorrência e concentração de OTA em vinho comercializado na Espanha foram apresentados em estudos de Burdaspal e Legarda (1999). A maior incidência e teor desta micotoxina foi detectada em vinhos de sobremesa (cerca de 73%), seguido dos vinhos rosé, tinto e branco. Posteriormente, estudos mostraram a estabilidade da toxina em vinhos do Norte deste país (pelo menos por 12 meses), e a enorme importância de fatores como o ano da colheita que, devido às mudanças nas condições climáticas de ano para

ano, resulta em diferentes porcentagens de vinhos contendo OTA (LÓPEZ-DE-CERAIN et al., 2002).

Ratola, Martins e Alves (2004) 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.

Na Grécia, mais de 66% das amostras apresentaram níveis detectáveis de OTA e os vinhos tintos e doces apresentaram os níveis mais elevados (MARKAKI et al., 2001; SOUFLEROS; TRICARD; BOLOUMPASI, 2003; STEFANAKI et al., 2003). Mais de 50% das amostras analisadas no Chipre e em 100% das amostras da Turquia apresentaram-se contaminadas com esta toxina (ANLI et al., 2005; IOANNOU-KAKOURI et al., 2004). Sugita-Konishi et al. (2006) estudaram os vinhos comercializados no Japão e mostraram que 60% continham OTA.

Estudos mostraram que os vinhos elaborados no Sul da Europa e Norte da África, com clima mediterrâneo, apresentaram maior contaminação com OTA do que os vinhos de regiões mais temperadas da Europa Central (OTTENEDER; MAJERUS, 2000; ZIMMERLI; DICK, 1996). Também foi relatado o efeito do clima sobre a ocorrência de OTA (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003) e produção desta micotoxina por fungos em uvas viníferas (BELLÍ et al., 2005b; SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005; SERRA et al., 2003).

O impacto dos efeitos geográficos sobre a ocorrência de OTA em vinhos tintos também foram relatados por Stefanaki et al. (2003) na Grécia, Ratola, Martins e Alves (2004) em vinhos portugueses e em vinhos chilenos (DÍAZ et al., 2009). A variação entre o teor de OTA em vinhos e a origem geográfica está relacionada com as condições climáticas das regiões vitivinícolas e com a micoflora das uvas (SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005). A ocorrência e as

preocupações relativas à OTA em uvas e vinhos têm sido abordadas em diversos estudos (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006; HOCKING et al., 2007; LEONG et al., 2006a).

Outros estudos realizados na costa do Mediterrâneo mostraram que a concentração de OTA nos vinhos analisados variou entre o intervalo de <0,01-0,76 µg/L, e os autores estimaram o seu consumo em 0,00001 µg/kg/dia (BLESA et al., 2004).

Por ser relatada em vários estudos como contaminante de vinho, suco de uva e uva, avaliações de risco tem sido realizadas para estimar a relevância do consumo humano desta micotoxina (BENFORD et al., 2001; COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES - CEC, 2002; VISCONTI et al., 2008). Em 2002, uma avaliação sobre a ingestão de OTA pela população de países da União Européia concluiu que o vinho contribui com 13% da média de ingestão total, tornando-o a segunda fonte mais relevante. Os cereais foram considerados os contribuintes mais importantes (50%) (CEC, 2002).

Em geral, a ocorrência e concentração de OTA é maior em ano quente e úmido, em regiões temperadas e no Sul, em vinhos doces feitos a partir de uvas mais maduras ou uvas passas, e aumenta a partir de vinho branco a rosado ao vinho tinto (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; BATTILANI; PIETRI, 2002; BAU et al., 2005; BEJAOUI et al., 2006b; BURDASPAL; LEGARDA, 1999; LASRAM et al., 2007; SERRA et al., 2003). A elevada concentração desta micotoxina em vinhos tintos, provavelmente ocorre como resultado de diferenças existentes no processamento dos vinhos (LASRAM et al., 2008).

Em pesquisas sobre os vinhos australianos têm-se observado níveis de OTA inferiores a 0,05 µg/L na maioria das amostras avaliadas, sugerindo que esta micotoxina, geralmente, não está presente em significativas concentrações nestes vinhos (LEONG; HOCKING; SCOTT, 2006b). Além disso, não foram observadas diferenças em relação ao teor de OTA entre vinhos tintos e brancos,

e os vinhos de regiões mais quentes não apresentaram incidência mais elevada (HOCKING et al., 2003), ao contrário do que ocorre na Europa.

Rosa et al. (2004) analisaram o teor de OTA em sucos de uva e vinhos de mesa nacionais e importados comercializados no Rio de Janeiro, Brasil. Foi detectado uma baixa porcentagem de amostras de suco contaminadas com OTA (29%), sendo a concentração máxima obtida de 0,1 µg/L. Nos vinhos, a concentração média de OTA obtida foi de 0,034 µg/L, sendo a maior porcentagem e nível de contaminação detectados em vinhos tinto. Segundo os autores, os sucos e vinhos brasileiros apresentaram baixo teor de OTA, sendo o nível máximo detectado em suco de uva tinto.

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

De acordo com Chulze, Magnoli e Dalcerro (2006), os estudos realizados com sucos de uva e vinhos da América do Sul mostraram que estes contêm níveis de OTA inferiores aos detectados na Europa. Entretanto, mais informações são necessárias para permitir uma melhor determinação do risco de consumo de OTA entre as populações destes países.

Bellí et al. (2004b) analisaram o teor de OTA de quarenta amostras de mostos, elaborados manualmente a partir de uvas tintas e brancas de regiões vinícolas da Espanha. Os autores mostraram que apenas seis mostos estavam contaminados com OTA (15%), sendo o maior teor detectado de 0,813 µg/L.

A OTA também foi detectada em todos os mostos de uvas concentrados analisados por Larcher e Nicolini (2001), com teores entre 0,06-6,18 µg/L e o

mesmo ocorreu em estudos de Burdaspal e Legarda (1999) em ambos os mostos de uvas tintas e brancas.

Em estudos de Lasram et al. (2007) ao avaliarem a ocorrência e níveis de OTA em mostos durante diferentes fases de desenvolvimento de uvas da Tunísia, detectaram OTA em 37% das amostras. No período de maturação, 75% dos mostos continham esta micotoxina.

Recentemente, 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 (intervalo de 0,019-0,05 µg/L) foram maiores do que nos vinhos (0 a 0,021 µg/L).

De acordo com estudos, a produção de OTA cessa no início do processamento, normalmente na etapa de esterilização na indústria de suco e nas etapas iniciais de elaboração de vinhos (ROSET, 2003). Fernandes et al. (2007) também demonstraram que a OTA não é produzida durante a vinificação. Deste modo, a presença de OTA nos mostos e vinhos ocorre em função do crescimento de fungos contaminantes em uvas nas fases de pré e pós-colheita, em etapas anteriores à vinificação e ao processamento (LASRAM et al., 2008).

Os dados sobre a ocorrência de OTA em sucos de uva são de grande importância, já que as crianças são um dos principais consumidores e o consumo de suco é maior que o de vinho (VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006). De acordo com dados relatados por Miraglia e Brera (2002), os sucos de frutas fornecem uma contribuição relevante para ingestão de OTA na população europeia. Em geral, o suco de uva é mais contaminado com OTA do que o vinho (BATTILANI et al., 2003; BAU et al., 2005; BEJAOUI et al., 2006b; LASRAM et al., 2007; OTTENEDER; MAJERUS, 2000; SERRA et al., 2003; ZIMMERLI; DICK, 1996).

Segundo Otteneder e Majerus (2000) 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 redução do teor de OTA durante a vinificação.

Zimmerli e Dick (1996) ao estudarem sucos de uva comercializados na Suíça observaram uma maior média de contaminação no suco de uva tinta do que no suco de uva branca. Na Alemanha, 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%). O nível médio de contaminação nos sucos de uva tinta e branca foi de 2,32 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. (2004b) não encontraram OTA em 10 amostras de suco de uva analisadas. Da mesma forma, no Brasil (ROSA et al., 2004) uma grande percentagem de amostras de suco de uva foram negativas (70,8%) 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. O maior nível foi detectado em uma amostra de suco de uva tinta (0,1 µg/L).

De acordo com estes estudos, pode-se inferir que o padrão de contaminação segue o que ocorre no vinho, ou seja, os sucos de uva tintas apresentam maiores níveis de contaminação do que os sucos de uva branca (DUARTE; PENA; LINO, 2009).

2.7 Ocratoxina A durante o processo de vinificação

Em vários estudos tem sido investigado o destino da OTA ao longo da vinificação experimental (CARIDI et al., 2006; CECCHINI et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; GAMBUTI et al., 2005; LEONG et al., 2006c; RATOLA et al., 2005), e os autores mencionam que há um decréscimo no teor desta toxina durante este processo.

Estudos têm sugerido que a maior diminuição desta toxina durante a vinificação ocorre após etapas de separação das fases sólido:líquido, através da decantação de precipitados sólidos do vinho (FERNANDES et al., 2003, 2007; LEONG et al., 2006b). Muitos dos sólidos presentes no suco de uva tem afinidade com a OTA, podendo precipitar a toxina da solução (ROSET, 2003).

Leong, Hocking e Scott (2004) relataram reduções na concentração de OTA em torno de 80% durante a vinificação tanto de vinho tinto quanto de branco. O principal modo de remoção da OTA foi através de sua ligação aos componentes sólidos da uva e à proteínas, conforme também foi relatado por Fernandes et al. (2003). As partes sólidas da uva são na sua maioria removidas durante a prensagem. Nesta etapa, uma redução de 70% no teor de OTA foi observada. Neste estudo, após a vinificação, os vinhos tintos reteram três vezes mais OTA do que os vinhos brancos.

Ratola et al. (2005) também observaram uma significativa diminuição da concentração de OTA durante o processo de microvinificação de vinho do Porto. Os níveis da toxina diminuíram em todas as etapas do processo de produção do vinho. A diminuição no teor de OTA foi mais pronunciada no mosto inicial do que após o início da fermentação. Segundo os autores, embora tenha sido relatado em diversos estudos que certa quantidade de OTA é removida juntamente com a remoção das partes sólidas, sabe-se que elevados níveis de OTA em uvas representam um elevado risco de contaminação no vinho.

Em estudos de Lasram et al. (2008) ao avaliarem o teor de OTA durante a microvinificação de vinho tinto, observaram que após a maceração a concentração de OTA aumentou significativamente, indicando que a casca da uva é, provavelmente, a parte mais contaminada do fruto. Também mostraram que a fermentação alcoólica reduziu significativamente o teor de OTA contido inicialmente nas uvas. Ao final do processo observou-se um decréscimo de 41% no conteúdo inicial de OTA. Resultados semelhantes foram observados durante o processo de macrovinificação dos vinhos.

As influências sobre a diminuição do teor de OTA durante as etapas iniciais de vinificação estão associadas com o efeito da remoção de sólidos por precipitação (DEL-PRETE et al., 2007; NUNEZ et al., 2008). Entretanto, ao final do processo, esta redução está relacionada com outros eventos, além da precipitação e filtração de sólidos (ANGIONI et al., 2007).

A remoção de OTA durante a fermentação alcoólica é relatada por diversos autores. Abrunhosa, Fernandes e Venâncio (2005) demonstraram que 31% do teor inicial de OTA foi reduzido após a fermentação alcoólica de vinho tinto. Lataste et al. (2004) também relataram que houve uma redução linear da concentração de OTA durante este processo. De acordo com alguns estudos, esta redução ocorre como resultado de mecanismos de adsorção e não de biodegradação da toxina (BEJAoui et al., 2004; BEZZO; MAGGIOROTTO; TESTA, 2002; BRAGULAT; ABARCA; CABANES, 2001; CARTESIO; CAMPOS, 1988; CECCHINI et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; LATASTE et al., 2004).

A adsorção de OTA, provavelmente, ocorre pela parede da célula de levedura que contém manoprotéínas, que são compostos capazes de se ligar a micotoxinas, como por exemplo o mananligossacarídeo modificado derivado da célula de *Saccharomyces* (DEVEGOWDA; ARAVIND; MORTON, 1996).

Além disto, de acordo com Cecchini et al. (2006), as leveduras adsorvem OTA diferentemente quando têm-se mosto tinto ou branco.

A OTA encontra-se fundamentalmente na casca da uva (LASRAM et al., 2008) e, portanto, apresenta-se em maior quantidade nos vinhos tintos em relação aos rosados e brancos devido às características do processo de vinificação (MORUNO, 2002).

No caso do vinho branco, após o desengace e o esmagamento, as partes sólidas da uva são separadas do mosto, havendo pouco contato deste com as cascas e sementes (SOUFLEROS; TRICARD; BOLOUMPASI, 2003). Já no vinho tinto e rosado, após o desengace e o leve esmagamento, as partes sólidas permanecem em contato com o mosto para potencializar a extração de cor e aromas, sendo este tempo maior para os tintos. É nesta fase que ocorre maior extração da micotoxina, quando está presente nas uvas (FERNANDES et al., 2003).

2.8 Fatores relacionados com o crescimento e produção de OTA por fungos

A produção de metabólitos secundários não é essencial para o desenvolvimento do fungo e é regulada por vários sinais ambientais (MÜHLENCOERT et al., 2004). O estresse é freqüentemente mencionado como uma causa para a síntese de micotoxinas (BIRZELE; PRANGE; KRÄMER, 2000).

Existem vários parâmetros que influenciam a contaminação fúngica, crescimento e produção de Ocratoxina A, tais como temperatura, atividade de água (a_w), pH, fatores nutricionais, dentre outros (ANLI; ALKIS, 2010; LASRAM et al., 2010). Dentre esses parâmetros ambientais, os mais importantes são a temperatura e a disponibilidade de água (MAGAN; LACEY,

1984), que são mais restritivos para a produção de micotoxinas do que para o crescimento de fungos (MAGNOLI et al., 2007).

O efeito da temperatura e da atividade de água no crescimento e produção de OTA por espécies de *A. carbonarius* isolados de vinhedos europeus e australianos foi analisado em vários estudos (BELLÍ et al., 2004a, 2005a; ESTEBAN et al., 2006; LEONG; HOCKING; SCOTT, 2006a; MITCHELL; ALDRED; MAGAN, 2003; MITCHELL et al., 2004). Observou-se que, em geral, as condições favoráveis para o crescimento deste fungo ocorrem nas faixas de 25 a 35 °C e na a_w entre 0,95-0,99, e a condição ótima para a produção da toxina ocorre no intervalo de 15 a 20 °C e 0,95-0,98 de a_w . Algumas diferenças foram observadas, provavelmente em decorrência do conjunto de condições avaliadas e da variabilidade entre os isolados de *A. carbonarius* testados.

A temperatura ideal para o crescimento de *A. niger* é relatada entre 35-37 °C (LEONG; HOCKING; SCOTT, 2004; PANASENKO, 1967) e 30-37 °C (BELLÍ et al., 2004a). E a produção máxima de OTA por isolados de *A. niger* Agregado ocorre entre 20-25 °C (ESTEBAN et al., 2004), sendo uma faixa de temperatura superior ao observado para *A. carbonarius* (BELLÍ et al., 2005a; ESTEBAN et al., 2004; MITCHELL et al., 2004).

Em estudos de Lasram et al. (2010) nenhuma correlação pôde ser obtida entre crescimento e produção de OTA por *A. carbonarius*, o que está de acordo com dados da literatura. Segundo Marín et al. (2006) em temperaturas elevadas, *A. carbonarius* cresce rapidamente com o consumo máximo de nutrientes do meio de cultura em poucos dias. De acordo com Lasram et al. (2010) é provável que este fungo utilize alguns nutrientes do substrato para a produção de OTA, deste modo, em alta temperatura, há diminuição da capacidade de produção da toxina em função do esgotamento de nutrientes do meio. Segundo os autores,

isto explica porque ocorre a produção máxima de OTA em temperaturas inferiores a de crescimento máximo.

Além de fatores ambientais, as características do substrato, a presença de microflora competitiva e a integridade do grão, são importantes para contaminação por espécies de *Aspergillus* e a produção de OTA (RAMOS et al., 1998).

O conhecimento sobre a ecologia e fisiologia de espécies potencialmente ocratoxigênicas pode fornecer ferramentas importantes para controlar a contaminação com OTA durante a produção de uvas (LASRAM et al., 2010).

2.9 Medidas preventivas e de descontaminação

Várias medidas têm sido testadas para reduzir a ocorrência de OTA em uvas e também para remoção da toxina durante e após a vinificação (SOLFRIZZO et al., 2010). Estratégias preventivas, como a utilização de agentes biocontroladores e fungicidas, têm sido utilizadas para controlar a contaminação com OTA nas videiras (BELLÍ et al., 2007; COZZI et al., 2009; FELICE et al., 2008; VISCONTI et al., 2008).

De acordo com Bejaoui et al. (2006a) a contaminação de uvas e produtos derivados com OTA pode ser considerado como um grave problema para saúde. Para compreender a origem desta contaminação e desenvolver medidas de controle, vários estudos têm sido feitos em diversos países, especialmente na Europa. Melhorias nas práticas vitivinícolas e de elaboração do vinho são necessárias para reduzir a presença de OTA (JØRGENSEN, 2005; ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET VIN - OIV, 2005).

Martínez-Rodríguez e Carrascosa (2009) afirmam que não existem dados bibliográficos disponíveis que sugerem o desenvolvimento de *Aspergillus carbonarius* ou de outras espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* durante o

processamento do mosto e, portanto, a presença de OTA deve ser atribuída a um desenvolvimento do fungo em etapas anteriores. Deste modo, segundo os autores, devem ser aplicadas medidas preventivas durante a fase de cultivo da uva para evitar o desenvolvimento de *Aspergillus carbonarius* e, conseqüentemente, a síntese da OTA. Assim, inicialmente, as principais medidas a serem tomadas são aquelas aplicadas para evitar danos na baga.

