



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**CARACTERIZAÇÃO MICOTOXICOLÓGICA DE UVAS VINÍFERAS PRODUZIDAS  
NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.**

Tiago Centeno Einloft

Porto Alegre, Brasil

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**CARACTERIZAÇÃO MICOTOXICOLÓGICA DE UVAS VINÍFERAS PRODUZIDAS  
NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.**

Tiago Centeno Einloft

Orientador: Prof. Dr. Isa Beatriz Noll

Co-Orientador: Dr. Michele Hoeltz

Porto Alegre, Brasil

2012

CIP – Catalogação na Publicação

E35c Einloft, Tiago Centeno  
Caracterização micotoxicológica de uvas viníferas produzidas no Rio Grande do Sul, Brasil. / Tiago Centeno Einloft. - - Porto Alegre, 2012.  
88 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, BR-RS, 2012.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dra. Isa Beatriz Noll.  
Coorientadora: Dra. Michele Hoeltz.

1. Vitivinicultura. 2. Uva. 3. Contaminação fúngica. 4. Ocratoxina A.  
5. *Aspergillus* seção *Nigri*. I. Noll, Isa Beatriz (orient.) II. Hoeltz, Michele (coorient.) III. Título

CDU 663.2

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

Autor: **Tiago Centeno Einloft**

Título da dissertação: **CARACTERIZAÇÃO MICOTOXICOLÓGICA DE UVAS  
VINÍFERAS PRODUZIDAS NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.**

Dissertação aprovada por:

**Prof. Dr. Vítor Manfro**

Membro da Comissão Julgadora

**Prof. Dra. Marina Venturini Copetti**

Membro da Comissão Julgadora

**Prof. Dra. Mercedes Passos Geimba**

Membro da Comissão Julgadora

**Prof. Dr. José Maria Wiest**  
Coordenador do PPGCTA

**Prof. Dr. Vítor Manfro**  
Diretor do ICTA/ UFRGS

Porto Alegre, 25 de março de 2012

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai, **Paulo Roberto**, exemplo de dedicação, competência e persistência,

À minha mãe, **Beatriz**, que sempre me incentivou e torceu por mim e fez de tudo para o meu bem estar,

Ao meu irmão, **Daniel**, meu eterno melhor amigo, que me incentivou em todos os momentos,

À minha namorada, **Ana Paula**, minha companheira, incentivadora, amiga e motivadora

A estas pessoas especiais,  
é dedicado este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação para Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela bolsa de mestrado concedida.

Às vinícolas **Almadén**, **Valduga** e **Valmarino** pelas amostras concedidas e em especial ao sr. **Leonel Caliari** e ao sr. **Marco Salton**, pela disposição em ajudar, responder todas as dúvidas e pelos dados fornecidos.

À professora e minha orientadora **Isa Beatriz Noll**, por ter me acolhido em seu laboratório e me dado à oportunidade de ser seu orientado, pela generosidade e pelos quatro anos de ensinamentos que me proporcionou.

À colega, amiga e co-orientadora **Michele Hoeltz**, pela grande amizade e companheirismo, principalmente nos momentos difíceis, pela dedicação e principalmente pelos ensinamentos de Micologia.

Ao professor **Vítor Manfro**, pelo grande conhecimento sobre a vitivinicultura e pelo contato com as vinícolas para a obtenção das amostras, fundamental para o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor **Adriano Brandelli**, pela permissão do uso de equipamentos em seu laboratório.

Às bolsistas de iniciação científica **Verônica Possebon Oldoni** e **Laurita Monezi** pela colaboração com este trabalho.

À secretária do PPG-CTA, **Sônia Maria Martins**, pela grande ajuda em todos os compromissos discentes.

Aos colegas de mestrado, pela troca de experiências e amizade.

Em especial, aos meus pais **Paulo Roberto Einloft** e **Beatriz Centeno Einloft**, irmão **Daniel Centeno Einloft** e minha namorada **Ana Paula Oselame Rodrigues**, por todo o amor, carinho e o apoio que foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 13 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....   | 14 |
| Objetivo Geral.....  | 15 |
| Objetivos Específicos .....  | 15 |
| <b>CAPÍTULO 1</b> .....  | 15 |
| 1.    Revisão Bibliográfica .....  | 16 |
| 1.1    Importância da vitivinicultura no Brasil e no Rio Grande do Sul .....                 | 16 |
| 1.2    Contaminação fúngica em uvas.....   | 20 |
| 1.2.1    Micobiota comum de uvas viníferas.....  | 20 |
| 1.2.2    Micobiota potencialmente toxigênica .....   | 23 |
| 1.2.2.1 <i>Aspergillus</i> sp.: Ocorrência .....   | 23 |
| 1.2.2.2 <i>Aspergillus</i> sp: fatores que favorecem o desenvolvimento .....                 | 27 |
| 1.3    Ocratoxina A.....   | 29 |
| 1.3.1    Ocratoxina A: Características físico-químicas e toxicidade .....                    | 29 |
| 1.3.2    Ocratoxina A: Legislação .....  | 31 |
| 1.3.3    Ocratoxina A em uvas e derivados .....  | 31 |
| 1.3.4    Ocratoxina A em uvas e derivados no Brasil.....                                     | 35 |
| <b>CAPÍTULO 2</b> .....  | 37 |
| Artigo: Mycotoxicological characterization of wine grapes from Rio Grande do Sul, Brazil ... | 37 |
| <b>CAPÍTULO 3</b> .....  | 55 |
| 3.    Discussão geral .....  | 55 |
| 3.1    Micobiota comum das uvas viníferas .....  | 55 |
| 3.2 <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> .....  | 59 |
| 3.2.1    Identificação das cepas .....   | 59 |
| 3.2.2    Ocorrência.....   | 62 |

|       |  |           |
|-------|--|-----------|
| 3.2.3 | Potencial ocratoxigênico .....           | 71        |
| 3.3   | OTA no mosto de uvas viníferas.....      | 72        |
| 3.3.1 | Técnicas para a determinação de OTA..... | 72        |
| 3.3.2 | Ocorrência de OTA nas uvas.....          | 73        |
|       | <b>CONCLUSÕES .....</b>                  | <b>75</b> |
|       | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>         | <b>76</b> |
|       | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                 | <b>77</b> |



## LÍSTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Mapa das principais regiões vitivinícolas no estado do Rio Grande do Sul .....                                   | 17 |
| Figura 2: Mapa da Serra do Nordeste do Rio Grande do Sul, com as principais regiões vitivinicultoras. ....                 | 18 |
| Figura 3: Mapa da Serra do Sudeste e Campanha do Rio Grande do Sul, com as principais regiões vitivinicultoras.....        | 19 |
| Figura 4: Classificação dos <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> de importância vitivinícola.....                         | 25 |
| Figura 5: Estrutura química da OTA.....  | 30 |
| Figure 6: Map of Rio Grande do Sul with the three wine producing regions .....   | 52 |
| Figure 7: Genera percentage frequency at ripeness and harvest periods. ....  | 52 |
| Figure 8: Species isolated belonging to <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> .....                                      | 54 |
| Figure 9: <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> frequency regarding to grape variety and cultivation period .....        | 54 |
| Figura 10: Micro estruturas reprodutivas dos gêneros isolados em aumento de 200x e 1000x (7 e 8).....                      | 55 |
| Figura 11: Percentagem de incidência gêneros isolados das uvas. ....   | 56 |
| Figura 12: Características micromorfológicas de <i>A. japonicus</i> .....  | 60 |
| Figura 13: Sieriação de fungos do agregado <i>A. niger</i> .....   | 60 |
| Figura 14: Conidióforo de <i>A. foetidus</i> com estipe não pigmentada (400x).....   | 61 |
| Figura 15: Conídios de <i>Aspergillus awamori</i> nos aumentos de 200x (A) e 1000x (B).....                                | 62 |
| Figura 16: Conídios característicos de <i>Aspergillus niger</i> em A (100x) e B (400x).....                                | 62 |
| Figura 17: Espécies de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> identificadas.....  | 63 |
| Figura 18: Cultivo vertical realizado na região da Serra do Sudeste .....  | 68 |
| Figura 19: Cultivo vertical realizado na região da Campanha. ....  | 68 |
| Figura 20: Cultivo horizontal realizado na região da Serra do Nordeste.....  | 69 |
| Figura 21: Frequência dos <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> em relação a variedade de uva e o período de cultivo ..... | 70 |
| Figura 22: Fluorescência dos metabólitos produzidos pelos fungos isolados.....   | 71 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Análise da microbiota de uvas em diferentes países.....   | 25 |
| Tabela 2: Percentual dos isolados de <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> encontrados em trabalhos realizados em diferentes países.....                | 26 |
| Tabela 3: Níveis máximos de OTA em uvas e vinhos analisados em diferentes países.....   | 32 |
| Table 4: Isolated genera incidence from grapes at three different regions and two varieties .....   | 53 |
| Tabela 5: Incidência dos gêneros isolados das uvas nas três diferentes regiões produtoras e duas variedades analisadas .....                            | 58 |
| Tabela 6: Número de isolados do agregado <i>A. niger</i> e <i>A. japonicus</i> nas diferentes regiões do estado, variedades e períodos do cultivo ..... | 66 |
| Tabela 7: Recuperação do método de análise de OTA em uvas.....  | 73 |

## RESUMO

A vitivinicultura é uma atividade extremamente importante no estado do Rio Grande do Sul, representando cerca de 50% das uvas produzidas e 90% dos vinhos em todo o país. Diferentes gêneros fúngicos são comumente encontrados infectando as bagas, os principais são *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium* e *Aspergillus*. Esta contaminação é influenciada por diferentes fatores, entre eles, características climáticas da região, variedades da uva, tipo de cultivo, entre outros. O gênero *Aspergillus* destaca-se dos demais, pois as espécies frequentemente encontradas nas uvas, os chamados *Aspergillus* seção *Nigri*, são potenciais produtores de Ocratoxina A, micotoxina nefrotóxica e possivelmente carcinogênica para humanos. Os objetivos deste trabalho foram a caracterização micotoxicológica de uvas das variedades Merlot e Cabernet Sauvignon, produzidas em três regiões vitivinícolas do Rio Grande do Sul, coletadas em dois estágios de maturação das bagas. As amostragens foram realizadas no início da mudança de cor e na colheita nas regiões da Campanha, Serra do Sudeste e Serra do Nordeste. Foram isolados oito gêneros fúngicos, com destaque para *Alternaria*, que foi predominante em todas as regiões, estágios de cultivo e nas duas variedades. Os *Aspergillus* seção *Nigri* foram predominantes no gênero *Aspergillus*, representando 88% dos isolados, que se destacaram na região da Campanha e na variedade Cabernet Sauvignon. O período da colheita demonstrou ser crítico para a contaminação por *Aspergillus* negros na variedade Cabernet Sauvignon, enquanto na variedade Merlot, maior frequência desses fungos foi observada durante o início da mudança de cor. Uma cepa de *Aspergillus japonicus* foi capaz de produzir ocratoxina A na concentração de 148 ng/mL/10<sup>6</sup> conídios. Não foram encontrados níveis detectáveis de OTA nas amostras de uvas. A caracterização da contaminação fungica e por OTA em uvas cultivadas no estado é relevante para garantir a qualidade destes produtos e a segurança da população consumidora.

**Palavras-chave:** *Aspergillus* seção *Nigri*, Ochratoxina A, uvas viníferas, microbiota

## ABSTRACT

The viticulture is an important activity in Brazil. Rio Grande do Sul, the southern state of Brazil, responsible for almost 90% of wines production. Different fungal genera are commonly found infecting the berries, mainly *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium* and *Aspergillus*. Grape infection and fungal growth is influenced by different factors, including climatic characteristics of the region, grape varieties, crop type, among others. Among the genus *Aspergillus*, *Aspergillus* section *Nigri* stands out from the others, because its ability to produce ochratoxin A, mycotoxin with nephrotoxic characteristics and classified as a possible carcinogenic to humans. The aim of this study was the mycological characterization of wine grapes of Merlot and Cabernet Sauvignon varieties, cultivated at three wine producer regions of Rio Grande do Sul, collected during two stages of berries maturation. The sampling was conducted at the early ripeness and harvesting from the Campanha, Serra do Sudeste and Serra do Nordeste regions. Eight fungal genera were isolated, highlighting *Alternaria*, which was predominant in all regions, growing stages and varieties. *Aspergillus* section *Nigri* were prevalent in the genus *Aspergillus*, representing 88% of the isolates mainly at Campanha region as well as Cabernet Sauvignon variety. The harvest period proved to be critical for contamination by *Aspergillus* section *Nigri* in C. Sauvignon variety; nevertheless, in Merlot, the greater frequency of these fungi was observed at early ripeness. One *Aspergillus japonicus* isolate was able to produce OTA at a concentration of 148 ng mL<sup>-1</sup>/10<sup>6</sup> conidia. No detectable levels of OTA were found in any grape samples. The characterization of fungal and OTA contamination in grapes cultivated in Rio Grande do Sul is extremely important to ensure the quality of these products and consumers safety.

**Key-words:** *Aspergillus* section *Nigri*, Ochratoxin A, wine grapes, mycobiota

## INTRODUÇÃO

A vitivinicultura é uma atividade muito importante em muitos países. No Brasil a importância dessa atividade vem crescendo a cada ano. O Rio Grande do Sul, estado localizado no extremo sul brasileiro, é o principal produtor, responsável por cerca de 50% das uvas e 90% dos vinhos em todo o país.

A contaminação das uvas com fungos pode acarretar a grandes perdas econômicas, pois estes reduzem tanto a sua produtividade quanto a qualidade das uvas. Os fungos filamentosos podem modificar a composição química das uvas, alterando o sabor, odor e cor do vinho.

Uma grande variedade de gêneros fúngicos pode contribuir para a deterioração das uvas antes do período da colheita, incluindo principalmente *Botrytis*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*. No gênero *Aspergillus*, fungos pertencentes à seção *Nigri* merecem destaque em função da sua alta ocorrência e pela sua capacidade de produzir ocratoxina A.

A ocratoxina A é uma micotoxina com propriedades nefrotóxicas, teratogênicas, imunossupressoras e carcinogênicas para animais e vem sendo classificada como grupo 2B pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, ou seja, possivelmente carcinogênica para humanos. Esta micotoxina também vem sendo apontada como possível causa da Nefropatia Endêmica dos Balcãs e de Anemia por Deficiência de Ferro. A ocratoxina A tem sido detectada em uvas e produtos derivados produzidos em diversos locais no mundo.

A ocorrência dos *Aspergillus* seção *Nigri* em uvas é governado por diversos fatores, incluindo a umidade e temperatura presentes no vinhedo, variedade das uvas cultivadas, uso de fungicidas, etc. A frequência destes fungos tende a aumentar dos estágios iniciais de maturação para a época da colheita.

Os *Aspergillus* seção *Nigri* vem sendo isolados em alta frequência principalmente na Europa, mas também em países sul-americanos como a Argentina, Chile e Brasil. No Brasil, poucos estudos foram realizados analisando a microbiota presente em uvas viníferas.

Este é o primeiro estudo caracterizando a contaminação fúngica e por OTA em uvas viníferas produzidas em diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul. Considerando a importância do estado na comercialização de vinhos nobres, os dados apresentados são de extrema relevância na caracterização da qualidade das uvas e produtos derivados.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar a micobiota e a ocorrência de ocratoxina A em uvas viníferas produzidas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

### **Objetivos Específicos**

- Isolar e identificar a micobiota comum e a potencialmente ocratoxigênica de uvas viníferas.
- Diferenciar a prevalência fúngica nas uvas das variedades Cabernet Sauvignon e Merlot, nos períodos de início da mudança de cor e colheita, produzidas nas três principais regiões vitivinícolas do estado.
- Determinar a capacidade produtora de ocratoxina A das espécies micotoxigênicas isoladas
- Determinar a ocorrência de ocratoxina A nas amostras de uvas viníferas

## CAPÍTULO 1

### 1. Revisão Bibliográfica

#### 1.1 Importância da vitivinicultura no Brasil e no Rio Grande do Sul

A cultura da uva é uma atividade muito importante no Brasil, merecendo destaque no cenário internacional. Nos últimos anos, esta atividade vem ganhando importância também na sustentabilidade da pequena propriedade e na geração de empregos em grandes empreendimentos neste setor (Guerra *et al.*, 2009).

O Brasil ocupa o 19º lugar mundial em relação à produção de uvas e o 17º em relação à área cultivada. No que se refere às transações internacionais, o Brasil foi o 11º colocado em quantidade de uvas exportadas, o 7º em valor das exportações de uvas e o 10º maior exportador de suco de uvas, em quantidade e em valor (FAO, 2011; Mello, 2011). No ano de 2010, foi produzido um total de 1.295.442 toneladas de uvas, sendo que destas, 43% foi destinada à produção de derivados sendo o restante destinado à comercialização do produto “in natura” (IBGE, 2011). Em relação à área plantada e colhida, houve um acréscimo de 1,37 e 2,04%, respectivamente, no ano de 2010 em relação a 2009 e os anos anteriores (Mello, 2010).

As exportações no setor vitivinícola também obtiveram um crescimento em relação ao ano de 2009. No ano de 2010, somaram 148,3 milhões de dólares, ou seja, um acréscimo de 11,95% em relação ao ano de 2009 (FAO, 2011). Embora os números de exportação de vinhos de mesa tenham caído no ano de 2010, os índices de exportação de espumantes aumentaram em 68,42% em quantidade e 284,73% em valor, o que reflete uma valorização da produto brasileiro (Mello, 2010).

O estado do Rio Grande do Sul se destaca dentro do cenário nacional, sendo o principal produtor de uva e produtos derivados, representando 53,5% da produção de uvas e 90% da produção de vinhos e sucos de uva (Mello, 2011). O total em toneladas produzido pelo estado no ano de 2010 foi significativamente maior do que a produção dos outros estados. O Rio Grande do Sul totalizou uma produção de



692.692 toneladas, enquanto o segundo lugar na produção foi São Paulo, com 177.538 toneladas (IBRAVIN 2011). No ano de 2010, o estado produziu um total de 414.365.13 litros de produtos derivados da uva, sendo que destes, 53,6% representam a produção total de vinhos de mesa e vinhos finos.

As principais regiões produtoras de uvas no estado são a Serra do Nordeste (Serra Gaúcha), Serra do Sudeste e Campanha; a primeira delas é considerada a região tradicional de produção vitivinícola e as duas últimas emergentes (Figura 1) (SEPLAG RS, 2009; Tonietto *et al.*, 2009).



Figura 1: Mapa das principais regiões vitivinícolas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil  
Fonte: Academia do Vinho, 2011.

A região da Serra do Nordeste (Serra Gaúcha) está próxima das condições geoclimáticas tradicionalmente consideradas as ideais para a produção de vinhos de qualidade (faixa com latitude entre os paralelos 30° e 50°). A região situa-se entre 400 a 700 metros acima do nível do mar, possui solo areno-argiloso ácido e é caracterizada pela excessiva e elevada frequência de chuvas, sendo classificado como clima temperado úmido, onde a média de precipitação corresponde a aproximadamente 1870 mm anuais (Academia do Vinho, 2011).

A cidade de Bento Gonçalves, responsável por 17,8% da produção do estado, e é onde ocorre anualmente a FENAVINHO (Festa Nacional do Vinho), evento que

atrai tanto o turismo quanto os investimentos nacionais e internacionais, com a finalidade de desenvolver ainda mais esta cultura no estado. Além de Bento Gonçalves, existem ainda cerca de trinta e cinco municípios da cuja produção vinícola é extremamente relevante para o Rio Grande do Sul e para o Brasil, com destaque para os municípios de Caxias do Sul e Garibaldi (Figura 2).



Figura 2: Mapa da Serra do Nordeste do Rio Grande do Sul, com as principais regiões vitivinícolas.

Fonte: Academia do Vinho, 2011

Os vinhedos comerciais estabelecidos na Campanha tiveram início na década de 1980 compreendendo treze municípios, com destaque para os municípios de Santana do Livramento, Bagé e Dom Pedrito (Figura 3) (Tonietto *et al.*, 2009; Academia do Vinho, 2011). As características topográficas da região permitem o estabelecimento de módulos de vinhedos extensos que podem ser amplamente mecanizados. O solo encontrado nesta região é classificado como arenoso com acidez reduzida, e possui boa drenagem da água precipitada, que corresponde a aproximadamente 1370 mm anuais, sendo assim, classificado como clima temperado com verões quentes e secos (Academia do Vinho, 2011).

O cultivo e produção vitivinícola da Serra do Sudeste tiveram igualmente início na década de 1980. Porém, foi nos anos mais recentes que diversos novos

empreendimentos foram estabelecidos na região, cuja topografia também permite a mecanização nos vinhedos. A Serra do Sudeste fica próxima ao extremo sul do Rio Grande do Sul, entre as cidades de Pinheiro Machado e Encruzilhada do Sul (Figura 4), caracterizando-se pela conformação serrana ondulada e altitudes medianas (de 500 a 600m acima do nível do mar). A região apresenta um clima temperado, com precipitação média de 1100 mm anuais e diferentemente das demais regiões produtoras, possui solo granítico (Academia do Vinho, 2011).

