



MICHELLE FERREIRA TERRA

**INCIDÊNCIA E CONTROLE DE FUNGOS DO
GÊNERO *Aspergillus* Seção *Nigri* EM UVAS
VINÍFERAS CULTIVADAS NA REGIÃO
TROPICAL DO BRASIL**

LAVRAS – MG

2015

MICHELLE FERREIRA TERRA

**INCIDÊNCIA E CONTROLE DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus*
Seção *Nigri* EM UVAS VINÍFERAS CULTIVADAS NA REGIÃO
TROPICAL DO BRASIL**

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

Orientador

Dr. Luis Roberto Batista

LAVRAS – MG

2014

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

Terra, Michelle Ferreira.

Incidência e controle de fungos do gênero *Aspergillus* Seção
Nigri em uvas viníferas cultivadas na região tropical do Brasil /
Michelle Ferreira Terra. – Lavras: UFLA, 2015.

90 p. : il.

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

Orientador(a): Luis Roberto Batista.

Bibliografia.

1. *Aspergillus*. 2. Seção *Nigri*. 3. Uva. 4. Fungicidas. 5. Brasil. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MICHELLE FERREIRA TERRA

**INCIDÊNCIA E CONTROLE DE FUNGOS DO GÊNERO *Aspergillus*
Seção *Nigri* EM UVAS VINÍFERAS CULTIVADAS NA REGIÃO
TROPICAL DO BRASIL**

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

APROVADA em 19 de dezembro de 2014.

Dra. Fabiana Reinis Franca Passamani	UFLA
Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista	UFLA
Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza	EPAMIG
Dra. Caroline Lima Angélico	TBIO Soluções Biotecnológicas

Dr. Luis Roberto Batista
Orientador

**LAVRAS – MG
2014**

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, pela proteção, amparo e luz em todos os momentos.

*Aos meus queridos pais, Evandro e Dalila,
pelo incentivo, confiança, pelas orações e apoio incondicional.*

A minha irmã Mariana, pela admiração e carinho sempre.

Aos meus avós, pela preocupação e imenso amor.

*Ao meu amor, Hugo, pela paciência, incentivo, companheirismo e por acreditar
e torcer pela minha felicidade sempre.*

Vocês são pedaços de mim.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Luis Roberto Batista, pelas oportunidades, paciência de escutar e ensinar, disponibilidade de sempre me atender, amizade e confiança na minha capacidade de conduzir este estudo. Muito obrigada.

Ao pesquisador da Embrapa Semiárido, Dr. Giuliano Elias Pereira, pela parceria, apoio e oportunidade de realizar este estudo em uma região vitivinícola tropical que apresenta características peculiares que a diferem das demais áreas produtoras de vinho do mundo. Também agradeço pela disponibilidade em nos receber e pelas ajudas nas coletas e no envio das amostras.

À Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza, pela coorientação, disponibilidade em me atender e por compartilhar seus conhecimentos.

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

Ao Wilder, pelo auxílio e grandes ajudas nas análises de quantificação da ocratoxina A.

Às amigas do Laboratório de Micologia e Micotoxinas em Alimentos, Abiah, Gislaine, Priscilla, Thaiana, Luisa, Noelly, Dani, Daiani, Sirlei e Vanessa, por todo o apoio, ajuda nos experimentos, carinho e momentos de descontração. Em especial, agradeço às minhas amigas Nathasha e Fabiana Passamani, pela força, incentivo e apoio sempre; pelas risadas e momentos de alegrias e também por me escutarem e apoiarem nos momentos difíceis. Mesmo distantes não mediram esforços para me ajudar a superar as dificuldades. Obrigada por tudo!

À Andréia e à Cintia, amigas e companheiras de República. Obrigada pelo carinho, conselhos, ajudas, amizade e pelos bons momentos de descontração.

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

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado no Brasil e de doutorado sanduíche no exterior. Agradeço a oportunidade de realização de parte do meu doutorado na Universidade da Flórida, nos EUA. Espero contribuir com os conhecimentos adquiridos no exterior para o desenvolvimento da pesquisa no Brasil.

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

RESUMO GERAL

Os *Aspergillus* Seção *Nigri* têm sido considerados os principais fungos responsáveis pela contaminação de uvas com OTA. A prevenção, no campo, do crescimento desses fungos é a estratégia mais efetiva para controlar a presença desta toxina nos alimentos. Este estudo foi realizado com os objetivos de avaliar a incidência dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* em diferentes cultivares de uvas viníferas da região tropical do Brasil e verificar o efeito de fungicidas sobre o crescimento de *A. carbonarius* e a produção de OTA. Os *Aspergillus* Seção *Nigri* foram isolados de cinco cultivares de uvas e identificados morfológicamente. A quantificação de OTA dos isolados foi realizada por HPLC. Foram isolados, no total, 272 fungos, sendo os de maior frequência nas uvas o *A. niger* Agregado (42%), seguido da espécie *A. carbonarius* (38%). A uva 'Petit Verdot' foi a que apresentou a maior incidência dos *Aspergillus* Seção *Nigri*. Todos os isolados de *A. carbonarius* (103) foram produtores de OTA, enquanto das demais espécies nenhum dos isolados foi ocratoxigênico. Os resultados demonstraram que a cultivar de uva pode influenciar a incidência dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri*. Além disso, para a região, o potencial risco de contaminação das uvas com OTA está relacionado com a alta frequência de *A. carbonarius*. Devido à elevada frequência desta espécie, também foi avaliado o efeito de diferentes fungicidas no crescimento e na produção de OTA. Para isso, foi realizado *screening* de cinco fungicidas comumente utilizados na cultura da uva no Brasil, em meio CYA inoculado com *A. carbonarius* com posterior incubação a 25 °C e avaliação diária do diâmetro da colônia, durante dez dias. A OTA foi extraída no décimo dia e quantificada por HPLC. Em seguida, determinaram-se a concentração mínima inibitória do crescimento do fungo e os efeitos dos fungicidas sobre a produção de OTA em meio semissintético à base de uva, com incubação a 15, 20 e 30 °C, durante 20 dias. O efeito dos fungicidas diretamente nas uvas também foi avaliado. Na dose comercial recomendada, a maioria dos fungicidas testados foi efetiva no controle do crescimento de *A. carbonarius* e na produção de OTA *in vitro*, sendo este efeito influenciado pelo tipo de fungicida, a dose e a temperatura. A temperatura foi considerada fator determinante que influencia a efetividade dos fungicidas sobre o crescimento de *A. carbonarius* e a produção de OTA, tendo a maior redução do crescimento e a maior produção de OTA sido detectados a 15 °C. As doses dos fungicidas testadas não foram efetivas no controle de *A. carbonarius* em uvas. Assim, o efeito direto dos fungicidas nas uvas deve ser mais estudado, a fim de se obter uma maior aproximação das condições que ocorrem no campo.