De acordo com estudos, deve-se limitar as possíveis vias que favorecem a infecção fúngica da baga, como por exemplo, ataques de insetos (COZZI et al., 2006) e outras pragas, ou a ação de fungos como *Botrytis cinerea*. Tratamentos químicos com fungicidas para o controle de *A. carbonarius* e *A. niger* Agregado têm sido estudados (VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006), entretanto as medidas de controle biológico, tais como o uso de leveduras epífitas (BLEVE et al., 2006) são preferíveis.

Para evitar a contaminação dos produtos com OTA sugeriu-se, inicialmente, que as camadas externas em contato com os fungos fossem retiradas dos alimentos (ALLDRICK, 1996). Entretanto, no caso de cereais e uvas, este procedimento é inviável. Também foi proposto a eliminação dos produtos contaminados com fungos do processo de produção (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006), o que pode reduzir o risco de contaminação com a micotoxina, mas a ausência do fungo não indica necessariamente que a toxina não esteja presente (AMÉZQUETA et al., 2009).

Outra medida preventiva, comumente aplicada no início do processamento da uva e elaboração do vinho, é a estabilização de mostos pela adição de sulfito, para impedir o crescimento de microrganismos indesejáveis (ROSET, 2003). No entanto, este composto não atua na redução ou degradação da OTA (HOCKING et al., 2007).

Segundo Solfrizzo et al. (2010) as medidas preventivas não impedem completamente a contaminação por OTA, sendo necessário a adoção de ações

corretivas, como a utilização de agentes capazes de remover a toxina de mostos e vinhos contaminados.

Métodos para descontaminação de alimentos com OTA são classificados dentro de três principais categorias: físicos, químicos e microbiológicos. O objetivo destes métodos é reduzir ou eliminar o efeito tóxico da OTA por destruição, modificação ou adsorção desta micotoxina (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2003). O método ideal deve ser econômico, não gerador de componentes tóxicos e não alterar os parâmetros de qualidade dos alimentos, como a composição nutricional (ANLI; ALKIS, 2010).

Com relação aos métodos físicos, têm-se os tratamentos térmicos, que não eliminam completamente a OTA (BOUDRA; LE-BARS; LE-BARS, 1995). Já o processo de congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, com descongelamento a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$, e tratamentos com radiações UV e gama, são capazes de diminuir a esporulação. No entanto, a OTA pode ser destruída apenas pela aplicação de radiações gama (AMÉZQUETA et al., 2009; AZIZ; MOUSSA; FAR, 2004).

Para a desintoxicação dos alimentos com OTA, muitos materiais químicos adsorventes como o carvão ativado, colestiramina, sódio, silicato de alumínio e cálcio, bentonita, além de fragmentos de madeira e leveduras foram testados (PITT; HOCKING, 1997; RINGOT et al., 2006; SAMSON et al., 2004; VARGA et al., 2003). Alguns destes compostos foram testados *in vivo*, porém, a atividade da maioria deles não foi tão eficiente quanto esperado, exceto para o carvão ativado (HARRIS; MANTLE, 2001; SCOTT et al., 1995).

O carvão enológico tem sido utilizado como uma prática aceitável para redução do teor de OTA em vinhos contaminados (EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE - EESC, 2006). Entretanto a eficácia do carvão na remoção da toxina está diretamente relacionada com a alteração dos parâmetros de qualidade de vinho, como o conteúdo de polifenóis (CASTELLARI et al., 2001; VISCONTI et al., 2008).

Estudos sobre o destino de OTA durante a vinificação de uvas tintas demonstraram que 95% da toxina originalmente presente na uva permanece adsorvida nos bagaços de uvas (VISCONTI et al., 2008). Altos níveis de OTA foram detectados em bagaço de uva tinta da safra de 2005, que foi particularmente propícia para infecção por *A. carbonarius*, o que confirma a elevada afinidade entre OTA e bagaços (SOLFRIZZO; PANZARINI; VISCONTI, 2008).

Solfrizzo et al. (2010) mostraram em seus estudos a elevada capacidade de remoção de OTA (50-65%) por bagaços de uvas em vinhos tintos. Além disso, afirmam que a remoção de OTA por bagaços de uva da mesma variedade utilizada na elaboração do vinho é eficiente e não afeta os parâmetros relevantes de qualidade do vinho, como intensidade de cor e conteúdo de compostos fenólicos. Deste modo, os autores sugerem este procedimento de descontaminação como um método útil para atender o limite de OTA regulamentado pela UE.

Outro método de descontaminação proposto é a ozonização. O desenvolvimento de técnicas eletroquímicas tem permitido o uso do ozônio na remoção de OTA para níveis indetectáveis em alimentos, como grãos, frutas e hortaliças (AMÉZQUETA et al., 2009).

A enzima carboxipeptidase A é capaz de destruir a OTA e o uso de cepas atoxigênicas de *A. niger* como fonte desta enzima tem sido sugerido na literatura (MERWE et al., 1965). Outras enzimas que são obtidas a partir de isolados desta espécie e que podem degradar eficientemente a OTA são lipases (SOLEAS; YAN; GOLDBERG, 2001), algumas proteases (ABRUNHOSA; SANTOS; VENÂNCIO, 2006) e uma metaloenzima (ABRUNHOSA; VENÂNCIO, 2007). A carboxipeptidase presente em *Phaffia rhodozyma* também pode degradar a OTA em até 90% (AMÉZQUETA et al., 2009; PASTER; LISKER; CHET, 1983).

A OTA é conhecida por causar danos à membrana celular através do aumento da peroxidação lipídica (ANLI; ALKIS, 2010), por isso as propriedades protetoras, contra a ação tóxica desta micotoxina, de substâncias antioxidantes estão sendo pesquisadas (ATROSHI et al., 2002). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a melatonina (ABDEL-WAHHAB; ABDEL-GALIL; EL-LITHEY, 2005), ácido rosmarínico (REINSCH et al., 2007), α -tocoferol, retinol, ácido ascórbico (GJERTEN; TROLLE; ANDERSEN, 1963), L-metionina (ABDEL-WAHHAB; NADA; ARBID, 1999), aspartame (CREPPY, 1999), polifenóis (COSTA et al., 2007), antioxidantes combinados (ATROSHI et al., 2000) e diferentes tipos de alcalóides (LARSSON; MÖLLER, 1996) são capazes de neutralizar alguns dos efeitos tóxicos da OTA.

Na indústria, os processos microbiológicos que atuam na redução dos níveis de OTA são, por exemplo, a maltagem e a fermentação (AMÉZQUETA et al., 2009; KOZAKIEWICZ, 1989). A OTA pode ser removida por microrganismos como consequência do seu metabolismo, ou por adsorção celular.

Bejaoui et al. (2004) avaliaram a capacidade de remoção de OTA por linhagens enológicas selecionadas de *Saccharomyces* em suco de uva natural e sintético. Os autores observaram que as linhagens foram capazes de reduzir significativamente o nível de OTA, através de mecanismos de adsorção celular e não de degradação. Além disso, mostraram que as células de levedura tratadas com calor (mortas) são capazes de remover aproximadamente 90% do teor de OTA por um processo rápido de adsorção (5 min), o que pode ser uma medida útil na descontaminação de suco de uva, já que as células estão inviáveis e não há risco de iniciar processos fermentativos.

A capacidade de degradação de OTA por isolados das espécies *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. japonicus*, obtidos de uvas, foi estudada na França (BEJAOUI et al., 2006a). Observou-se em ambos os meios, caldo Czapek

extrato de levedura (CYB) e em meio sintético de suco de uva (SGM), que todos os isolados foram capazes de degradar a OTA em OT α (baixa toxicidade). A espécie que apresentou melhor capacidade de degradação foi *A. niger*.

Bejaoui et al. (2006a) também estudaram a cinética de descontaminação do suco de uva por estas espécies, e mostraram que *A. niger* foi capaz de degradar totalmente a OTA, enquanto que *A. carbonarius* e *A. japonicus* degradaram parcialmente. Em apenas cinco dias, 99% da OTA foi degradada por *A. niger*. Os autores sugerem a utilização da espécie *A. niger*, por ser um fungo reconhecido como seguro (baixa toxicidade), para eliminação biológica de OTA em sucos de uva e mosto.

A degradação da OTA por algumas espécies da Seção *Nigri* ocorre, em meio de cultura, por clivagem da molécula na porção isocumarina, ocratoxina α e fenilalanina, e a partir daí em vários outros produtos (LEONG, 2007; VALERO et al., 2006). Segundo Hocking et al. (2007) esta degradação pode ser benéfica para o fungo como fonte de nitrogênio orgânico para o crescimento, mas não se sabe se este processo ocorre em uvas naturalmente infectadas.

A ação das bactérias do ácido láctico sobre a OTA durante a fermentação malolática varia de acordo com a cepa. Certas cepas parecem remover a toxina somente através do mecanismo de adsorção, como observado para as leveduras (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 degradam a OTA em ocratoxina α , e podem diminuir a concentração da toxina no vinho em até 80% (FUMI; GALLI; SILVA, 2005).

REFERÊNCIAS

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

ABDEL-WAHHAB, M. A.; ABDEL-GALIL, M. M.; EL-LITHEY, M. Melatonin counteracts oxidative stress in rats fed with an ochratoxin A contaminated diet. **Journal of Pineal Research**, Copenhagen, v. 38, n. 2, p. 130-135, Mar. 2005.

ABDEL-WAHHAB, M. A.; NADA, A. S.; ARBID, M. S. Ochratoxicosis: prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 19, n. 1, p. 7-12, Jan./Feb. 1999.

ABID, S. et al. Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: is the situation endemic? **Human & Experimental Toxicology**, Hampshire, v. 22, n. 2, p. 77-84, Feb. 2003.

ABRUNHOSA, L.; FERNANDES, A.; VENÂNCIO, A. Ochratoxin A removal during the main steps of wine making. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DOS ALIMENTOS, 7., 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: IPV/SPQ, 2005. p. 13-16.

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, Dec. 2006.

ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochatoxin 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, E. 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.

ALLDRICK, A. J. The effects of processing on the occurrence of ochratoxin A in cereals. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 15, p. 27-28, Oct. 1996.

AMÉZQUETA, S. et al. Ochratoxin A decontamination: a review. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 4, p. 326-333, Apr. 2009.

AMORIM, D. A. et al. Elaboração de vinho tinto fino. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 234, p. 65-76, ago. 2006.

ANGIONI, A. et al. In vitro interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 5, p. 2043-2048, Mar. 2007.

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

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

ATROSHI, F. et al. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, Limerick, v. 180, n. 2, p. 151-167, Nov. 2002.

_____. Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, Bethesda, v. 3, n. 3, p. 281-291, Nov. 2000.

AZIZ, N. H.; MOUSSA, L. A. A.; FAR, F. M. E. Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma-radiation. **Journal Food Safety**, Westport, v. 24, n. 2, p. 109-127, July 2004.

BACHA, H. et al. Ochratoxines et ochratoxicoses humaine en Tunisie. In: CREPPY, E.; CASTEGNARO, M.; DIRHEIMER, G. (Ed.). **Human ochratoxicosis and its pathologies**. Paris: J. Libbey, 1993. p. 111-121.

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

_____. 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 of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 13, p. 1736-1740, Oct. 2004.

BATTILANI, P.; GIORNI, P.; PIETRI, A. Epidemiology of toxin producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 715-722, 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. 52-54, Sept. 2006.

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 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. 6, p. 1038-1044, June 2004.

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**, Oxford, v. 98, n. 4, p. 839-844, Apr. 2005a.

_____. 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.

_____. 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.

_____. 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.

BELLÍ, N. et al. 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-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. 2005b.

_____. 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.

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).

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

BEZZO, G.; MAGGIOROTTO, G.; TESTA, F. **A method for the determination of specific mycotic contaminants random occurring in wines**. Paris: Office International de la Vigne et du Vin, 2002. 112 p.

BIRZELE, B.; PRANGE, A.; KRÄMER, J. Deoxynivalenol and Ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 12, p. 1027-1035, Dec. 2000.

BLESA, J. et al. Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian Community, Spain. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 154, n. 1/2, p. 397-401, Oct. 2004.

BLEVE, G. et al. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 204-209, Apr. 2006.

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.

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

BULLERMAN, 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.

CABAÑAS, R. et al. Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish market. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 5, p. 642-647, Aug. 2008.

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.

CALDAS, G. M. M. et al. Occurrence of patulin in grape (*Vitis vinifera* L. cv. 'Rubi') with indication of the sour rot. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 14-18, jan./fev. 2008.

CARIDI, A. et al. Ochratoxin A removal during winemaking. **Enzyme and Microbial Technology**, London, v. 40, n. 1, p. 122-126, Dec. 2006.

CARTESIO, M. S.; CAMPOS, T. V. Malolactic fermentation in wine: improvement in paper chromatographic techniques. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 39, n. 2, p. 188-189, June 1988.

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, July 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. 5, p. 411-417, Aug. 2006.

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.

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.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Commission regulation (EC) n° 472**: amending regulation (EC) n° 466 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. Brussels, 2002. 20 p.

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:2005:025:0003:0005:EN:P DF>>. Acesso em: 10 out. 2010.

COSTA, S. et al. Natural free-radical scavengers against ochratoxin A-induced cell damage in a pig kidney cell line (LLCPK1). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 10, p. 1910-1917, Oct. 2007.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins**: risks in plants, animal and human systems. Ames, 2003. 199 p. (Report, 139).

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

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

_____. Influence of *Lobesia botrana* field control on black *Aspergillus* rot and ochratoxin A contamination in grapes. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 4, p. 894-897, Apr. 2009.

CREPPY, E. E. Human ochratoxicosis. **Journal of Toxicology**, New York, v. 18, n. 2, p. 277-293, June 1999.

DEL-PRETE, V. et al. In vitro removal of Ochratoxin A by wine lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 7, n. 9, p. 2155-2160, Sept. 2007.

DEVEGOWDA, G.; ARAVIND, B. I. R.; MORTON, M. G. *Saccharomyces cerevisiae* and mannanoligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers. In: AUSTRALIAN POULTRY SCIENCES SYMPOSIUM, 8., 1996, Melbourne. **Proceedings...** Melbourne: APS, 1996. p. 103-106.

DÍAZ, G. A. et al. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 133, n. 1/2, p. 195-199, July 2009.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Ochratoxin A non-conventional exposure sources: a review. **Microchemical Journal**, London, v. 93, n. 2, p. 115-120, June 2009.

_____. Review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 2, p. 187-198, Feb. 2010.

ESTEBAN, A. et al. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by Black *Aspergillus*. **Research in Microbiology**, Paris, 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.

EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE. **Opinion of the European Economic and Social Committee on the 'Proposal for a Council Regulation amending Regulation (EC) n° 1493/1999 on the common organization of the market in wine'**: official journal of the European Union 2006, C28/13. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2006:028:0068:0068:EN:pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2010.

FELICE, D. V. de et al. Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 12, p. 1261-1270, Dec. 2008.

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. **Aspects of Applied Biology**, London, v. 68, n. 1, p. 73-80, Nov. 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.

FLAMINI, R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry: part I, polyphenols. **Mass Spectrometry Reviews**, Conegliano, v. 22, n. 4, p. 218-250, July/Aug. 2003.

FRISVAD, J. C. et al. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 59, n. 1, p. 31-37, Oct. 2007.

FUMI, M. D.; GALLI, R.; SILVA, A. Ochratoxin A reduction by lactic acid bacteria. In: _____. **Ochratoxin A in grapes and wine: prevention and control**. Sicily: WHO, 2005. p. 20-21.

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

GJERTEN, P.; TROLLE, B.; ANDERSEN, K. Weathered barley as a contributory cause of gushing in beer. In: EUROPEAN BREWERY CONVENTION CONGRESS, 2., 1963, Brussels. **Proceedings...** Brussels: Elsevier Scientific, 1963. p. 320-341.

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

GOMEZ, C. et al. Ochratoxin A producing fungi from grapes intended for liqueur wine production. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 6, p. 541-545, Sept. 2006.

GROSSO, F. et al. New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 41, n. 8, p. 1133-1140, Aug. 2003.

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. 1/2, p. 84-88, Feb. 2007.

_____. Occurrence of ochratoxin A in Australian wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Melbourne, v. 9, n. 1, p. 72-78, Apr. 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Banco de dados agregados**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 2 dez. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. **Regiões produtoras**. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php>>. Acesso em: 2 dez. 2010.

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).

IOANNOU-KAKOURI, E. et al. Occurrence and control of mycotoxins in foodstuffs in Cyprus. In: _____. **An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. p. 51-65.

JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Geneva, 2001. (WHO Food Additives Series, 47). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=RedirectURL&_method=externObjLink&_locator=url&_cdi=6800&_issn=07400020&_origin=article&_zone=art_page&_plusSign=%2B&_targetURL=http%253A%252F%252Fwww.inchem.org%252Fdocuments%252Fjecfa%252Fjecmono%252Fv47je01.htm>. Acesso em: 22 out. 2010.

JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Geneva, 2008. (WHO Food Additives Series, 59).

Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=RedirectURL&_method=externObjLink&_locator=url&_cdi=6800&_issn=07400020&_origin=article&_zone=art_page&_plusSign=%2B&_targetURL=http%253A%252F%252Fwhqlibdoc.who.int%252Fpublications%252F2008%252F9789241660594_eng.pdf>. Acesso em: 22 out. 2010.

JONHSON, H. A. **História do vinho**. São Paulo: Companhia das Letras, 2001. 526 p.

JØRGENSEN, 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.

KOZAKIEWICZ, Z. **Aspergillus species on stored products**. Kew: CAB International Mycological Institute, 1989. 188 p. (Mycological Paper, 161).

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

KROGH, P. Causal associations of mycotoxic nephropathy. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section A**, Copenhagen, v. 269, n. 1, p. 1-28, Apr. 1978.