Cabe ainda ressaltar que embora a região da Serra do Nordeste seja a maior e mais tradicional produtora do estado, as duas outras regiões emergentes distinguem-se em função das condições climáticas e de solo, o que influencia diretamente nos vinhos produzidos (Tonietto *et al.*, 2009).



Figura 3: Mapa da Serra do Sudeste e Campanha do Rio Grande do Sul, com as principais regiões vitivinícolas.

Fonte: Academia do Vinho, 2011

Diversas variedades de uvas viníferas vêm sendo cultivadas com sucesso no estado, principalmente as variedades Cabernet Sauvignon, Merlot, Tannat, Cabernet Franc, Moscato Branco e Chardonnay, que são cultivadas nas três principais regiões produtoras. As variedades Cabernet Sauvignon e Merlot merecem destaque, sendo destinadas para elas aproximadamente 3,8 e 2,16% de toda a área plantada de videiras no estado (IBRAVIN, 2009). A preferência por estas variedades existe, pois originam vinhos de alta qualidade, além de estarem bem adaptadas às condições

climáticas encontradas no estado e possuem alta aceitação do mercado nacional e internacional.

## **1.2 Contaminação fúngica em uvas**

As uvas são frutas destinadas tanto ao consumo “in natura” até a produção de derivados, como o suco de uva, o vinho, geléias, etc. Assim sendo, a cultura da uva envolve uma grande parte da sociedade, movendo o sistema econômico de diferentes regiões do mundo (Guerra *et al.*, 2009).

Estas frutas podem ser contaminadas por diversos grupos microbianos capazes de se desenvolver em pH ácido, desde bactérias lácticas, leveduras fermentadoras até fungos saprofiticos, fitopatogênicos e toxigênicos em função de seus componentes nutricionais onde se destacam os altos teores de açúcares (de la Torre *et al.*, 1998). A contaminação das bagas por estes micro-organismos implica numa queda generalizada da qualidade; pois além de modificarem a composição química das uvas; as enzimas produzidas por estes micro-organismos alteram as características sensoriais de cor e sabor dos vinhos e podem afetar a fermentação durante o processamento (Fleet, 1999; Fleet, 2001). Muitos fatores intrínsecos e extrínsecos influenciam a ocorrência e o crescimento de micro-organismos nesse fruto, incluindo as condições climáticas, as variedades da uva, o ataque de pássaros e insetos e a ação de agrotóxicos (Pitt & Hocking, 1997).

### **1.2.1 Micobiota comum de uvas viníferas**

A micobiota presente em uvas sadias e uvas injuriadas vêm sendo estudada por diversos pesquisadores na Europa, Américas do Sul e do Norte e Oceania, relatando que na superfície de uvas maduras sadias, a micobiota é formada principalmente por leveduras (Fleet and Heard 1993; Pitt & Hocking, 1997; Fleet *et al.*, 1999; Rosa *et al.*, 2002; Magnoli *et al.*, 2003; Bau *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2006; Belli *et al.*, 2006b; Romancino *et al.*, 2008; Diaz *et al.*, 2009; Nally *et al.*, 2012). Fleet (1999) analisando a ocorrência de micro-organismos em vários alimentos relata que na superfície de uvas sadias o grau de contaminação é, em média, de  $10^3 - 10^5$

Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g). A espécie *Kloeckera apiculata* (teleomorfo *Hanseniaspora uvarum*) é geralmente a espécie dominante, compreendendo de 50-75% dos isolados de uvas na Itália (Zambonelli, 1998; Romancino *et al.*, 2008) e na Austrália (Heard & Fleet, 1985; Fleet & Heard, 1993). Outros gêneros também foram isolados com frequência, destacando-se os fermentadores *Candida* sp., *Saccharomyces* sp., *Kluyveromyces* sp., *Torulaspota* sp. e *Zygosaccharomyces* sp.; gêneros muito utilizados como cultura starter para a fermentação vitícola (Fleet & Heard 1993; Pitt & Hocking, 1997; Garijo *et al.*, 2008; Romancino *et al.*, 2008, Brezna *et al.*, 2010). Alguns destes gêneros são produtores de compostos antifúngicos, inibindo o crescimento de fungos filamentosos na superfície da baga e garantindo a predominância destas leveduras (Nally *et al.*, 2012).

A superfície de uvas injuriadas e principalmente o mosto podem apresentar contaminações de  $10^6$  até  $10^8$  UFC/g, sendo o fungo filamentoso *Botrytis cinera* uma das espécies mais comuns em uvas destinadas à produção de vinho, detectada no período pré-colheita (Coley-Smith *et al.*, 1980; Hocking *et al.*, 2007; Mirzaei *et al.*, 2008; Sawant *et al.*, 2008; Steel & Greer., 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Mikusova *et al.*, 2010). Esta espécie é causadora de diversas doenças da videira, incluindo a podridão cinzenta das bagas e a podridão do ramo da videira e assim como as espécies *Plasmopara viticola* e *Ensinula necator*, causadoras do míldio e oídio, respectivamente. Estas espécies atraem maior atenção dos produtores, em função das impactantes perdas econômicas causadas pela contaminação dos vinhedos (Masih *et al.*, 2001; Nally *et al.*, 2012). Atualmente, com o emprego de fungicidas específicos, as três espécies têm sido bem controladas pelos produtores, fato que deixa o nicho ecológico disponível para o desenvolvimento de outros micro-organismos não tão afetados por estes tratamentos químicos: fungos filamentosos saprotróficos oportunistas (Serra *et al.*, 2005; Nally *et al.*, 2012).

Os fungos saprotróficos são representados principalmente pelos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* (Magnoli *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2005; Diguta *et al.*, 2011). Os isolados pertencentes ao gênero *Alternaria* ocorrem com muita frequência em diversos trabalhos que analisaram a microbiota comum de uvas para vinho e de mesa (Magnoli *et al.*, 2003;

Medina *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2005). Medina *et al.* (2005) analisando a microbiota de uvas espanholas relataram que pode ser observada uma contaminação de até  $10^3$  UFC/g de representantes pertencentes ao gênero *Alternaria* sp., fungos que foram predominantes em relação aos demais isolados. Magnoli *et al.* (2005) em trabalho semelhante desenvolvido na Argentina também relatou a predominância de fungos deste gênero, ocorrendo em até 80% das bagas infectadas. Serra *et al.* (2005) também analisando a biota de uvas em Portugal, destacaram a predominância de fungos desse gênero, inclusive sobre as espécies fitopatogênicas que, tradicionalmente, contaminam as videiras, com destaque para a espécie *Alternaria alternata*.

Outro gênero de fungo saprofítico importante é *Cladosporium*, porém, há divergências sobre sua ocorrência, tendo sido relatado tão frequente quanto o gênero *Alternaria* (Serra *et al.*, 2005, Briceño & Latorre, 2008; Sawant *et al.*, 2008) ou com uma incidência significativamente mais baixa (Magnoli *et al.*, 2003; Tournas & Katsoudas, 2005; Diguta *et al.*, 2011).

O gênero *Trichoderma* também é relatado com frequência, porém não com incidência tão alta quanto os gêneros citados anteriormente (Sage *et al.*, 2002; Serra *et al.*, 2005; Mikusova *et al.*, 2011). Juntamente com *Alternaria* sp. e *Cladosporium* sp., considerados fungos de campo, sua frequência tende a diminuir conforme a aproximação da época de colheita (Serra *et al.*, 2005).

As espécies pertencentes ao gênero *Penicillium*, fungos que aparentemente não incidem com muita frequência nas bagas antes do período de colheita, sendo entretanto, muito comuns durante o armazenamento destas frutas (Tournas & Stack, 2001; Magnoli *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2005; Tournas & Katsoudas, 2005). Embora Diguta *et al.* (2011) analisando a microbiota de uvas francesas, tenham encontrado altíssima incidência do gênero, a grande parte de outros trabalhos realizados na Europa (Medina *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2005; Brezna *et al.*, 2011) e na América do Norte (Tournas & Katsoudas, 2005) e do Sul (Magnoli *et al.*, 2005), não reportaram a ocorrência de espécies deste gênero com altas taxas de prevalência. Assim como o gênero *Penicillium*, o gênero *Rhizopus* é um importante contaminante no período pós-colheita sendo pouco relatado

causando moléstias e danos no período pré-colheita (Pitt & Hocking, 1997; Medina *et al.*, 2005; Sawant *et al.*, 2008; Camargo *et al.*, 2011).

O gênero *Aspergillus* vem sendo o grupo fúngico contaminante de uvas destinadas ao consumo direto e a produção de derivados mais estudado em diversos países. Além de ser um gênero com alta prevalência em vinhedos cultivados nos mais diferentes ambientes e condições climáticas, o gênero possui representantes potencialmente produtores de diversas micotoxinas de grande importância econômica e de saúde pública.

### **1.2.2 Micobiota potencialmente toxigênica**

Além da deterioração, os fungos podem produzir compostos secundários que acabam sendo transferidos para os alimentos. As micotoxinas são um exemplo destes compostos secundários, que possuem estrutura química diversificada e possuem propriedades tóxicas para animais e seres humanos (Taniwaki & Silva, 2001). A ocorrência destes fungos potencialmente produtores de micotoxinas é ainda mais séria em relação aos fungos deteriorantes, pois coloca em risco a saúde dos consumidores dos alimentos contaminados (Pitt & Hocking, 1997).

#### **1.2.2.1 *Aspergillus* sp.: Ocorrência**

O gênero *Aspergillus* se destaca no contexto vitivinícola devido à contaminação por espécies pertencentes ao grupo dos negros, sendo algumas potencialmente produtoras da micotoxina ocratoxina A (OTA) (Pitt & Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2007). Os fungos pertencentes a este grupo possuem como principal característica morfológica os esporos de coloração negra, que dão nome ao grupo; que é um dos mais difíceis em relação à taxonomia. Essa dificuldade de identificação através dos métodos tradicionais de taxonomia ocorre, pois espécies comprovadamente distintas possuem características morfológicas muito semelhantes, como a seriação da vesícula, tamanho e textura de conídios e crescimento em diferentes meios de cultura (Samson *et al.*, 2007). O desenvolvimento de fungos deste grupo no interior da uva ocorre mais

frequentemente quando há uma contaminação primária por outro patógeno, diminuindo os mecanismos de resistência da planta ou quando o fruto está injuriado por alguma causa física ou fisiológica (Bau *et al.*, 2005).

Inicialmente, os fungos *Penicillium verrucosum* e *Aspergillus ochraceus* foram responsabilizados pela ocorrência de OTA em uvas e conseqüentemente em vinhos e outros produtos derivados. Porém, após diversos trabalhos relatando a baixa frequência ou até a inexistência dessas duas espécies, outros grupos fúngicos foram buscados, com o intuito de justificar a presença desta micotoxina nas uvas, chegando finalmente no grupo dos *Aspergillus* seção *Nigri*, também conhecidos como *Aspergillus* negros (Pitt & Hocking, 1997; Codex Alimentarius Commission, 1999; Bau *et al.*, 2005).

As principais espécies pertencentes a este grupo de relevância em relação às uvas são os unisseriados *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus aculeatus* e os bisseriados *Aspergillus niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. awamori* e *A. carbonarius* (Pitt, 2000; Abarca *et al.*, 2001; Rosa *et al.*, 2002). Embora exista uma dificuldade muito grande em relação à taxonomia destas espécies, alguns pesquisadores analisaram diferenças moleculares entre estas espécies de *Aspergillus* produtoras de OTA, através de sequenciamento das regiões ITS e IGS do genoma destes micro-organismos (Zanzotto *et al.*, 2006; Martínez-Culebras *et al.*, 2009). Nestes trabalhos, foram caracterizados três diferentes grupos de espécies, o agregado *Aspergillus japonicus*, o agregado *Aspergillus niger* e o agregado *Aspergillus carbonarius* (Figura 4) (Abarca *et al.*, 2004; Zanzotto *et al.*, 2006; Martínez-Culebras *et al.*, 2009). Frequentemente, porém, as espécies *Aspergillus awamori*, *A. foetidus* e *A. niger* (Agregado *A. niger*) são classificadas como a mesma espécie, subdivididas em variedades diferentes (Klich, 2002; Abarca *et al.*, 2004; Zanzotto *et al.*, 2006; Perrone *et al.*, 2011).



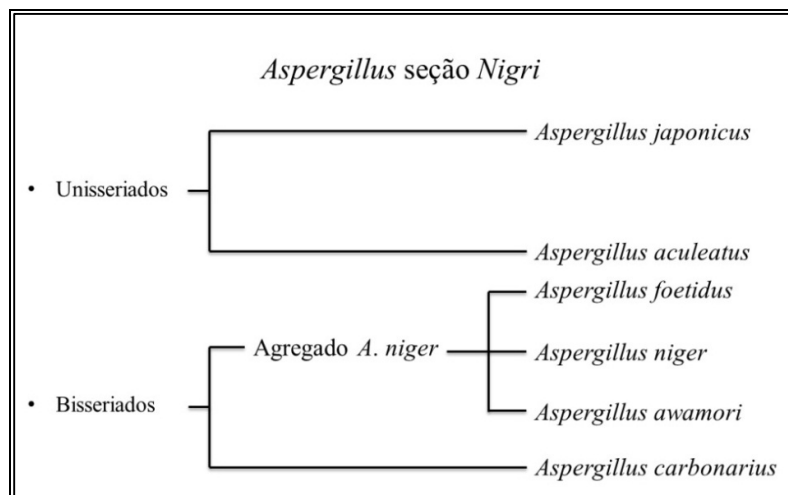


Figura 4: Classificação dos *Aspergillus* seção *Nigri* de importância vitivinícola

Diversos trabalhos têm relatado a ocorrência desta microbiota potencialmente produtora de OTA em uvas, sendo a maioria dos trabalhos realizados em países da União Europeia (Tabela 1), onde há uma maior preocupação com esta contaminação devido à exigente legislação que existe desde 2006 (European Commission, 2006).

**Tabela 1:** Análise da microbiota de uvas em diferentes países.

| Autores                 | Ano da publicação | País                      |
|-------------------------|-------------------|---------------------------|
| Bau <i>et al.</i>       | 2005              | Espanha                   |
| Battilani <i>et al.</i> | 2003              | Itália                    |
| Belli <i>et al.</i>     | 2006              | Espanha                   |
| Bejaoui <i>et al.</i>   | 2006              | França                    |
| Chulze <i>et al.</i>    | 2006              | Argentina                 |
| Chiotta <i>et al.</i>   | 2011              | Argentina, Brasil e Chile |
| Díaz <i>et al.</i>      | 2009              | Chile                     |
| Guzev <i>et al.</i>     | 2006              | Israel                    |
| Lasram <i>et al.</i>    | 2007 e 2012       | Tunísia                   |
| Leong <i>et al.</i>     | 2007              | Austrália                 |
| Magnoli <i>et al.</i>   | 2003              | Argentina                 |
| Fredj <i>et al.</i>     | 2009              | Tunísia                   |
| Khoury <i>et al.</i>    | 2006              | Líbano                    |
| Rosa <i>et al.</i>      | 2002              | Argentina e Brasil        |
| Serra <i>et al.</i>     | 2007              | Portugal                  |
| Selouane <i>et al.</i>  | 2009              | Marrocos                  |
| Tassou <i>et al.</i>    | 2007              | Grécia                    |
| Varga <i>et al.</i>     | 2006 e 2007       | Hungria e Rep. Tcheca     |

Na maioria dos trabalhos observa-se o mesmo padrão: uma predominância na frequência de isolados pertencentes ao agregado *Aspergillus niger* e maior produção de OTA por *Aspergillus carbonarius* em relação às demais espécies do grupo dos *Aspergillus* seção *Nigri* (Tabela 2). Assim sendo, estes fungos são responsabilizados pela alta contaminação por OTA em uvas e derivados (Pitt *et al.*, 2000; Abarca *et al.*, 2001, Dalcero *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2002; Magnoli *et al.*, 2003; Bau *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2005; Belli *et al.*, 2006; Bejaoui *et al.*, 2006; Chulze *et al.*, 2006).

No Brasil apenas um trabalho foi publicado relatando a microbiota potencialmente toxigênica (Rosa *et al.*, 2002). Nesta publicação, os autores encontraram resultados muito semelhantes aos encontrados nas demais publicações: elevada frequência de fungos do agregado *A. niger*, que foram responsabilizados pela ocorrência de OTA neste caso.

**Tabela 2:** Percentual dos isolados de *Aspergillus* seção *Nigri* encontrados em trabalhos realizados em diferentes países

| Citação                        | País      | A. negros unisseriados | Agregado <i>A. niger</i> | <i>A. carbonarius</i> |
|--------------------------------|-----------|------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Bau <i>et al.</i> (2005)       | Espanha   | < 1% **                | 16% **                   | 3,6% **               |
| Battilani <i>et al.</i> (2003) | Itália    | 23%                    | 58%                      | 19%                   |
| Bejaoui <i>et al.</i> (2005)   | França    | 7%                     | 46%                      | 36%                   |
| Chiotta <i>et al.</i> (2009)   | Argentina | 8%                     | 81%                      | 11%                   |
| Diaz <i>et al.</i> (2009)      | Chile     | < 1% *                 | 50% *                    | 14% *                 |
| Lasram <i>et al.</i> (2007)    | Tunísia   | < 1% *                 | 63% *                    | 36% *                 |
| Rosa <i>et al.</i> (2002)      | Brasil    | 0% *                   | 56% *                    | 8,5% *                |

\* Resultados em relação aos fungos do gênero *Aspergillus* isolados

\*\* Resultados em relação a todos os fungos filamentosos isolados

A grande importância da espécie *Aspergillus carbonarius* está relacionada não apenas a sua baixa ocorrência em relação ao agregado *A. niger*, mas sim pela sua alta capacidade de produzir OTA (Bellí *et al.*, 2005; Bejaoui *et al.*, 2006). Abarca *et al.* (2003) analisando a microbiota ocratoxigênica em uvas secas na Espanha, mostraram que 98% das amostras estavam contaminadas por cepas pertencentes ao agregado *Aspergillus niger* e 58% contaminadas com *Aspergillus carbonarius*. Os

autores mostraram também que 96,7% dos *A. carbonarius* isolados foram produtores de OTA, e apenas 0,6% dos *A. niger* mostraram a mesma capacidade.

Os resultados apresentados por diversos autores sugerem que ambas as espécies são potencialmente a maior fonte de ocratoxina A em uvas, não apenas pelo caráter toxigênico intrínseco, mas também pela sua agressividade (Bau *et al.*, 2005). Assim sendo, os fungos pertencentes ao agregado *A. niger* destacam-se pela sua alta ocorrência e os *Aspergillus carbonarius* destacam-se pela sua grande capacidade produtora de OTA (Battilani *et al.*, 2003; Bau *et al.*, 2005; Bejaoui *et al.*, 2006; Chiotta *et al.*, 2009)

### **1.2.2.2 *Aspergillus* sp: fatores que favorecem o desenvolvimento**

Estudos foram desenvolvidos com o objetivo de avaliar em qual estágio do processo de cultivo da uva acontecia a contaminação por estes fungos. Primeiramente, a sua ocorrência foi relacionada ao estágio de pós-colheita (Pitt & Hocking, 1997), Battilani *et al.* (2000, 2001), entretanto, encontraram uma maior contaminação por espécies do gênero *Aspergillus* (aproximadamente 95%, de onde 50% eram de *Aspergillus* negros) nos estágios de amadurecimento e de mudança de cor da uva (*veraison*), que antecede o período da colheita. Da mesma forma, Bau *et al.* (2005), Cozzi *et al.*, (2007), Lasram *et al.* (2007) e Visconti *et al.*, (2008) mostraram que a contaminação pelos *Aspergillus* negros aumenta a cada período de desenvolvimento do fruto, sendo baixa no período de formação e aumentando consideravelmente nos períodos de mudança de cor e maturação da uva, onde atinge o seu pico máximo de ocorrência. Os mesmos autores também mostraram que a contaminação ocorre em altos índices após a colheita, nos períodos de estocagem e comercialização. Atribui-se a esta grande incidência em regiões tropicais e temperadas, provavelmente por causa da coloração negra dos esporos fúngicos, que agem como um filtro, proporcionando uma proteção da luz do sol e da luz ultravioleta, gerando uma vantagem competitiva em relação a outras espécies e gêneros em locais quentes (Pitt & Hocking, 1997).

Segundo Battilani *et al.*, (2006) e Visconti *et al.*, (2008) diversos fatores extrínsecos afetam a ocorrência destes fungos nos vinhedos e a sua condição de

produzir OTA. Os autores ressaltam que, além das características climáticas do ambiente, como umidade, precipitação e temperatura, alguns fatores como a posição geográfica (latitude e longitude) do vinhedo, a variedade das uvas cultivadas e o tipo de cultivo (horizontal ou vertical) podem afetar a ocorrência destes contaminantes. A irrigação excessiva, assim como um alto índice pluviométrico provocam um aumento da frequência de rachadura da baga, principalmente durante o período perto da colheita da uva, que propicia uma porta de entrada para estes micro-organismos oportunistas, aumentando a severidade da contaminação (Leong *et al.* 2006; Cozzi *et al.* 2007; Visconti *et al.*, 2008).