Palavras-chave: *Aspergillus*. Seção *Nigri*. Uva. Fungicidas. Brasil.

GENERAL ABSTRACT

The *Aspergillus* section *Nigri* is reported as the main contaminant species of wine grapes. The production profile of OTA can be changed under different fungus cultivation conditions, such as availability of water, nutrients, pH and temperature. Thus the prevention of growth of mycotoxin-producing fungi is the most effective strategy for controlling the presence of mycotoxins in foods. In this sense, the present study aimed to evaluate the occurrence of *Aspergillus* section *Nigri* in different grapes varieties cultivated in tropical vineyard of Brazil, and evaluate the impact of the application of several fungicides on *A. carbonarius* growth and OTA production. The *Aspergillus* Seção *Nigri* were isolated from five grape cultivar and morforlogical identified. OTA was quantify by HPLC. A total of 272 isolates of *Aspergillus* section *Nigri* was isolated and identified in the following species *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. niger* Agregado, *A. foetidus*, *A. aculeatus* and *A. japonicus*. Among them, *A. niger* Agregado was the most common specie in all grape samplings (42%), followed by the *A. carbonarius* (38%). All isolates of *A. carbonarius* (103) were OTA producers. The other species were not ochratoxigenic. These data suggest that the potential risk of OTA contamination in grapes was associated with *A. carbonarius*, due to the high frequency of occurrence and the OTA levels produced in vitro. Five fungicides used in Brazilian grapes were screen in CYA media and then incubated at 25°C. The colony diameter was measured every day during ten days of incubation period. OTA was quantified after period of incubation by HPLC. Then, the minimum inhibitory concentration (MIC) of each fungicide for *A. carbonarius* growth on semi synthetic grape medium at 15, 20 and 30°C was found. The effect of fungicides on *A. carbonarius*-inoculated grapes was investigated. At the doses recommended by manufacturers the majority of fungicides tested reduced *A. carbonarius* growth rate and OTA production. This effect was affected by fungicide, dose and temperature. The temperature was the main factor that affected the fungicides effectiveness again *A. carbonarius* growth and OTA production. The reduced growth and OTA levels were higher at 15°C than 20 and 30°C. The fungicides doses tested on grapes were not effective.

Keywords: *Aspergillus*. Section *Nigri*. Grape. Fungicides. Brazil.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Estrutura da ocratoxina A.....19

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Municípios pertencentes à região do Vale do Submédio São Francisco, situada no nordeste brasileiro, com as respectivas localizações das vinícolas (1, 2 e 3) onde foram coletadas as amostras de uvas.....39
- Figura 1 Frequência de ocorrência das espécies em relação ao total de *Aspergillus* Seção *Nigri* isolados das uvas42
- Figura 2 Porcentagem de *A. Seção Nigri* isolados das diferentes cultivares de uva. Os valores representam a média do número de isolados obtidos em cada cultivar.....43
- Figura 3 Distribuição das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* entre as diferentes cultivares de uva. Valores representam o número médio de isolados das espécies obtidos das cultivares45

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Efeito das diferentes doses dos fungicidas F5 (Folicur), F4 (Cuprogard) e F3 (Kocide) sobre o crescimento de *A. carbonarius* em meio CYA, durante dez dias de incubação a 25 °C. Valores são representados pela média dos dois isolados e das repetições71
- Figura 2 Efeito dos três fungicidas na taxa de crescimento de *A. carbonarius* cultivado em CYA a 25 °C72
- Figura 3 Efeito das diferentes doses do fungicida F1 sobre o crescimento de *A. carbonarius* cultivado em meio semissintético à base de uva, nas temperaturas de 15, 20 e 30 °C. Valores são representados pela média dos dois isolados e das repetições79
- Figura 4 Efeito das diferentes doses do fungicida F2 sobre o crescimento de *A. carbonarius* cultivado em meio semissintético à base de uva, nas temperaturas de 15, 20 e 30 °C. Valores são representados pela média dos dois isolados e das repetições80
- Figura 5 Efeito das diferentes doses do fungicida F5 sobre o crescimento de *A. carbonarius* cultivado em meio semissintético à base de uva, nas temperaturas de 15, 20 e 30 °C. Valores são representados pela média dos dois isolados e das repetições81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Frequência de distribuição da concentração de OTA dos isolados de <i>A. carbonarius</i> em CYA.....	46
----------	---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Fungicidas estudados, empresa fabricante, ingrediente ativo e dose comercial recomendada.....	63
Tabela 2	Efeito das variáveis estudadas sobre o crescimento de <i>A. carbonarius</i> em meio CYA a 25 °C (P<0,05).....	69
Tabela 3	Crescimento médio de <i>A. carbonarius</i> , mensurado pelo diâmetro da colônia, obtido a partir dos diferentes fungicidas testados. Valores são representados pela media dos dois isolados e das repetições ± erro padrão.....	69
Tabela 4	Efeito dos fungicidas na produção de OTA por <i>A. carbonarius</i> em meio CYA após dez dias de incubação a 25 °C. Valores são representados pela média dos dois isolados e das repetições±erro padrão.....	73
Tabela 5	Crescimento de <i>A. carbonarius</i> , a 15, 20 e 30 °C, em meio semissintético de uva com os fungicidas F1, F2 e F5, nas concentrações D, dose comercial recomendada; D1, 0,75xD; D2, 0,5xD; D3, 0,25xD; D4, 0,125xD; D5, 0,0125xD e D6, 0,006xD....	76
Tabela 6	ANAVA do efeito das variáveis estudadas sobre o crescimento de <i>A. carbonarius</i> em meio CYA a 25 °C (P<0,05).....	77
Tabela 7	Efeito dos fungicidas na produção de OTA por <i>A. carbonarius</i> cultivado em meio semissintético à base de uva, a 15, 20 e 30 °C. Valores são representados pela média dos dois isolados e das repetições±erro padrão.....	83