LARCHER, R.; NICOLINI, G. Survey of ochratoxin A in musts, concentrated musts and wines produced or marketed in Trentino, Italy. **Journal of Commodity Science**, Pescara, v. 40, n. 2, p. 69-78, Mar. 2001.

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.

LARSSON, K.; MÖLLER, T. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in barley, wheat bran, and rye by the AOAC/IUPAC/NMKL method: NMKL collaborative study. **AOAC International**, Arlington, v. 79, n. 5, p. 1102-1106, Nov. 1996.

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.

_____. 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.

LATASTE, C. et al. Evolution de la contamination en ochratoxine A: du vignoble Français au vin. **Le Progrès Agricole et Viticole**, Année, v. 121, n. 3, p. 57-64, Aug. 2004.

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

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. 2006a.

_____. Black *Aspergillus* species in Australian vineyards: from soil to ochratoxin A in wine. In: HOCKING, J. I. et al. (Ed.). **Advances in food mycology**. New York: Springer, 2006b. p. 153-171.

_____. 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.

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**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 124-133, Jan. 2007.

_____. 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. 2006a.

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; SCOTT, E. S. Ochratoxin A: from grapes to wine. In: AUSTRALIAN WINE INDUSTRY TECHNICAL CONFERENCE, 20., 2004, Melbourne. **Proceedings...** Melbourne: Australian Wine Industry Technical, 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. 83-87, Sept. 2006b.

LEONI, L. A. B.; SOARES, L. M. V.; OLIVEIRA, P. L. C. Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 10, p. 867-870, Oct. 2000.

LO CURTO, R. et al. Ochratoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatments on grapes. **Food Chemistry**, London, v. 84, n. 1, p. 71-75, Jan. 2004.

LOGRIECO, A. et al. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 645-667, Feb. 2003.

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

MAAROUFI, K. et al. Human nephropathy related to ochratoxin A in Tunisia. **Journal of Toxicology**, New York, v. 15, n. 3, p. 223-237, June 1996.

MAGAN, N.; LACEY, J. Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 82, n. 1, p. 71-81, Feb. 1984.

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

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

MARÍN, S. et al. Kinetics of ochratoxin A production and accumulation by *Aspergillus carbonarius* on synthetic grape medium at different temperature levels. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 6, p. 196-200, Aug. 2006.

MARKAKI, P. et al. Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 4, p. 533-537, Apr. 2001.

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.

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. de. **Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial: panorama 2009**. Brasília, 2010a. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/mercextvi2009vf.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2011.

_____. **Produção e comercialização de uvas e vinhos: panorama 2005**. Brasília, 2006. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama2005-produção.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2010.

_____. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2009**. Brasília, 2010b. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2009vf.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2010.

MERWE, K. J. van der. et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, London, v. 205, n. 976, p. 1112-1113, Mar. 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, reports of experts participating in task 3.2.7. Rome: General Health and Consumer Protection, 2002. Disponível em: <http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2010.

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 and Applied Microbiology**, London, v. 97, n. 2, p. 439-445, Aug. 2004.

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.

MOREIRA, A. N. et al. **Cultivo da videira**. Brasília: EMBRAPA Semi-Árido, 2004. Disponível em: <<http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/.../Uva/CultivodaVideira/index.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2010.

MORUNO, E. G. **La determinación de la Ocratoxina A en La uva y en los cultivos de hongos**. Paris: OIV, 2002. 18 p. (Bulletin OIV, 1170).

MÜHLENCOERT, E. et al. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5/6, p. 651-659, Nov. 2004.

NUNEZ, Y. P. et al. Effects of aging and heat treatment on whole yeast cells and yeast cell walls and on adsorption of ochratoxin A in a wine model system. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 7, p. 1496-1499, July 2008.

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.

ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET VIN. **Resolution VITI-OENO 1/2005**: code of sound vitivinicultural practices in order to minimise levels of ochratoxin A in vine-based products. Paris, 2005. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=RedirectURL&_method=externObjLink&_localoc=url&_cdi=5061&_issn=01681605&_origin=article&_zone=art_page&_plusSign=%2B&_targetURL=http%253A%252F%252Fnews.reseauconcept.net%252Fimages%252Foiv_uk%252FClient%252FVITI-OENO_1-2005_EN.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2009.

OSPITAL, M. et al. L'ochratoxine A dans les vins. **Revue Française D'Œnologie**, Paris, v. 65, n. 6, p. 164-166, 1998.

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

PANASENKO, V. Ecology of microfungi. **Botanic Reviews**, Cambridge, v. 33, n. 3, p. 189-215, July/Sept. 1967.

PASTER, N.; LISKER, N.; CHET, I. Ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus* Wilhem grown under controlled atmospheres. **Applied and Environmental Microbiology**, London, v. 45, n. 3, p. 1136-1139, Mar. 1983.

PEREIRA, G. E. **Notas técnicas**. Curitiba: CODEVASF, 2006. Disponível em: <<http://www.vinhovASF.com.br/site/arquivos/NotasTecnicas.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

PÉREZ-DE-OBANOS, A. et al. Ochratoxina A en plasma humano: nuevos datos de exposición en España. **Revista de Toxicología**, Pamplona, v. 18, n. 1, p. 19-23, 2001.

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

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.

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

PONSONE, L. et al. *Aspergillus* section *Nigri* and ochratoxin A in Argentinean wine grape. In: INTERNATIONAL WORKSHOP: OCHRATOXIN A IN GRAPES AND WINE: PREVENTION AND CONTROL, 1., 2005, Marsala. **Proceedings...** Zagreb: University of Zagreb, 2005. p. 66.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; ABRANTES, F. M. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 192-196, ago. 2000.

PROTAS, J. F. S. da. **O Brasil vitivinícola: regiões produtoras**. Brasília: EMBRAPA, 2005. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/palestras/regioes.pdf>>. Acesso em: 5 ago. 2009.

PROTAS, J. F. S. da; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. R. **A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas**. Brasília: EMBRAPA, 2001. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/>>. Acesso em: 14 nov. 2010.

_____. Vitivinicultura brasileira: regiões tradicionais e pólos emergentes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 234, p. 7-15, mar. 2006.

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

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

REINSCH, M. et al. Determination of ochratoxin A in beer by LC-MS/MS ion trap detection. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 312-317, Oct. 2007.

RINGOT, D. et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin 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 de sucos**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2007.
Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos>>. Acesso em: 15 dez. 2010.

ROSA, C. A. R. 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 OTA producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 4, p. 408-414, May 2002.

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

ROSSI, P. et al. Early detection of ochratoxigenic fungi in wine grapes and of ochratoxin A in wine. **Annales de Microbiologie**, Paris, v. 61, n. 1, p. 11-15, Jan. 2010.

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, Sept. 2004.

SAMSON, R. A. et al. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 50, n. 2, p. 45-61, Dec. 2004.

SAMSON, R. A.; HONG, S. B.; FRISVAD, J. V. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Medical Mycology**, North Adelaide, v. 44, n. 4, p. 133-148, May 2006.

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

SCOTT, P. M. et al. Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B1 and B2. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 1, p. 31-40, Jan./Feb. 1995.

SELWYN, B. Globalized horticulture: the formation and global integration of export grape production in North East Brazil. **Journal of Agrarian Change**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 537-563, Oct. 2010.

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

_____. 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.

SHEPHARD, G. S. et al. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 4, 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.

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

SILVA, R. 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.

SOLEAS, G. J.; YAN, J.; GOLDBERG, D. M. Assay of ochratoxin A in wine and beer by high pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 6, p. 2733-2740, June 2001.

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.

SOLFRIZZO, M.; PANZARINI, G.; VISCONTI, A. Determination of ochratoxin A in grapes, dried vine fruits, and winery by-products by high performance liquid chromatography with fluorometric detection and immunoaffinity clean up. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 23, p. 11081-11086, Dec. 2008.

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

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.

STOJKOVIC, R.; GANULIN, S.; PLESTINA, R. High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents. **Biochemistry International**, Marrickville, v. 9, n. 1, p. 33-38, July 1984.

STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, C. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. **Archives of Toxicology**, San Diego, v. 74, n. 9, p. 499-510, Nov. 2000.

SUGITA-KONISHI, Y. et al. Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, and fumonisins in retail foods in Japan. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, n. 6, p. 1365-1370, June 2006.

TÉREN, J. et al. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 134, n. 3, p. 171-176, Oct. 1996.

THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **Trends in Genetics**, London, v. 22, n. 9, p. 511-519, Sept. 2006.

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.

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

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. **Produção de uvas, elaboração de vinhos e derivados: 1998-2009**. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/pdf/safra_uva1998-2009.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2010.

VALERO, A. et al. Kinetics and spatial distribution of OTA in *Aspergillus carbonarius* cultures. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 8, p. 753-756, Dec. 2006.

VALEXPOR. **Valexport e a fruticultura no Vale do São Francisco**. Petrolina, 2002. Disponível em: <<http://www.valexport.com.br>>. Acesso em: 10 out. 2010.

VARGA, J. et al. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 29-36, Jan. 2003.

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

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

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTONZE, G. Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography analysis with fluorometric detection: collaborative study. **AOAC International**, Arlington, v. 84, n. 6, p. 1818-1827, Jan. 2001.

_____. Determination of Ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 864, n. 1, p. 89-101, Dec. 1999.

WINES FROM BRAZIL. **Exportações 2009**. Disponível em:
<<http://www.winesfrombrazil.com/admin/UPLarquivos/050420100844352.pdf>>
. Acesso em: 3 nov. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of certain mycotoxins in food. **WHO Technical Report**, Lausanne, v. 906, n. 1, p. 11-44, Apr. 2002.

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 wines and grapejuice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 6, p. 655-668, Aug./Sept. 1996.

CAPÍTULO 2

***Aspergillus* ocratoxigênicos em solos de videiras, uvas e mostos do Nordeste do Brasil**

RESUMO

No presente estudo, objetivou-se avaliar a ocorrência de fungos ocratoxigênicos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* em solos com cultivo de videiras, uvas e mostos do Nordeste brasileiro. Analisou-se um total de dez amostras de uvas viníferas para vinhos e três amostras de uvas utilizadas para elaboração de suco. Os mostos foram obtidos por esmagamento de bagas, e os solos foram coletados por parcela correspondente a cada variedade de uva analisada. O isolamento de fungos das bagas e sementes foi realizado por Plaqueamento Direto no meio Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). Para as amostras de mosto e de solo utilizou-se a técnica de espalhamento superficial a partir de diluições seriadas. As espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* foram identificadas por características morfológicas. Todos os isolados obtidos foram testados quanto ao potencial de produção de OTA pelo método Plug Agar. Foi utilizada a análise de variância (ANAVA) e o teste de Scott e Knott (1974) para as amostras infectadas de baga, semente, mosto e solo. O maior número de bagas (91%) e sementes (49%) colonizadas foi detectado nas variedades viníferas Grenache e Petit Verdot, respectivamente. Em 30% das amostras de mosto e em todas as amostras de solo foi detectada a presença de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*. A amostra de solo mais contaminada foi da parcela de cultivo da variedade Grenache que também apresentou o maior número de bagas infectadas. Do total de isolados obtidos (281) a maioria (61,2%) foi identificado nas espécies *A. niger*, *A. foetidus* e *A. tubingensis*, e 11 % (31) foram produtores de OTA. A espécie *A. niger* foi a mais detectada, principalmente nas bagas, entretanto apenas 5,3 % (4) dos seus isolados foram ocratoxigênicos. A fonte primária da espécie *A. carbonarius* foram as sementes. Todos os isolados de *A. carbonarius* obtidos foram produtores desta toxina, o que realça a importância desta espécie como a principal fonte de OTA para as uvas cultivadas no Nordeste brasileiro.

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

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the occurrence of ochratoxigenic fungi belonging to the genus *Aspergillus* Section *Nigri* in grapes, grape musts and cultivation soils of the varieties used in the production of wine and juice in Northeastern Brazil. A total of ten samples were analyzed in wine grapes and three samples of the cultivars Isabel and BRS Cora, used in the production of grape juice. The grape musts were obtained through berry crushing, and the soil was sampled according to parcels corresponding to each variety of grape analyzed. The isolation of fungi from the berries was performed through the serial dilution with superficial spreading technique. Species of the genus *Aspergillus* Section *Nigri* were identified through morphologic characteristics. All the isolates obtained were tested for OTA production potential through the Plug Agar method. The variance analysis (ANOVA) and the Scott and Knott (1974) test ($p < 0.05$) were used for the analysis of infected berry, seed and grape must samples. Most of the berries (91%) and seeds (49%) colonized were detected in the wine varieties Grenache and Petit Verdot, respectively ($p < 0.05$). Species of *Aspergillus* Section *Nigri* were detected in 30% of the samples of grape must and in all the soil samples. The most contaminated soil sample was from the cultivation parcel of the Grenache variety, which also presented the highest number of infected berries ($p < 0.05$). From the total isolates obtained (281), the majority (61.2%) was identified as *A. niger*, *A. foetidus* and *A. tubingensis*, and 11% (31) were OTA producers. *A. niger* was the most detected species in the vineyard, especially in berries. However, only 5.3% (4) of these isolates were ochratoxigenic. The primary source of *A. carbonarius* was the seeds. All the isolates of *A. carbonarius* obtained produced this toxin, which highlights the importance of this species as main source of OTA in grapes cultivated in Northeastern Brazil.

Keywords: *Aspergillus*. Section *Nigri*. Grapes. Soil. Ochratoxin A.

1 INTRODUÇÃO

Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por algumas espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. A espécie *P. verrucosum* está associada com a produção de OTA em alimentos de regiões de clima temperado, enquanto *Aspergillus* spp. predominam em regiões mais quentes e em países tropicais (LARSEN; SVENDSEN; SMEDSGAARD, 2001).

OTA têm demonstrado efeitos carcinogênicos, nefrotóxicos, teratogênicos e imunotóxicos em animais (SOLFRIZZO et al., 2010) e acredita-se que esteja relacionada com a Nefropatia Endêmica dos Balcãs e com tumores do trato urinário em seres humanos (BENFORD et al., 2001). É relatada em uma grande variedade de alimentos e tem sido considerada como a principal micotoxina contaminante de vinho, suco de uva e uva.

Os fungos do gênero *Aspergillus* pertencentes a Seção *Nigri* são considerados como sendo a micobiota predominante de uvas no momento da colheita, embora possam ser detectados na superfície de uvas saudáveis em todas as fases de desenvolvimento do fruto (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003a; BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2004, 2006; CABAÑES et al., 2002; MATEO et al., 2007; ROSA et al., 2002; SAGE et al., 2002; SERRA et al., 2003). Os esporos de cor preta conferem proteção à luz solar e a radiação UV, atuando como uma vantagem competitiva em regiões de clima quente (PITT; HOCKING, 1997).

Em estudos realizados em seis vinícolas na Austrália, notou-se que o solo e os restos de videira sob o solo foram as fontes primárias de propágulos de fungos da Seção *Nigri*, principalmente *A. niger* e *A. carbonarius* (LEONG et al., 2006a, 2006b). Vários estudos mostraram que a espécie *Aspergillus carbonarius* é predominantemente responsável pela produção de OTA em uvas cultivadas em países da Europa (BATTILANI et al., 2003; BATTILANI; GIORNI; PIETRI,

2003; BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006; BAU et al., 2005; BEJAOUI et al., 2006b; BELLÍ et al., 2004, 2005a, 2006; CABAÑES et al., 2002; GOMEZ et al., 2006; SAGE et al., 2002; SERRA et al., 2003; SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005; TJAMOS; ANTONIOU; TJAMOS, 2006), na Austrália (LEONG et al., 2006b; LEONG; HOCKING; PITT, 2004), na Tunísia (LASRAM et al., 2007) e na Argentina (CHIOTTA et al., 2009). *A. niger* é a espécie mais comum do gênero *Aspergillus* presente em uvas, mas poucos isolados são considerados ocratoxigênicos, o que a difere de *A. carbonarius* (CHULZE; MAGNOLI; DALCERO, 2006; DACHOUPAKAN et al., 2009; LASRAM et al., 2008; LEONG et al., 2006a; LEONG, 2007; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

No Brasil, há necessidade de mais estudos sobre a incidência de fungos ocratoxigênicos em uvas, visto que os fungos presentes podem limitar e definir o potencial risco toxicológico dos vinhos e sucos de uva. Deste modo, no presente estudo objetivou-se avaliar a ocorrência de fungos ocratoxigênicos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* em solos com cultivo de videiras, uvas e mostos do Nordeste brasileiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

A região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco, no Nordeste brasileiro, foi utilizada neste estudo em função das vantagens geo-biológicas e climáticas em relação às demais áreas tradicionais de produção de vinho no mundo, que propicia condições para produção de uvas durante o ano todo. As coordenadas geográficas, tipo de clima, temperatura e precipitação anual estão descritos na Tabela 1. Nesta região, embora o clima seja extremamente seco, o cultivo da uva é possível através de projetos de irrigação.