Cozzi *et al.* (2007) demonstraram ao comparar a ocorrência de *Aspergillus carbonarius* em três diferentes temporadas, que a frequência destes fungos aumenta quando há maior umidade e precipitação associadas a temperaturas mais altas no período de amadurecimento/colheita das uvas. Battilani *et al.*, (2006) também encontraram uma correlação positiva entre a incidência destes fungos em relação à mudança geográfica. Os autores sugerem que existe uma maior ocorrência destas espécies com a proximidade da linha do equador, provavelmente em função do aumento da temperatura e umidade.

Em relação ao tipo de cultivo, Cozzi *et al.*, (2007) também relataram em seu estudo que em cultivos verticais, a proximidade dos cachos e das bagas com o solo aumenta a incidência fúngica em relação às plantas cultivadas de maneira horizontal, onde as bagas ficam com uma distância maior em relação ao solo.

A variedade de uva cultivada também interfere na micobiota presente nas bagas. Diversos trabalhos compararam a presença de fungos ocratoxigênicos nas uvas de diferentes variedades e constataram que é frequente a maior contaminação por estes fungos nas variedades tintas em relação às brancas, sendo a variedade Cabernet Sauvignon a mais susceptível tanto à contaminação por fungos do grupo dos *Aspergillus* negros quanto em relação à produção e ocorrência de OTA (Battilani *et al.*, 2004; Lasram *et al.*, 2007; Cozzi *et al.*, 2007; Visconti *et al.*, 2008; Diaz *et al.*, 2009).

Embora a ocorrência dos *Aspergillus* seção *Nigri* e a predominância de fungos do agregado *A. niger* seja evidente, os níveis de contaminação fúngica e OTA em

uvas e produtos derivados pode variar consideravelmente, dependendo dos diferentes fatores que influenciam todo o processo de cultivo deste produto.

### **1.3 Ocratoxina A**

#### **1.3.1 Ocratoxina A: Características físico-químicas e toxicidade**

A Ocratoxina A (OTA) vem ganhando atenção nos dias atuais, em função da sua frequente ocorrência em diferentes produtos alimentícios e do seu aspecto toxicológico relevante. A presença desta micotoxina já foi relatada em alimentos como café, cacau, cerveja, entre outros (Levi *et al.*, 1974; Zimmerli & Dick, 1996 ; Legarda & Burdaspal, 1998; Mateo *et al.*, 2007; Brera *et al.*, 2011; Imperato *et al.*, 2011; Teixeira *et al.*, 2011). O primeiro relato desta micotoxina ocorreu em 1965 na África do Sul, como um metabólito secundário produzido pelo fungo *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965).

A OTA é o composto mais tóxico dentro da família das ocratoxinas e, em função disso, a mais estudada. Possui uma fórmula química complexa: L-phenylalanine-N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl)carbonyl]-(R)-isocoumarin (Figura 5), e peso molecular correspondente a 403,82 (Ringot *et al.*, 2006). Esta micotoxina é altamente solúvel em solventes orgânicos polares e medianamente solúvel em água e, por isso, rapidamente absorvida pelo estômago e intestino (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). Apresenta uma ponto de fusão de 90 °C e 171°C quando recristalizada em benzeno e xileno, respectivamente (Duarte *et al.*, 2010). Ainda exibe absorção ultravioleta no comprimento de onda de 333 nm e possui capacidade fluorescente, com o pico máximo de fluorescência em 428 nm diluída em etanol absoluto (Ringot *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2010).

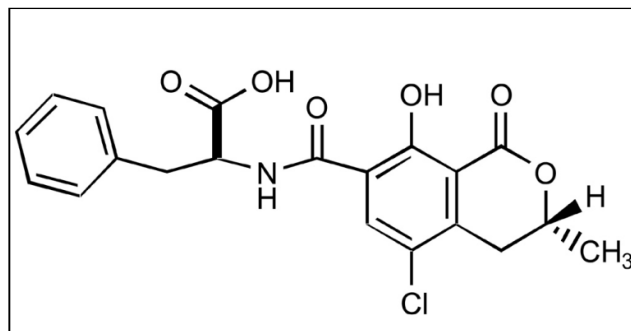


Figura 5: Estrutura química da OTA  
Fonte: Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007

A ocratoxina A possui propriedades nefrotóxicas, hepatotóxicas, genotóxicas, teratogênicas e imunossupressoras em animais e demonstrou possuir características carcinogênicas em animais de laboratório (Castegnaro *et al.*, 1998; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1998; Mateo *et al.*, 2007). Ainda demonstrou causar hemorragias, congestão, aumento de tamanho e mudança de cor renal e hepática em animais (Duarte *et al.*, 2011) Em função destas propriedades observadas e comprovadas em animais, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou a ocratoxina A como grupo 2B, ou seja, possivelmente carcinogênica para humanos (IARC, 1993). Essa micotoxina ainda é relacionada com a Nefropatia Endêmica dos Balcãs, doença renal degenerativa restrita à região dos Balcãs e que seria provocada pela alta e contínua ingestão de OTA através dos alimentos. Além disso, está relacionada com a indução da formação de tumores no trato urinário de humanos (Bacha *et al.*, 1993; Nikolov *et al.*, 1996; Radic *et al.*, 1997; Varga & Kozakiewicz, 2006; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007).

Considerando a sua toxicidade bem definida, o JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) recomenda a Dose Semanal Tolerável Provisória (sigla em inglês, PTWI) de 100 ng/kg peso corpóreo (p.c.). O Comitê Científico Europeu de Alimentos por sua vez, recomenda uma ingestão diária tolerável (sigla em inglês, TDI) abaixo da definida pelo JECFA, de 5 ng/kg p.c., (European Commission, 1998; JECFA, 2001). Mais recentemente, o Painel de Contaminantes da Cadeia Alimentar da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (CONTAM – EFSA) definiu a Dose Semanal Tolerável de 120 ng/kg p.c. (EFSA, 2006). Uma análise de exposição à OTA através da dieta por adultos na

Europa foi realizada e revelou que mesmo nos consumidores de produtos de risco, os níveis de exposição variaram entre 15 – 60 ng/ kg p.c., valor abaixo da TWI (Mateo *et al.*, 2007).

Além da perspectiva toxicológica e de saúde, a exposição à OTA pode gerar barreiras econômicas em relação à agropecuária, com destaque para a comercialização de vinhos (Duarte *et al.*, 2010).

### **1.3.2 Ocratoxina A: Legislação**

Com o intuito de garantir a segurança da população consumidora de uvas e derivados, vários países fixaram concentrações máximas permitidas em diversos gêneros alimentícios.

As autoridades da comunidade Europeia, fixaram o limite máximo permitido de OTA para vinhos e sucos de uva (incluindo concentrados e néctar de uvas) em 2 µg/Kg e 10 µg/Kg para uvas passas e sultanas (European Commission, 2006). Os produtos importados também devem seguir esta legislação e caso não estejam de acordo com as normas fixadas pela União, os produtos serão bloqueados para o comércio na Europa (Duarte *et al.*, 2010).

No Brasil, até 2011 não existiam limites máximos para OTA em alimentos. A RDC nº7/2011, fixou um limite similar ao encontrado na Europa: 2 µg OTA/ kg para vinhos e seus derivados, sucos, polpa de uva e 10 µg/kg para frutas secas e desidratadas (BRASIL, 2011).

Nos outros países sul-americanos não existe legislação semelhante, então os produtos a serem exportados devem adequar-se às legislações dos países de destino, a fim de que o produto obtenha a liberação para entrada e venda (Duarte *et al.*, 2010; Micotoxinas, 2011; Codex Alimentarius, 2011).

### **1.3.3 Ocratoxina A em uvas e derivados**

O primeiro relato da ocorrência de OTA em produtos derivados de uvas (vinhos de mesa e sucos de uva) foi feita por Zimmerli & Dick (1996). A partir deste

primeiro relato, a ocorrência desta micotoxina foi observada em diversos países, principalmente na Europa (Tabela 3).

**Tabela 3:** Níveis máximos de OTA em uvas e vinhos analisados em diferentes países

| Citação                        | País               | OTA em uvas | OTA em vinhos |
|--------------------------------|--------------------|-------------|---------------|
| Battilani <i>et al.</i> (2006) | Itália             | 1,3 ng/g    | -             |
| Belli <i>et al.</i> (2004)     | Espanha            | 0,18 ng/ mL | 0,30 ng/ mL   |
| Chiotta <i>et al.</i> (2010)   | Argentina          | 140 ng/ g   | -             |
| Chulze <i>et al.</i> (2006)    | Argentina e Brasil | -           | 38 ng/ L      |
| Flajs <i>et al.</i> (2009)     | Croácia            | 50 ng/ L    | 21 ng/ L      |
| Guzev <i>et al.</i> (2006)     | Israel             | 0,72 ng/ mL | -             |
| Hocking <i>et al.</i> (2003)   | Austrália          | -           | 0,62 ng/ mL   |
| Khoury <i>et al.</i> (2006)    | Líbano             | 0,221 µg/ L | 0,126 ng/ mL  |
| Lasram <i>et al.</i> (2012)    | Tunísia            | 5,85 µg/ L  | -             |
| Meletis <i>et al.</i> (2007)   | Grécia             | 2,69 ng/g   | -             |
| Ng <i>et al.</i> (2004)        | Canadá e EUA       | -           | 163 pg/ ml    |
| Ponesone <i>et al.</i> (2010)  | Argentina          | 0,12 ng/mL  | 0,37 ng/mL    |
| Sage <i>et al.</i> (2002)      | França             | 461 ng/L    | -             |
| Serra <i>et al.</i> (2006)     | Portugal           | 149 ng/Kg   | -             |
| Shephard <i>et al.</i> (2003)  | África do Sul      | -           | 0,24 µg/ L    |
| Shundo <i>et al.</i> (2006)    | Brasil             | -           | 1,33 ng/mL    |
| Varga <i>et al.</i> (2006)     | Hungria            | 6,2 ng/ g   | -             |

\* Resultados em relação aos fungos do gênero *Aspergillus* isolados

\*\* Resultados em relação a todos os fungos filamentosos isolados

Adaptado pelo autor

A maioria dos trabalhos realizados na Europa apresentam concentrações semelhantes de OTA nos produtos; porém, um aumento dessa concentração é observado em regiões mais ao sul da Europa. Esse aumento da concentração de OTA ocorre possivelmente em função do clima com temperaturas mais altas em relação aos países e regiões do norte, facilitando a ocorrência, infecção e desenvolvimento fúngico nas bagas e a produção de OTA nestes produtos (Otteneder & Majerus, 2000; Varga & Kozakiewicz, 2006).

Domijan & Peraica (2005), ao analisar amostras de vinho na Croácia, relataram que a maioria das amostras produzidas com uvas cultivadas no sul da Croácia eram OTA positivas, enquanto as amostras produzidas no norte croata eram OTA negativas, comprovando que a região e as condições ambientais



desempenham um papel crucial na contaminação das bagas com fungos produtores e conseqüentemente com a OTA.

Níveis de contaminação de até 15 µg/L de OTA em vinho tinto foram relatados no sul Europeu, tendo em vista que a contaminação em vinhos tintos é mais frequente e geralmente em concentrações maiores em relação aos vinhos rose (6,32 µg/l) e brancos (8,86 µg/l) produzidos na mesma região (Otteneder & Majerus, 2000; Miraglia & Brera, 2002). A contaminação por fungos e as concentrações de OTA encontrados nas uvas tintas, brancas e rose são muito semelhantes. Assim sendo, é sugerido que ocorre uma maior redução desta micotoxina em vinhos rose e branco em função dos diferentes tipos de processamento para a produção destes vinhos em relação ao vinho tinto (Majerus, Bresch, & Otteneder, 2000; Varga & Kozakiewicz, 2006).

Na Alemanha, foram relatadas concentrações de até 7 µg/L de OTA em vinhos importados da França (Majerus & Otteneder, 1996; Majerus *et al.*, 2000). Na Grécia, Chipre e Turquia, foi detectada a presença da micotoxina em 66, 50 e 100% das amostras de vinhos, respectivamente (Markaki *et al.*, 2001; Soufleros *et al.*, 2003; Stefanaki *et al.*, 2003; Ioannou-Kakouri *et al.*, 2004; Anli *et al.*, 2005). Ratola *et al.*, (2004) ao analisar 340 vinhos comercializados e produzidos em Portugal, relatou uma incidência desta micotoxina em 20,3% das amostras testadas, com concentrações até 2,1 µg/L de OTA.

Embora a maioria dos trabalhos buscando determinar a ocorrência de OTA em vinhos tenha sido realizado na Europa, outros trabalhos relevantes foram executados em outros continentes. Siantar *et al.*, (2003) relataram a presença desta micotoxina em 84 amostras de vinhos americanos, e destas, 15 amostras apresentaram contaminações a até 1µg/L de OTA. Soleas *et al.* (2001) relataram que de 942 amostras Canadenses, 16,6% das amostras de vinho tinto e 3,9% de vinho branco apresentavam concentrações detectáveis desta micotoxina.

Na América do Sul foram encontradas concentrações de OTA muito reduzidas em relação às encontradas na Europa, assim como o número de amostras positivas. Ponsone *et al.*, (2010) ao analisarem vinhos produzidos em diferentes províncias argentinas, relataram que apenas 10% das amostras estavam contaminadas, e com concentrações menores que 0,16 ng/mL. Magnoli *et al.* (2004), ao analisar vinhos

brancos argentinos, encontraram concentrações até 7,5 ng/L de OTA. Chulze et al. (2006) ainda relatam que no Uruguai não foi encontrada a presença de OTA em uvas das variedades Tanat e Cabernet Sauvignon, esta última sendo conhecida como a variedade mais susceptível à contaminação de fungos ocratoxigênicos e consequentemente ocratoxina A.

Esta ocorrência consideravelmente mais baixa pode ser explicada pela região onde as uvas e os vinhos são produzidos, que está localizada em locais com temperaturas mais baixas em relação aos países do sul europeu, o que implica numa menor contaminação por fungos e por OTA.

A contaminação de OTA em mosto e uvas secas quando ocorre, geralmente é muito maior em relação aos vinhos e aos sucos de uva, com níveis chegando a até 50-70 µg/kg em alguns trabalhos (Miraglia & Brera, 2002; Varga & Kozakiewicz, 2006). Esta elevada contaminação ocorre, pois além de o mosto ser mais concentrado em relação aos vinhos, ainda não foram submetidos às várias etapas de fermentação, processamento o qual reduz consideravelmente os níveis de OTA presentes (Miraglia & Brera, 2002; Varga & Kozakiewicz, 2006).

Larcher & Nicolini (2001) analisaram presença de OTA em mosto concentrado de uvas viníferas e relataram que 100% das amostras estavam contaminadas, com concentrações variando entre 0,06 µg/L e 6,18 µg/L. Burdaspal & Legarda (1999), também relataram a ocorrência dessa micotoxina em 100% das amostras realizadas, porém, em concentrações inferiores (variando entre 0.015–0.102 µg/L de OTA).

Em contrapartida, Belli *et al.* (2004) relataram que foi encontrada a presença de OTA em apenas 10% das amostras de uvas analisadas na Espanha, em concentrações entre 0,08 – 0,18 µg/L. Khoury *et al.* (2006; 2008) relataram a baixa incidência de OTA em uvas libanesas na safra de 2004 e a ausência total desta micotoxina na safra de 2005. Neste contexto, estes resultados comprovam que a ocorrência e a concentração desta micotoxina podem variar drasticamente em uvas cultivadas em condições climáticas e geográficas diferentes.

Estes resultados estão de acordo com pesquisas realizadas na América do Sul. Ponsone *et al.* (2010) analisando mosto de uva e vinhos argentinos, relataram a baixa incidência de *Aspergillus carbonarius* e conseqüentemente uma baixa concentração de OTA (até 0,12 ng/mL).

### 1.3.4 Ocratoxina A em uvas e derivados no Brasil

No Brasil existem poucos trabalhos relatando a ocorrência de OTA nos vinhos e uvas destinadas a vinificação em relação à Argentina e à Europa. Porém, a presença desta micotoxina nos produtos sempre foi uma preocupação em função da exportação principalmente para países europeus, os quais possuem legislação rígida em relação a ocorrência e concentrações nos vinhos (European Commission, 2006). A detecção desta micotoxina em vinhos nacionais gera barreiras econômicas de grande impacto, fazendo com que a entrada dos produtos contaminados seja barrada, evitando o consumo pela sociedade europeia.

No Brasil, o primeiro trabalho apontando a ocorrência de OTA em vinhos e sucos foi realizado por Rosa *et al.* (2004). Neste trabalho, os autores relataram a ocorrência desta micotoxina em 28,75% dos vinhos analisados, com uma baixa concentração média (34,4 ng/L). No mesmo trabalho, ao analisarem sucos e polpa de uva, 25% das amostras apresentaram presença de OTA com uma de concentração média também baixa (37 ng/L e máximo de 100 ng/L). Os autores ressaltaram que, assim como nos diversos trabalhos já publicados, as maiores concentrações foram encontradas em vinhos tintos.

Chulze *et al.* (2006) também analisaram sucos e polpa de uva e vinhos produzidos nos países sul-americanos Argentina, Brasil e Chile. Os autores relataram a incidência de OTA em 29%, 12,5% e 24% das amostras de suco de uva, polpa de uva e vinhos produzidos no Brasil, respectivamente, com uma concentração média desta micotoxina de 38 ng/L, 28,3 ng/L e 33,1 ng/L nestes produtos, respectivamente.

Em 2006, Shundo *et al.* também analisaram a ocorrência de OTA em vinhos e sucos de uva brasileiros. Os autores relataram a ocorrência desta micotoxina em 42,9% das amostras de sucos de uva e em 31% das amostras de vinhos brasileiros. Ainda foi relatado que nas amostras de vinho, as concentrações encontradas variaram entre 0,10 – 0,24 ng/mL.

Mais recentemente, Teixeira *et al.*, (2011) analisaram 176 amostras de vinhos produzidos na região sul do país (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná).

Neste trabalho foram encontradas 5 amostras positivas para a presença de OTA, com concentrações até 0,8 µg/L. Esta baixa incidência provavelmente é relacionada com a posição geográfica dos estados e conseqüentemente as condições climáticas, bem diferentes das condições dos estados do sudeste e norte do país.

Raros são os trabalhos analisando a ocorrência de ocratoxina A no Brasil, especialmente se comparado a outras regiões vinícolas do mundo. Considerando que tanto a produção quanto a exportação de uvas e derivados tem aumentado em anos recentes, torna-se importante o conhecimento mais profundo sobre a ocorrência de fungos e micotoxinas nestes produtos, assim como as situações predisponentes.

## CAPÍTULO 2

**Artigo:** Mycotoxicological characterization of wine grapes from Rio Grande do Sul, Brazil.

**Submetido ao periódico:** International Journal of Food Microbiology

## **Mycotoxicological characterization of wine grapes from Rio Grande do Sul, Brazil.**

**Einloft, T.C.<sup>1</sup>; Hoeltz, M.<sup>1</sup>; Teixeira, T.R.<sup>1</sup>; Oldoni, V.P.<sup>1</sup>; Manfroi, V.<sup>1</sup>; Noll, I.B.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, 91501970, Porto Alegre, Brazil.

### **Abstract**

To evaluate the fungal and ochratoxin A (OTA) contamination in wine grapes of two varieties cultivated in southern Brazil, a survey was conducted in three regions with different climates. From each region samples were obtained at early ripeness and at harvest stage. Eight genera were isolated, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Aspergillus* and *Nigrospora* were the most frequent. The black aspergilli were predominant within the *Aspergillus* genus (88%). Four black aspergilli were identified: *A. japonicus*, *A. niger*, *A. awamori* and *A. foetidus*. The vineyards with low rainfall exhibited the highest genera and *Aspergillus* section *Nigri* occurrence. One strain of *A. japonicus* was able to produce OTA in range of 148 ng mL<sup>-1</sup>/ 10<sup>6</sup> conidia. No detectable levels of OTA were found in the grape samples. Low incidence of *Aspergillus* section *Nigri* and the absence of OTA can be explained by the meteorological conditions at the analyzed regions and by the absence of *A. carbonarius*, considered the main OTA producer in this substrate. The occurrence of an *A. japonicus* with the ability to produce OTA suggests that this species may contribute to OTA contamination in grapes. This study is extremely relevant to characterize fungal and mycotoxin contamination in wine grapes from southern Brazil.

**Keywords:** *Aspergillus* section *Nigri*, wine grapes, Ochratoxin A, mycobiota

### **1. Introduction**

The viticulture is an important activity in many countries. In Brazil the economic importance of this activity is becoming increased every year. Rio Grande

do Sul, the southern state of Brazil, is the main producer, responsible for almost 90% of the wines in the country (Mello, 2010).