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	13
	INTRODUÇÃO GERAL	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Uvas e vinhos no Brasil	15
2.2	Vitivinicultura no Vale do Submédio São Francisco	17
2.3	Ocratoxina A	18
2.4	Espécies produtoras de ocratoxina A em uvas	20
2.4.1	<i>Aspergillus carbonarius</i>	21
2.4.2	<i>Aspergillus niger</i>	22
2.5	Ocratoxina A em uvas e vinhos	22
2.6	Fatores relacionados com o crescimento e a produção de OTA por fungos	24
2.7	Efetividade de fungicidas no controle de fungos toxigênicos	25
	REFERÊNCIAS	27
	CAPÍTULO 2 Incidência dos fungos <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> em diferentes cultivares de uvas viníferas do Brasil	35
1	INTRODUÇÃO	36
2	OBJETIVO GERAL	37
2.1	Objetivos específicos	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Área de estudo	38
3.2	Amostragem das uvas	38
3.3	Isolamento e identificação dos <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i>	39
3.4	Extração e quantificação de OTA das culturas	40
3.4.1	Preparo da curva padrão	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Ocorrência das espécies de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i>	42
4.2	Distribuição das espécies de <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> entre as cultivares de uva	43
4.3	Potencial ocratoxigênico das espécies	45
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	CAPÍTULO 3 Efeito de fungicidas no crescimento e na produção de ocratoxina A por <i>Aspergillus carbonarius</i> isolado de uvas viníferas cultivadas no Brasil	58
1	INTRODUÇÃO	59
2	OBJETIVO GERAL	61

2.1	Objetivos específicos	61
3	MATERIAL E MÉTODOS	62
3.1	Isolados fúngicos	62
3.2	Obtenção do inóculo.....	62
3.3	<i>Screening</i> de fungicidas em CYA 3 <i>Screening</i> de fungicidas em CYA.....	62
3.4	Efeito de fungicidas sobre o desenvolvimento de <i>A. carbonarius</i> e sobre a produção de OTA em meio semissintético à base de uva	64
3.5	Extração e análise de OTA	65
3.6	Ensaio de recuperação.....	66
3.7	Efeito de fungicidas nas uvas inoculadas com <i>A. carbonarius</i>	66
3.8	Análises estatísticas	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1	<i>Screening</i> de fungicidas em CYA.....	68
4.2	Efeito de fungicidas em meio semissintético à base de uva	74
4.3	Efeito de fungicidas nas uvas	84
5	CONCLUSÃO.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

As instituições de controle da segurança alimentar têm demonstrado grande interesse em pesquisas relacionadas à incidência de micotoxinas e suas concentrações em alimentos e bebidas, devido aos vários efeitos tóxicos prejudiciais para a saúde humana. Com relação à OTA, desde 2005, a Comissão Europeia estabeleceu o limite máximo para esta micotoxina, em vinho e em suco de uva, de 2,0 µg/L (COMMISSION REGULATION, 2005). No Brasil, em fevereiro de 2011, foi estabelecido este mesmo limite máximo tolerável para OTA em vinhos, sucos de uva e derivados (AGÊNCIA NACIONAL DE

VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011). Assim, torna-se cada vez mais necessário adotar medidas preventivas no campo para evitar níveis de contaminação elevados, já que, para a maioria dos alimentos, tem-se estabelecido um limite tolerável de micotoxina como critério para exportações.

O uso de fungicidas tem sido uma das principais medidas adotadas para evitar o crescimento de fungos no campo. Entretanto, no Brasil, os fungicidas comumente utilizados para a cultura da uva não são registrados para o controle de fungos toxigênicos como *A. carbonarius*. Estudos realizados na Europa mostram que alguns fungicidas podem atuar positivamente ou negativamente na produção de OTA (LO CURTO et al., 2004; TJAMOS et al., 2004; BELLÍ et al., 2006). Assim, o conhecimento destes efeitos pode propiciar um melhor manuseio desses componentes químicos, de forma a minimizar os riscos de exposição dos consumidores brasileiros, tanto aos resíduos quanto à OTA.

Nesse sentido, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a incidência e o potencial de produção de OTA dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* isolados de diferentes cultivares de uvas viníferas da região vitivinícola tropical do Brasil e o efeito de fungicidas sobre o crescimento de *A. carbonarius* e a produção de OTA.

Os resultados deste trabalho são apresentados em dois capítulos. No primeiro capítulo foi avaliado se existe diferença no percentual de contaminação por *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas viníferas de diferentes cultivares da região vitivinícola tropical do Brasil, com especial atenção às espécies potencialmente produtoras de OTA. No segundo capítulo foi avaliada a eficiência de diferentes fungicidas utilizados em uvas no Brasil sobre o crescimento de *A. carbonarius* e a produção de OTA. Verificou-se também o efeito de diferentes doses dos fungicidas em meio semissintético à base de uva para determinar a concentração mínima inibitória do crescimento de *A. carbonarius*. As doses mais efetivas foram testadas diretamente em uvas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Uvas e vinhos no Brasil

No Brasil, a uva foi introduzida no ano de 1532, no estado de São Paulo. Por algum tempo, o cultivo das variedades de *Vitis vinifera* procedentes de Portugal e da Espanha ficou restrito a pequenas áreas dispersas pelo território nacional (CALDAS et al., 2008). Permaneceu como cultura doméstica até o final do século XIX, tornando-se uma atividade comercial a partir do início do século XX, por iniciativa dos imigrantes italianos estabelecidos no sul do país (PROTAS et al., 2006).