Tabela 1 Coordenadas geográficas, temperatura média e precipitação anual, e tipo de clima da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco

Latitude	9°S
Longitude	40°W
Temperatura média anual (°C)	27
Precipitação anual (mm)	500
Tipo de clima	Tropical Semi-Árido

2.2 Amostragem

2.2.1 Uvas

Uvas viníferas para vinhos foram coletadas nos estágios finais de maturação da baga (época de colheita), durante o período de estiagem da região, sendo composta por uvas tintas ($n = 5$) e brancas ($n = 5$), totalizando dez amostras analisadas. As variedades de uvas tintas estudadas foram Syrah,

Grenache e Petit Verdot e de uvas brancas foram Chenin Blanc, Sauvignon Blanc, Viognier e Verdejo (Tabela 2). Amostras das variedades Syrah e Sauvignon Blanc foram coletadas em dois anos consecutivos (2009 e 2010) no mesmo período de estiagem (junho). A variedade Petit Verdot foi coletada em ambos os períodos, de estiagem (setembro) e chuvoso (março), do ano de 2010. As uvas utilizadas para elaboração de suco também foram obtidas na época de colheita dos frutos, sendo composta por três amostras ($n = 3$) das cultivares Isabel e BRS Cora. Amostras da cultivar Isabel foram coletadas nos períodos chuvoso (março) e de estiagem (agosto) do ano de 2010, e a cultivar BRS Cora foi coletada no mês de março de 2010. Dados de temperatura, precipitação e umidade relativa (U.R.) durante cada mês de coleta das amostras estão descritos na Tabela 2. Cachos de uvas (aproximadamente 2 kg) de cada variedade foram colhidos, de forma aleatória, em diferentes plantas do vinhedo. Foram coletados cachos representativos do estado observado nas vinhas. Cachos com uvas deterioradas detectados foram colhidos e analisados à parte. As uvas foram transportadas para o laboratório em sacos plásticos estéreis lacrados dentro de caixas térmicas.

Tabela 2 Dados de temperatura, precipitação e umidade relativa (U.R.) durante os meses de coleta das amostras

Amostras (uvas)	Produto	Mês de coleta	Temperatura média* (°C)	Precipitação* (mm)	U.R.* (%)
Syrah 1	Vinho tinto	junho (2009)	23,8	23	76
Sauvignon Blanc 1	Vinho branco				
Viognier	Vinho branco				
BRS Cora	Suco	março (2010)	27,6	91,0	66
Isabel 1	Suco				
Petit Verdot 1	Vinho tinto	junho (2010)	24,2	9,7	77
Syrah 2	Vinho tinto				
Sauvignon Blanc 2	Vinho branco				
Chenin Blanc	Vinho branco				
Verdejo	Vinho branco	agosto (2010)	24,0	0,0	64
Isabel 2	Suco				
Grenache	Vinho tinto	setembro (2010)	25,7	2,7	51
Petit Verdot 2	Vinho tinto				

*Dados médios mensais obtidos das Estações Agrometeorológicas de Mandacaru (Juazeiro/BA) e de Bebedouro (Petrolina/PE)/Embrapa Semiárido

2.2.2 Mostos

Amostras de mostos (200 mL), de cada variedade de uva vinífera, foram obtidas por esmagamento de bagas (escolhidas aleatoriamente) dos cachos coletados nas videiras e posterior filtragem. Os mostos foram analisados imediatamente após serem obtidos.

2.2.3 Solos

Nas parcelas com as videiras foram coletadas amostras de solos correspondentes à cada variedade de uva analisada. Foram retiradas três subamostras de solo em cada parcela na profundidade de 5 cm diretamente abaixo das videiras cultivadas em espaldeira, conforme Leong, Hocking e Scott (2007). As subamostras foram homogeneizadas em sacos plásticos estéreis resultando num total aproximado de 300 g de solo. Nas parcelas das variedades de uvas de suco, a partir das subamostras coletadas obteve-se uma única amostra

composta. A amostragem foi realizada de forma aleatória. As amostras foram mantidas sob refrigeração até serem analisadas.

2.3 Análises micológicas

O isolamento de fungos de uvas foi realizado conforme descrito por Samson et al. (2000). De cada amostra, selecionou-se 100 bagas ao acaso e as demais foram utilizadas para extração de sementes. As bagas e sementes foram submetidas ao procedimento de desinfecção superficial. Um total de 100 bagas e 100 sementes foram plaqueadas, assepticamente, no meio Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (Merck).

Para os mostos, 25 mL de cada amostra foram homogeneizados com 225 mL de água peptonada 0,1% estéril, seguindo-se da agitação por 5 minutos. Por espalhamento, 0,1 mL de cada diluição (1:10, 1:100, 1:1000) foi transferido para três placas de Petri estéreis com o meio DRBC.

Das amostras de solo, 10 g foi adicionado a 90 mL de água peptonada 0,1% estéril com posterior agitação em shaker a 130 rpm por 30 minutos. De cada diluição obtida (1:10, 1:100, 1:1000) 0,1 mL foi espalhado em três placas de Petri estéreis com o meio Agar Dicloran Glicerol a 18% (DG 18) (Merck).

Todas as placas foram incubadas no escuro por 5-7 dias a 25°C. Posteriormente, os fungos identificados, conforme aspectos morfológicos por estereomicroscopia, como pertencentes ao gênero *Aspergillus* e a Seção *Nigri* foram re-isolados no meio Agar Malt para purificação das colônias. Os fungos em cultura pura foram incubados em meios e temperaturas padronizados e identificados de acordo com Klich (2002).

2.4 Screening do potencial ocratoxigênico dos isolados

Todos 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 no meio de cultura Czapek Yeast Agar (CYA), sendo incubados por 7 dias a 25°C. Foram utilizadas Placas de Cromatografia de Camada Delgada (Merk-Sílica Gel 60, 20×20), solução padrão de ocratoxina A (Sigma-Aldrich) e a Fase móvel TEF composta por Tolueno, Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (50:40:10). A confirmação quanto à produção de OTA foi efetuada sob luz ultravioleta de λ 366 nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de OTA apresentaram um RF (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão da micotoxina.

2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas da incidência de fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* foram efetuadas para as amostras infectadas de solo, baga, semente e mosto. Realizou-se a análise de variância (ANAVA) e o teste de agrupamento de médias Scott e Knott (1974) a $p < 0,05$. Para testar os contrastes de interesse entre variedades viníferas para vinhos e de suco foi aplicado o Teste F a $p < 0,05$. As análises foram efetuadas no software R (versão 2.11.1, 2010).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Incidência dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri*

As amostras de bagas infectadas com *Aspergillus* Seção *Nigri* e as respectivas proporções médias de colonização estão descritas no Gráfico 1. Embora a incidência de colonização destes fungos não tenha sido elevada em todas as variedades de uva estudadas, a sua presença já era esperada, visto que em diversos estudos, os *Aspergillus* Seção *Nigri* são considerados como a microbiota predominante de uvas, principalmente na época de colheita (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003a; BEJAOUI et al., 2006a; BELLÍ et al., 2004, 2006; LASRAM et al., 2007; ROSA et al., 2002; SAGE et al., 2002; SERRA et al., 2003).

O maior número de bagas colonizadas (91 %) foi detectado na amostra da variedade Grenache, que diferiu significativamente das demais pelo teste Scott e Knott (1974) a $p < 0,05$ (Gráfico 1). Este fato pode estar relacionado com a característica diferencial desta variedade de formação de cachos muito compactos, que pode contribuir para manutenção da umidade em torno das bagas e assim, favorecer a infecção fúngica.

Apenas um pequeno número das sementes (14 %) da variedade Grenache apresentou-se infectada, e esta porcentagem foi estatisticamente a mesma das amostras Sauvignon Blanc, Verdejo, Syrah 2 e BRS Cora (Gráfico 2). Situação contrária ocorreu para variedade Petit Verdot, coletada em março de 2010, em que foi observado o maior número de sementes colonizadas (49 %) (Gráfico 2) e nenhuma baga infectada. Este fato indica que as bagas da amostra Petit Verdot 1 estavam mais susceptíveis a colonização interna pelos fungos do que as uvas da amostra Grenache. Os valores de precipitação dos meses de coleta destas amostras podem estar relacionados com este fato (Tabela 2). Na

época de coleta da amostra Petit Verdot 1 obteve-se o maior valor de precipitação (91 mm), dentre as demais épocas, e no mês em que coletou-se as uvas da variedade Grenache não ocorreu precipitação. A chuva antes da colheita é uma causa comum de dano nas uvas, o que favorece a infecção por fungos do gênero *Aspergillus* e a consequente produção de OTA (COZZI et al., 2007; LEONG; HOCKING; PITT, 2004).

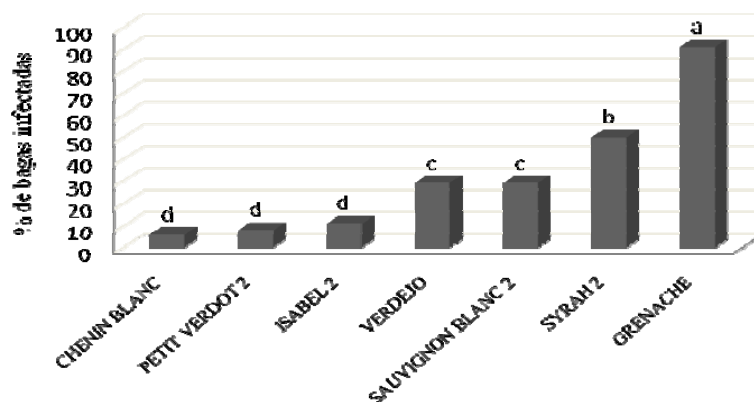


Gráfico 1 Bagas das variedades de uva infectadas com *Aspergillus* Seção *Nigri* e as respectivas proporções médias de colonização. Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. O número 2 de algumas variedades corresponde à segunda época de coleta das mesmas, sendo: Syrah 2 (jun/2010); Sauvignon Blanc 2 (jun/2010); Isabel 2 (ago/2010); Petit Verdot 2 (set/2010)

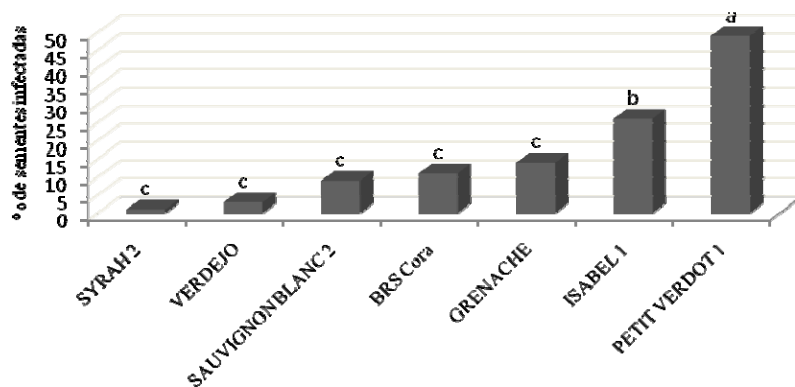


Gráfico 2 Sementes das variedades de uva infectadas com *Aspergillus* Seção *Nigri* e as respectivas proporções médias de colonização. Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Os números 1 e 2 de algumas variedades correspondem às diferentes épocas de coleta das mesmas, sendo: Syrah 2 (jun/2010); Petit Verdot 1 (mar/2010); Sauvignon Blanc 2 (jun/2010); Isabel 1 (mar/2010)

As bagas e sementes da variedade Syrah, coletada em 2009, não estavam colonizadas por estes fungos. Já na amostra obtida em 2010, 50 % das bagas continham colônias de espécies da Seção *Nigri*, sendo considerada a segunda amostra mais infectada (Gráfico 1). Resultado semelhante foi observado para variedade Sauvignon Blanc, em que a colonização das bagas foi detectada apenas na amostra coletada em 2010. Este aumento na infecção de bagas, da época de colheita do ano de 2009 para 2010, provavelmente está relacionado com a influência de algumas condições ambientais, ocorridas durante a época de coleta de 2010, na incidência dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri*.

O contraste entre as uvas viníferas e as uvas para suco colonizadas com fungos da Seção *Nigri* foi estatisticamente significativo (Tabela 3). Deste modo, é possível inferir que a porcentagem de bagas viníferas infectadas deferiu significativamente da proporção detectada nas amostras de uva de suco. De acordo com o Gráfico 1, nota-se que a amostra da variedade Isabel, coletada em

agosto de 2010, embora não tenha diferido estatisticamente das amostras Petit verdot 2 e Chenin Blanc, apresentou a menor porcentagem de bagas infectadas, sendo a única variedade de uva de suco colonizada com estes fungos. Entretanto, entre as sementes das amostras viníferas e de suco o contraste não foi significativo (Tabela 3).

Tabela 3 Resultado do Teste F para o contraste entre as amostras de baga e semente viníferas e de suco contaminadas

Contraste	GL	QM	F calculado
Vinho vs Suco (Bagas)	1	2576,89	29,53**
Vinho vs Suco (semente)	1	2,066	1,71 ^{ns}

**Significativo ao nível de 5% de probabilidade

^{ns}Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL: grau de liberdade

QM: quadrado médio

Além da amostra Syrah 1, na variedade Viognier também não cresceram fungos do gênero *Aspergillus* nas bagas e sementes, o que pode ter ocorrido devido à ausência de danos na superfície das bagas. Segundo Leong et al. (2006b) a maior incidência de colonização das uvas por espécies de *Aspergillus* ocorre quando estas apresentam algum rompimento em sua película. Assim, de acordo com Martínez-Rodríguez e Carrascosa (2009) uma das principais medidas a serem tomadas, para evitar o desenvolvimento de fungos potencialmente ocratoxigênicos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, são aquelas aplicadas para evitar danos na baga, por meio do controle de fungos patogênicos e insetos durante o cultivo da uva. Além disso, Zimmerli e Dick (1996) sugerem outros fatores que podem influenciar na incidência de fungos nas uvas, como as diferentes práticas agrícolas, que incluem, por exemplo, o uso de fungicidas, os tipos de variedades cultivadas, e as condições climáticas da região vitivinícola.

Com relação a incidência dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* nos mostos, observou-se que 70% das amostras não estavam contaminadas com estes fungos. Entretanto, nos mostos obtidos das variedades Petit Verdot 1, Syrah 1 e Viognier foi detectada a presença de espécies da Seção *Nigri*, sendo a contaminação estatisticamente diferente entre estas amostras. Deste modo, é provável que estes fungos são capazes de desenvolver no mosto, antes do início do processo fermentativo.

Em todas as amostras de solo estudadas foi detectada a presença de espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* (Gráfico 3). Este fato já era esperado, visto que estes fungos são comuns em solo (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1993). Além disto, os *Aspergillus* Seção *Nigri* são muito resistentes à exposição solar e a ambientes quentes e secos (CABAÑES et al., 2002; JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES - JECFA, 2008; LOGRIECO et al., 2003; SERRA et al., 2003), o que os tornam bem adaptados as condições climáticas da região do Vale do Submédio São Francisco.

A amostra de solo mais contaminada com os fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* foi da parcela de cultivo da variedade Grenache, que não diferiu estatisticamente da contaminação encontrada no solo da variedade Verdejo (Gráfico 3). E o maior número de bagas infectadas também foi detectado na variedade Grenache. A partir destes resultados é possível inferir que a elevada contaminação destas bagas pode ser uma consequência da alta incidência de fungos no solo de cultivo das videiras. Segundo Hocking et al. (2007) a importância dos fungos ocratoxigênicos em solo está relacionada com o movimento de esporos pelo ar do solo para a superfície das bagas. Outros estudos destacaram o papel da circulação de ar na dispersão de esporos do solo, pelo aumento da incidência de *A. carbonarius* em bagas após uma severa tempestade de poeira (LEONG et al., 2006a). Deste modo, o controle da incidência destes fungos no solo pode auxiliar na prevenção da contaminação

das uvas na vinha. A redução na queda das bagas e no descarte de bagas danificadas na vinha pode minimizar a incidência de *A. carbonarius* no solo, visto que as uvas proporcionam um meio rico em açúcar ideal para o desenvolvimento de espécies saprófitas do gênero *Aspergillus* (HOCKING et al., 2007).

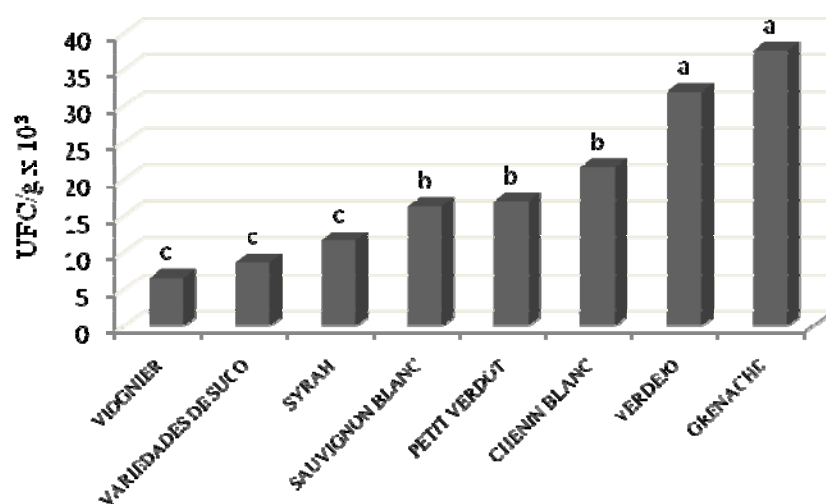


Gráfico 3 Incidência de fungos *Aspergillus* Seção *Nigri*, em UFC/g x 10³, nas amostras de solo de cultivo das variedades viníferas e de suco estudadas. Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$

3.2 Ocorrência das espécies da Seção *Nigri* e de isolados ocratoxigênicos

Das amostras de baga (sadia e deteriorada), semente, mosto e solo foram obtidos um total de 281 isolados do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, que foram identificados nas espécies que estão descritas na Tabela 4. Cinco isolados apresentaram características microscópicas diferenciais, e portanto, não foi

possível identificá-los a nível de espécie com base na morfologia. Por isto, estudos moleculares com estes isolados serão realizados.