Contamination of grapes with moulds can generate significant economic losses, reducing its productivity and the quality. Fungi may change grapes chemical composition altering wine flavor and color (Fleet, 1999; Fleet, 2001; Magnoli *et al.*, 2003).

A variety of fungal genera can contribute to the grape spoilage before harvest, including mainly *Botrytis*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium* (Magnoli *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2005; Belli *et al.*, 2006). *Aspergillus* section *Nigri* can be highlighted in due to its high frequency as a grape spoiler and also to have the ability to produce ochratoxin A (OTA) (Abarca *et al.*, 1994; Codex Alimentarius, 1999; Rosa *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2005, Belli *et al.*, 2006).

OTA is a mycotoxin with nephrotoxic, teratogenic, immunosuppressive and carcinogenic properties (Bondy & Armstrong, 1998; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1998; Creppy, 1999; Mateo *et al.*, 2007) and it has been classified in group 2B by the International Agency for Research on Cancer as a possible human carcinogen (IARC, 1993). It is also associated with Balkan Endemic Nephropathy and iron deficiency anemia (Smith *et al.*, 1994; Abouzied *et al.*, 2002). This mycotoxin has been detected in grape must and wine worldwide produced (Rosa *et al.*, 2004; Hocking *et al.*, 2003; Shephard *et al.*, 2003; Belli *et al.*, 2004; Ng *et al.*, 2004; Chulze *et al.*, 2005; Battilani *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2011).

The occurrence of *Aspergillus* section *Nigri* in grapes is ruled by many factors, including the vineyard humidity and temperature, grape variety and chemical fungicides and it's known that its frequency increases from the setting to the harvesting (Bau *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2005). *Aspergillus* section *Nigri* has been isolated in high frequencies mainly in Europe, but also in South American countries like Argentina, Chile and Brazil (Battilani *et al.*, 2001; Rosa *et al.*, 2002; Bau *et al.*, 2005; Bejaoui *et al.*, 2005; Diaz *et al.*, 2009; Chiotta *et al.*, 2009). In Brazil, a few studies were conducted in order to characterize grape quality. Rosa *et al.* (2002) were the first to report of the occurrence of ochratoxigenic fungi on Brazilian grapes. Data about fungal contamination are important to characterize the product quality and assures consumers safety. The aim of this study was the mycotoxicological

characterization of two varieties of wine grapes cultivated in three different regions of Rio Grande do Sul state during two maturation stages.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Grape sampling*

Grape samples of Cabernet Sauvignon and Merlot varieties were obtained in three vineyards: (1) Serra do Nordeste located at northeast; (2) Serra do Sudeste, located at southeast and (3) Campanha, located at southwest of state of Rio Grande do Sul, respectively (Figure 6). Samples were collected at different stages: (A) early ripeness and (B) harvest. The sampling was conducted at the 2011 vintage, between January and March of this year. At each sampling time, two diagonals crossing the vineyards were delimited and 5 healthy bunches from each diagonal were randomly obtained. Each bunch was collected in a sterilized plastic bag and sent to laboratory under refrigerated temperature to be analyzed.

### *2.2 Mycological analysis*

Ten berries were randomly selected from each bunch (totalizing 1200 berries), surface disinfected with 0,4% sodium hypochlorite for 1 minute and inoculated directly into the surface of Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar and Malt Extract (MEA) Agar supplemented with chloramphenicol (Pitt & Hocking, 1997). Plates were incubated at 25 °C for 7 days at darkness.

After incubation, all colonies from different genera and within *Aspergillus* section *Nigri* morphology were isolated to Czapek Yeast Extract (CYA) Agar and incubated at 25°C for 7 days at darkness. Genera identification was conducted according to microscopic and macroscopic criteria using Pitt & Hocking (1997) and Pitt (2009) keys. The *Aspergillus* colonies were identified to species level also according to micro and macroscopic criteria, using Klich (2000) keys.



### 2.3 *Ochratoxin A production ability*

OTA production was tested in 22 *Aspergillus* strains belonging to section *Nigri*. Qualitative analysis was conducted according to the method proposed by Bragulat *et al* (2001) using Thin Layer Chromatography (TLC) with Charged Coupled Device (CCD) (Welke *et al*, 2009; Teixeira *et al*, 2011). In this technique, the isolates were grown in CYA plates for 10 days at 30°C. For each isolate, agar plugs were removed from central and border areas of the colony and extracted with 1 ml of chloroform. Extracts were analyzed using TLC-CCD technique.

Quantitative analysis was conducted according to the method proposed by Ponsone *et al* (2007) with a few modifications, using TLC-CCD. Briefly, 10<sup>6</sup> spores from a suspension previously prepared were grown in 20 mL of CYA medium for 10 days at 30 °C at darkness. After the incubation period, 1 mL of the media was mixed with 1 mL chloroform and centrifuged at 4000g for 10 minutes. 0,5 mL of the chloroform was then transferred to a clean vial, evaporated and redissolved in 0,5 mL of the diluent (PBS). The PBS solution employed was prepared following the VICAM manual. The mobile phase was added to an immunoaffinity column OchraTest (VICAM, St. Louis, MO, USA), that was cleaned up with 10mL of PBS and 10 mL of distilled water. OTA was eluted with methanol, evaporated to dryness and redissolved in 100µL of chloroform and applied to the TLC plate. Plates with samples were eluted with a toluene/ethyl acetate/formic acid solution (60:30:10, v/v) analyzed and quantified through CCD using ImageJ Software (Welke *et al.*, 2009; Teixeira *et al*, 2011). The confirmation of the compound identity was conducted according Hunt *et al.* (1980) methodology, using boron trifluoride.

### 2.4 *Ochratoxin A occurrence on grape samples*

The methodology was divided in two steps: extraction and clean-up. To extraction, the grapes collected were crushed with a blender and the OTA occurrence and content was determined according to the methodology proposed by Zimmerli & Dick (1996). Briefly, the blended grapes were filtered to remove particulate matter and 5 mL of the juice was mixed with 10 ml of aqueous solution

(3,4% orthophosphoric acid, 1,18% sodium chloride) in a clean vial. The OTA content was extracted with 10 mL of chloroform, shaken three times and transferred to a clean vial. To the clean-up, the 10mL chloroform extract was evaporated to dryness in a bath at 65°C and re dissolved in 5 ml PBS that was added to an immunoaffinity column OchraTest (VICAM, St. Louis, MO, USA) pre-washed with 20 mL PBS. The column was washed with 10 ml distilled water and OTA was eluted from the column with 3 mL methanol/acetic acid (98:2). The extract was evaporated to dryness in nitrogen and re dissolved in Toluene:Acetic Acid (99:1) and applied in TLC plates. The plates with the samples were eluted in a glass chamber containing toluene/ethyl acetate/formic acid solution (60:30:10, v/v) and then analyzed with CCD, using the computer software ImageJ for Windows.

## 2.5 Recovery

Samples were contaminated with an OTA standard, in the concentrations of 7.5, 10 and 20 ng mL<sup>-1</sup> in triplicates. The OTA extraction and determination analysis was conducted three times accordingly the item 2.4.

## 2.6 Statistical analysis

To compare the means of fungal incidence of two groups (grape varieties and cultivation stage) the Mann-Whitney tests were used, and to compare the means of more than two groups the Kruskal-Wallis tests were conducted. This non-parametric tests were chosen in due to the reduced sample size .

## 3. Results and Discussion

Eight fungal genera were identified from the grape samples: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* and *Curvularia*, highlighting the first four genera (Figure Z). About 3% of the isolated fungi did not produced conidiophores or conidia on the tested conditions and were nominated “non sporulated fungi”. *Botrytis* genus which is regarded as the main

spoilage cause in wine grapes was not isolated (Doneche, 1993; Masih *et al.*, 2001; Gabrielotto *et al.*, 2009)

The predominance of *Alternaria* sp. (82%) was observed both in the beginning of the ripeness and in the harvest, but the genera incidence decreased at harvest (Figure 7). This results agree with Magnoli *et al.* (2003), Medina *et al.* (2005) and Serra *et al.* (2006). It is common that ambiental genera frequency decreases as the ripness advance, being gradually substituted by degrading fungi (Serra *et al.*, 2006).

*Aspergillus* was the fourth most common genera (1,3% of all fungi). These results showed differences with those obtained by other authors, which reported much higher frequency from this genus, ranging from 70 to 95% (Magnoli *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2005; Khoury *et al.*, 2008).

Comparing the three analysed regions (Table 4), higher contaminantion at Campanha region was found, with 785 isolates, highlighting the *Aspergillus* genus, which showed predominance on Cabernet Sauvignon variety. At Serra do Sudeste and Serra do Nordeste region, 554 and 474 isolates were found, respectively.

Magnoli *et al.* (2003) analyzing wine grapes in Argentina in a region that is geographically very close to Rio Grande do Sul, found similar results in comparison to this study, probably due to the geographical proximity of the analyzed regions. Rosa *et al.* (2002) suggest that the fungal diversity also depends on the degree of maturity of the berries and the physical damage taken.

In this study 22 *Aspergillus* section *Nigri* were found, distributed between the varieties, grape growing period and geographical regions. Four species were identified: *Aspergillus japonicus*, *A. awamori*, *A. niger* and *A foetidus* (Figure 8). The section *Nigri* was predominant inside the *Aspergillus* genus, representing 88% fungal isolated from this genus.

About the *Aspergillus* section *Nigri*, the *A. niger* aggregate was predominant representing 78%, which agrees with previous publications (Khoury *et al.* 2006; Battilani *et al* 2003; Ponsone *et al.*, 2010. The species that belong to this aggregate are considered the main *Aspergillus* contaminant in wine grapes produced even in regions with climate conditions completely different from our study, probably because these fungi are great competitors and extremely adapted to the ecosystem present in

the vineyards. The aggregate *A. niger* species represent 80-85% of the contamination, mainly during harvest period (Visconti *et al.*, 2008).

The occurrence of unisseriate fungi is also consistent with other published studies (Battilani *et al.*, 2003; Khoury *et al.*, 2006; Belli *et al.*, 2006). This group is considered the third more important black *Aspergillus* contaminating wine grapes, right above the *A. niger* aggregate and *A. carbonarius* (Visconti *et al.*, 2008). Battilani *et al.* (2003) reported that about 23% of the black aspergilli isolated correspond to unisseriate species, similar with what was found in our study, where these fungi represented 32% of the *Aspergillus* section *Nigri*. The frequency of unisseriate black aspergilli is higher in colder regions, probably in due to its resistance structures (Visconti *et al.* 2008)

It is interesting to note the absence of isolates belonging to the species *A. carbonarius*, considered the main responsible for the occurrence of OTA in wine grapes and derivatives (Visconti *et al.*, 2008; Khoury *et al.*, 2008; Ponsone *et al.*, 2010). Low occurrence of this fungi was already been reported in Argentina (Chiotta *et al.*, 2009; Ponsone *et al.*, 2010) and in Lebanon (Khoury *et al.*, 2006) and the absence of this fungi was observed in cold regions, like Germany, North Hungary, Czech Republic and Portugal (Abrunhosa *et al.*, 2001; Ostry *et al.*, 2005; Varga *et al.*, 2005).

The occurrence of *A. carbonarius* is closely related not only to high temperatures during the growing season, but throughout the year (Battilani *et al.*, 2006; Chiotta *et al.*, 2009). The absence of this species can be attributed to the climate conditions of Rio Grande do Sul, which is located in southern Brazil, characterized by having temperate climate (average temperature between 15 and 18 °C), with particularly harsh winter (minimum temperature of -10 ° C) (SEPLAG, 2011).

Although this work has identified potentially ochratoxigenic species in all regions of the state, the number of isolates founded was lower than that other studies conducted in different countries. Belli *et al.* (2005) isolated about 1100 black *Aspergillus* in Spain, Khoury *et al.* (2008) found 487 in Lebanon, Serra *et al.* (2003) found 333 in Portugal, Chiotta *et al.* (2009) found 284 in Argentina and Diaz *et al.* (2009) found 77 in Chile. When compared the fungal contamination between the

regions surveyed, in spite of no significant difference between the regions ( $p>0,05$ ), there was a slightly higher percentage of *Aspergillus* section *Nigri* in Campanha (59%), followed by Serra do Sudeste (32%) and the Serra do Nordeste (9%).

Campanha is the region where there is greater risk of drought and the lowest rainfall rate (mean of 94,8 mm at the grape growing months) (Leivas *et al.*, 2005; SEPLAG, 2011; INMET, 2011), and these factors may explain the higher contamination in the area considering that *A. niger* aggregate and the unisseriate species requires less moisture for optimal growth (Battilani *et al.*, 2006). The Serra do Nordeste is a wetter region and has a higher rainfall rate (between 1500-1800 mm annually and with a mean of 218,5 mm at the grape growing months) when compared to the other two regions (between 1200-1500 mm annually and with a mean of 111,4 mm at the grape growing months), and this factor could explain the difference in the number of isolated fungi (Berlato & Fontana, 2003; Leivas *et al.*, 2005; SEPLAG, 2011; INMET, 2011).

Another important factor regarding the fungal incidence is the canopy type. Vertical vineyards are more susceptible to fungal infection in due to the proximity of the bunches to the soil (Cozzi *et al.*, 2007; Battilani *et al.*, 2008). The results found at this study agreed with that assumption: higher fungal incidence at Campanha and Serra do Sudeste regions, both with vertical cultivation.

Fourteen black aspergilli were isolated from the Cabernet Sauvignon variety and eight from Merlot. No statistical differences was found between the varieties ( $p>0,05$ ), but the higher fungal incidence in C. Sauvignon agreed with previous studies conducted by Visconti *et al.* (2008) and Battilani *et al.* (2004) where a higher susceptibility of C. Sauvignon was suggested.

A high incidence of black *Aspergillus* was found at the harvest time (13 isolates) in relation to the ripeness (1 isolate) for the C. Sauvignon variety (Figure 9). The results obtained in this study showed the same pattern described by other authors in Spain (Belli *et al.*, 2004; Bau *et al.*, 2005), Tunisia (Lasram *et al.*, 2007) and Portugal (Serra *et al.*, 2003). The glucose concentration is higher at the harvesting period, characterizing better conditions to fungal growth. At the harvesting also, the grape acidity decreases and the cuticle gets more fragile letting the berry suffer more injuries facilitating the fungal infection (Bejaoui *et al.*, 2006).

Regarding the Merlot variety, opposite results were found: higher black aspergilli incidence at the ripeness period (Figure 9) which disagrees with previous data provided by other authors, and can be explained possibly for reason that the ripeness and harvest time from this variety differ from C. Sauvignon (Serra *et al.*, 2003; Belli *et al.*, 2004; Bau *et al.*, 2005; Lasram *et al.*, 2007). No statistical differences were found regarding the fungal incidence between the two varieties ( $p>0,05$ ).

One *Aspergillus japonicus*, isolated from Serra do Sudeste at the beginning of the ripeness period was able to produce ochratoxin A at the conditions tested. The concentration produced was  $148 \text{ ng mL}^{-1}/10^6$  conidia. The occurrence of an *A. japonicus* OTA producer was previously reported by Battilani *et al.* (2003) in Italy and by Dalcero *et al.* (2002) and Ponsone *et al.* (2007) in Argentina.

The samples used for fungal isolation were also analysed about OTA occurrence. The method recovery was 97% and the detection limit and quantification limit were  $0.4$  and  $0.8 \text{ ng mL}^{-1}$ , respectively. None of the samples were contaminated with OTA.

OTA was not found in samples of Cabernet Sauvignon grapes cultivated in Uruguay (Chulze *et al.*, 2007), which agree with the present results, especially considering that Uruguay is bordered by the state of Rio Grande do Sul and has climatic conditions similar to the Brazilian state. The geographical location, the climate and the non-occurrence of *A. carbonarius* probably explain the absence of OTA in the grapes analysed.

This is the first study about fungal and OTA contamination in wine grapes produced at different regions in the Rio Grande do Sul state. Considering the importance of the state at marketing noble wines, the data presented are extremely relevant to characterize the grape and derivatives quality

## **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the support of CAPES, ICTA/UFRGS and also Vinícola Almadén, Casa Valduga and Vinícola Valmarino.

## 5. References

- Abarca, M. L., M. R. Bragulat, G. Castella, and F. J. Cabanes. 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied Environmental Microbiology*, 60:2650–2652
- Abouzied, M. M., A. D. Horvat, Podlesny, P. M., Regina, N. P., Metodiev, V. D., Kamenova-Tozeva, R. M., Niagolova, N. D., Stein, A. D., Petropoulos, E. A., Ganev, V. S. 2002. Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan endemic nephropathy. *Food Additives and Contaminants*. 19 755– 764.
- Abrunhosa, L., Paterson, R. R. M., Kozakiewicz, Z., Lima, N., & Venancio, A. 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*. 32:240–242.
- Battilani P., Giorni P., Languasco L., Pietri A., Bertuzzi T. 2001. Dynamics of fungi responsible for ochratoxin A in grape. *Book of Abstracts: Bioactive Fungal Metabolites – Impact and Exploitation*. p. 47.
- Battilani, P.; Magan, N.; Logrieco, A. 2006. European research on ochratoxin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*. 11: 2–4.
- Battilani, P., Logrieco, A., Giorni, P., Cozzi, G., Bertuzzi, T., Pietri, A. 2004. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84 (13): 1736-1740.
- Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P., Kozakiewicz, Z. 2003. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection*. 66 (4): 633-636.
- Bau, M.; Bragulat, M.R.; Abarca, M.L.; Minguez, S.; Cabañes, F.J. 2005 Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*. 98: 125– 130.
- Bellí, N.; Bau, M.; Marín, S.; Abarca, M.L.; Ramos, A.J.; Bragulat, M.R. 2006. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111: 40–45.
- Bellí, N.; Marin, S.; Duaigues, A.; Ramos, A.J.; Sanchis, V. 2004. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84: 591–594.
- Bejaoui, H.; Mathieu, F.; Taillandier, P.; Lebrihi, A. 2006. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. *International Journal of Food Microbiology*. 111: 46–52.

Berlato, M.A.; Fontana, D.C. El niño e la niña: impactos no clima, na vegetação e na agricultura do Rio Grande do Sul, aplicações de previsões climáticas na agricultura. Editora UFRGS, Porto Alegre, 2003.

Bondy, G. S., and C. L. Armstrong. 1998. Cytotoxicity of nephrotoxic fungal toxins to kidney-derived LLC-PK1 and OK cell lines. *Cell Biology and Toxicology*. 14:323–332.

Bragulat, R., Abarca, L. And Cabanes, J. 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*. 71: 139–144.

Chiotta, M.L.; Ponsone, M.L.; Combina, M.; Torres, A.; Chulze, S. 2009. *Aspergillus* section Nigri species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 136: 137–141.

Chulze, S.N.; Magnoli, C.E.; Dalcerro, A.M. 2006. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology*. 111: 5-9.

Codex Alimentarius Commission. 1999. Position paper on ochratoxin A, p. 1–9. In Codex Committee on Food Additives and Contaminants, 31st session, The Hague, The Netherlands.

Creppy, E. E., A. M. Betbeder, A. Ghardi, J. Counord, M. Castegnaro, H. Bartsch, P. Montcharmont, B. Fouillet, P. Chambon, and G. Dirheimer. 1991. Human ochratoxicosis in France, p. 145–151. IARC Scientific publication no. 115. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Dalcerro, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiacchiera, S.M., Palacio, G., Rosa, C.A.R. 2002. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section Nigri in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 19: 1065-1072.

Diaz, G.A.; Torres, R.; Vega, M.; Latorre, B.A. 2009. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 133: 195– 199.

Doneche, B. 1993. Botrytized wines. In *Wine Microbiology and Biotechnology* ed. Fleet, G.H. pp. 1–26. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers.

Fleet, G.H. 1999 Microorganisms in food ecosystems. *International Journal Food Microbiology*, 50: 101–117.

Fleet, G.H. 2001 Wine. In *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, 2<sup>nd</sup> edn ed. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. pp. 747–772. Washington, DC: ASM Press.

Gabriolotto, C.; Monchiero, M.; Negre, M.; Spadaro, D.; Gullino, M.L. 2009. Effectiveness of control strategies against *Botrytis cinerea* in vineyard and evaluation



of the residual fungicide concentrations. *Journal of Environmental Science and Health*, 44: 389-396.

Hocking, A.D., Varelis, P., Pitt, J.I., Cameron, S.F., Leong, S.-L.L. 2003. Occurrence of ochratoxin A in Australian wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9: 72-78.

Hunt DC, McConnie BR, Crosby NT. 1980. Confirmation of ochratoxin A by chemical derivatization and high performance liquid chromatography. *Analyst*, 105: 89–90.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: World Health Organization, v.56, p.489, 1993

INMET (National Meteorologic Institute). 2011. Network and Conventional Automatic Stations of the National Institute of Meteorology. Available in: <<http://www.inmet.gov.br/>>.