Desde seu início até a década de 1960, a viticultura brasileira ficou restrita às regiões sul e sudeste, mantendo as características de clima temperado, com ciclo vegetativo anual e período de repouso definido pela ocorrência das baixas temperaturas nos meses de inverno. A partir da década de 1960, o cultivo da videira foi introduzido com sucesso na região semiárida do Vale do São Francisco, o que marcou o início da viticultura tropical no Brasil. Na década de 1970, consolidou-se um polo no Norte do Paraná e, na década seguinte, no nordeste de São Paulo e norte de Minas Gerais. Devido à diversidade ambiental é possível observar diferentes características bioclimáticas entre as regiões vitivinícolas do Brasil, sendo possível encontrar videiras com um, dois ou três ciclos anuais (PROTAS et al., 2006).

A legislação brasileira define vinho como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples da uva sã, fresca e madura. A denominação de vinhos finos é utilizada para designar os vinhos elaborados a partir de uvas europeias da espécie *Vitis vinifera* L. Ao contrário destes, vinhos que são produzidos de uvas americanas, como a *Vitis labrusca* e seus híbridos, são classificados como vinhos comuns. Esta classificação é empregada pela

diferenciação entre as espécies de uva utilizadas na elaboração do vinho, o que não implica na qualidade das mesmas (AMORIM et al., 2006).

As áreas vitícolas do Brasil, que incluem o cultivo de uvas para a produção de sucos e/ou a elaboração de vinhos, podem ser classificadas em três zonas. A viticultura temperada está concentrada nos estados do sul e do sudeste, representando cerca de 88% da área de vinhedos e mais de 98% da uva utilizada para processamento (vinhos, sucos e outros derivados) do país. A região norte do Paraná é considerada subtropical. As regiões noroeste de São Paulo, norte de Minas Gerais e Vale do Submédio do São Francisco caracterizam-se como zonas tropicais (IBRAVIN, 2010).

De acordo com dados do IBGE (2010), a produção de uvas no Brasil cresceu cerca de 9,5%, no período de 2002-2005, tendo como principal produtora a região sul, também se destacando em crescimento a região nordeste que, no mesmo período, apresentou crescimento produtivo de aproximadamente 48%, principalmente com participação dos estados de Pernambuco e da Bahia.

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

2.2 Vitivinicultura no Vale do Submédio São Francisco

A produção de uvas destinadas à elaboração de vinhos iniciou-se na região do Vale do Submédio São Francisco, em meados dos anos 1980, com a implantação de videiras europeias trazidas do sul do Brasil. Em meados dos anos 1990 e no início do ano 2000, outras empresas se instalaram na região, o que proporcionou um aumento no volume de vinho elaborado. O Vale é considerado a segunda maior região produtora de vinhos finos do Brasil, representando cerca de 15% do mercado nacional. Este avanço ocorreu em função do sucesso no cultivo de variedades *Vitis vinifera* que se adaptam melhor em áreas de verão longo e seco com invernos brandos, devido à alta susceptibilidade a doenças fúngicas (PEREIRA, 2006; TONIETTO; CAMARGO, 2006).

O Vale do São Francisco tem características climáticas que o distinguem das demais regiões produtoras de vinho no mundo. A temperatura média anual é de 27 °C (variando de 18 a 34 °C), com baixos índices de precipitação anual (cerca de 540 mm por ano), intensidade de luz solar elevada (cerca de 3.000 horas por ano), ar relativamente seco, o que dificulta a proliferação de pragas e doenças, e uma fonte de água disponível e controlada por meio da irrigação, o que facilita a produção de uvas durante todo o ano. Em outras regiões, como Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, a produção de uvas está restrita entre quatro e seis meses do ano. Assim, as experiências iniciais na produção de uvas foram incentivadas pelas vantagens agroclimáticas da região (SELWYN, 2010).

Segundo Pereira (2006), Vale do São Francisco é a única região do mundo que produz uvas o ano todo, sendo possível, dependendo da cultivar, colher entre duas a três safras, anualmente. Este fato ocorre em função do clima e da irrigação a partir do rio São Francisco, que faz com que o ciclo fenológico da videira seja mais curto. Além disso, é possível realizar o escalonamento da produção ao longo do ano, o que reduz os investimentos em termos de

infraestrutura para a elaboração dos vinhos, além de possibilitar escolher os períodos do ano mais favoráveis para obtenção de uvas e vinhos de melhor qualidade e com tipicidades. Segundo o autor, estas vantagens estão tornando o Vale um dos polos vitivinícolas mais dinâmicos do país.

2.3 Ocratoxina A

Micotoxinas são produtos naturais de baixo peso molecular, produzidos como metabólitos secundários por fungos filamentosos. Em geral, são consideradas compostos estáveis e a ocratoxina A (OTA), em particular, é uma molécula moderadamente estável ao calor que permanece intacta durante a maioria das operações de processamento dos alimentos e, portanto, pode permanecer nos produtos finais (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

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

Ocratoxinas são um grupo de micotoxinas estruturalmente relacionadas e, dentro deste grupo, a OTA é considerada a mais tóxica, em função da presença do átomo de cloro na posição C5, adicionado à presença de um OH fenólico (Figura 1). O grupo também inclui a ocratoxina C (OTC), 4-hidroxiocratoxina A (4-OH OTA), ocratoxina B (não contém o átomo de cloro no 5C da di-idro-metil-isocumarina) e a ocratoxina α (OT α , em que a fenilalanina está ausente) (DUARTE et al., 2010). Essas micotoxinas são compostas, basicamente, de dois grupamentos: uma di-hidroxi isocumarina, ligada, através do seu grupo 7-carboxi, à amida do grupamento L- β fenilalanina

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

A OTA é um composto branco cristalino cujo nome químico é (R) N-[(5-cloro-3,4-di-hidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopiran-7-il) carbonil] – L-fenilalanina. É pouco solúvel em água e solúvel em solução aquosa de bicarbonato de sódio. Sua fórmula empírica é C₂₀H₁₈O₆NCl (Figura 1) e o peso molecular é de 403,82 g mol⁻¹ (ANLI; ALKIS, 2010).