Tabela 4 Espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* isoladas das amostras de baga (sadia e deteriorada), semente, mosto e solo com o respectivo número de isolados ocratoxigênicos

Gênero/Espécies	Número de isolados (Número de isolados ocratoxigênicos)					Total
	Baga sadia	Semente	Mosto	Solo	Baga deteriorada	
<i>Aspergillus aculeatus</i>	7 (0)	1 (0)	7 (0)	13 (0)	2 (0)	30 (0)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	3 (3)	12 (12)	0 (0)	4 (4)	3 (3)	22 (22)
<i>Aspergillus foetidus</i>	9 (0)	26 (0)	6 (0)	8 (1)	0 (0)	49 (1)
<i>Aspergillus japonicus</i>	1 (0)	0 (0)	13 (0)	1 (0)	9 (0)	24 (0)
<i>Aspergillus niger</i>	37 (0)	12 (0)	15 (1)	11 (3)	0 (0)	75 (4)
<i>Aspergillus niger</i> Agregado	3 (0)	6 (0)	1 (0)	18 (2)	0 (0)	28 (2)
<i>Aspergillus spp.</i>	1 (0)	3 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	5 (0)
<i>Aspergillus tubingensis</i>	16 (0)	12 (0)	2 (0)	18 (2)	0 (0)	48 (2)
Total	76 (3)	73 (12)	43 (1)	75 (12)	14 (3)	281 (31)

Neste estudo, *A. niger*, *A. foetidus* e *A. tubingensis* foram as espécies isoladas com maior frequência (61,2%), seguindo-se da espécie unisseriada, *A. aculeatus*. Destas, *A. niger* foi a que apresentou o maior número de isolados (Tabela 4), sendo portanto a espécie mais detectada nas vinhas do Nordeste brasileiro. Em estudos de Leong, Hocking e Pitt (2004), *A. niger* também foi a espécie mais frequentemente isolada a partir de videiras na Austrália.

A espécie isolada com menor frequência foi *A. carbonarius* (7,83%), entretanto todos os seus isolados foram ocratoxigênicos. Sage et al. (2002) e Bau et al. (2005) também encontraram todos os isolados desta espécie como produtores de OTA. Resultado semelhante foi observado, recentemente, para os isolados de *A. carbonarius* obtidos de uvas cultivadas em regiões da França (DACHOUPAKAN et al., 2009). Em diversos estudos têm sido relatado que *A. carbonarius* é a principal espécie responsável pela presença de OTA em uvas,

em função da porcentagem de isolados positivos e dos níveis de OTA detectados *in vitro* (ABARCA et al., 2003; BATTILANI et al., 2003b; BEJAOUI et al., 2006a; CABAÑES et al., 2002; COZZI et al., 2007; LEONG et al., 2006a; SERRA et al., 2003). Outros autores também afirmam que a porcentagem de isolados de *A. carbonarius* produtores de OTA é superior ao encontrado para outras espécies de *A. niger* Agregado (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006; PERRONE et al., 2007).

Nas bagas sadias, a principal espécie isolada foi *A. niger* (49,3%), seguindo-se de *A. tubingensis* (20%) e *A. foetidus* (12%) (Tabela 4). Vários estudos têm relatado que as espécies mais frequentemente encontradas em uvas pertencem ao *A. niger* Agregado (CHIOTTA et al., 2009; DACHOUPAKAN et al., 2009; GUZEV et al., 2006; LASRAM et al., 2007). Segundo López-Mendoza, Crespo-Sempere e Martínez-Culebras (2009), dentro deste grupo, *A. tubingensis* pode ser considerada uma das principais. A importância da espécie *A. tubingensis* aumentou recentemente com a descrição de algumas cepas capazes de produzir OTA (MEDINA et al., 2005; PERRONE et al., 2006a, 2006b). Neste estudo, dois isolados desta espécie foram ocratoxigênicos.

Das amostras de semente, apenas a espécie *A. japonicus* não foi isolada (Tabela 4). BAU et al. (2005) relataram que não houve crescimento fúngico a partir das sementes removidas das bagas. Segundo os autores a contaminação por espécies produtoras de OTA vêm da superfície das uvas e não do seu interior. Entretanto, neste estudo, os *Aspergillus* Seção *Nigri* foram capazes de infectar a parte interna do fruto, o que indica que algum agente (físico, fisiológico ou microbiológico) promoveu danos nas bagas, facilitando esta colonização, já que estes fungos são considerados como agentes secundários de deterioração. Além disto, a maior porcentagem de isolados de *A. carbonarius* foi obtida a partir das sementes (54,5%), o que realça a importância da parte interna

destas bagas como fonte de espécies ocratoxigênicas e conseqüentemente de OTA.

Em estudo recente, os autores afirmam que não existem dados bibliográficos disponíveis, que sugerem o desenvolvimento de *Aspergillus carbonarius* ou de outras espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* no mosto e, portanto, a presença de OTA deve ser atribuída a um desenvolvimento anterior do fungo (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ; CARRASCOSA, 2009). Entretanto, neste estudo, embora não tenha sido detectada a presença de *A. carbonarius*, outras espécies da Seção *Nigri* foram isoladas das amostras de mosto (Tabela 4), inclusive um isolado de *A. niger* ocratoxigênico. Assim, acredita-se que estes fungos são capazes de se desenvolver no mosto inicial devido a presença de nutrientes e demais fatores necessários para o crescimento, como água e oxigênio.

Neste estudo, foi possível observar que os solos das videiras do Nordeste do Brasil representam uma importante fonte de propágulos de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*. Resultados semelhantes foram observados em vinícolas da Austrália, em que o solo e os restos de videira sob o solo foram as fontes primárias de fungos da Seção *Nigri* (LEONG et al., 2006a, 2006b). Além disso, dos isolados obtidos, 16% foram produtores de OTA. A presença de *A. carbonarius* nestes solos pode estar relacionada com a temperatura média das vinhas (26 °C). De acordo com alguns estudos a temperatura do solo pode afetar a incidência desta espécie, sendo observado uma temperatura ótima para o seu crescimento em solo seco de 25 °C, com contagem decrescente a 15 °C e 35 °C (KAZI et al., 2003, 2004). A presença de isolados ocratoxigênicos no solo de cultivo destas variedades potencializa o risco de contaminação das uvas com OTA. Porém, este fato não indica necessariamente a presença desta toxina nos produtos derivados de uva.

A partir de algumas bagas deterioradas das variedades Syrah e Chenin Blanc, detectadas na videira, obteve-se três isolados de *A. carbonarius* (Tabela 4). GUZEV et al. (2006) relataram que esta espécie foi isolada várias vezes a partir de bagas com sintomas visíveis de deterioração. Segundo Ratola, Martins e Alves (2004) e Serra et al. (2004) a contaminação de uvas saudáveis por OTA não é significativa, mas a vinificação de bagas deterioradas deve ser evitada em áreas onde os fungos produtores de OTA são detectados. Assim, a remoção de bagas deterioradas antes do processamento é uma boa prática para diminuir o potencial risco de contaminação com OTA nos produtos finais (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006).

Dos isolados de *A. Seção Nigri* obtidos, 11 % foram produtores de OTA. Destes 71 % foram da espécie *A. carbonarius* e 29 % das espécies de *A. niger* Agregado. Apenas 5,3 % dos isolados de *A. niger* foram ocratoxigênicos. Embora esta espécie tenha sido detectada com elevada frequência nas videiras, é possível observar que sua presença não representa um alto risco de contaminação com OTA, ao contrário de *A. carbonarius*, em que 100% dos isolados foram ocratoxigênicos. A baixa ocorrência de isolados de *A. niger* Agregado produtores de OTA também foi observada em estudos anteriores (BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2006; CHIOTTA et al., 2009; GUZEV et al., 2006; LASRAM et al., 2007). Segundo Duarte, Pena e Lino (2010) a presença de espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* não é sempre um indicativo da ocorrência de OTA. Entretanto, a incidência de *A. carbonarius* provavelmente está relacionada com a presença desta toxina.

As uvas da variedade Petit Verdot, coletadas em março de 2010, foram as que apresentaram maior contaminação com *A. carbonarius*, sendo considerada a amostra com maior incidência de isolados produtores de OTA. Das demais variedades viníferas, apenas a Viognier não apresentou fungos ocratoxigênicos em nenhuma das amostras (baga, semente, mosto e solo de

cultivo). As amostras das variedades Isabel e BRS Cora também não apresentaram fungos produtores desta toxina, o que diminui o potencial risco da presença de OTA nos sucos de uva elaborados nesta região.

Este estudo foi o primeiro a relatar sobre a incidência de fungos potencialmente ocratoxigênicos em uvas cultivadas em vinícolas do Nordeste do Brasil. Estes dados são relevantes para auxiliar na definição dos fatores de risco para presença de OTA nestas uvas. Estudos futuros sobre a relação entre as características das bagas das diferentes variedades de uva e a susceptibilidade à espécie *A. carbonarius* serão de grande importância, visto que neste estudo esta espécie também foi considerada como a principal fonte de OTA para as uvas.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, o maior número de bagas (91 %) e sementes (49 %) colonizadas com *Aspergillus* Seção *Nigri* foi detectado nas variedades Grenache e Petit Verdot, respectivamente. Em 30% das amostras de mosto e em todas as amostras de solo foi detectada a presença de espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*. A amostra de solo mais contaminada foi da parcela de cultivo da variedade Grenache que também apresentou o maior número de bagas infectadas. Do total de isolados obtidos (281) 11% foram produtores de OTA. As espécies identificadas foram *A. aculeatus*, *A. carbonarius*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. niger* Agregado e *A. tubingensis*. Destas, *A. niger*, *A. foetidus* e *A. tubingensis* foram isoladas com maior frequência (61,2%). A espécie *A. niger* foi a mais detectada nas videiras, entretanto apenas 5,3 % dos seus isolados foram ocratoxigênicos. Todos os isolados de *A. carbonarius* obtidos (22) foram produtores desta toxina, o que realça a importância desta espécie como a principal fonte de OTA para as uvas cultivadas no Nordeste do Brasil.

REFERÊNCIAS

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

BATTILANI, 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.

BATTILANI, P.; GIORNI, P.; PIETRI, A. Epidemiology of toxin producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 715-722, 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. 52-54, 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.

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. 1, p. 541-546, Mar. 2004.

_____. Ochratoxin A-producing fungi in Spanish wine grapes and their relationship with meteorological conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 113, n. 3, p. 233-239, Nov. 2005a.

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.

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.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins: risks in plants, animal and human systems**. Ames, 2003. 199 p. (Report, 139).

COZZI, G. et al. 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.

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. 1, p. 14-23, June 2009.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. San Francisco: Academic, 1993. 860 p.

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

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.

GOMEZ, C. et al. Ochratoxin A producing fungi from grapes intended for liqueur wine production. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 6, p. 541-545, Sept. 2006.

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

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.

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).

JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Geneva, 2008. (WHO Food Additives Series, 59).

Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=RedirectURL&_method=externObjLink&_locator=url&_cdi=6800&_issn=07400020&_origin=article&_zone=art_page&_plusSign=%2B&_targetURL=http%253A%252F%252Fwhqlibdoc.who.int%252Fpublications%252F2008%252F9789241660594_eng.pdf>. Acesso em: 22 out. 2010.

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

_____. Incidence of *Aspergillus carbonarius* in Australian vineyards. In: AUSTRALASIAN SOIL-BORNE DISEASE SYMPOSIUM, 3., 2004, Adelaide. **Proceedings...** Adelaide: South Australian Research and Development Institute, 2004. p. 75-76.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* species**. Netherlands: 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. 3, p. 376-379, Mar. 2007.

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

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. 2006a.

_____. Black *Aspergillus* species in Australian vineyards: from soil to ochratoxin A in wine. In: HOCKING, J. I. et al. (Ed.). **Advances in food mycology**. New York: Springer, 2006b. p. 153-171.

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**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 124-133, Jan. 2007.

LÓPEZ-MENDOZA, M. C.; CRESPO-SEMPERE, A.; MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V. Identification of *Aspergillus tubingensis* strains responsible for OTA contamination in grapes and wine based on the acyl transferase domain of a polyketide synthase gene. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 44, n. 11, p. 2147-2152, Nov. 2009.

LOGRIECO, A. et al. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 645-667, Feb. 2003.

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. 1-2, p. 79-83, Oct. 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.

PERRONE, G. et al. AFLP characterization of Southern Europe population of *Aspergillus* Section *Nigri* from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 22-27, Sept. 2006b.

_____. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Micology**, Netherlands, 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**, Washington, v. 72, n. 1, p. 680-685, Jan. 2006a.

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

RATOLA, N.; MARTINS, L.; ALVES, A. 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, C. A. R. et al. Potential OTA producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 4, p. 408-414, May 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.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food-borne fungi**. 4th ed. Baarn Delft: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 2000. 322 p.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Arlington, v. 30, n. 2, p. 507-512, Sept. 1974.

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.

_____. Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 513, n. 1, p. 41-47, June 2004.

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.

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

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

CAPÍTULO 3

Ocratoxina A em vinhos e sucos de uva elaborados no Vale do Submédio São Francisco, Nordeste do Brasil

RESUMO

Um total de 34 amostras de vinhos e sucos de uva, obtidas experimentalmente a partir de variedades cultivadas no Nordeste brasileiro, foram analisadas quanto ao teor de Ocratoxina A (OTA). A quantificação de 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. Foi utilizada a análise de variância (ANAVA) e o teste de Scott e Knott (1974) para as amostras contaminadas (>LQ). Os valores de recuperação para as amostras de vinho foram em média 71% e 74% e os coeficientes de variação foram 21,07% e 31,18% para os níveis de contaminação de 0,22 e 0,44 µg/L, respectivamente. Para o suco de uva, a recuperação foi de 95% e o coeficiente de variação foi 2,67% para o nível de 2,78 µg/L. A OTA foi detectada em 13 (38,24%) amostras analisadas, em concentrações entre 0,03 a 0,62 µg/L. A maioria das amostras de vinho tinto apresentou-se contaminada com OTA (75%), e em apenas uma amostra de vinho branco, obtido da variedade Verdejo, esta toxina foi detectada. Não foi detectado OTA em nenhuma amostra de suco de uva. O maior valor de OTA (0,62 µg/L) foi detectado no vinho tinto elaborado a partir da variedade Syrah Clone 525 PE: IAC-313. Não foi observada diferença significativa entre as épocas de vinificação, quanto ao teor desta toxina. Os níveis de OTA detectados foram inferiores ao limite máximo tolerável para esta toxina em vinho e suco de uva estabelecido pela Comunidade Européia (EC 123/2005).

Palavras-chave: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. *Aspergillus*. Vinho tinto. Vinho branco.

ABSTRACT

A total of 34 samples of wine and grape juice, obtained from varieties of grapes cultivated in Northeastern Brazil, were analyzed considering the level of Ochratoxin A (OTA). The OTA level was determined through the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detection method, as described in EM 14133. The detection (DL) and quantification (QL) limits established were 10 ng L^{-1} and 30 ng L^{-1} , respectively. The variance analysis (ANOVA) and the Scott and Knott (1974) test ($p < 0.05$) were used for the contaminated samples ($>QL$). The recuperation mean values for the samples of wine were 71% and 74%, and the variation coefficients were 21.07 and 31.18% for the contamination levels of 0.22 and $0.44 \text{ } \mu\text{g/L}$, respectively. For the grape juice, the recuperation was 95% and the variation coefficient was 2.67% for the $2.78 \text{ } \mu\text{g/L}$ level. OTA was detected in 13 (38.24%) samples analyzed, in concentrations from 30.2 to 622.0 ng l^{-1} . Most of the red wine samples were contaminated by OTA (75%). The toxin was also detected in one sample of white wine of the Verdejo variety. OTA was not detected in any samples of grape juice. The highest OTA level (622.0 ng l^{-1}) was detected in the red wine produced from Syrah variety Clone 525 PE: IAC-313. No significant relation was observed between the vinification periods and the contamination level by OTA. The levels of OTA were below the maximum limit permitted in wine and juice according to the European Commission (EC 123/2005).

Keywords: High Performance Liquid Chromatography. *Aspergillus*. Red wine. White wine.

1 INTRODUÇÃO

Ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário tóxico produzido por algumas espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Foi descoberta em 1965 como um metabólito secundário de *Aspergillus ochraceus* (MERWE et al., 1965). Posteriormente, várias outras espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram relatadas como produtoras desta micotoxina. Dentro do gênero *Aspergillus*, a OTA está relacionada com espécies da Seção *Circumdati* e *Nigri*.

OTA têm demonstrado efeitos carcinogênicos, nefrotóxicos, teratogênicos e imunotóxicos em animais (SOLFRIZZO et al., 2010), sendo classificada como um possível carcinogênico renal humano (grupo 2B) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 1993). A presença de OTA em suco de uva e vinho foi relatada primeiramente por Zimmerli e Dick (1995). Atualmente, é considerada a principal micotoxina encontrada em produtos derivados de uvas (HOCKING et al., 2007).

Por ser relatada em vários estudos como contaminante de uva, vinho e suco de uva, avaliações de risco têm sido realizadas para estimar a relevância do consumo humano desta micotoxina (BENFORD et al., 2001; MIRAGLIA; BRERA, 2002; VISCONTI et al., 2008). Em 2002, após uma avaliação sobre a ingestão de OTA pela população de países da União Européia concluiu-se que, depois dos cereais, o vinho é a principal fonte de ingestão diária de OTA (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1999; MIRAGLIA; BRERA, 2002).

Vários estudos mostram que os fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, principalmente a espécie *A. carbonarius*, desempenham papel principal na produção de OTA em uvas (ABARCA et al., 2001; BATTILANI et al., 2003; CABAÑES et al., 2002; MAGNOLI et al., 2003; ROSA et al., 2002). Além

disto, têm-se observado que os níveis de OTA variam em função do tipo de vinho, da região vitivinícola e da safra (SOLFRIZZO et al., 2010). Estudos realizados com sucos de uva e vinhos de origem brasileira, argentina e chilena mostraram que estes contêm níveis de OTA inferiores aos observados na Europa (CHULZE; MAGNOLI; DALCERO, 2006).