Kilch, M.A. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands, 2002.

Khoury, A.; Rizk, T.; Lteif, R.; Azouri, H.; Delia, M.L.; Lebrihi, A. 2006 Occurrence of ochratoxin A- and aflatoxin B1-producing fungi in Lebanese grapes and ochratoxin a content in musts and finished wines during 2004. *Journal of Agricultura and Food Chemistry*, 54: 8977–8982.

Khoury, A.; Rizk, T.; Lteif, R.; Azouri, H.; Delia, M.L.; Lebrihi, A. 2008. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine–grapes and musts. *Food Chemistry and Toxicology*, 46: 2244–2250.

Lasram, S.; Bellí, N.; Chebil, S.; Nahla, Z.; Ahmed, N.; Sanchis, V.; Ghorbel, A. 2007. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 376–379.

Leivas, J.F.; Berlato, M.A.; Fontana, D.C. 2006. Risco de deficiência hídrica decendial na metade sul do Estado do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 10: 397–407.

Loiva, M.R.M. Vitivinicultura brasileira: panorama 2010. Embrapa Uva e Vinho. Available in: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/>>

Magnoli, C.; Violante M.; Combina, M.; Palacio G.; Dalcero, A. 2003. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 179–184.

Masih, E.I., Slezack Deschaumes, S., Marmaras, I., Barka, E.A., Vernet, G., Charpentier, C., Adholeya, A., Paul, B., 2001. Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*

causing the grey mould disease of grapevine. *FEMS Microbiological Letters*, 202: 227–232.

Mateo, R., Medina, Á., Mateo, E.M., Mateo, F., Jiménez, M. 2007. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 79–83.

Medina, A.; Mateo, R.; López-Ocaña, L.; Valle-Algarra, F.M.; Jiménez, M. 2005. Study of Spanish Grape Mycobiota and *Aspergillus tubingensis* and Other Ochratoxin A production by Isolates of Members of *Aspergillus* Section *Nigri*. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 4696–4702.

Ng, W.; Mankotia, M.; Pantazopoulos, P.; Neil, R.J.; Scott, P.M. 2004. Ochratoxin A in wine and grape juice sold in Canada. *Food Additives and Contaminants*, 21: 971–981.

Ostry, V., Skarkova, J., Kubatova, A., Prochaykova, I., Ruprich, J., Vajcner, P., et al. 2005. Grape vine, toxigenic microfungi a ochratoxin A. (II.). *Vinarsky obzor*, 98: 389–391.

Ponsone, M.L.; Chiotta, M.L.; Combina, M.; Torres, A.; Knass, P.; Dalcero, A.; Chulze, S. 2010. Natural Occurrence of Ochratoxin A in Musts, Wines and Grape Vine Fruits from Grapes Harvested in Argentina. *Toxins*, 2: 1984–1996.

Ponsone, M.L.; Combina, M.; Dalcero, A.; Chulze, S. 2007. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 131–135.

Pfohl-Leszkowicz, A., Pinelli, E., Bartsch, H., Mohr, U., Castegnaro, M. 1998. Sex- and strain-specific expression of cytochrome P450s in ochratoxin A-induced genotoxicity and carcinogenicity in rats. *Molecular Carcinogenesis*, 23: 76–85.

Pitt J.I., Hocking A.D. 1997. *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic and Professional, London, UK.

Pitt, J.I., Rico, E., Jhonson, S. 2009. *Food Mold*. BCN Research Laboratories, Rockford, Tennessee,

Rosa, C.A.R., Magnoli, C.E., Fraga, M.E., Dalcero, A.M., Santana, D.M.N. 2004. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 21: 358–364.

Rosa, C.A.R.; Palacios, V., Combina, M., Fraga, M.E., De Oliveira Rekson, A., Magnoli, C.E., Dalcerro, A.M . 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 19: 408-414.

Secretaria De Planejamento, Gestão E Participação Cidadã (SEPLAG). Socioeconomic Atlas of Rio Grande do Sul. Available in: <<http://www.scp.rs.gov.br/>>. Accessed at 02/01/2012

Serra, R.; Abrunhosa, L.; Kozakiewicz, Z.; Venâncio, A. 2003. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 63– 68.

Serra, R.; Lourenço, A.; Alipio, P.; Venâncio, A. 2006. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological Research*, 110: 971-978.

Shephard, G.S., Fabiani, A., Stockenström, S., Mshicileli, N., Sewram, V. 2003. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 1102–1106.

Smith, J. E., Solomons, G. L. 1994. Mycotoxins in human nutrition and health, p. 104–123. European Commission, Agro-Industrial Research Division, Brussels, Belgium.

Teixeira, T.R.; Hoeltz, M.; Einloft, T.C.; Dottori, H.A.; Manfroi, V.; Noll, I.B. 2011. Determination of ochratoxin A in wine from the southern region of Brazil by thin layer chromatography with a charge-coupled detector. *Food Additives and Contaminants*, 4: 289-293.

Welke, J.E., Hoeltz, M., Noll, I.B. 2009. Aspects related to the presence of toxigenic fungi in grapes and ochratoxin A in wines. *Ciencia Rural*, 39: 2567-2575.

Varga, J., Kiss, R., Matrai, T., Matrai, T., & Teren, J. 2005. Detection of ochratoxin A in Hungarian wines and beers. *Acta Alimentaria*, 34: 381–392.

Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G., Solfrizzo, 2008. M. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Additives and Contaminants*, 25: 193-202.

Zimmerli, B., Dick, R. 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, 13: 655-668.

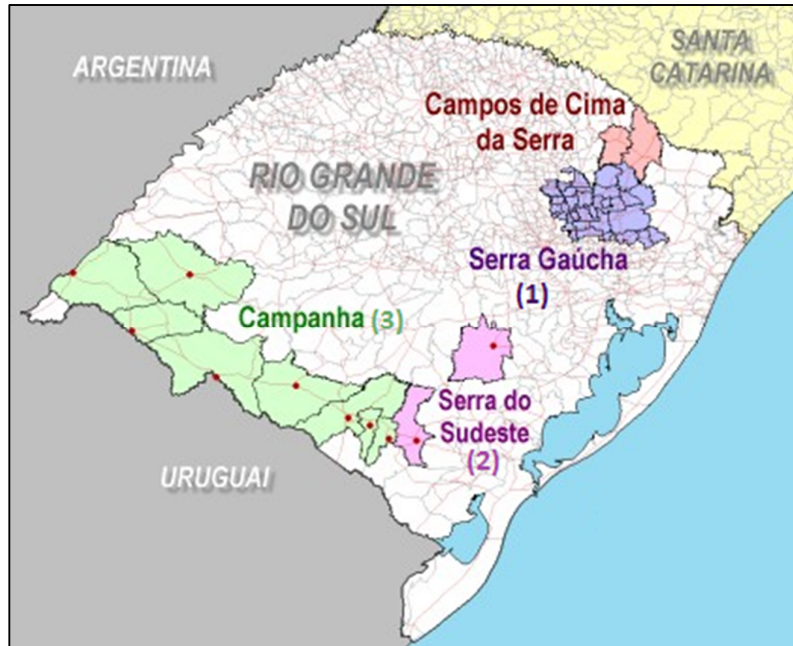


Figure 6: Map of Rio Grande do Sul with the three wine producing regions  
 From: [www.academiadovinho.com.br](http://www.academiadovinho.com.br)

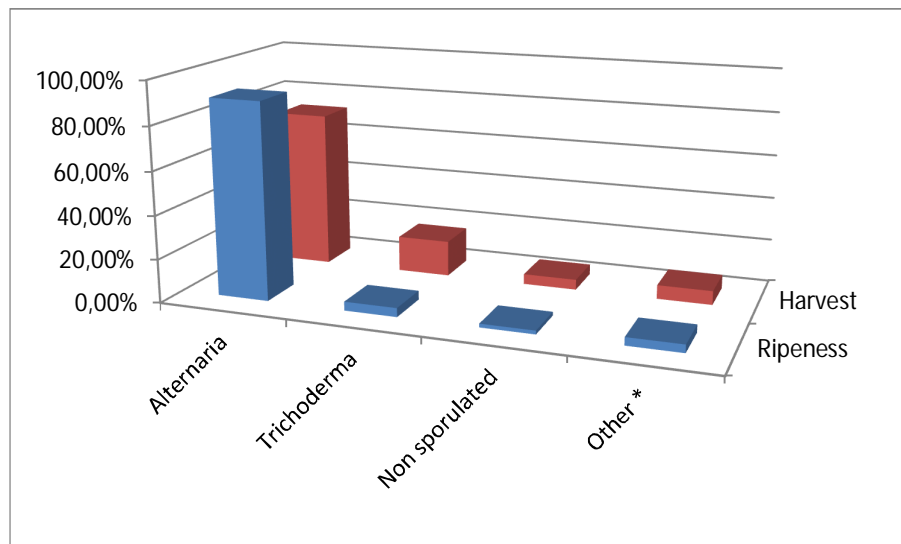


Figure 7: Genera percentage frequency at ripeness and harvest periods of vintage 2011 wine grapes.

\* = *Aspergillus*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium*.

Table 4: Isolated genera incidence from 2011 vintage grapes at three different regions and two varieties

| Fungi               | Campanha          |                   | Serra do Sudeste  |                   | Serra do Nordeste |                   |
|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                     | Cab. Sauvignon    | Merlot            | Cab. Sauvignon    | Merlot            | Cab. Sauvignon    | Merlot            |
| <i>Alternaria</i>   | 386 (85%)         | 334 (92%)         | 174 (67%)         | 224 (76%)         | 243 (89%)         | 183 (90%)         |
| <i>Aspergillus</i>  | 12 (2,6%)         | 3 (0,8%)          | 1 (0,4%)          | 6 (2%)            | 3 (1%)            | 0                 |
| <i>Cladosporium</i> | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 | 1 (0,4%)          | 7 (3,5%)          |
| <i>Curvularia</i>   | 0                 | 11 (3%)           | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 |
| <i>Fusarium</i>     | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 | 4 (1,5%)          | 0                 |
| <i>Nigrospora</i>   | 35 (7,7%)         | 0                 | 0                 | 0                 | 1 (0,4%)          | 0                 |
| <i>Penicillium</i>  | 10 (2,2%)         | 1 (0,3%)          | 0                 | 1 (0,3%)          | 0                 | 2 (1%)            |
| <i>Trichoderma</i>  | 7 (1,5%)          | 14 (3,8%)         | 85 (32,7%)        | 63 (21%)          | 20 (7,4%)         | 10 (5%)           |
| <b>Total</b>        | <b>450 (100%)</b> | <b>336 (100%)</b> | <b>260 (100%)</b> | <b>294 (100%)</b> | <b>272 (100%)</b> | <b>202 (100%)</b> |

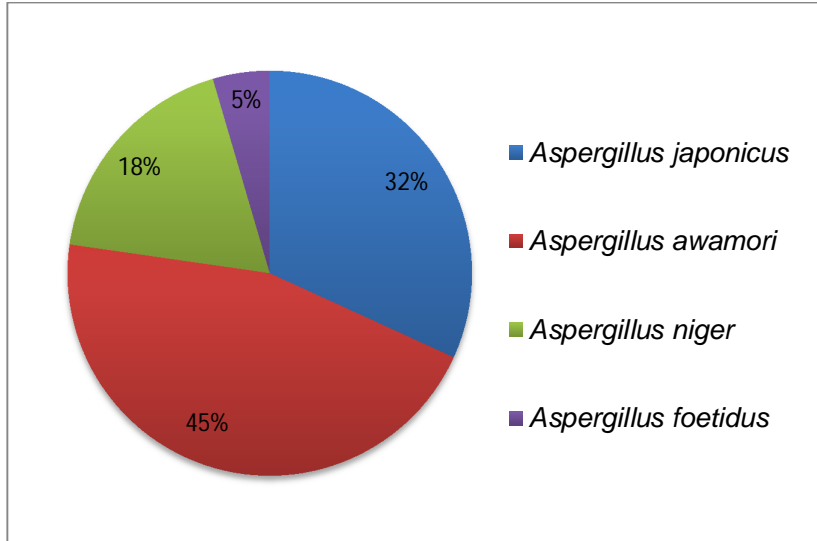


Figure 8: Species isolated belonging to *Aspergillus* section *Nigri*

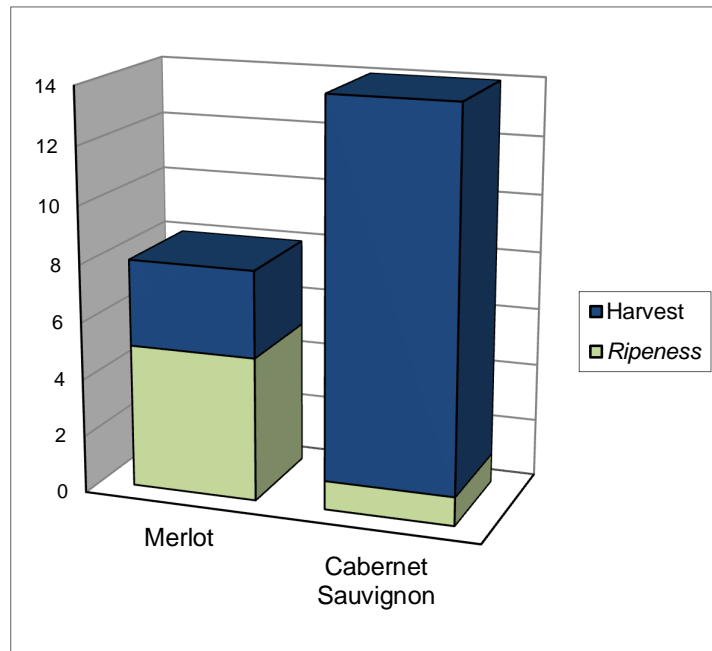


Figure 9: *Aspergillus* section *Nigri* frequency regarding to grape variety and cultivation period

## CAPÍTULO 3

### 3. Discussão geral

#### 3.1 Micobiota comum das uvas viníferas

Foram identificados oito gêneros fúngicos contaminantes das bagas: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Curvularia* (Figura 10), com destaque para os quatro primeiros (Figura 11). Cabe salientar que 3% dos fungos não foram capazes de esporular nas condições testadas e em condições de indução à esporulação (microcultivo), estes fungos foram denominados “não esporulados”. Ao analisar a frequência dos gêneros fúngicos, dois pontos podem ser destacados: a ausência do gênero *Botrytis* sp., considerado o grupo fúngico mais frequente neste substrato, e a predominância do gênero *Alternaria* sp. A ausência do gênero *Botrytis* sp. já foi relatada por autores na Argentina (Magnoli *et al.*, 2003) e Espanha (Medina *et al.*, 2005), e pode ser atribuída ao uso de fungicida pelos produtores (Serra *et al.*, 2005; Nally *et al.*, 2012).

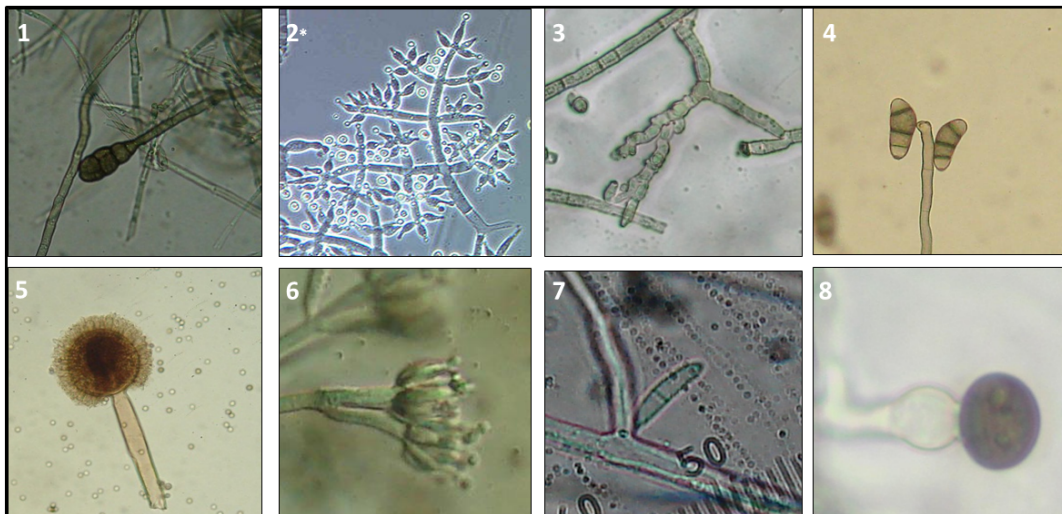


Figura 10: Micro estruturas reprodutivas dos gêneros isolados em aumento de 200x e 1000x (7 e 8). 1= *Alternaria*. 2= *Trichoderma*, 3= *Cladosporium*, 4= *Curvularia*, 5= *Aspergillus*, 6= *Penicillium*, 7= *Fusarium* e 8= *Nigrospora*. \* Fonte: US Department of Agriculture, 2011.

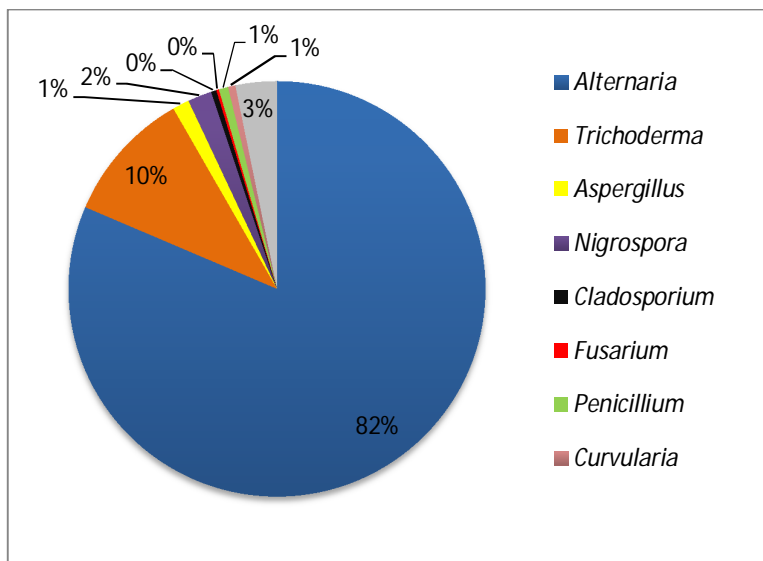


Figura 11: Percentagem de incidência gêneros isolados das uvas.

A alta prevalência de *Alternaria* sp. (82%) foi observada desde o período de início da maturação das bagas até o período de colheita, apresentando uma leve redução da sua frequência no segundo período. Esta predominância do gênero *Alternaria* sp. está de acordo com o que foi relatado por Magnoli *et al.* (2003), Medina *et al.* (2005) e Serra *et al.* (2005). É comum que a frequência de fungos ambientais decresça conforme o avanço da maturação, sendo substituído gradativamente por fungos deterioradores (Serra *et al.*, 2005).

Foi observada também a frequência atípica dos gêneros *Trichoderma* sp. e *Nigrospora* sp. A ocorrência de *Trichoderma* sp. em uvas de mesa e viníferas é comum, porém não com uma taxa tão alta (10%). Já *Nigrospora* sp. é citado em apenas dois trabalhos realizados nos Estados Unidos (Lucca *et al.*, 2008) e na Austrália (Steel & Greer., 2008), mas com uma taxa de ocorrência muito mais baixo do encontrado neste trabalho (2% dos isolados).

O gênero *Aspergillus* sp., composto basicamente de isolados pertencentes a seção *Nigri*, foi o quarto gênero mais frequente (1,3% de todos os isolados), o que está de acordo com a maioria dos demais trabalhos publicados. Esta frequência, porém, está muito abaixo do que foi relatado em outros estudos realizados na Europa e na América Latina que encontraram uma média de contaminação variando de 70 a 95% (Magnoli *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2005; Khoury *et al.*, 2008). Embora



a incidência deste grupo tenha aumentado durante a maturação das bagas, mesmo no período da colheita, o percentual de incidência não ultrapassa o encontrado para *Alternaria* sp., discordando dos dados relatados por Magnoli *et al.* (2003), Medina *et al.* (2005), Serra *et al.* (2005), Sage *et al.* (2005) entre outros. Abrunhosa *et al.* (2001), encontraram resultados semelhantes em Portugal: elevado percentual de incidência de *Alternaria* e 0% de incidência de cepas do gênero *Aspergillus* sp.

A incidência dos gêneros *Cladosporium*, *Curvularia*, *Penicillium* e *Fusarium* foi baixa em relação aos outros fungos isolados. A baixa frequência desses fungos já foi observada por Magnoli *et al.*, (2003), Belli *et al.*, (2005) e Tournas & Katsoudas, (2005).

Comparando as três regiões analisadas (Tabela 5), foi observada uma maior contaminação total na Campanha, com 785 isolados. Nesta região também foram isolados o maior número de *Aspergillus*, destacando-se a variedade Cabernet Sauvignon. Foram isolados 554 fungos na Serra do Sudeste e 474 na Serra do Nordeste.