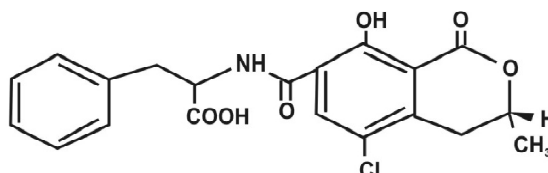


Figura 1 Estrutura da ocratoxina A
Fonte: Anli; Alkis (2010), modificada.

Desde 2005, a Comissão Europeia de alimentos estabeleceu o limite máximo para a OTA em vinho e suco de uva de 2,0 $\mu\text{g/L}$ (COMMISSION REGULATION, 2005). Mais de 300 micotoxinas já foram isoladas e descritas (DUARTE et al., 2010) e, dentre elas, a OTA é uma das mais estudadas, devido aos seus efeitos teratogênicos, embriotóxicos, genotóxicos, neurotóxicos, imunossupressores, carcinogênicos e nefrotóxicos em animais (JECFA, 2001; CHIOTTA et al., 2009). Foi classificada, em 1993, pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer, como um potencial carcinogênico humano (IARC, 1993).

OTA foi originalmente descrita como um metabólito secundário de *Aspergillus ochraceus* (MERWE et al., 1965). Atualmente, sabe-se que é produzida por várias espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (LASRAM et al., 2008).

2.4 Espécies produtoras de ocratoxina A em uvas

Estudos indicam que *P. verrucosum* é a principal espécie associada com a produção de OTA em alimentos e rações de regiões frias e de clima temperado (CHULZE et al., 2006). As espécies ocratoxigênicas do gênero *Aspergillus* predominam em regiões mais quentes e em países tropicais, e pertencem às Seções *Circumdati* e *Nigri* (BELLÍ et al., 2004; CHULZE et al., 2006).

Os fungos da Seção *Nigri* apresentam esporos de cor preta que conferem proteção à luz solar e à radiação UV, atuando como uma vantagem competitiva em regiões de clima quente (PITT; HOCKING, 1997). São espécies resistentes a temperaturas relativamente altas, tolerantes à acidez e preferem atividade de água (Aa) um pouco mais baixa (LOGRIECO et al., 2003; JECFA, 2008).

Os fungos responsáveis pela contaminação de uvas com OTA são os *Aspergillus* Seção *Nigri* (FRISVAD et al., 2007; LASRAM et al., 2010). As espécies *A. brasiliensis*, *A. ibericus* e *A. foetidus* são ocasionalmente encontradas em uvas e as mais frequentes são *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. japonicus* e *A. carbonarius* (OLIVER et al., 2008). Durante a maturação das uvas ocorrem aumento no teor de açúcar e amolecimento da película da baga, e, até a colheita, as uvas tornam-se mais susceptíveis à infecção por fungos do gênero *Aspergillus* (BATTILANI et al., 2006; LEONG et al., 2007). Assim, o retardamento da colheita de uvas pode aumentar o risco de contaminação com OTA (GAMBUTI et al., 2005).

Sabe-se que a infecção fúngica ocorre por meio de injúrias, principalmente nas bagas maduras, e sob condições de calor (20-25 °C), e se espalha promovendo a colonização de todo o cacho. Essas injúrias podem ser causadas por manuseio inadequado dos cachos, rachaduras mecânicas ou ferimentos causados por insetos ou pássaros, que acabam fornecendo uma porta

de entrada para o tecido das bagas, no qual os fungos encontram um hábitat ideal para o seu desenvolvimento (COZZI et al., 2006).

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

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

2.4.1 *Aspergillus carbonarius*

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

crescimento do fungo e ocorrem a 15 °C e 20°C, e a 0,95-0,99 de atividade de água (LEONG et al., 2006; BELLÍ et al., 2007).

2.4.2 *Aspergillus niger*

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

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

2.5 Ocratoxina A em uvas e vinhos

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

A presença de OTA em suco de uva e vinho foi relatada, primeiramente, por Zimmerli e Dick (1995). Posteriormente, vários estudos foram realizados para avaliar os níveis desta toxina em sucos de uva e vinhos da Europa e da

África do Sul. Dados sobre a ocorrência de OTA em vinho apresentaram níveis de até 7,0 µg/L, sendo os níveis mais elevados detectados nos vinhos tintos elaborados na Europa (KOZAKIEWICZ et al., 2003; STEFANAKI et al., 2003; LO CURTO et al., 2004) e na África do Sul (SHEPHARD et al., 2003).

No Brasil, Rosa et al. (2004) analisaram o teor de OTA em vinhos de mesa nacionais e importados comercializados no Rio de Janeiro. A concentração média de OTA obtida foi de 0,034 µg/L, tendo a maior porcentagem e nível de contaminação sido detectados em vinhos tinto. Posteriormente, Shundo et al. (2006) pesquisaram vinhos de diferentes regiões brasileiras e detectaram OTA em 31% das amostras estudadas. Apenas duas das 22 amostras oriundas do estado do Rio Grande do Sul apresentaram concentrações de OTA de 0,10 e 0,24 µg/L. O nível mais elevado (1,33 µg/L) foi encontrado no vinho produzido no Vale do São Francisco, localizado na região nordeste do Brasil, onde todas as amostras estavam contaminadas em concentrações que variaram de 0,36 a 1,33 µg/L.

De acordo com Chulze et al. (2006), em estudos realizados com vinhos da América do Sul foi demonstrado que estes contêm níveis de OTA inferiores aos detectados na Europa. Entretanto, mais informações são necessárias para permitir uma melhor determinação do risco de consumo de OTA entre as populações destes países.