Em geral, têm-se observado que o vinho tinto apresenta maior nível de contaminação do que o branco e rosé (BATTILANI et al., 2003; BAU et al., 2005; BEJAOUI et al., 2006b; BELLÍ et al., 2004a; LASRAM et al., 2007; OTTENEDER; MAJERUS, 2000; SERRA et al., 2003; ZIMMERLI; DICK, 1996). Os sucos de uva tinta também apresentam maiores teores de OTA em relação aos de uva branca, seguindo-se o mesmo padrão de contaminação observado para os vinhos (DUARTE; PENA; LINO, 2009).

Dados sobre a ocorrência de OTA em sucos de uva são de grande importância, já que as crianças são um dos principais consumidores e o consumo de suco é maior que o de vinho (VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006). Desde 2005, a legislação da União Européia determinou o nível máximo permitido de OTA em vinho e suco de uva em $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ (COMMISSION REGULATION, 2005).

Poucos são os estudos com relação a ocorrência e níveis desta toxina em produtos derivados de uva no Brasil. Portanto, mais informações são necessárias para permitir uma melhor determinação do risco de consumo de vinhos e sucos deste país. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência e os níveis de OTA em vinhos e sucos de uva elaborados no Vale do Submédio São Francisco, Nordeste do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

As amostras de vinhos e sucos de uva foram obtidas a partir de variedades de videiras cultivadas na região do Vale do Submédio São Francisco, no Nordeste brasileiro. Esta região (9°S; 40°W) apresenta temperatura média anual de 27 °C, precipitação anual de 500 mm, clima Tropical Semi-Árido e situa-se a 350 m de altitude. Diferencia-se das demais áreas tradicionais de uva e vinho no mundo pela produção de uvas durante o ano todo, o que ocorre em função das condições climáticas e da alta disponibilidade de água para a irrigação dos vinhedos.

2.2 Amostras

Foram analisadas um total de 23 amostras de vinhos (16 tintos e 7 brancos), elaborados experimentalmente a partir de uvas tintas e brancas de diferentes tratamentos, como clones de variedades e porta-enxertos (PE). As amostras de vinhos com os respectivos períodos de elaboração estão descritos na Tabela 1. Os vinhos, elaborados a partir das variedades Tempranillo, Petit Verdot, Viognier, Chenin Blanc e Sauvignon Blanc, foram obtidos em duas épocas de vinificação distintas no ano de 2009 (Tabela 1). Dentre os porta-enxertos estudados, o IAC-313 é o que apresenta alto vigor.

Tabela 1 Amostras de vinhos com os respectivos períodos de elaboração

Amostras de vinhos (uvas)	Tipo de vinho	Período de elaboração (mês/ano)
Syrah Clone 525 PE: IAC-313		11/2009
Syrah Clone 525 PE: 1103-P		11/2009
Tempranillo PE: IAC-313		11/2009
Alicante PE: 1103-P		11/2009
Syrah sem maceração		12/2009
Tempranillo PE: 1103-P		11/2009
Marselan Clone 980 PE: 1103-P		11/2009
Petit Verdot 2	Tinto	11/2009
Petit Verdot 1		06/2009
Tempranillo 1		06/2009
Tempranillo 2		11/2009
Syrah		06/2009
Grenache		09/2009
Cabernet Sauvignon		09/2009
Cabernet Sauvignon PE: IAC-766		12/2009
Carmenère		12/2009
Verdejo		
Viognier 1		06/2009
Viognier 2		11/2009
Chenin Blanc 1	Branco	07/2009
Chenin Blanc 2		11/2009
Sauvignon Blanc 1		06/2009
Sauvignon Blanc 2		11/2009

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 a 18 °C, respectivamente. Os vinhos foram em seguida estabilizados e engarrafados.

Os sucos de uva foram elaborados a partir de três cultivares de uvas enxertadas sobre diferentes porta-enxertos, sendo Isabel Precoce, Isabel Precoce IAC-313, Isabel Precoce Paulsen 1103, Isabel Precoce IAC-776, Isabel Precoce IAC-572, Isabel Precoce 313 R2, Rúbea Paulsen 1103, Rúbea IAC-766, BRS Cora IAC-572, BRS Cora IAC- 776, BRS Cora IAC-313, totalizando 11 amostras. Os sucos de uva experimentais foram elaborados através do uso de suqueira artesanal, com capacidade para 20 litros, extração a 75°C com resfriamento rápido (flesh pasteurização), e posterior engarrafamento.

2.3 Análise de OTA

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

2.3.1 Soluções e reagentes

A solução de diluição 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.). Solução estoque de OTA Sigma (St. Louis, MO, USA) foi preparada em tolueno:ácido acético (99:1, v/v). A concentração foi determinada de acordo com a Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1997), sendo verificada em Espectrofotômetro UV a 333 nm, com $\epsilon = 5440 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. L. 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 a

fase móvel foi utilizado acetonitrila:metanol:ácido acético aquoso (35:35:30), seguindo-se da filtração a vácuo em membrana de celulose regenerada PTFE de 0,45 µm. Ácido acético aquoso foi preparado com uma solução de ácido acético glacial em água purificada (1:29, v/v). As soluções foram armazenadas de -15 °C a -20 °C no escuro.

2.3.2 Preparo das amostras e purificação em coluna de imunoafinidade

Inicialmente, as amostras foram resfriadas a 4 °C. De cada amostra, 40 mL foram adicionados a 40 mL da solução de diluição e homogeneizados sob agitação mecânica em shaker, em velocidade média, por 30 minutos. Esta solução foi submetida à filtração a vácuo (2 mL/min) em membrana GFA e 40 mL do filtrado foi passado por uma 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 remoção dos resíduos não-específicos. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de metanol à coluna para liberação da OTA vinculada ao anticorpo, com repetição do procedimento por três vezes. O eluato obtido foi evaporado com aquecimento (± 50 °C) da amostra sob atmosfera de nitrogênio. Este extrato seco foi reconstituído em 250 µL de fase móvel. Injetou-se então 50 µL das soluções padrão de OTA e dos extratos das amostras no Cromatógrafo Líquido.

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 μm ; 4,6 x 250 mm), precedida da pré-coluna Shim-pack G-ODS (5 μm ; 4,0 x 10 mm), sendo o fluxo de 0,8 mL/min. A confirmação da presença de OTA foi determinada pela formação de ésteres metílicos, sendo observado um aumento no tempo de retenção das amostras devido à 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 $\mu\text{g/L}$ e 0,03 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

2.3.4 Eficiência da metodologia analítica

Para avaliar o desempenho da metodologia analítica utilizada testes de recuperação foram realizados pela adição de OTA em amostras de vinho e suco de uva não contaminadas. Amostra de vinho foi contaminada, em cinco repetições, com duas concentrações de OTA: 0,22 $\mu\text{g/L}$ e 0,44 $\mu\text{g/L}$. Amostra de suco foi contaminada, em duplicata, com a concentração de 2,78 $\mu\text{g/L}$ 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.

2.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas do teor de OTA foram efetuadas para as amostras contaminadas ($>LQ$). Realizou-se a análise de variância (ANAVA), e para isto, os dados foram transformados pela raiz quadrada, a fim de atender os pressupostos básicos. Foi utilizado o teste de agrupamento de médias Scott e Knott (1974) a $p < 0,05$, e para testar o contraste de interesse (contaminação de

vinhos tintos versos brancos) foi aplicado o Teste F a $p < 0,05$. As análises foram efetuadas no software R (versão 2.11.1, 2010).

3 RESULTADOS

3.1 Padronização da metodologia analítica

A curva de calibração obtida a partir da equação da 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 de uva 95% e 2,7%, respectivamente (Tabelas 2 e 3). Estes resultados estão dentro das normas recomendadas em EC 401/2006 (COMMISSION REGULATION, 2006) para valores de contaminação inferiores a 1,0 µg/L e entre 1,0 e 10 µg/L.

Tabela 2 Valores de recuperação de Ocratoxina A das amostras de vinho

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

Tabela 3 Valores de recuperação de Ocratoxina A das amostras de suco de uva

Contaminação ($\mu\text{g/L}$)	Quantidade Recuperada ($\mu\text{g/L}$)	Média ($\mu\text{g/L}$)	Recuperação (%)	Coefficiente de Variação (%)
2,78	2,70	2,65	95,0	2,67
	2,60			

3.2 Ocorrência e níveis de Ocratoxina A em vinhos e sucos de uva

A incidência e os valores médios (mínimos e máximos) de OTA encontrados nas amostras de vinhos e sucos de uva estão descritos na Tabela 4. A OTA foi detectada em 13 (38,24%) amostras analisadas, em concentrações entre 0,03 a 0,62 $\mu\text{g/L}$. Das amostras positivas, 12 foram de vinhos tintos e apenas uma de vinho branco. A maioria das amostras de vinho tinto apresentou-se contaminada com OTA (75%), e esta toxina não foi detectada em nenhuma amostra de suco de uva.

Os vinhos tintos em que a OTA não foi detectada ou que a concentração foi inferior ao LQ (30 ng l^{-1}) foram obtidos das variedades Cabernet Sauvignon, Grenache, Cabernet Sauvignon PE: IAC-766 e Carmenère. Estes vinhos foram elaborados na mesma época, que foi diferente da época de elaboração das amostras positivas, o que indica que as condições climáticas do período de colheita destas uvas podem ter contribuído para a não ocorrência desta toxina.

Tabela 4 Incidência e limites médios de ocratoxina A nos vinhos tintos, brancos e sucos de uva do Nordeste do Brasil

Produtos de uva	No. não detectado ou <LQ ^a	Amostras positivas	
		No. detectado ^b (>LQ)	Limites (µg/L) ^c
Vinhos tintos	4/16 (25%)	12/16 (75%)	0,03-0,62
Vinhos brancos	6/7 (85,7%)	1/7 (14,3%)	0,03
Sucos de uva	11/11 (100%)	0/11	ND
Total	21/34 (61,76%)	13/34 (38,24%)	0,03-0,62

^aNúmero e porcentagem de amostras com teor médio de OTA não detectado ou < LQ (0,03 µg/L)

^bNúmero e porcentagem de amostras com concentração média de OTA > LQ

^cMenor e maior nível médio de OTA detectado; ND: Não Detectado

Com relação às amostras positivas, pelo Teste F ($p < 0,05$) é possível inferir que pelo menos um dos vinhos diferiu dos demais, quanto ao teor de OTA (Tabela 5). Este fato foi confirmado pelo teste Scott e Knott (1974) a $p < 0,05$. Conforme pode ser observado no Gráfico 2, os níveis médios de OTA dos vinhos contaminados são considerados diferentes entre os cinco grupos definidos estatisticamente (a, b, c, d, e). Alguns vinhos elaborados a partir de variedades diferentes, como Petit Verdot e Marselan Clone 980 PE: 1103-P apresentaram, estatisticamente, o mesmo nível médio de contaminação. O maior valor médio de OTA (0,62 µg/L) foi detectado no vinho tinto elaborado a partir da variedade Syrah Clone 525 PE: IAC-313 (Gráfico 1), sendo que o teor de contaminação deste vinho diferiu significativamente dos demais (Gráfico 2). Pode-se observar no Gráfico 2, que a segunda amostra mais contaminada foi também de vinho tinto, obtido da variedade Syrah Clone 525 PE: 1103-P, e que o menor teor de OTA foi detectado nos vinhos Syrah, Tempranillo e Verdejo, que não diferiram estatisticamente entre si.

Não foi observada diferença significativa entre as épocas de vinificação, quanto ao teor desta toxina (Tabela 5). A interação entre os vinhos elaborados a

partir de diferentes variedades de uva e a época de vinificação também não foi estatisticamente significativa (Tabela 5).

Tabela 5 Resultado da análise de variância (ANAVA) do teor de OTA dos vinhos contaminados

Fonte de Variação	GL	QM	F calculado
Variedades de uva	10	52,867	68,20**
Época de vinificação	1	1,315	1,70 ^{ns}
Variedades* Época	1	2,171	2,80 ^{ns}
Resíduo	13	0,775	
CV(%) = 8,88	R ² = 98%	Média = 123,86	s(□) = 0,593

**Significativo ao nível de 5% de probabilidade

^{ns}Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL: grau de liberdade

QM: quadrado médio

CV: coeficiente de variação

R²: coeficiente de determinação

s(□): desvio padrão

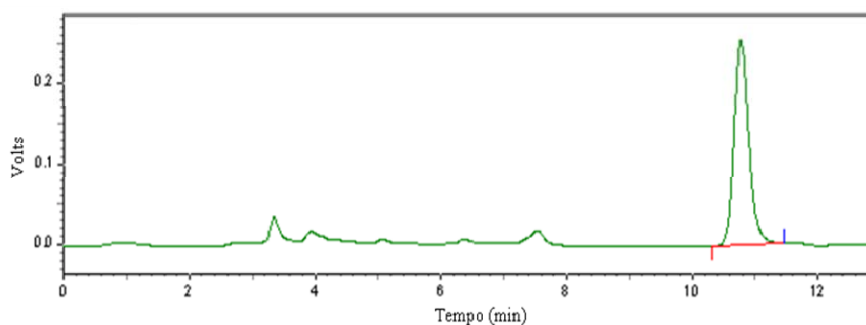


Gráfico 1 Cromatograma da amostra de vinho tinto elaborada a partir da variedade Syrah Clone 525 PE: IAC-313

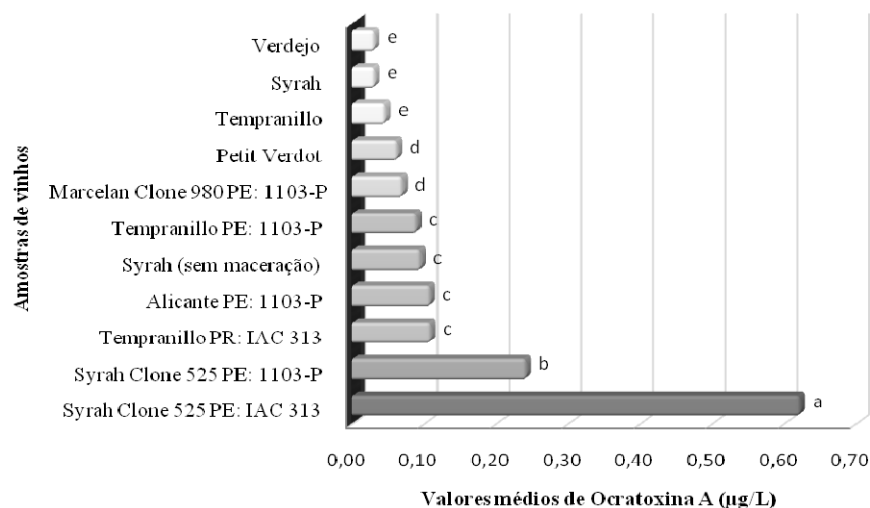


Gráfico 2 Concentração média de OTA detectada nas amostras positivas (> LQ) (amostras são identificadas pelas variedades de uvas utilizadas na elaboração dos vinhos). Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Scott e Knott (1974) a $p < 0,05$

O contraste entre os vinhos tintos e brancos contaminados com OTA foi estatisticamente significativo (Tabela 6). Deste modo, é possível inferir que o nível médio de contaminação das amostras positivas de vinhos tintos diferiu significativamente do nível detectado nos vinhos brancos. De acordo com o Gráfico 2, nota-se que o vinho da variedade Verdejo, embora não tenha diferido estatisticamente dos vinhos das variedades Syrah e Tempranillo, apresentou o menor valor de OTA detectado neste estudo, sendo o único vinho branco contaminado com esta toxina. Este fato já era esperado visto que em diversos estudos tem-se observado uma maior incidência e níveis de contaminação nos vinhos tintos em relação aos brancos.

Tabela 6 Resumo do contraste ortogonal entre o nível de contaminação dos vinhos tintos e dos brancos

Contraste	GL	QM	Y(h)	F calculado
Branco vs Tinto	1	53,078	53,0788	58,7**

**Significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL: grau de liberdade

QM: quadrado médio

Y(h): estimativa do contraste ortogonal

Neste estudo, embora tenha sido observada a presença de OTA nos vinhos, principalmente nos tintos, elaborados no Vale do Submédio São Francisco (Gráfico 2), os níveis detectados podem ser considerados baixos, sendo inferiores ao limite máximo tolerável para esta toxina em vinho e suco de uva estabelecido pela Legislação Europeia (2,0 $\mu\text{g/L}$) (COMMISSION REGULATION, 2005).

4 DISCUSSÃO

A maior incidência e nível de contaminação com OTA foram detectados nos vinhos tintos, o que está de acordo com o relatado em pesquisas realizadas na Europa (BATTILANI et al., 2003; BAU et al., 2005; BEJAOUI et al., 2006b; BELLÍ et al., 2004a, 2004b; LASRAM et al., 2007; OTTENEDER; MAJERUS, 2000; SERRA et al., 2003; ZIMMERLI; DICK, 1996). Em estudos com vinhos brasileiros este padrão de contaminação também foi observado (ROSA et al., 2004; SHUNDO et al., 2006). A maior contaminação observada neste tipo de vinho em relação aos demais, provavelmente ocorre devido às características do processo de vinificação, principalmente em relação à maceração do bagaço. Além disso, o período de fermentação, que contribui significativamente para a redução no teor de OTA (ABRUNHOSA; FERNANDES; VENÂNCIO, 2005; LASRAM et al., 2008; LATASTE et al., 2004), é geralmente mais curto para o vinho tinto do que para o branco, o que provavelmente permite que ocorra uma maior remoção desta toxina dos vinhos brancos em relação aos tintos.