A região da Serra do Sudeste destacou-se pelo elevado número de isolados de *Trichoderma* sp., que chegou a representar até 32% dos isolados desta região para a variedade Cabernet Sauvignon.

Os resultados encontrados foram, em geral, muito semelhantes aos relatados por Magnoli *et al.* (2003). Neste estudo, os autores realizaram a análise na província de Mendonça, Argentina, região geograficamente muito próxima ao Rio Grande do Sul. Ainda neste trabalho, foram analisadas algumas variedades de uvas, entre elas, as Cabernet Sauvignon e Merlot. Essa semelhança entre os resultados é atribuída provavelmente a fatores em comum, tais como o clima, os quais influenciariam diretamente a composição fúngica das uvas.

Rosa *et al.* (2002), por sua vez, sugere que a diversidade da microbiota genérica das uvas depende do grau de maturidade das bagas e do dano físico causado por pragas, precipitações e o manuseio pelos produtores.

Tabela 5. Incidência dos gêneros isolados das uvas da safra de 2011 nas três diferentes regiões produtoras e duas variedades analisadas

| Fungos              | Campanha          |                   | Serra do Sudeste  |                   | Serra do Nordeste |                   |
|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                     | Cab. Sauvignon    | Merlot            | Cab. Sauvignon    | Merlot            | Cab. Sauvignon    | Merlot            |
| <i>Alternaria</i>   | 386 (85%)         | 334 (92%)         | 174 (67%)         | 224 (76%)         | 243 (89%)         | 183 (90%)         |
| <i>Aspergillus</i>  | 12 (2,6%)         | 3 (0,8%)          | 1 (0,4%)          | 6 (2%)            | 3 (1%)            | 0                 |
| <i>Cladosporium</i> | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 | 1 (0,4%)          | 7 (3,5%)          |
| <i>Curvularia</i>   | 0                 | 11 (3%)           | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 |
| <i>Fusarium</i>     | 0                 | 0                 | 0                 | 0                 | 4 (1,5%)          | 0                 |
| <i>Nigrospora</i>   | 35 (7,7%)         | 0                 | 0                 | 0                 | 1 (0,4%)          | 0                 |
| <i>Penicillium</i>  | 10 (2,2%)         | 1 (0,3%)          | 0                 | 1 (0,3%)          | 0                 | 2 (1%)            |
| <i>Trichoderma</i>  | 7 (1,5%)          | 14 (3,8%)         | 85 (32,7%)        | 63 (21%)          | 20 (7,4%)         | 10 (5%)           |
| <b>Total</b>        | <b>450 (100%)</b> | <b>336 (100%)</b> | <b>260 (100%)</b> | <b>294 (100%)</b> | <b>272 (100%)</b> | <b>202 (100%)</b> |

## 3.2 *Aspergillus* seção *Nigri*

### 3.2.1 Identificação das cepas

Ao todo vinte e dois isolados de *Aspergillus* com morfologia de colônia característica da seção *Nigri* foram isoladas e identificadas através da chave de identificação proposta por Klich (2001). Nesta chave, características de macromorfologia (diâmetro de colônia em CYA e MEA) e micromorfologia (septação de hifas, seriação de conidióforo, comprimento, textura e coloração de vesícula, estipe e conídios) foram levadas em consideração.

Apesar da pigmentação das estruturas dos *Aspergillus* seção *Nigri* dificultar a sua visualização, foi possível a realização da identificação dos isolados até o nível de espécie. Quatro espécies fúngicas pertencentes a seção *Nigri* foram identificadas: *Aspergillus japonicus*, *A. awamori*, *A. niger* e *A. foetidus*.

Os isolados identificados como *Aspergillus japonicus* possuíram a sua seriação como principal característica diferencial (cabeças conidiais unisseriadas). Os fungos ainda possuíam conídios globosos, de 4 – 4,5 µm de diâmetro de textura lisa com espinhas espaçadas, com estipe não pigmentada de marrom no ápice e vesículas com formato globoso a elipsoidal (Figura 12). Em relação à morfologia de colônia, as cepas tiveram um crescimento médio (após sete dias à 25°C no escuro) de 6,6 cm em CYA e 6,4 cm em MEA.

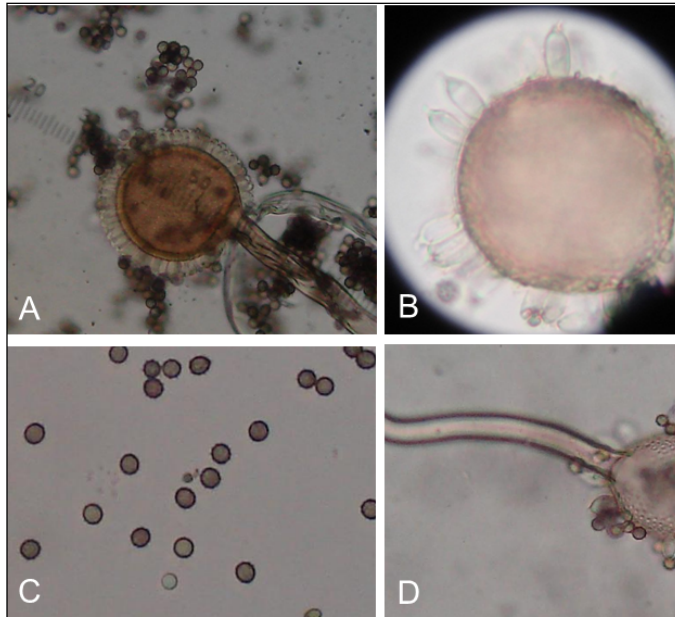


Figura 12: Características micromorfológicas de *A. japonicus*  
 A= Conidióforo (200x), B= Sieriação (400x), C= Conídios (1000x), D= Estipe não pigmentada (200x)

Devido a grande dificuldade taxonomica, os *Aspergillus niger*, *A. awamori* e *A. foetidus* muitas vezes são identificados como uma única espécie, denominada agregado *Aspergillus niger*, possuindo como característica comum vesículas bisseriadas (Figura 13) e geralmente globosa e com conídios pigmentados de 4-6  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

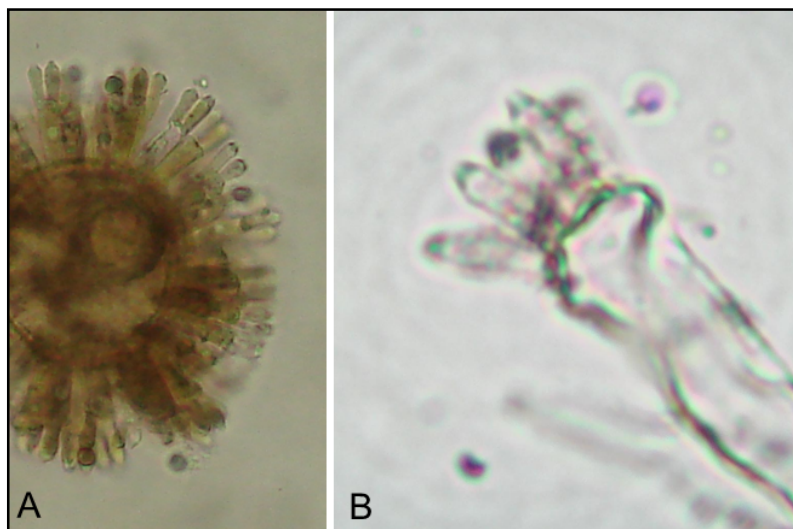


Figura 13: Sieriação de fungos do agregado *A. niger*  
 A= Conidióforo bisseriado (400x) B= Métula com quatro fiáides (1000x)

Os *Aspergillus foetidus* possuem uma característica distintiva de *A. niger* e *A. awamori*, que é a falta de pigmentação na estipe (Figura 14). A espécie ainda possui conídios lisos e esféricos, característica também rara nas outras espécies. As outras características do isolado foram muito semelhantes as encontradas nos demais fungos, como o diâmetro dos conídios com uma média de 4,1  $\mu\text{m}$  de diâmetro, vesícula globosa e pequena, e diâmetro de colônia de 5,53 cm em CYA e 5,67 cm em MEA.



Figura 14: Conidióforo de *A. foetidus* com estipe não pigmentada (400x)

Os isolados de *A. awamori* foram diferenciados dos demais em função da textura dos conídios, que são de lisos a pouco rugosos e do diâmetro de vesícula, menor que em *A. niger* (Figura 15). Esta espécie também possui conídios globosos, com 4-5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com estipe pigmentada de marrom no ápice e vesícula globosa. Os isolados apresentaram crescimento médio de 6,4 cm em CYA e 4,7 cm em MEA a 25°C por sete dias.

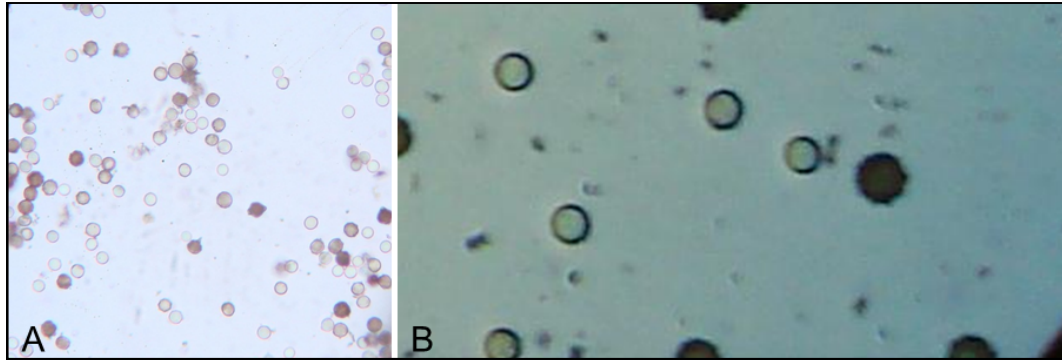


Figura 15: Conídios de *Aspergillus awamori* nos aumentos de 200x (A) e 1000x (B)

Já os isolados identificados como *Aspergillus niger* diferenciaram-se dos demais principalmente na morfologia dos conídios. Nesta espécie estes esporos são levemente maiores que nas demais (até 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro), de formato irregular e apresentam textura mais rugosa, com espinhas bem definidas (Figura 16). A vesícula de *A. niger* geralmente tem um formato mais esférico, o que diferencia de *A. awamori*, onde esta forma é mais rara. Os isolados de *A. niger* cresceram em média 6,2 cm em CYA e em MEA 6,4 cm.

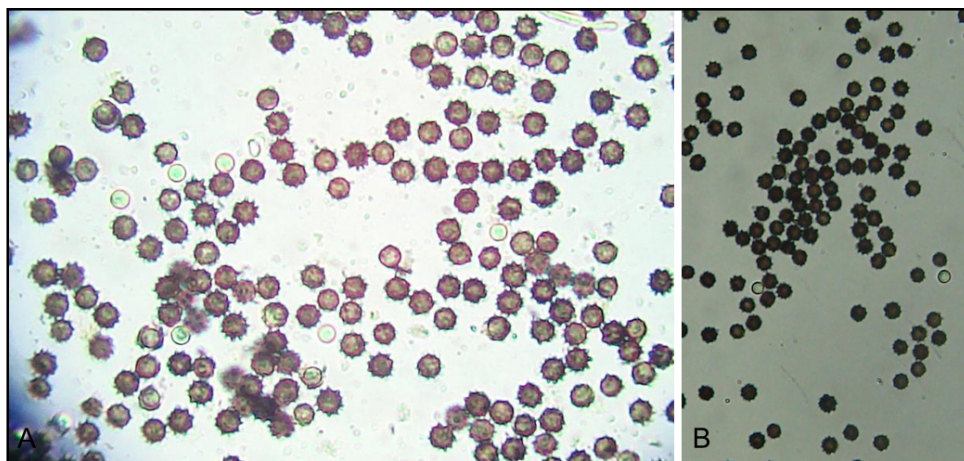


Figura 16: Conídios característicos de *Aspergillus niger* em A (100x) e B (400x)

### 3.2.2 Ocorrência

Foram isoladas ao todo, vinte e dois isolados pertencentes ao grupo dos *Aspergillus* seção *Nigri*, distribuídos entre as variedades, períodos de cultivo e

regiões geográficas. Sete cepas foram identificadas como *Aspergillus japonicus* e quinze como pertencentes ao agregado *A. niger*, sendo 10 isolados com características de *A. awamori*, 4 de *A. niger* e 1 de *A. foetidus* (Figura 17). Fungos da seção *Nigri* foram predominantes dentro do gênero *Aspergillus*, representando 88% dos isolados do gênero.

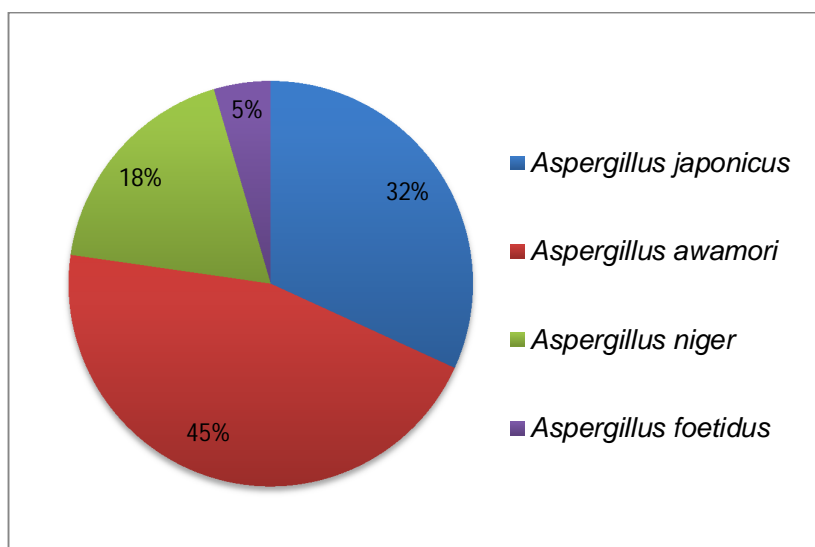


Figura 17: Espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* identificadas

A grande predominância de fungos pertencentes ao agregado *A. niger* (78% dos isolados) está de acordo com o que foi observado por outros autores. Rosa *et al.* (2002) encontraram elevada incidência de *A. niger* em uvas viníferas produzidas no Brasil (cerca de 56% dos isolados de *Aspergillus*), assim como Khoury *et al.* (2006) que também relataram a alta incidência de fungos do agregado *A. niger* em uvas produzidas no Líbano. Battilani *et al.* (2002) na Itália e Ponsone *et al.* (2010) na Argentina também encontraram resultados semelhantes. Fungos pertencentes a este agregado são considerados os principais contaminantes em uvas viníferas mesmo em regiões com características climáticas muito diferentes, provavelmente em função de estes fungos serem ótimos competidores e estarem extremamente adaptados no ecossistema presente nos vinhedos. Segundo Visconti *et al.* (2008), espécies deste grupo representam 80-85% da contaminação, principalmente no período da colheita.

A ocorrência de fungos unisseriados (*A. japonicus*) também está de acordo com outros trabalhos publicados (Battilani *et al.*, 2002; Khoury *et al.*, 2006; Belli *et al.*, 2006). Este grupo é considerado o terceiro de maior importância quanto a incidência em uvas viníferas, depois de fungos do agregado *A. niger* e *A. carbonarius* (Visconti *et al.*, 2008). Igualmente ao que foi observado por Khoury *et al.* (2006) e Battilani *et al.* (2002), a incidência de fungos desta espécie foi menor em relação aos do agregado *A. niger*. Battilani *et al.* (2002) relataram que cerca de 23% dos isolados de *Aspergillus* seção *Nigri* correspondiam às espécies unisseriadas, semelhante ao que foi encontrado nas uvas gaúchas (32% dos isolados). Segundo Visconti *et al.* (2008), a frequência de *Aspergillus* unisseriados é maior em regiões com temperaturas mais baixas durante o ano, provavelmente em função das espécies possuírem uma capacidade maior de sobrevivência devido a suas estruturas de resistência.

É interessante ressaltar a ausência de isolados pertencentes à espécie *Aspergillus carbonarius*, considerado o principal responsável pela ocorrência de OTA nos vinhos e derivados de uvas (Visconti *et al.*, 2008; Khoury *et al.*, 2008; Ponsone *et al.*, 2010). A baixa ocorrência em relação as demais espécies do grupo dos *Aspergillus* seção *Nigri* já foi observada na Argentina (Chiotta *et al.*, 2009, Ponsone *et al.*, 2010) e no Líbano (Khoury *et al.*, 2006) e a completa ausência deste fungo foi relatada em trabalhos realizados em regiões com temperaturas frias, como na Alemanha, norte da Hungria, República Tcheca e Portugal (Abrunhosa *et al.*, 2001; Ostry *et al.*, 2005; Varga *et al.*, 2005). Segundo Chiotta *et al.* (2009) e Battilani *et al.* (2006), a ocorrência de *Aspergillus carbonarius* está intimamente relacionada a altas temperaturas não apenas durante o período de cultivo, mas sim durante todo o ano. Assim sendo, a ausência desta espécie nas uvas gaúchas pode ser atribuída as condições climáticas da região, tendo em vista que o estado do Rio Grande do Sul localiza-se no extremo sul do Brasil, caracterizado por possuir clima temperado (temperatura média entre 15 e 18 °C), com inverno muito rigoroso (temperatura mínima de -10 °C) (SEPLAG, 2011)

Embora este trabalho tenha identificado 22 espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* potencialmente ocratoxigênicas em todas as regiões do estado (Tabela 6), o número de isolados foi menor em relação a outros trabalhos realizados em



diferentes países. Belli *et al.* (2004) isolaram cerca de 1100 cepas na Espanha, Khoury *et al.*, (2008) 487 no Líbano, Serra *et al.*, (2003) 333 em Portugal, Chiotta *et al.*, (2009) 284 na Argentina e Diaz *et al.*, (2009) 77 no Chile.

Comparando o número de isolados encontrados nas três regiões do estado, embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre as regiões ( $p>0,05$ ), foi possível observar que o maior número de fungos é proveniente das regiões da Campanha (13 isolados) e da Serra do Sudeste (7 isolados) em relação a Serra do Nordeste (2 isolados).

Tabela 6: Número de isolados do agregado *A. niger* e *A. japonicus* em uvas viníferas da safra 2011 nas diferentes regiões do estado, variedades e períodos do cultivo

|                              | Campanha |          |          |          |           |          | Serra do Sudeste |          |          |          |           |          | Serra do Nordeste |          |          |          |           |          |
|------------------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|------------------|----------|----------|----------|-----------|----------|-------------------|----------|----------|----------|-----------|----------|
|                              | Merlot   |          | Cabernet |          | Sauvignon |          | Merlot           |          | Cabernet |          | Sauvignon |          | Merlot            |          | Cabernet |          | Sauvignon |          |
|                              | Veraison | Colheita | Veraison | Colheita | Veraison  | Colheita | Veraison         | Colheita | Veraison | Colheita | Veraison  | Colheita | Veraison          | Colheita | Veraison | Colheita | Veraison  | Colheita |
| Agregado <i>A. niger</i>     | 0        | 2        | 0        | 9        | 0         | 1        | 0                | 1        | 0        | 0        | 1         | 0        | 0                 | 0        | 0        | 0        | 0         | 2        |
| <i>Aspergillus japonicus</i> | 0        | 0        | 1        | 1        | 5         | 0        | 0                | 0        | 0        | 0        | 0         | 0        | 0                 | 0        | 0        | 0        | 0         | 0        |
| Total                        | 0        | 2        | 1        | 10       | 5         | 1        | 5                | 1        | 0        | 0        | 1         | 0        | 0                 | 0        | 0        | 0        | 0         | 2        |

A Serra do Nordeste é uma região mais úmida (umidade relativa do ar de em média 82% nos meses de maturação das bagas na temporada de 2011) e com maior índice pluviométrico (precipitação entre 1500-1800 mm anuais e com média de 218,5mm nos meses de maturação da uva na temporada de 2011) em relação às duas outras regiões (entre 1200-1500 mm anuais), e este fator poderia explicar a diferença no número de fungos isolados (Berlato & Fontana, 2003, Leivas *et al.*, 2005; INMET, 2011; SEPLAG, 2011). Segundo Battilani *et al.* (2006), espécies do agregado *A. niger* e os *Aspergillus* unisseriados requerem menor umidade para seu crescimento. Na região da Campanha existe maior risco de déficit hídrico, menor umidade relativa do ar (média de 72% nos meses de maturação da uva na temporada de 2011) e a menor taxa precipitação (média de 92,4mm nos meses de maturação da uva na temporada de 2011) em relação à região da Serra do Sudeste (76% umidade relativa do ar e 111,4mm de precipitação média no período de maturação das bagas na temporada de 2011), fatores que podem ter influenciado positivamente na maior ocorrência deste grupo fúngico. (Leivas *et al.*, 2005; INMET, 2011; SEPLAG, 2011).