No Brasil existe um regulamento técnico, aprovado e publicado em 22 de fevereiro de 2011, sobre os limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Esse regulamento tem o objetivo de estabelecer os limites máximos para aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e AFM1), ocratoxina A (OTA), desoxivalenol (DON), fumonisinas (FB1 e FB2), patulina (PAT) e zearalenona (ZON) admissíveis em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas. Os limites máximos tolerados referem-se aos resultados obtidos por metodologias que atendam aos critérios de desempenho

estabelecidos pelo Codex Alimentarius. Este regulamento aplica-se às empresas que importem, produzam, distribuam e comercializem alguns produtos descritos nesta resolução. Entre as bebidas encontram-se os vinhos e seus derivados e os limites máximos aceitáveis para a ocratoxina A são de 2 µg/L (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011).

2.6 Fatores relacionados com o crescimento e a produção de OTA por fungos

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

Existem vários parâmetros que influenciam a contaminação fúngica, o crescimento e a produção de ocratoxina A, tais como temperatura, atividade de água (a_w), pH e tipo de substrato, dentre outros (ANLI; ALKIS, 2010; LASRAM et al., 2010). Dentre esses parâmetros ambientais, os mais importantes são a temperatura e a disponibilidade de água (VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006), que são mais restritivos para a produção de micotoxinas do que para o crescimento de fungos (MAGNOLI et al., 2007).

Estudos detectam elevada ocorrência de espécies ocratoxigênicas do gênero *Aspergillus* em vinhedos localizados, principalmente, em regiões de clima quente e seco (BLESA et al., 2006). Além disso, uvas danificadas têm apresentado maiores níveis de contaminação com OTA do que uvas sadias.

Em estudos de Lasram et al. (2010) nenhuma correlação pôde ser obtida entre crescimento e produção de OTA por *A. carbonarius*, o que está de acordo com dados da literatura. Segundo Marín et al. (2006), em temperaturas elevadas,

A. carbonarius cresce rapidamente com o consumo máximo de nutrientes do meio de cultura em poucos dias. De acordo com Lasram et al. (2010), é provável que este fungo utilize alguns nutrientes do substrato para a produção de OTA. Desse modo, em alta temperatura, há diminuição da capacidade de produção da toxina em função do esgotamento de nutrientes do meio. Segundo os autores, isto explica porque ocorre a produção máxima de OTA em temperaturas inferiores à de crescimento máximo.

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

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

2.7 Efetividade de fungicidas no controle de fungos toxigênicos

A prevenção do crescimento de fungos micotoxigênicos é uma estratégia efetiva no controle da presença de micotoxinas nos alimentos. Em muitos casos, o uso de fungicidas é a única maneira eficiente, econômica e frequentemente bem sucedida para evitar o crescimento fúngico (GARCÍA-CELA et al., 2011). Vários fungicidas têm sido testados no controle da espécie *A. carbonarius* em uvas, no campo e em laboratório (LO CURTO et al., 2004; TJAMOS et al., 2004; BELLÍ et al., 2006). Entretanto, as restrições legais sobre o limite máximo de resíduos e a demanda dos consumidores por produtos seguros tornam necessário o uso de antifúngicos menos agressivos ao meio ambiente.

Autores relatam que o Ciprodinil, um tipo de fungicida amilinopirimidino, é efetivo na redução da produção de OTA por *A. carbonarius* em meio sintético de uva e também nas bagas (BELLÍ et al., 2006). De acordo com Valero et al. (2007), a aplicação de ciprodinil e fludioxonil em vinhedos inibe o crescimento e a produção de OTA de espécies da Seção *Nigri*.

Em estudos de Techarat e Dachoupakan (2012) com uvas da Tailândia, o crescimento e a produção de OTA por *A. carbonarius* foram significativamente reduzidos ao aplicar os fungicidas testados (Carbendazim e difeconazol) em concentrações mais elevadas.

García-Cela et al. (2011) avaliaram o impacto das mudanças climáticas de temperatura e umidade previstas para Espanha no desenvolvimento de fungos ocratoxigêncos. Os autores concluíram que o efeito dos fungicidas depende, principalmente, do ingrediente ativo, sendo os resultados apenas fracamente relacionados às mudanças nas condições ambientais.

De acordo com o princípio ativo, os antifúngicos atuam de modo diferente na fisiologia da célula microbiana. Alguns, como os azoles, inibem a síntese de ergosterol, o principal componente da membrana celular fúngica, responsável pela sua fluidez e integridade. Outros bloqueiam a síntese da parede celular, por meio da inibição da síntese dos polissacarídeos glucano e quitina, que são essenciais para garantir a rigidez da parede e evitar a lise celular. Por fim, têm-se os antifúngicos que inibem a síntese dos ácidos nucleicos e proteínas essenciais ao metabolismo celular (KATHIRAVAN et al., 2012).

REFERÊNCIAS

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

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

ANLI, E.; ALKIS, I. M. Ochratoxin A and brewing technology: a review. **Journal of Institute Brewing**, London, v. 116, n. 1, p. 23-32, Jan. 2010.

BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 52-54, Sept. 2006.

BELLÍ, N. et al. Impact of fungicide on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. **Food Additives and Contaminants**, 23, 1021-1029, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

COMMISSION REGULATION. Amending regulation (EC) n° 466/2001 as regards ochratoxin A: text with EEA relevance n° 123/2005 of 26 January 2005. **Official Journal of the European Union**, Berlin, v. 25, p. 3-5, 2005.

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

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

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

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

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

GARCÍA-CELA, E. et al. Ochratoxigenic moulds and effectiveness of grape field antifungals in a climatic change scenario. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 92, n.7, p. 1455-61, 2011.

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

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

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

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

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

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

KATHIRAVAN, M.K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review (article in press). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MARÍN, S. et al. Kinetics of ochratoxin A production and accumulation by *Aspergillus carbonarius* on synthetic grape medium at different temperature levels. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, n. 6, p. M196-M200, Aug. 2006.