No processo de vinificação de vinho branco, após o esmagamento, as partes sólidas da uva são separadas do mosto, havendo pouco contato deste com as cascas e sementes. Já no vinho tinto e rosado, as partes sólidas fermentam juntamente com o mosto para potencializar a extração de cor e aromas, sendo este tempo maior para os tintos. Segundo Lasram et al. (2008), é nesta fase que ocorre a maior extração da OTA das uvas, indicando que a casca é, provavelmente, a parte mais contaminada do fruto. Esta conclusão foi confirmada pela análise do conteúdo de OTA de diferentes componentes da baga, demonstrando que a casca contém aproximadamente 66% do total da toxina presente no fruto. Battilani e Pietri (2002) ao investigarem a ocorrência de OTA na casca e na polpa de bagas naturalmente infectadas, mostraram que a casca da uva é o tecido frequentemente mais contaminado. Gambuti et al. (2005) também

observaram que a intensa maceração do bagaço promoveu aumento no teor de OTA, ressaltando o papel da casca como carreadora de OTA para o vinho.

O Brasil não tem legislação específica para OTA em vinhos e sucos de uva. Apesar do maior nível de contaminação obtido (0,62 µg/L) ter sido detectado em amostra de vinho tinto, este valor é inferior ao limite máximo proposto pela Comissão Européia (COMMISSION REGULATION, 2005). Resultados semelhantes foram apresentados em estudos de Shundo et al. (2006), em que os níveis de OTA detectados em vinhos tintos brasileiros variaram de 0,10 a 1,33 µg/L. Segundo os autores, embora os resultados das amostras de vinho brasileiros quanto ao teor OTA tenham sido inferiores aos limites estabelecidos pela EC 123/2005 (COMMISSION REGULATION, 2005), a exposição pequena e contínua a esta micotoxina pode representar risco para a saúde humana. Estudos realizados em outros países, como no Canadá (NG et al., 2004) e na Austrália (LEONG et al., 2006), também observaram que todas as amostras contaminadas com OTA continham níveis inferiores a este limite.

A não ocorrência de OTA em vinhos que foram elaborados na mesma época pode estar relacionada com as condições climáticas ocorridas no período de colheita e também com a sanidade das uvas. Os fungos potencialmente ocratoxigênicos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* se desenvolvem no fruto com maior frequência na época da colheita, que ocorre nos estágios finais de maturação (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; BEJAOUI et al., 2006a; BELLÍ et al., 2004a, 2006; LASRAM et al., 2007; ROSA et al., 2002; SAGE et al., 2002; SERRA et al., 2003). Entretanto, diversos estudos mostram que o crescimento destes fungos em uvas e principalmente a produção de OTA, são influenciados por fatores climáticos (ANLI; ALKIS, 2010; BATTILANI et al., 2006; BELLÍ et al., 2005a; LASRAM et al., 2010; LEONG et al., 2006; MAGNOLI et al., 2007).

Os baixos níveis de OTA detectados nos vinhos estudados podem estar relacionados com o clima tropical semi-árido da região, em que temperaturas elevadas são observadas durante o ano todo (média de 27 °C). Segundo Lasram et al. (2010), considerando que a produção de OTA por *A. carbonarius* é favorecida por temperaturas mais baixas (15 a 20 °C), a condição climática dos países europeus é mais favorável para contaminação de uvas com OTA do que em regiões de clima tropical, como no Brasil. Isto pode explicar os baixos níveis de contaminação por esta micotoxina, detectado em alguns estudos (ROSA et al., 2004; SHUNDO et al., 2006), nos vinhos brasileiros quando comparado com os resultados obtidos para vinhos europeus (Tabela 7).

Tabela 7 Níveis de Ocratoxina A detectados em vinhos elaborados em países europeus

Origem	Níveis de OTA (µg/L)	Referência
Croácia	□0,005-44	Flajs et al. (2009)
Espanha	□0,01-4,63	Burdaspal e Legarda (2007)
Europa	□0,01-3,3	Otteneder e Majerus (2000)
Grécia	□0,02-3,2	Soufleros, Tricard e Boloumpasi (2003)
Itália	□0,01-5,2	Finoli et al. (2004)
Portugal	□0,5-2,1	Ratola, Martins e Alves (2004)

Em geral, têm-se observado que a condição favorável para o crescimento de *Aspergillus carbonarius*, a principal espécie produtora de OTA em uvas, ocorre na faixa de 25 a 35 °C, entretanto a temperatura ótima para a produção da toxina ocorre no intervalo de 15 a 20 °C (BELLÍ et al., 2004c, 2005b; ESTEBAN et al., 2006; LEONG; HOCKING; SCOTT, 2006; MITCHELL; ALDRED; MAGAN, 2003; MITCHELL et al., 2004;). Segundo Marín et al. (2006) em temperaturas elevadas, esta espécie cresce rapidamente com o consumo máximo de nutrientes do meio em poucos dias. De acordo com

Lasram et al. (2010) é provável que este fungo utilize alguns nutrientes do substrato para a produção de OTA. Deste modo infere-se que, em alta temperatura, há diminuição da capacidade de produção da toxina em função do esgotamento de nutrientes do meio. Assim, as temperaturas elevadas do Vale do Submédio São Francisco podem representar uma vantagem para os vinhos e sucos de uva elaborados nesta região, favorecendo os baixos níveis de contaminação com OTA nestes produtos, conforme observado neste estudo.

Neste estudo, não foi detectada OTA em nenhuma amostra de suco de uva estudada. Este fato pode estar relacionado a vários fatores, como o tipo de uva, região geográfica, condições climáticas e diferentes práticas aplicadas no cultivo das uvas, que influenciam na incidência dos fungos ocratoxigênicos e na produção da toxina. Em estudo anterior realizado no Brasil, na maioria (70,8%) das amostras de sucos de uva analisadas a OTA também não foi detectada (ROSA et al., 2004). Segundo Dachoupan et al. (2009) durante três anos de avaliação do teor de OTA em suco de uva de várias variedades cultivadas na França, baixos níveis foram detectados. Na Austrália, Bellí et al. (2004a) também não encontraram OTA em 10 amostras de suco de uva analisadas. O mesmo ocorreu no Brasil (SHUNDO et al., 2006). Entretanto, em outros estudos realizados na Europa têm-se observado que o suco de uva é mais contaminado com OTA do que o vinho. Na Alemanha, Majerus, Bresch e Otteneder (2000) detectaram OTA em 85% das amostras de suco de uva e em 40% dos vinhos analisados. O nível médio de contaminação nos sucos de uva tinta e branca foi de 2,32 µg/L. De acordo com Miraglia e Brera (2002), os sucos de frutas fornecem uma contribuição relevante para ingestão de OTA pela população europeia.

O Scientific Committee on Food (1998) estabeleceu uma Dose Diária Aceitável para OTA de 5 ng/kg peso corpóreo/dia. Considerando o consumo de vinho no Brasil de 5 mL/dia, o maior nível de OTA encontrado no presente

estudo (0,622 ng/mL) e peso corpóreo médio de 70 kg, o consumo diário de OTA é estimado em 0,88% da Dose Diária Tolerável. Com relação à média dos teores de OTA detectados nas amostras de vinho tinto (0,098 ng/mL) e branco (0,004 ng/mL) este consumo é estimado em apenas 0,14% e 0,005%, respectivamente, da Dose Diária Tolerável.

Outros estudos sobre a contaminação com OTA nos vinhos e sucos de uva elaborados nesta região brasileira são necessários, para permitir uma melhor compreensão dos fatores que contribuem significativamente na incidência e teor da toxina neste produtos, a fim de minimizar o potencial risco da presença de OTA e facilitar a manutenção de baixos níveis de contaminação, conforme observado neste estudo.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, a maior incidência de OTA foi observada nas amostras de vinho tinto (75%), sendo o único vinho branco contaminado obtido da variedade Verdejo. O maior teor de OTA (0,62 µg/L) foi encontrado no vinho tinto elaborado a partir da variedade Syrah Clone 525 PE: IAC-313. Não foi detectado OTA em nenhuma amostra de suco de uva estudada. Embora tenha sido observada a presença desta toxina nos vinhos elaborados no Vale do Submédio São Francisco, a incidência e os níveis detectados podem ser considerados baixos, sendo inferiores ao limite máximo tolerável para OTA em vinho e suco de uva estabelecido pela Legislação Europeia (COMMISSION REGULATION, 2005). Assim, este estudo demonstra que os vinhos e sucos de uva analisados representam um risco mínimo para a saúde dos consumidores.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L. et al. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 6, p. 903-906, June 2001.
- ABRUNHOSA, L.; FERNANDES, A.; VENÂNCIO, A. Ochratoxin A removal during the main steps of wine making. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DOS ALIMENTOS, 7., 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: IPV/SPQ, 2005. p. 13-16.
- 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.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington, 1997. 806 p.
- BATTILANI, P. et al. Mapping of *Aspergillus* section *Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 72-82, Sept. 2006.
- _____. 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.; GIORNI, P.; PIETRI, A. Epidemiology of toxin producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 715-722, Apr. 2003.
- 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 ochratoxinA by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxinA 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.

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**, Oxford, v. 98, n. 4, p. 839-844, Apr. 2005b.

_____. 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. 2004c.

_____. 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. 1, p. 541-546, Mar. 2004a.

_____. 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. 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. 2005a.

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).

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

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.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Report of codex committee on food additives and contaminants**. Hague, 1999. 4 p.

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:2005:025:0003:0005:EN:PDF>>. Acesso em: 10 out. 2010.

_____. 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: 12 out. 2010.

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. 1, p. 14-23, June 2009.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Ochratoxin A non-conventional exposure sources: a review. **Microchemical Journal**, London, v. 93, n. 2, p. 115-120, June 2009.

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. 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**, Treviso, v. 57, n. 2, p. 63-77, Feb. 2004.

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.

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

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.

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).

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.

_____. 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.

LATASTE, C. et al. Evolution de la contamination en ochratoxine A: du vignoble Français au vin. **Le Progrès Agricole et Viticole**, Année, v. 121, n. 3, p. 57-64, Aug. 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.

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.

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

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

MARÍN, S. et al. Kinetics of ochratoxin A production and accumulation by *Aspergillus carbonarius* on synthetic grape medium at different temperature levels. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 6, p. 196-200, Aug. 2006.

MERWE, K. J. van der. et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Willh. **Nature**, London, v. 205, n. 976, p. 1112-1113, Mar. 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, reports of experts participating in task 3.2.7.** Rome: General Health and Consumer Protection, 2002. Disponível em:
<http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2010.

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 and Applied Microbiology**, London, v. 97, n. 2, p. 439-445, Aug. 2004.

NG, W. et al. Ochratoxin A in wine and grape juice sold in Canada. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 21, n. 10, p. 971-981, Oct. 2004.

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

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

RATOLA, N.; MARTINS, L.; ALVES, A. 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, C. A. R. 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 OTA producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 4, p. 408-414, May 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.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. **Opinion of the scientific committee on food on Ochratoxin A**: expressed on 17 september 1998. Brussels, 1998. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out14_en.html>. Acesso em: 15 nov. 2010.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Arlington, v. 30, n. 2, p. 507-512, Sept. 1974.

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.

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.

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

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

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

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 wines and grapejuice: occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 6, p. 655-668, Aug./Sept. 1996.

CAPÍTULO 4

***Aspergillus* Seção *Nigri* em solos, uvas e mostos e Ocratoxina A em vinhos e sucos tropicais do Brasil**

RESUMO

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a incidência de fungos potencialmente ocratoxigênicos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* em solos de videiras, uvas e mostos do Nordeste brasileiro, bem como verificar a contaminação com Ocratoxina A (OTA) em vinhos finos e sucos de uva desta região. Foram analisadas um total de cinco amostras de uvas viníferas e de suco. Mostos de cada variedade de uva vinífera foram obtidos por esmagamento de bagas, e os solos foram coletados por parcela correspondente a cada variedade de uva analisada. O isolamento de fungos das bagas e sementes foi realizado por Plaqueamento Direto no meio Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). Para as amostras de mosto e de solo utilizou-se a técnica de espalhamento superficial a partir de diluições seriadas em meio DRBC e Agar Dicloran Glicerol a 18% (DG 18), respectivamente. As espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* foram identificadas por características morfológicas. Todos os isolados obtidos foram testados quanto ao potencial de produção de OTA pelo método Plug Agar. A quantificação de OTA dos vinhos e sucos de uva foi realizada pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detecção por fluorescência. A maioria (73,4%) dos isolados obtidos foram identificados nas seguintes espécies: *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. niger* Agregado, *A. tubingensis* e *A. foetidus*. As espécies produtoras de OTA foram *A. niger*, *A. niger* Agregado, *A. carbonarius* e *A. foetidus*. As espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* estão naturalmente presentes nas uvas, sementes, mosto e solo da região vitícola estudada. Porém, na maioria das amostras (80%) de vinho e suco analisadas não foi detectada a presença de OTA, o que provavelmente está relacionado com as condições climáticas, manejo cultural e processamento das uvas para elaboração dos produtos finais.

Palavras-chave: Ocratoxina A. *Aspergillus*. Uva. Solo. Vinho.

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the incidence of potentially ochratoxigenic fungi *Aspergillus* Section *Nigri* in soils, grapes and musts of the Brazilian Northeast, as well as to investigate the contamination with Ochratoxin A (OTA) in wines and grape juices in the region. Was analyzed a total of five samples of wine grapes and juice. The must of each grape variety of wine were obtained by crushing the grapes, and soil were collected per plot for each grape variety. The isolation of fungi from the berries and seeds was performed by Direct Plating on Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol media (DRBC). For samples of must and soil was used the technique of surface serial dilutions in DRBC and Agar Dichloran Glycerol 18% (DG18). The species of *Aspergillus* Section *Nigri* were identified by morphological characteristics. All isolates were tested for potential production of OTA by Agar Plug Method. The quantification of OTA from wines and grape juices was performed by the method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detection. Were identified the following species: *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. niger* Aggregate, *A. tubingensis* and *A. foetidus*. OTA-producing species were *A. niger*, *A. niger* Aggregate, *A. carbonarius* and *A. foetidus*. Thus, one can consider that the main source of these species in the vineyards studied is the soil. The species of *Aspergillus* Section *Nigri* are naturally present in grape seeds, grape and wine region of the soil studied. However, in most samples (80%) of wine and juice analysis was not detected the presence of OTA, which is probably related to climatic conditions, management and processing of grapes for the elaboration of final products.

Keywords: Ochratoxin A. *Aspergillus*. Grape. Soil. Wine.

1 INTRODUÇÃO

A Ocratoxina A (OTA) é hoje a principal micotoxina encontrada como contaminante de uvas e seus derivados, sendo considerada uma das mais prejudiciais para a saúde humana devido aos seus efeitos teratogênicos, embriotóxicos, genotóxicos, neurotóxicos, imunossupressores, carcinogênicos e nefrotóxicos em animais (CHIOTTA et al., 2009; JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES - JECFA, 2001).

Durante algum tempo, os cereais e produtos animais foram considerados os principais alimentos contaminados com OTA. Na atualidade, sabe-se que esta micotoxina pode estar presente em diversos alimentos. Entre eles, o vinho, que é considerado uma das principais fontes de OTA para os consumidores europeus devido à elevada incidência desta micotoxina neste produto (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - CAST, 2003; VISCONTI; PASCALE; CENTONZE, 1999). O suco de uva também pode representar uma importante fonte de OTA para a população, principalmente por ser mais consumido do que o vinho (VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006). Além disto, têm-se observado que o suco de uva é mais contaminado com OTA do que o vinho (BATTILANI et al., 2003; BAU et al., 2005; BEJAOUI et al., 2006; LASRAM et al., 2007; OTTENEDER; MAJERUS, 2000; SERRA et al., 2003; ZIMMERLI; DICK, 1996).

OTA foi originalmente descrita como um metabólito secundário de *Aspergillus ochraceus* (MERWE et al., 1965). Atualmente, sabe-se que é produzida por várias espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (LASRAM et al., 2008). Os fungos responsáveis pela contaminação de uvas com OTA são os *Aspergillus* Seção *Nigri* (FRISVAD et al., 2007; LASRAM et al., 2010). Estes fungos têm sido considerados como sendo a microbiota predominante de uvas no momento da colheita, embora possam ser

detectados na superfície de uvas saudáveis em todas as fases de maturação (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; BAU et al., 2005; BELLÍ et al., 2004; CABAÑES et al., 2002; ROSA et al., 2002; SAGE et al., 2002; SERRA et al., 2003). Dentro do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, a espécie *Aspergillus carbonarius* é considerada a principal fonte de OTA em uvas (HOCKING et al., 2007; LASRAM et al., 2008), e os níveis da toxina variam em função do tipo de vinho, da região vitivinícola e da safra (SOLFRIZZO et al., 2010).

A incidência de *Aspergillus* Seção *Nigri*, principalmente *A. carbonarius*, em uvas, sementes, mostos e solos de videiras aumenta o risco de contaminação com OTA nos vinhos e sucos de uva. Assim, neste estudo objetivou-se avaliar a incidência de fungos potencialmente ocratoxigênicos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* em solos cultivados com videiras, uvas e mostos do Nordeste brasileiro, bem como verificar a contaminação com Ocratoxina A (OTA) em vinhos finos e sucos de uva desta região.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

As amostras foram obtidas na região vitícola do Vale do Submédio São Francisco, no Nordeste brasileiro. Esta região (9°S; 40°W) apresenta temperatura média anual de 27 °C, precipitação anual de 500 mm e clima Tropical Semi-Árido. Diferencia-se das demais áreas tradicionais de vinho e uva no mundo pela produção de uvas durante o ano todo, o que ocorre em função das condições climáticas e da alta disponibilidade de água para a irrigação dos vinhedos.

2.2 Amostragem

2.2.1 Uvas, mostos e solos

Um total de cinco amostras de uvas foram coletadas nos estágios finais de maturação da baga (época de colheita), sendo composta por variedades viníferas tinta (Syrah), branca (Sauvignon Blanc e Viognier), e cultivares utilizadas para elaboração de suco (BRS Cora em porta-enxerto IAC 572 e Isabel Precoce). Cachos de uva (aprox. 3 kg) de cada variedade foram colhidos, de forma aleatória, em diferentes plantas do vinhedo. Foram coletados cachos representativos do estado observado nas vinhas. As uvas foram transportadas para o laboratório em sacos plásticos estéreis lacrados dentro de caixas térmicas.