Outro fator importante na contaminação fúngica é o tipo de cultivo. Segundo Cozzi *et al* (2007) e Battilani *et al* (2008), vinhedos verticais fazem com que os cachos fiquem mais próximos ao solo, aumentando consideravelmente a contaminação fúngica em relação a vinhedos onde é praticado o cultivo horizontal, nos quais os cachos ficam localizados em maior altura. Os esporos de *Aspergillus* seção *Nigri* sobrevivem durante o inverno no solo, e a proximidade das bagas a estes esporos facilita a infecção dos fungos. Esta afirmação dos autores está de acordo com o observado nos vinhedos do Rio Grande do Sul: nas regiões da Serra do Sudeste (Figura 18) e Campanha (Figura 19), onde a contaminação por fungos do grupo dos *Aspergillus* seção *Nigri* foi maior, o cultivo é feito de maneira vertical, e na Serra do Nordeste (Figura 20), onde foi observada menor contaminação, o cultivo é realizado de maneira horizontal.



Figura 18: Cultivo vertical realizado na região da Serra do Sudeste



Figura 19: Cultivo vertical realizado na região da Campanha.



Figura 20: Cultivo horizontal realizado na região da Serra do Nordeste

Quatorze das vinte e duas cepas foram isoladas das uvas da variedade Cabernet Sauvignon enquanto oito foram isoladas das uvas Merlot (Figura 21). Não foram encontradas diferenças significativas entre as duas variedades ( $p > 0,05$ ), porém, levando em consideração que a maioria dos isolados ocorreram nas uvas C. Sauvignon, pode-se sugerir uma maior suscetibilidade desta variedade, conforme observaram Visconti *et al.* (2008) e Battilani *et al.* (2004), que relataram uma maior suscetibilidade desta variedade em relação as demais estudadas.

Nas uvas da variedade Cabernet Sauvignon foi observado o mesmo padrão descrito por outros autores: aumento da frequência de *Aspergillus* seção *Nigri* na época da colheita em relação à época da mudança de cor das bagas. Para esta variedade, foram encontrados treze isolados na colheita e apenas um no início da mudança de cor (Figura 21). Resultados semelhantes foram observados por Belli *et al.* (2004) e Bau *et al.* (2005) na Espanha, Lasram *et al.* (2007) na Tunísia e Serra *et al.* (2003) em Portugal. A concentração de glicose é maior no período de colheita em relação ao início da mudança de cor, caracterizando melhores condições para o desenvolvimento fúngico, juntamente com o decréscimo do espessamento da cutícula (Bejaoui *et al.*, 2006). É no período de colheita também que as bagas por

estarem mais frágeis, sofrem mais injúrias devido às condições climáticas (chuvas, rajadas de vento, excesso de sol) propiciando rachaduras nos galhos e principalmente nas bagas, formando uma porta de entrada para este grupo fúngico, que se caracteriza por seu hábito oportunista.

Já para a variedade Merlot, o observado foi o oposto: maior frequência dos *Aspergillus* seção *Nigri* durante a época da mudança de cor (Figura 21). Este resultado está em desacordo com o que foi observado por outros autores, possivelmente pelo fato da época do início da mudança de cor e o tempo de maturação das uvas Merlot ser diferente em relação às uvas Cabernet Sauvignon (Serra *et al.*, 2003; Belli *et al.*, 2004; Bau *et al.*, 2005; Lasram *et al.*, 2007).

Para as duas variedades, não foram encontradas diferenças significativas na frequência dos *Aspergillus* seção *Nigri* entre os dois períodos de cultivo ( $p>0,05$ ).

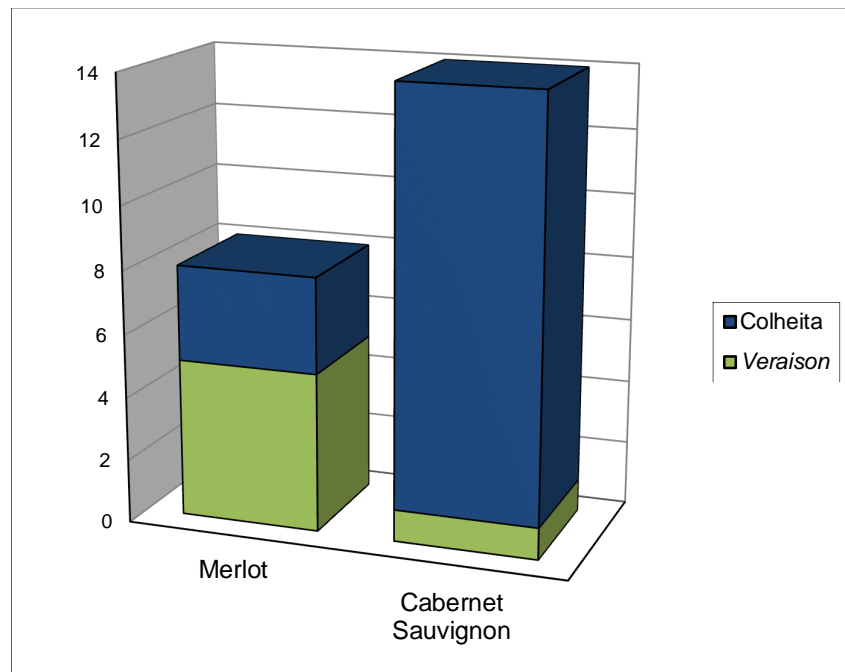


Figura 21: Frequência dos *Aspergillus* seção *Nigri* em relação a variedade de uva e o período de cultivo

### 3.2.3 Potencial ocratoxigênico

Após a identificação dos vinte e dois isolados de *Aspergillus* em nível de espécie, foi testado o seu potencial de produzir ocratoxina A. Foram utilizadas duas metodologias que se diferenciaram apenas em alguns detalhes.

Para o screening inicial, foi utilizada a metodologia proposta por Bragulat *et al.* (2001) com pequenas modificações. Esta técnica foi utilizada apenas como screening inicial, pois o meio sólido proporciona condições para a produção de diversos compostos fluorescentes pelos fungos, o que dificulta a identificação da micotoxina, caso seja produzida (Figura 22).

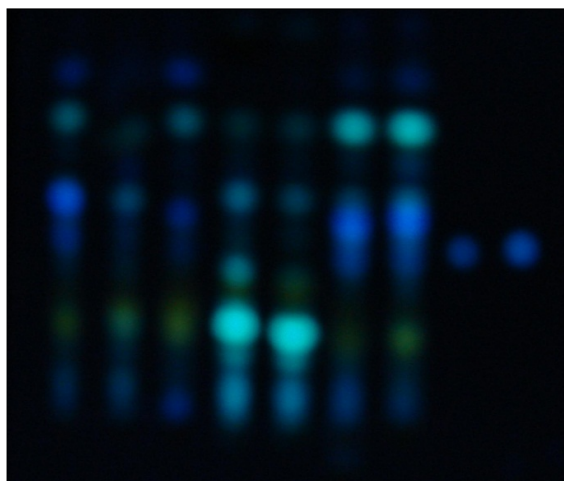


Figura 22: Fluorescência dos metabólitos produzidos pelos fungos isolados e controle positivo (padrão de OTA)

No screening inicial destacaram-se três isolados como possivelmente produtores (EVM3, SCC1 e SCC6). Estes isolados foram submetidos à outra análise, com metodologia proposta por Ponsone *et al* (2007). O diferencial desta técnica, além da concentração de esporos inoculados ser conhecida, é o meio de cultura líquido. Foi observada uma redução na produção de metabólitos neste meio, possibilitando a visualização e quantificação da OTA produzida. Para a confirmação da identidade dos compostos, foi feita a derivatização da OTA com Trifluoreto de Boro (Hunt *et al.*, 1980)

Das três cepas analisadas, apenas uma foi confirmada como produtora de OTA: a cepa EVM3, pertencente à espécie *Aspergillus japonicus* e isolada das uvas da variedade Merlot no período do *veraison* na região da Serra do Sudeste. A concentração de OTA produzida pelo isolado EVM3 foi 148 ng/mL/10<sup>6</sup> conídios.

A ocorrência de uma cepa de *Aspergillus japonicus* produtora de OTA é muito incomum. Resultados semelhantes foram relatados apenas por Batillani *et al.* (2003) na Itália e por Dalcerro *et al.* (2002) e Ponsone *et al.* (2007) na Argentina. A concentração produzida pela cepa EVM3 foi muito alta em comparação com os demais trabalhos, que encontraram 8,62 ng/mL (Ponsone *et al.*, 2007) e 13,4 ng/mL (Dalcerro *et al.*, 2002) e baixa quando comparado com as concentrações produzidas pelos principais fungos ocratoxigênicos, como *Aspergillus carbonarius*, que chegam a até 477 µg/g (Belli *et al.*, 2006).

Neste trabalho foram isolados 15 fungos do agregado *A. niger* e nenhum foi produtor de OTA. Resultados semelhantes foram encontrados no Líbano por Khoury *et al.*, (2006) e na Espanha por Abarca *et al.*, (2003); neste último caso, somente uma cepa mostrou-se produtora entre os 168 isolados do agregado *A. niger*.

### **3.3 OTA no mosto de uvas viníferas**

#### **3.3.1 Técnicas para a determinação de OTA**

Duas metodologias de extração de OTA das uvas foram testadas, ambas utilizando coluna de imunoafinidade para a purificação do composto. Primeiramente a metodologia proposta por Serra *et al.* (2004) foi utilizada, em função de ser a metodologia mais utilizada para a extração dessa micotoxina do mosto de uvas e por não utilizar solventes orgânicos, diminuindo o impacto ambiental e a exposição dos manipuladores. Nesta técnica, porém, a recuperação não repetiu o que foi encontrado na literatura (recuperação em volta de 100%). Maiores concentrações de metanol na fase de captura de OTA foram testadas, que aumentaram consideravelmente a recuperação (de 50 para 70%, com 5ml de metanol), porém a técnica tornava-se inviável na fase da *secura*, em função do tempo excessivo.



A outra metodologia testada foi adaptada do que foi proposto por Zimmerli & Dick (1996) para vinhos. Esta metodologia apresentou vantagens como a alta recuperação e repetibilidade.

Na técnica original, a eluição com Metanol:Ácido acético (98:2) era realizada uma vez, porém foi observado um aumento da recuperação em 30% realizando esta etapa em dois ciclos. Comparando as duas técnicas, foi observado que a extração com clorofórmio é mais eficiente em relação à com a solução composta por NaHCO<sub>3</sub> e PEG 8000.

A técnica de Zimmerli & Dick (1996) foi escolhida devido a sua recuperação (que se aproximou a 97%) e repetibilidade, com um coeficiente de variação médio de 4,6% (Tabela 7). O limite de detecção (LD) e limite de recuperação (LQ) foram de 0,4 ng/mL e 0,8 ng/mL, respectivamente.

Tabela 7: Recuperação do método de análise de OTA em uvas

| OTA Contaminada (ng/mL) | Recuperação (ng/mL) | Recuperação (%) | CV (%) |
|-------------------------|---------------------|-----------------|--------|
| 7,5                     | 7,6                 | 101,42          | 6,3    |
| 10                      | 9,02                | 90,23           | 2,9    |
| 20                      | 18,16               | 99,82           | 4,7    |

CV= Coeficiente de Variação

O método escolhido para as análises mostrou ser eficiente e confiável para a análise das doze amostras de mosto de uvas viníferas. Os resultados das análises confirmaram que a técnica é sensível suficientemente para determinar concentrações abaixo dos limites máximos permitidos pela legislação.

### 3.3.2 Ocorrência de OTA nas uvas

Foram analisadas as doze amostras provenientes das três principais regiões vitivinícolas do Estado e não foi encontrada a presença de OTA

A ocorrência de espécies potencialmente toxigênicas e de um isolado comprovadamente produtor de OTA é de extrema relevância, tendo em vista a possibilidade deste fungo contaminar as uvas com esta micotoxina. No entanto, a ausência da micotoxina nas amostras é atribuída, provavelmente, à falta da

ocorrência do fungo *Aspergillus carbonarius*, que é considerado o principal produtor de OTA em uvas produzidas em diferentes lugares do mundo (Visconti *et al.*, 2008; Khoury *et al.*, 2008; Ponsone *et al.*, 2010).

Ponsone *et al.* (2010) também relatou baixa incidência de *A. carbonarius* em uvas viníferas argentinas, e atribuiu a este fato a baixa contaminação com OTA nas uvas produzidas na região.

Segundo Chulze *et al.* (2006), nenhuma amostra de uvas da variedade Cabernet Sauvignon cultivadas no Uruguai apresentou contaminação por OTA. Estes resultados estão de acordo com o que foi encontrado, principalmente considerando que o Uruguai faz fronteira com o estado do Rio Grande do Sul e possui condições climáticas muito semelhantes ao estado brasileiro.

Aliada a não ocorrência de *A. carbonarius*, a localização geográfica e o clima do estado provavelmente influenciaram negativamente à ocorrência e produção de OTA pelos fungos. O estado localiza-se ao extremo sul do Brasil, sendo caracterizado por possuir clima temperado e apresentar temperaturas mais baixas em relação ao resto do país, diminuindo a probabilidade de ocorrência de *Aspergillus* seção *Nigri* e da produção desta micotoxina.

## CONCLUSÕES

A caracterização micotoxicológica das uvas viníferas é de extrema relevância na análise da qualidade dos vinhos produzidos no estado. A baixa contaminação por fungos do gênero *Aspergillus* seção *Nigri* e a ausência de ocratoxina A nas uvas demonstra que o risco da ocorrência de ocratoxina A é mais baixo em relação a outros países vitivinícolas. Porém, a ocorrência de um isolado comprovadamente produtor desta micotoxina não descarta a contaminação com esta micotoxina nas uvas e vinhos produzidos no estado. A análise comparativa dos fatores envolvendo esta contaminação é de grande relevância, pois estes fatores devem ser considerados quando for realizado um planejamento para o manejo e redução de uma possível contaminação fúngica e por OTA existentes nos vinhedos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho observou-se uma predominância de fungos saprófitos, com destaque para o gênero *Alternaria*. Maior contaminação fúngica geral foi encontrada nas uvas produzidas na região da Campanha. O gênero *Aspergillus* demonstrou baixa incidência, representando cerca de 1% da contaminação fúngica total. Entre os fungos do gênero *Aspergillus*, houve maior ocorrência da seção *Nigri*, que representou 88% dos isolados, e destes, 78% foram identificados como pertencentes ao agregado *A. niger*.

A região da Campanha apresentou o maior índice de contaminação por *Aspergillus* negros, com destaque para a variedade Cabernet Sauvignon, mais suscetível em relação à variedade Merlot. De maneira geral, mais *Aspergillus* seção *Nigri*, porém, este padrão não foi observado para a variedade Merlot, que apresentou mais *Aspergillus* no período de início da mudança de cor das uvas.

A espécie *Aspergillus carbonarius*, considerada a principal espécie produtora de OTA em uvas viníferas, não foi encontrada. Entretanto, uma cepa de *A. japonicus* demonstrou capacidade de produzir esta micotoxina nas condições testadas.

Embora o método utilizado para a detecção de OTA em uvas seja extremamente efetivo, nenhuma das amostras de uvas das duas variedades analisadas apresentaram contaminação detectável por esta micotoxina.

## REFERÊNCIAS

- ABARCA, M.L., ACCENSI, F., BRAGULAT, M.R., CABAÑES, F.J. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. **Journal of Food Protection**, 64 (6), pp. 903-906, 2001
- ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F.J. Taxonomy and significance of black aspergilli. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 86(1), pp. 33-49, 2004.
- ABRUNHOSA, L., PATERSON, R. R. M., KOZAKIEWICZ, Z., LIMA, N., & VENANCIO, A. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, 32, 240–242, 2001.
- ACADEMIA DO VINHO. Disponível em <http://www.sitedovinhobrasileiro.com.br/>. Acesso em: 25/11/2011
- ANLI, E., ÇABUK, B., VURAL, N., BAŞPINAR, E., Ochratoxin A in Turkish wines. **Journal of Food Biochemistry**. 29, 611–623, 2005.
- ATLAS SOCIOECONOMICO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. Características do território: temperatura e precipitação. Disponível em: <http://www.scp.rs.gov.br/>. Acessado em 04/01/2012
- BACHA, H., MAAROUFI, K., ACHOUR, A., HAMMAMI, M., ELLOUZ, F., CREPPY, E.E. Human ochratoxicosis and its pathologies. **Colloquium INSERM** 231, 101–110, 1993.
- BATTILANI P, GIORNI P, LANGUASCO L, PIETRI A AND BERTUZZI T. Dynamics of fungi responsible for ochratoxin A in grape. **Book of Abstracts: Bioactive Fungal Metabolites – Impact and Exploitation**. p. 47, 2001.
- BATTILANI P, LANGUASCO L, PIETRI A, BERTUZZI T AND GIORNI P. Ochratoxin A in grape and wine: Causes and conditions of production. **Journal of Plant Pathology**, v. 56, p. 553–555, 2000.
- BATTILANI, P., LOGRIECO, A., GIORNI, P., COZZI, G., BERTUZZI, T., PIETRI, A. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Vol. 84 (13), pp. 1736-1740, 2004.
- BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**. v. 111, p. 2–4, 2006.

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

BATTILANI, P., PIETRI, A., BERTUZZI, T., LANGUASCO, L., GIORNI, P., KOZAKIEWICZ, Z. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. **Journal of Food Protection** 66 (4) , pp. 633-636, 2003.

BAU, M.; BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; MINGUEZ, S.; CABAÑES, F.J. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**. v. 98, p. 125– 130, 2005.

BEJAOU, H.; MATHIEU, F.; TAILLANDIER, P.; LEBRIHI, A. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. **International Journal of Food Microbiology**. v. 111, p. 46–52, 2006.

BELAJOVA, E.; RAUOVA, D. Determination of ochratoxin A and its occurrence in wines of Slovakian retail. **Journal of Food and Nutrition Research**. Vol. 46 (2), pp. 68-74, 2007.

BELLÍ, N.; BAU, M.; MARÍN, S.; ABARCA, M.L.; RAMOS, A.J.; BRAGULAT, M.R. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**. v. 111, p. 40–45, 2006b

BELLÍ, N.; MARIN, S.; DUAIGUES, A.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 84, p. 591–594, 2004.

BELLÍ, N.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 72–77, 2004b.

BELLÍ, N.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Effect of photoperiod and day–night temperatures simulating field conditions on growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* strains isolated from grapes. **Food Microbiology**. v. 23, p. 622–627, 2006.

BERLATO, M.A.; FONTANA, D.C. **El niño e la niña: impactos no clima, na vegetação e na agricultura do Rio Grande do Sul, aplicações de previsões climáticas na agricultura**. Editora UFRGS, Porto Alegre, 2003.

BRAGULAT, R., ABARCA, L. AND CABANES, J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 71, p. 139–144, 2001.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **RESOLUÇÃO - RDC Nº 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011**, limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/>> Acesso em 5/12/2011.

BRERA, C., DEBEGNACH, F., DE SANTIS, B., IAFRATE, E., PANNUNZI, E., BERDINI, C., PRANTERA, E., MIRAGLIA, M. Ochratoxin A in cocoa and chocolate products from the Italian market: Occurrence and exposure assessment. **Food Control** 22 (10), pp. 1663-1667, 2011

BREŽNÁ, B., ŽENIŠOVÁ, K., CHOVANOVÁ, K., CHEBEŇOVÁ, V., KRAKOVÁ, L., KUČHTA, T., PANGALLO, D. Evaluation of fungal and yeast diversity in Slovakian wine-related microbial communities. **International Journal of General and Molecular Microbiology** 98 (4), pp. 519-529, 2010.

BRICEÑO, E.X., LATORRE, B.A. Characterization of cladosporium rot in grapevines, a problem of growing importance in Chile. **Plant Disease**. 92 (12), pp. 1635-1642, 2008.

BURDASPAL, P. A., & LEGARDA, T.M. Ochratoxin A in wines and grape products originating from Spain and other European countries. **Alimentaria**. Vol 36, 107–113, 1999.

CAMARGO, R.B.; PEIXOTO, A.R.; TERAÓ, D.; ONO, E.O.; CAVALCANTI, L.S. fungos causadores de podridões pós-colheita em uvas apirênicas no pólo agrícola de Juazeiro-BA e Petrolina-PE. **Revista Caatinga**, vol. 24(1), pp. 15-19, 2001.

CASTEGNARO, M., MOHR, U., PFOHL-LESZKOWICZ, A., ESTEVE, J., STEINMANN, J., TILLMANN, J., MICHELSON, T., BARTSCH, J. Sex- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlated with DNA adduction. **International Journal of Cancer**. Vol. 77, 70–75, 1998.

CERAIN, A.L.; PEÑAS, E.G.; JIMENEZ, A.M.; BELLO, J. Contribution to the study of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**. Vol. 19(11), pp 1058-1064, 2002.