MERWE, K. J. van der. et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, London, v. 205, n. 976, p. 1112-1113, Mar. 1965.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SHEPHARD, G. S. et al. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 4, p. 1102-1106, Feb. 2003.

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

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

STEFANAKI, I. et al. Ochratoxin A concentration in Greek domestic wines and dried vine fruits. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 20, n. 1, p. 74-83, Jan. 2003.

TECHARAT, S.; DACHOUPAKAN, C. Growth and Ochratoxin A production of black aspergilli isolated from Thai wine grapes. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, v. 5, n. 3, p. 172-182, Nov. 2012.

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

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

VALERO, A. et al. Effect of preharvest fungicides and interacting fungi on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A synthesis in dehydrating grapes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 2, Ago. 194-199, 2007.

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

WINES FROM BRAZIL. **Exportações 2009**. Disponível em:
<<http://www.winesfrombrazil.com/admin/UPLarquivos/050420100844352.pdf>>
. Acesso em: 2 nov. 2014.

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

CAPÍTULO 2

Incidência dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* em diferentes cultivares de uvas viníferas do Brasil

RESUMO

Os *Aspergillus* Seção *Nigri* têm sido considerados os principais fungos responsáveis pela contaminação de uvas com OTA. Sabe-se que vários fatores influenciam a infecção, a colonização e a produção de OTA pelos fungos ocratoxigênicos, dentre eles, as condições ambientais, a localização da vinícola, as práticas agrícolas e as características das uvas. No presente estudo, objetivou-se avaliar a incidência dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* em diferentes cultivares de uvas viníferas da região vitivinícola tropical do Brasil, com especial atenção às espécies potencialmente produtoras de OTA. Nesta região foram coletadas as seguintes cultivares Syrah, Petit Verdot, Cabernet Sauvignon, Merlot e Chenin Blanc, totalizando 15 amostras. As espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* foram identificadas por características morfológicas. A quantificação de OTA dos isolados foi realizada por HPLC com detector de fluorescência. Foram isolados, no total, 272 *Aspergillus* Seção *Nigri*, identificados nas espécies *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. niger* Agregado, *A. foetidus*, *A. aculeatus* e *A. japonicus*. Os fungos detectados com maior frequência nas uvas foram o grupo *A. niger* Agregado (42%), seguido da espécie *A. carbonarius* (38%). A uva 'Petit Verdot' foi a que apresentou a maior incidência dos *Aspergillus* Seção *Nigri*, principalmente da espécie *A. carbonarius*. Todos os isolados de *A. carbonarius* (103) foram produtores de OTA, em níveis médios (5-20 µg OTA/g CYA) e altos (> 20 µg OTA/g CYA), enquanto, das demais espécies, nenhum dos isolados foi ocratoxigênico. Os resultados mostraram que o tipo de cultivar de uva pode influenciar a incidência dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri*. Além disso, para a região, o potencial risco de contaminação das uvas com OTA está relacionado com *A. carbonarius*, em função da alta frequência de ocorrência e dos níveis produzidos *in vitro*.

Palavras-chave: HPLC; ocratoxina A; uva; Seção *Nigri*; *Aspergillus carbonarius*

1 INTRODUÇÃO

Os *Aspergillus* Seção *Nigri* têm sido considerados os principais fungos responsáveis pela contaminação de uvas com OTA, podendo ser isolados desde os estádios iniciais de desenvolvimento da baga até a época de colheita (BAU et al., 2005; FRISVAD et al., 2007; LASRAM et al., 2010; PALUMBO et al., 2011; SAGE et al., 2002). Dentre os *Aspergillus* Seção *Nigri*, a espécie *Aspergillus carbonarius* é considerada a principal fonte de OTA em uvas (HOCKING et al., 2007; LASRAM et al., 2008).

A ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário produzido por algumas espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. É uma micotoxina classificada como um possível carcinogênico renal humano (grupo 2B), devido aos vários efeitos tóxicos em animais (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993). A OTA tem sido amplamente detectada em vinho e em suco de uva (MATEO et al., 2007; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006), o que os tornam fontes importantes de ingestão diária para os seres humanos, especialmente em países europeus, devido às condições climáticas favoráveis à síntese desta micotoxina (KHOURY; ATOUI, 2010). Vários fatores influenciam a infecção, a colonização e a produção de OTA pelos fungos ocratoxigênicos. Dentre eles estão as condições ambientais, a localização da vinícola, as práticas agrícolas e as características das uvas (LASRAM et al., 2012).

O Brasil apresenta regiões produtoras de vinho com características agroclimáticas bem distintas. Dentre elas, a região do Vale do São Francisco, onde embora a vitivinicultura seja uma atividade recente, ela se destaca das demais áreas produtoras de vinho no mundo por ser a única na qual é possível produzir uvas durante o ano todo. Esta característica tem favorecido o reconhecimento do grande potencial do Vale para a produção de vinhos finos e

outros produtos derivados de uva. Assim, para garantir ao consumidor a qualidade e a segurança micotoxicológica destes vinhos, há a necessidade de mais estudos sobre os parâmetros abióticos que influenciam a contaminação das diferentes cultivares de uvas com OTA. Assim, este estudo foi realizado com os objetivos de avaliar a incidência dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* em diferentes cultivares de uvas viníferas da região vitivinícola tropical do Brasil, com especial atenção para as espécies potencialmente produtoras de OTA, e quantificar a capacidade ocratoxigênica dos isolados.

2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho foi realizado com o objetivo geral de avaliar a incidência dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* em diferentes cultivares de uvas viníferas da região vitivinícola tropical do Brasil, com especial atenção para as espécies potencialmente produtoras de OTA.