Amostras de mostos (200 mL), de cada variedade de uva vinífera, foram obtidas por esmagamento de bagas (escolhidas aleatoriamente) dos cachos coletados nas vinhas e posterior filtragem. Os mostos foram analisados imediatamente após serem obtidos.

Nas vinhas foram coletadas amostras de solo por parcela correspondente a cada variedade de uva analisada. Foram retiradas três subamostras de solo em cada parcela na profundidade de 5 cm diretamente abaixo das videiras, conforme Leong, Hocking e Scott (2007). As subamostras foram homogeneizadas em sacos plásticos estéreis resultando num total aproximado de 300 g de solo. A amostragem foi realizada de forma aleatória. As amostras foram mantidas sob refrigeração até serem analisadas.

2.2.2 Vinhos e sucos de uva

Vinhos e sucos de uva foram obtidos, experimentalmente, a partir de cada amostra de uva coletada (item 2.2.1), totalizando cinco amostras.

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 a 18 °C, respectivamente. Os vinhos foram em seguida estabilizados e engarrafados.

Os sucos de uva experimentais foram elaborados através do uso de suqueira artesanal, com capacidade para 20 litros, extração a 75 °C com resfriamento rápido (flesh pasteurização), e posterior engarrafamento.

2.3 Análises micológicas

O isolamento de fungos de uvas foi realizado conforme descrito por Samson et al. (2000). De cada amostra, selecionou-se 100 bagas ao acaso e as demais foram utilizadas para extração de sementes. As bagas e sementes foram submetidas ao procedimento de desinfecção superficial. Um total de 100 bagas e 100 sementes foram plaqueadas, assepticamente, no meio Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (Merck).

Para os mostos, 25 mL de cada amostra foram homogeneizados com 225 mL de água peptonada 0,1% estéril, seguindo-se da agitação por 5 minutos. Por espalhamento, 0,1 mL de cada diluição (1:10, 1:100, 1:1000) foi transferido para três placas de Petri estéreis com o meio DRBC.

Das amostras de solo, 10 g foram adicionados a 90 mL de água peptonada 0,1% estéril com posterior agitação em shaker a 130 rpm por 30 minutos. De cada diluição obtida (1:10, 1:100, 1:1000) 0,1 mL foi espalhado em três placas de Petri estéreis com o meio Agar Dicloran Glicerol a 18% (DG 18) (Merck).

Todas as placas foram incubadas no escuro por 5-7 dias a 25°C. Posteriormente, os fungos identificados, conforme aspectos morfológicos por estereomicroscopia, como pertencentes ao gênero *Aspergillus* e a Seção *Nigri* foram re-isolados no meio Agar Malt para purificação das colônias. Os fungos em cultura pura foram incubados em meios e temperaturas padronizados e identificados de acordo com Klich (2002).

2.4 Screening do potencial ocratoxigênico dos isolados

Todos 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 no meio de cultura Czapek Yeast Agar (CYA), sendo incubados por 7 dias a 25°C. Foram utilizadas Placas de Cromatografia de Camada Delgada (Merk-Sílica Gel 60, 20×20), solução padrão de Ocratoxina A (Sigma-Aldrich) e a Fase móvel composta por Tolueno, Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (TEF) (50:40:10). A confirmação quanto à produção de OTA foi efetuada sob luz ultravioleta de λ 366 nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados

produtores de OTA apresentaram um RF (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão da micotoxina.

2.5 Análise de OTA

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

2.5.1 Soluções e reagentes

A solução de diluição 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.). Solução estoque de OTA Sigma (St. Louis, MO, USA) foi preparada em tolueno:ácido acético (99:1, v/v). A concentração foi determinada de acordo com a Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1997), sendo verificada em Espectrofotômetro UV a 333 nm, com $\epsilon = 5440 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. L. 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 a fase móvel foi utilizado acetonitrila:metanol:ácido acético aquoso (35:35:30), seguindo-se da filtração a vácuo em membrana de celulose regenerada PTFE de 0,45 μm . Ácido acético aquoso foi preparado com uma 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.

2.5.2 Preparo das amostras e purificação em coluna de imunoafinidade

Inicialmente, as amostras foram resfriadas a 4 °C. De cada amostra, 40 mL foram adicionados a 40 mL da solução de diluição e homogeneizados sob agitação mecânica em shaker, em velocidade média, por 30 minutos. Esta solução foi submetida à filtração a vácuo (2 mL/min) em membrana GFA e 40 mL do filtrado foi passado por uma coluna de imunoafinidade (Ochraprep, R-Biopharm Rhône Ltd) adaptada ao sistema Visiprep™ SPE *Vacuum Manifold*. A coluna foi lavada com 10 mL da solução de lavagem e, em seguida, com 10 mL de água purificada para remoção dos resíduos não-específicos. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de metanol à coluna para liberação da OTA vinculada ao anticorpo, com repetição do procedimento por três vezes. O eluato obtido foi evaporado com aquecimento (± 50 °C) da amostra sob atmosfera de nitrogênio. Este extrato seco foi reconstituído em 250 μ L de fase móvel. Injetou-se então 50 μ L das soluções padrão de OTA e dos extratos das amostras no Cromatógrafo Líquido.

2.5.3 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), sendo o fluxo de 0,8 mL/min.

A confirmação da presença de OTA foi determinada pela formação de ésteres metílicos, sendo observado um aumento no tempo de retenção das amostras devido à 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 10 ng L^{-1} e 30 ng L^{-1} , respectivamente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras de baga, semente, mosto e solo obteve-se um total de 94 isolados do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*. Destes, 73,4% foram identificados nas espécies *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. niger* Agregado, *A. tubingensis* e *A. foetidus*, consideradas na literatura como potenciais produtoras de OTA em uvas (PERRONE et al., 2008). A incidência de isolados ocratoxigênicos destas espécies nas amostras das variedades de uva estudadas, está descrita na Tabela 1. As espécies *A. niger*, *A. niger* Agregado, *A. carbonarius* e *A. foetidus* foram consideradas, neste estudo, como produtoras de OTA. As demais espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* identificadas foram *A. japonicus* e *A. aculeatus*.

Tabela 1 Espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* com o respectivo número de isolados produtores de OTA obtidos das amostras de baga, semente, mosto e solo, e os teores de OTA detectados nos vinhos e sucos de uva

Amostras (uvas)	Produto	Espécie de <i>A. Seção Nigri</i> potencialmente ocratoxigênica (número de isolados produtores de OTA)				OTA (ng/L) nos produtos
		Baga	Semente	Mosto	Solo	
Syrah	Vinho Tinto	-	-	<i>A. niger</i> (1)	<i>A. foetidus</i> (1)	30,3
Sauvignon Blanc	Vinho Branco	<i>A. foetidus</i> (0)	<i>A. foetidus</i> (0) <i>A. tubingensis</i> (0)	-	<i>A. carbonarius</i> (3) <i>A. niger</i> Agregado (1)	ND
Viognier	Vinho Branco	-	-	<i>A. niger</i> (0)	<i>A. niger</i> Agregado (0)	ND
BRS Cora	Suco	-	<i>A. niger</i> Agregado (0) <i>A. foetidus</i> (0) <i>A. tubingensis</i> (0)	-	<i>A. niger</i> (0) <i>A. niger</i> Agregado (0)	ND
Isabel	Suco	-	<i>A. foetidus</i> (0) <i>A. niger</i> Agregado (0)	-	<i>A. niger</i> (0) <i>A. niger</i> Agregado (0)	ND

ND: Não Detectado

As bagas e sementes da variedade Syrah não estavam contaminadas com os fungos *Aspergillus* Seção *Nigri*. Entretanto, o mosto e o solo de cultivo destas

uvas continham isolados ocratoxigênicos das espécies *A. niger* e *A. foetidus*, e conforme descrito na Tabela 1, o vinho obtido desta variedade apresentou-se contaminado com OTA. Este fato indica que não somente as uvas podem ser a fonte desta toxina para os produtos finais. Martínez-Rodríguez e Carrascosa (2009) afirmam que não existem dados bibliográficos disponíveis, que sugerem o desenvolvimento de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* durante o processamento do mosto. Entretanto, neste estudo a espécie *A. niger* foi isolada de amostras de mosto, o que pode representar um risco de contaminação com OTA no vinho após o crescimento de isolados ocratoxigênicos em etapas iniciais do processo de vinificação.

Nas amostras de baga, semente e no solo de cultivo da variedade Sauvignon Blanc foram detectadas as espécies *A. foetidus*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* e *A. niger* Agregado. Porém, apenas no solo foram encontrados isolados considerados ocratoxigênicos das espécies *A. carbonarius* e *A. niger* Agregado (Tabela 1). Em estudos anteriores, o solo e os restos de videira sob o solo foram as fontes primárias de propágulos de fungos da Seção *Nigri*, principalmente *A. niger* e *A. carbonarius* (LEONG et al., 2006a, 2006b).

O vinho elaborado a partir desta variedade não continha níveis detectáveis de OTA, o que demonstra a importância do solo apenas como uma fonte de esporos dos fungos potencialmente ocratoxigênicos, não sendo considerado uma fonte direta de OTA para as uvas e vinhos. Hocking et al. (2007) também mencionaram que a importância dos fungos ocratoxigênicos em solo está relacionada com o movimento de esporos pelo ar do solo para a superfície das bagas. Outros estudos destacaram o papel da circulação de ar na dispersão de esporos do solo, pelo aumento da incidência de *A. carbonarius* em bagas após uma severa tempestade de poeira (LEONG et al., 2006a). A OTA foi detectada em solos agrícolas na Dinamarca (MORTENSEN; STROBEL; HANSEN, 2003) e de acordo com alguns estudos pode ser translocada através

da planta do café (MANTLE, 2000). No entanto, segundo Hocking et al. (2007) devido às mínimas concentrações de OTA que podem estar presentes no solo, é pouco provável que o mecanismo de translocação contribua para a contaminação das uvas com esta toxina.

Neste estudo, as amostras de baga das variedades Syrah, Viognier, BRS CORA e Isabel não continham fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, entretanto foi detectada a presença de espécies deste gênero nos solos de cultivo destas uvas. Este fato já era esperado, visto que o habitat natural destas espécies é o solo (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1993). Assim, embora a presença de fungos toxigênicos no solo represente um risco de contaminação das uvas, solo naturalmente contaminado não indica necessariamente uva infectada.

Nas amostras de mosto e solo da variedade Viognier foram detectadas espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*, entretanto os isolados não foram produtores de OTA. O mesmo ocorreu com as amostras de semente e solo das cultivares utilizadas para elaboração de suco (Tabela 1). O vinho e os sucos obtidos destas uvas também não estavam contaminados com OTA. Deste modo, pode-se inferir que a presença destes fungos nas uvas, mostos e solos não indica necessariamente produto final contaminado. Isto ocorre, principalmente, pelo fato de que a produção de OTA pelos fungos é influenciada por diversos fatores, tais como temperatura, atividade de água (a_w), pH, fatores nutricionais, dentre outros (ANLI; ALKIS, 2010; LASRAM et al., 2010). Além disto, sabe-se que dos isolados de *A. niger* Agregado, obtidos de uvas e produtos derivados, uma pequena porcentagem (5-10%) é considerada ocratoxigênica, ao contrário do que é observado para a espécie *A. carbonarius* (CHULZE; MAGNOLI; DALCERO, 2006; LEONG, 2007; LEONG et al., 2006a; PERRONE et al., 2008; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

Neste estudo, além de todos os isolados da espécie *A. carbonarius* obtidos serem produtores de OTA, a quantidade produzida foi elevada, o que realça a importância deste fungo como fonte de OTA. Assim, pode-se inferir que o maior risco de contaminação do vinho e/ou suco ocorre quando tem-se a presença de *A. carbonarius*, principalmente nas uvas e mostos.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, 73,4% dos isolados obtidos foram identificados nas espécies *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. niger* Agregado, *A. tubingensis* e *A. foetidus*. As espécies produtoras de Ocratoxina A foram *A. niger*, *A. niger* Agregado, *A. carbonarius* e *A. foetidus*. Os fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* estão naturalmente presentes nas uvas, sementes, mosto e solo da região vitícola estudada. Porém, na maioria das amostras (80%) de vinhos e sucos analisadas não foi detectada a presença de OTA, o que provavelmente está relacionado com as condições climáticas, manejo cultural e processamento das uvas para elaboração dos produtos finais. A presença de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* nas uvas, mostos e solos não indica necessariamente produto final contaminado. Entretanto, a incidência de isolados produtores de OTA, principalmente da espécie *A. carbonarius*, aumenta o risco de contaminação com OTA nos vinhos e sucos de uva.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington, 1997. 806 p.
- BATTILANI, 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.
- BATTILANI, P.; GIORNI, P.; PIETRI, A. Epidemiology of toxin producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 715-722, Apr. 2003.
- BAU, M. et al. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 125-130, Feb. 2005.
- BEJAOU, H. et al. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 46-52, Sept. 2006.
- BELLÍ, N. et al. 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. 2004.
- 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.
- 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.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY.

Mycotoxins: risks in plants, animal and human systems. Ames, 2003. 199 p. (Report, 139).

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. San Francisco: Academic, 1993. 860 p.

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.

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.

FRISVAD, J. C. et al. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 59, n. 1, p. 31-37, Oct. 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.

JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Geneva, 2001. (WHO Food Additives Series, 47).

Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=RedirectURL&_method=externObjLink&_locator=url&_cdi=6800&_issn=07400020&_origin=article&_zone=art_page&_plusSign=%2B&_targetURL=http%253A%252F%252Fwww.inchem.org%252Fdocuments%252Fjecfa%252Fjecmono%252Fv47je01.htm>. Acesso em: 22 out. 2010.

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

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.

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

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

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. 2006a.

_____. Black *Aspergillus* species in Australian vineyards: from soil to ochratoxin A in wine. In: HOCKING, J. I. et al. (Ed.). **Advances in food mycology**. New York: Springer, 2006b. p. 153-171.

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**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 124-133, Jan. 2007.

MANTLE, P. G. Uptake of radiolabelled ochratoxin A from soil by coffee plants. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 53, n. 3, p. 377-378, Feb. 2000.

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.

MERWE, K. J. van der; STEYN, P. S.; FOURIE, L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, London, v. 205, n. 976, p. 1112-1113, Mar. 1965.

MORTENSEN, G. K.; STROBEL, B. W.; HANSEN, H. C. B. Determination of zearalenone and ochratoxin A in soil. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 376, n. 1, p. 98-101, May 2003.

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

PERRONE, G. et al. *Aspergillus* in grapes: ecology, biodiversity and genomics. In: VARGA, J.; SAMSON, R. A. ***Aspergillus in the genomic era***. Netherlands: Wageningen Academic, 2008. p. 179-212.

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

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

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food-borne fungi**. 4th ed. Baarn Delft: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 2000. 322 p.

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.

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.

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

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTONZE, G. Determination of Ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 864, n. 1, p. 89-101, Dec. 1999.

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

APÊNDICES

Tabela 1A Resultado da análise de variância (ANAVA) das amostras infectadas de baga, semente, mosto e solo

Fontes de Variação	BAGAS		SEMENTES		SOLO		MOSTO	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Tratamento	6	5141,6* *	6	18,13**	7	363565476**	2	258165,67 **
Erro	29	87,27	23	1,20	16	22875000	6	10307,96
Total	35	-	29	-	23	-	8	-
	CV(%) = 27		CV(%) = 25		CV(%) = 25		CV(%) = 24	
	Média = 33,61		Média = 19,86		Média = 18958,33		Média = 22900	
	R ² = 92%		R ² = 79%		R ² = 87%		R ² = 89%	

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade

^{ns} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

GL: grau de liberdade

QM: quadrado médio

CV: coeficiente de variação

R²: coeficiente de determinação

Tabela 2A Níveis de Ocratoxina A (OTA) detectados nas amostras de vinho tinto e branco analisadas

Amostras de vinho (variedades de uva)	Tipo de vinho	Período de elaboração (mês/ano)	OTA (ng/L)	
Syrah Clone 525 PE: IAC-313	Tinto	11/2009	622,0	
Syrah Clone 525 PE: 1103-P		11/2009	241,1	
Tempranillo PE: IAC-313		11/2009	108,8	
Alicante PE: 1103-P		11/2009	107,9	
Syrah sem tratamento		12/2009	94,9	
Tempranillo PE: 1103-P		11/2009	89,2	
Marselan Clone 980 PE: 1103-P		11/2009	69,5	
Petit Verdot 2		11/2009	64,4	
Petit Verdot 1		06/2009	60,7	
Tempranillo 1		06/2009	57,9	
Tempranillo 2		11/2009	33,4	
Syrah		06/2009	30,3	
Grenache		09/2009	ND	
Cabernet Sauvignon		09/2009	ND	
Cabernet Sauvignon PE: IAC-766		12/2009	□LQ	
Carmenère T2		12/2009	□LQ	
Verdejo		Branco	07/2009	30,2
Viognier 1			06/2009	ND
Viognier 2			11/2009	□LQ
Chenin Blanc 1	07/2009		ND	
Chenin Blanc 2	11/2009		□LQ	
Sauvignon Blanc 1	06/2009		ND	
Sauvignon Blanc 2	11/2009		□LQ	

ND: Não Detectado

LQ: Limite de Quantificação (30 ng/L)

LD: Limite de Detecção (10 ng/L)

Limite Máximo Proposto na Legislação europeia: 2000 ng/L

Limite Máximo Em Estudo no Brasil (Consulta Pública nº 100, 2009): 10000 ng/L