CHIOTTA, M.L.; PONSONE, M.L.; COMBINA, M.; TORRES, A.; CHULZE, S. Aspergillus section Nigri species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 136 , pp. 137–141, 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**. v. 111, p. 5-9, 2006.

CODEX ALIMENTARIUS – Food and Agricultural Organization & World Health Organization (FAO/WHO). Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net/>> Acesso em: 29.12.2011

COLEY-SMITH, J.R.; VERHOFF, K.; JARVIS, W.R. **The Biology of Botrytis**. London: Academic Press, 1980.

COZZI, G, PERRONE, G, EPIFANI, F, PASCALE, M AND VISCONTI, A. May 21–25 2007. "Epidemiology of ochratoxin A producing fungi in Apulian vineyards". In Poster 1422r presented at **XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, 2007 May 21–25, Istanbul

DALCERO, A., MAGNOLI, C., HALLAK, C., CHIACCHIERA, S.M., PALACIO, G., ROSA, C.A.R. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus section Nigri* in Argentina. **Food Additives and Contaminants**. Vol. 19 (11), pp. 1065-1072, 2002.

DIAZ, G.A.; TORRES, R.; VEGA, M.; LATORRE, B.A. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. **International Journal of Food Microbiology**. v. 133, p. 195– 199, 2009.

DIGUTA, C.F., VINCENT, B., GUILLOUX-BENATIER, M., ALEXANDRE, H., ROUSSEAUX, S. PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. **Food Microbiology**. Vol. 28 (6), pp. 1145-1154, 2011.

DOMIJAN, A. M., & PERAICA, M. Ochratoxin A in wine. **Arhivza higijenu rada i toksikologiju**, 56, 17–20, 2005.

DUARTE, S.C.; PENA, A.; LINO, C.M. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**. Vol. 27, pp. 187-198, 2010.

EFSA (European Food Safety Authority), 2006. **Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the Commission related to ochratoxin A in food**. Question N° EFSA-Q-2005-154. Adotado em 4 Abril 2006, The EFSA Journal 365. Disponível em: [http://www.efsa.europa.eu/en/science/contam/contam\\_opinions/1521.html](http://www.efsa.europa.eu/en/science/contam/contam_opinions/1521.html).

EUROPEAN COMMISSION. **Scientific Committee for Food. Opinion on Ochratoxin A**, CS/CNTM/MYC/14, Brussels. 18 September, 1998

European Commission, 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union** 364, 5–24, 2006.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION (FAO). Disponível em <http://www.fao.org/>. Acesso em 26/11/2011.

FLEET, G.H. AND HEARD, G.M. Yeasts – growth during fermentation. In **Wine Microbiology and Biotechnology** ed. Fleet, G.H. pp. 27–54 Chur: Harwood Academic Publishers, 1993.

FLEET, G.H. (1999) Microorganisms in food ecosystems. **International Journal Food Microbiology**. Vol. 50, 101–117.



FLEET, G.H. Wine. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**, 2<sup>nd</sup> edn ed. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. pp. 747–772. Washington, DC: ASM Press, 2001.

GARIJO, P.; SANTAMARIA, P.; LOPEZ, R.; SANZ, S. OLARTE, C.; GUTIERREZ, A.R. The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. **International Journal of Food Microbiology**. Vol.125 (2), pp. 141-145, 2008.

GUERRA, C.C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M.C; CAMARGO, U.A. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. **Embrapa uva e vinho: Documentos**. V. 48, 2009.

HOCKING, A.D., VARELIS, P., PITT, J.I., CAMERON, S.F., LEONG, S.-L.L. Occurrence of ochratoxin A in Australian wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. Volume 9 (1), pp 72-78, 2003.

HOCKING, A.D., LEONG, S.-L.L., KAZI, B.A., EMMETT, R.W., SCOTT, E.S. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 119 (1-2) , pp. 84-88, 2007.

HUNT, D.C.; MCCONNIE, B.R.; CROSBY, N.T.. Confirmation of ochratoxin A by chemical derivatization and high performance liquid chromatography. **Analyst**.105:89–90, 1980.

HURST, W.J., MARTIN JR., R.A. High-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A in artificially spiked cocoa beans. **Journal of Chromatography**. Vol. 265 (2), pp. 353-356, 1983.

IARC (International Agency for Research on Cancer). **Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: World Health Organization, v.56, p.489, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO (IBRAVIN). Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/>> Acesso em: 25/11/2011.

IOANNOU-KAKOURI, E., ALETRARI, M., CHRISTOU, E., RALLI, A., KOLIU, A., CHRISTOFIDOU, M.,. Occurrence and control of mycotoxins in foodstuffs in Cyprus. In: Logrieco, A., Visconti, A. (Eds.), **An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 51–65, 2004.

IMPERATO, R., CAMPONE, L., PICCINELLI, A.L., VENEZIANO, A., RASTRELLI, L. Survey of aflatoxins and ochratoxin a contamination in food products imported in Italy. **Food Control**, Vol. 22 (12), pp. 1905-1910, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em 26/11/2011

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). **Rede de Estações Automáticas e Convencional do Instituto Nacional de Meteorologia**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/>>. Acesso em 10/02/2012

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2001. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. WHO Food Additives Series 47; FAO Food and Nutrition Paper 74. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>>

KHOURY, A.; RIZK, T.; LTEIF, R.; AZOURI, H.; DELIA, M.L.; LEBRIHI, A. Occurrence of ochratoxin A- and aflatoxin B1-producing fungi in Lebanese grapes and ochratoxin a content in musts and finished wines during 2004. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 54, pp. 8977–8982, 2006,

KHOURY, A.; RIZK, T.; LTEIF, R.; AZOURI, H.; DELIA, M.L.; LEBRIHI, A. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine–grapes and musts. **Food Chem. Toxicol.** Vol. 46, 2244–2250, 2008.

KILCH, M.A. **Identification of common Aspergillus species**. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands, 2002.

LARCHER, R., & NICOLINI, G. Survey of ochratoxin A in musts, concentrated musts and wines produced or marketed in Trentino (Italy). **Journal of Commodity Sciences**. Vol. 40, 69–78, 2001.

LASRAM, S.; BELLÍ, N.; CHEBIL, S.; NAHLA, Z.; AHMED, N.; SANCHIS, V.; GHORBEL, A. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. **International Journal of Food Microbiology**. v. 114, p. 376–379, 2007.

LEIVAS, J.F.; BERLATO, M.A.; FONTANA, D.C. Risco de deficiência hídrica decendial na metade sul do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. V.10, n.2, p.397–407, 2006.

LEGARDA, T.M., BURDASPAL, P.A. Ocratoxina A em cervezas elaboradas em Espanha y em otros países europeos. **Alimentaria**, 291, 115–122, 1998

LEONG, S.L., HOCKING, A.D., PITT, J.I., KAZI, B.A., EMMETT, R.W., SCOTT, E.S. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 111 , pp. S10-S17, 2006.

LEVI, C.P., TRENK, H.L., MOHR, H.K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. 57 (4), pp. 866-870, 1974.

MAGNOLI, C.; VIOLANTE M.; COMBINA, M.; PALACIO G.; DALCERO, A. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**. Vol. 37, pp. 179–184, 2003.

MAJERUS, P., OTTENEDER, H. Nachweis und Vorkommen von Ochratoxin A in Wein und Traubensaft. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau** 92, 338–390, 1996

MAJERUS, P., BRESCH, H., & OTTENEDER, H. Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. **Archives fur Lebensmittelhygiene**, 51, 95–97, 2000.

MASIH, E.I., SLEZACK DESCHAUMES, S., MARMARAS, I., BARKA, E.A., VERNET, G., CHARPENTIER, C., ADHOLEYA, A., PAUL, B.,. Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea* causing the grey mould disease of grapevine. **FEMS Microbiol. Lett.** 202, 227–232. 2001

MARKAKI, P., DELPONT-BINET, C., GROSSO, F., DRAGACCI, S., Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. **Journal of Food Protection** 64, 533–537, 2001.

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.V., CRESPO-SEMPERE, A., SÁNCHEZ-HERVÁS, M., ELIZAQUIVEL, P., AZNAR, R., RAMÓN, D. Molecular characterization of the black *Aspergillus* isolates responsible for ochratoxin A contamination in grapes and wine in relation to taxonomy of *Aspergillus* section *Nigri*. **International Journal of Food Microbiology** 132 (1), pp. 33-41, 2009.

MATEO, R., MEDINA, Á., MATEO, E.M., MATEO, F., JIMÉNEZ, M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**. Vol.119 (1-2) , pp. 79-83, 2007.

MEDINA, A.; MATEO, R.; LÓPEZ-OCAÑA, L.; VALLE-ALGARRA, F.M.; JIMÉNEZ, M. Study of Spanish Grape Mycobiota and *Aspergillus tubingensis* and Other Ochratoxin A production by Isolates of Members of *Aspergillus* Section *Nigri*. **Applied Environmental Microbiology**. Vol. 71(8), p. 4696–4702, 2005.

MELETIS, K.; MEIMAROGLOU, S.M.; MARKAKI, P. Determination of ochratoxin A in grapes of Greek origin by immunoaffinity and high-performance liquid chromatography. **Food Additives and Contaminants**. Vol 24 (11), 2007.

MELLO, L.M.R. Vitivinicultura brasileira: panorama 2010. Embrapa Uva e Vinho. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/>. Acesso em 25/11/2011.

MELLO, L.M.R. Vitivinicultura brasileira: panorama 2011. Embrapa Uva e Vinho. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/>. Acesso em 25/11/2011.

MICOTOXINAS ONLINE. Fonseca, H. Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br/>. Acessado em 29/01/2011

MIRAGLIA, M., & BRERA, C. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. **Reports on tasks for scientific cooperation. Directorate-General Health and Consumer Protection**, Rome, Italy, 2002.

MIKUSOVA, P.; RITIENI, A.; SANTINI, A.; SROBAROVA, A. Contamination by mould of grape berries in Slovakia. **Food Additives and Contaminants**. Vol 27 (5), pp. 738-747, 2010.

MIRZAEI, S., GOLTAPPEH, E.M., SHAMS-BAKHSH, M., SAFAIE, N. Identification of Botrytis spp. on plants grown in Iran. **Journal of Phytopathology** 156 (1), pp. 21-28, 2008.

NALLY, M.C., PESCE, V.M., MATURANO, Y.P., MUÑOZ, C.J., COMBINA, M., TORO, M.E., DE FIGUEROA, L.I.C., VAZQUEZ, F. Biocontrol of Botrytis cinerea in table grapes by non-pathogenic indigenous Saccharomyces cerevisiae yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. **Postharvest Biology and Technology** 64 (1), pp. 40-48, 2012.

NIKOLOV, I.G., PETKOVA-BOCHAROVA, D., CASTEGNARO, M., PFOHL-LESKOWICZ, C., GILL, N., DAY, C., CHERNOZEMSKY, I.N., Molecular and epidemiological approaches to the etiology of urinary tract tumors in an area with Balkan endemic nephropathy. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology** 15, 201–207, 1996.

NG, W.; MANKOTIA, M.; PANTAZOPOULOS, P.; NEIL, R.J.; SCOTT, P.M. Ochratoxin A in wine and grape juice sold in Canada. **Food Additives and Contaminants**. Volume 21 (10), pp 971-981, 2004.

OLIVEIRA, M.A , GUERNER-MOREIRA, J.B , MESQUITA, M.M.B , ABREU, I. Important phytopathogenic airborne fungal spores in a rural area: Incidence of Botrytis cinerea and Oidium spp. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. Vol. 16 (2), pp. 197-204, 2009.

OSTRY, V., SKARKOVA, J., KUBATOVA, A., PROCHAYKOVA, I., RUPRICH, J., VAJCNER, P., ET AL. Grape vine, toxigenic microfungi a ochratoxin A. **Vinarsky obzor**, 98, 389–391, 2005.

OTTENEDER, H., & MAJERUS, P. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: Influence of the type of wine and its geographical origin. **Food Additives and Contaminants**, 17,793–798, 2000.

OZDEN, S., AKDENIZ, A.S., ALPERTUNGA, B. Occurrence of ochratoxin A in cereal-derived food products commonly consumed in Turkey. **Food Control** 25 (1), pp. 69-74, 2011.

PAYEN, J., GIRARD, T., GAILLARDIN, M., LAFONT, P. Sur la presence des mycotoxines dans les bieres. **Microbiologie-Aliments-Nutrition** 1, 143–146, 1983.

PERRONE, G.; STEA G.; EPIFANI, F.; VARGA, J.; JENS C. FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. **Fungal Biology**. Vol.115 (11), pp. 1138-1150, 2011.

PITT, J.I. Toxigenic fungi: Which are important? **Medical Mycology**, 38 (SUPPL. 1), pp. 17-22, 2000

PITT, J.I., HOCKING, A.D.. **Fungi and Food Spoilage**. Blackie Academic & Professional, London, 1997.

PITT, J.I., RICO, E., JHONSON, S. **Food Mold**. BCN Research Laboratories, Rockford, Tennessee, 2009.

PFOHL-LESZKOWICZ, A., MANDERVILLE, R.A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition and Food Research** 51 (1), pp. 61-99, 2007.

PFOHL-LESZKOWICZ, A., PINELLI, E., BARTSCH, H., MOHR, U., CASTEGNARO, M. Sex- and strain-specific expression of cytochrome P450s in ochratoxin A-induced genotoxicity and carcinogenicity in rats. **Molecular Carcinogenesis** 23, 76–85, 1998

PONSONE, M.L.; CHIOTTA, M.L.; COMBINA, M.; TORRES, A.; KNASS, P.; DALCERO, A.; CHULZE, S. Natural Occurrence of Ochratoxin A in Musts, Wines and Grape Vine Fruits from Grapes Harvested in Argentina. **Toxins**. Vol. 2, 1984-1996, 2010

PONSONE, M.L.; COMBINA, M.; DALCERO, A.; CHULZE, S. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 114, pp. 131–135, 2007.

RACZ, L.; RACZ, J.; CSUTORAS, S.; OVARI, M.; ZARAY, G. Effect of variety of grapes on trace element and ochratoxin A contents of Hungarian red wines. **Toxicological and Environmental Chemistry**. Vol. 92 (8), pp 609-616, 2010.

RADIC, B., FUCHS, R., PERAICA, M., LUCIS, A.,. Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. **Toxicological Letters** 91, 105–109, 1997.

RATOLA, N., MARTINS, L., ALVES, A. Ochratoxin A in wines-assessing global uncertainty associated with the results. **Analytica Chimica Acta**. Vol. 513, pp. 319-324, 2004.

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y.J.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**. Vol. 159, pp.18–46, 2006.

ROMANCINO, D.P., DI MAIO, S., MURIELLA, R., OLIVA, D. Analysis of non-*Saccharomyces* yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy). **Journal of Applied Microbiology**. Vol. 105 (6), pp. 2248-2254, 2008.

ROSA, C.A., PALACIOS, V., COMBINA, M., FRAGA, M.E., DE OLIVEIRA REKSON, A., MAGNOLI, C.E., DALCERO, A.M. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants** 19 (4), pp. 408-414, 2002.

ROSA, C.A.R., MAGNOLI, C.E., FRAGA, M.E., DALCERO, A.M., SANTANA, D.M.N. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Food Additives and Contaminants** 21 (4), pp. 358-364, 2004.

SAMSON, R.A.; NOONIM, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. **Studies in Mycology**. v. 59, p. 129–145, 2007.

SAGE, L., KRIVOBOK, S., DELBOS, E., SEIGLE-MURANDI, F., CREPPY, E.E. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50 (5), pp. 1306-1311, 2002.

SAWANT, I.S., SAWANT, S.D., ADSULE, P.G. Studies on fungi associated with post-harvest decay in table grapes from Maharashtra. **Acta Horticulturae** 785, pp. 425-430, 2008

SECRETARIA DE PLANEJAMENTO, GESTÃO E PARTICIPAÇÃO CIDADÃ (SEPLAG). Atlas Socioeconômico do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www.scp.rs.gov.br/>>. Acesso em 02/01/2012.

SHEPHARD, G.S., FABIANI, A., STOCKENSTRÖM, S., MSHICILELI, N., SEWRAM, V. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51, 1102–1106, 2003.

SERRA, R.; ABRUNHOSA, L.; KOZAKIEWICZ, Z.; VENÂNCIO, A. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**. v. 88, p. 63– 68, 2003

SERRA, R., MENDONÇA, C., ABRUNHOSA, L., PIETRI, A., VENÂNCIO, A. Determination of ochratoxin A in wine grapes: Comparison of extraction procedures and method validation. **Analytica Chimica Acta** 513 (1) , pp. 41-47, 2004;

SERRA, R.; LOURENÇO, A.; ALIPIO, P.; VENÂNCIO, A. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Mycological Research**. v. 110, p. 971-978, 2006.

SHUNDO, L.; ALMEIDA, A.P.; ALABURDA, J.; RUVIERI, V.; NAVAS, S.A.; SABINO, L.M. ochratoxin a in wines and grape juices commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. Vol. 37, pp. 533-537, 2006.

SIANTAR, D.P., HALVERSON, C.A., KIRMIZ, C., PETERSON, G.F., HILL, N.R. Ochratoxin A in wine: survey by antibody- and polymeric-based SPE columns using HPLC/fluorescence detection. **American Journal of Enological Viticulture** 54, 170–177, 2003.

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** 49, 2733–2740, 2001.

SOUFLEROS, E.H., TRICARD, CH., BOLOUMPASI, E.C. Occurrence of ochratoxin A in Greek wines. **Journal of Science of Food and Agriculture** 83, 173–179, 2003.

SPADARO, D., CIAVORELLA, A., LORE, A., GARIBALDI, A., GULLINO, M.L. Low levels of ochratoxin A in wines from Piedmont. **Communications in agricultural and applied biological sciences**. Volume 72 (2), pp 327-332, 2007.

STEFANAKI, I., FOUFA, E., TSATSOU-DRITSA, A., DAIS, P. Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried vine fruits. **Food Additives and Contaminants** 20, 74–83, 2003.

STEEL, C.C., GREER, D.H. Effect of climate on vine and bunch characteristics: Bunch rot disease susceptibility. **Acta Horticulturae**. Vol. 785, pp. 253-262, 2008.

TEIXEIRA, T.R.; HOELTZ, M.; EINLOFT, T.C.; DOTTORI, H.A.; MANFROI, V.; NOLL, I.B. Determination of ochratoxin A in wine from the southern region of Brazil by thin layer chromatography with a charge-coupled detector. **Food Additives and Contaminants**. Vol.4 (4), pp. 289-293, 2011.

TONIETTO, J.; GUERRA, C.C.; MANDELLI, FRANCISCO, M.; ZANUS, M.C.; CAMARGO, U.A. **Conhecendo o essencial sobre uva e vinhos**. Embrapa uva e vinho, n 48, 2009.

TOURNAS, V.H., KATSODAS, E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 105 (1), pp. 11-17, 2005.

TOURNAS, V.H. AND STACK, M.E. Production of alternariol and alternariol monomethyl ether by *Alternaria* grown on fruits at various temperatures. **Journal of Food Protection** 64, 528–532, 2001.

DE LA TORRE, M.J., MILLAN, M.C., PEREZ-JUAN, P.M., MORALES, J., ORTEGA, J.M. Changes in the microbiota during ripening of two *Vitis vinifera* grape varieties grown in southern Spain. **Microbios** 96 (385), pp. 165-176, 1998

TURCOTTE, A.M., SCOTT, P.M. Ochratoxin a in cocoa and chocolate sampled in Canada. **Food Additives and Contaminants**. Vol. 28 (6), pp. 762-766, 2011

US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Systematic Botany and Mycology Laboratory. Available at: <<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/framephotogallery.cfm?gen=Trichoderma>>. Acessado em 12/12/2011

VAN DER MERWE, K.J., STEYN, P.S., FOURIE, L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature** 205, 1112–1113, 1965.

VARGA, J., KISS, R., MATRAI, T., MATRAI, T., & TEREN, J. Detection of ochratoxin A in Hungarian wines and beers. **Acta Alimentaria** 34, 381–392, 2005.

VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin A in grapes and grape derived products. **Trends in Food Science & Technology**. Vol. 17, pp. 72–81, 2006.

VISCONTI, A., PERRONE, G., COZZI, G., SOLFRIZZO, M. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. **Food Additives and Contaminants** 25 (2) , pp. 193-202, 2008.

WELKE, J.E., HOELTZ, M., NOLL, I.B. Aspects related to the presence of toxigenic fungi in grapes and ochratoxin A in wines. **Ciencia Rural** 39 (8), pp. 2567-2575, 2009.

ZAMBONELLI, C. **Microbiologia e biotecnologia dei vini**. Bologna: Edagricole, 1998.

ZAHAVI, T.; COHEN, L.; WEISS, B.; SCHENA, L.; DAUS, A.; KAPLUNOV, T.; ZUTKHI, J.; BEN-ARIE, R.; DROBY, S. Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. **Postharvest Biology and Technology**, Vol. 20 (2000), pp. 115–124

ZIMMERLI, B., DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants** 13 (6), pp. 655-668, 1996.