2.1 Objetivos específicos

- a) avaliar a frequência de ocorrência de *Aspergillus* Seção *Nigri* em uvas viníferas de diferentes cultivares;
- b) quantificar a ocratoxina A produzida por *A. Carbonarius*;
- c) avaliar se há diferença na frequência de ocorrência de espécies toxigênicas em relação às cultivares de uva.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

As amostras de uvas viníferas foram obtidas na região vitivinícola tropical do Brasil, localizada no Vale do Submédio São Francisco (9°S; 40°W), nordeste brasileiro (Figura 1). Na região, a temperatura média anual é de 27 °C, a precipitação anual é de 500 mm e o clima tropical semiárido. Destaca-se pelas vantagens geobiológicas e climáticas em relação às demais áreas tradicionais de produção de vinho no mundo, que propiciam condições para a produção de uvas durante o ano todo. Na região, embora o clima seja extremamente seco, o cultivo da uva é possível por meio de projetos de irrigação.

3.2 Amostragem das uvas

Uvas viníferas para vinhos foram coletadas nos estágios finais de maturação da baga (época de colheita), em três vinícolas situadas nos municípios destacados na Figura 1. Foram obtidas três amostras de cada uma das seguintes cultivares: Syrah, Petit Verdot, Cabernet Sauvignon, Merlot e Chenin Blanc, totalizando 15 amostras (n=15). Nas vinícolas foram coletados dois cachos de uvas em três pontos distintos (P1, P2 e P3) e aleatórios no vinhedo, totalizando seis cachos para cada cultivar de uva. Foram coletados cachos representativos do estado observado nas vinhas. As uvas foram transportadas para o laboratório em sacos plásticos estéreis lacrados, dentro de caixas térmicas.

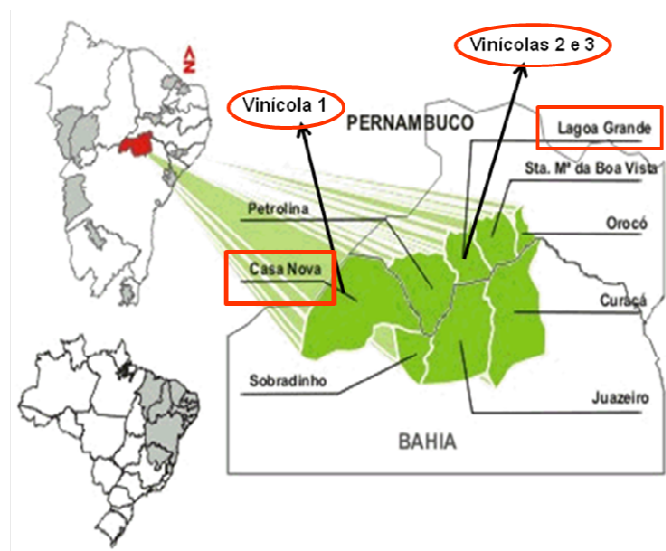


Figura 1 Municípios pertencentes à região do Vale do Submédio São Francisco, situada no nordeste brasileiro, com as respectivas localizações das vinícolas (1, 2 e 3) onde foram coletadas as amostras de uvas

3.3 Isolamento e identificação dos *Aspergillus* Seção *Nigri*

O isolamento dos fungos das uvas foi realizado conforme descrito por Samson et al. (2000), com algumas modificações. Após o procedimento de desinfecção superficial, 50 bagas de cada ponto amostrado (total de 150 bagas/amostra) foram plaqueadas diretamente em meio de cultura dichloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC). As placas foram incubadas no escuro, por 5-7 dias, a 25 °C. Posteriormente, os fungos identificados, conforme aspectos morfológicos, como pertencentes ao gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* foram reisolados no meio ágar malte, para purificação das colônias. Os fungos em cultura pura foram incubados em meios e temperaturas padronizados e identificados de acordo com Klich (2002), Samson e Varga (2007) e Varga et al. (2011).

3.4 Extração e quantificação de OTA das culturas

A ocratoxina A foi extraída de acordo com o método de Bragulat, Abarca e Cabanes (2001) modificado. Os isolados foram inoculados em três pontos distintos no meio de cultura CYA e incubados, por sete dias, a 25 °C. Posteriormente, três plugs da cultura foram removidos da área interna, meio e borda de cada colônia e colocados em tubos de ensaio. Os plugs foram pesados e, em seguida, homogeneizados com 1 ml de metanol. Após 60 minutos, os extratos foram filtrados em unidades filtrantes de PTFE (0,22 µm) (Millipore) e injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC).

O equipamento utilizado foi um HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU 20A3, interface modelo CBM-20^a, injetor automático modelo SIL-10AF e detector de fluorescência RF-10 AXL (λ_{exc} 330 nm; λ_{em} 460 nm). Foram utilizadas as colunas Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5µm) conectadas a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5 µm). A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (metanol:acetonitrila:água:ácido acético), com fluxo de 0,8 mL min⁻¹. O volume injetado das amostras e do padrão foi de 20 µL. O tempo de retenção médio foi de 11±0,1 minutos. A quantificação da OTA nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ($y = 1,11756 \times 10^7 x + 2592,1485$; em que y = área do pico e x = concentração de OTA), correlacionando a área do pico *versus* a concentração da respectiva solução padrão, tendo o coeficiente de determinação (r^2) obtido sido de 0,9999. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de 0,0004 e 0,0016 µg/g, respectivamente. A recuperação da OTA em meio de cultura CYA foi, em média, de 87% ($n = 3$). Todas as amostras foram analisadas em duplicata, enquanto as soluções padrão de OTA foram injetadas em triplicata.

3.4.1 Preparo da curva padrão

A curva padrão foi preparada baseando-se no método descrito pelo Comitê de Normalização para a Análise de OTA em Vinho e Cerveja. Para o preparo da curva, utilizou-se uma solução estoque previamente preparada, dissolvendo-se o padrão comercial de OTA (O1877, Sigma) em tolueno/ácido acético (99:1, v/v). A concentração da solução estoque foi determinada por medição da absorvância UV a 333 nm e calculada segundo AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2002) em 136% de OTA. Após a determinação da concentração da solução estoque, foram preparadas, por diluição, soluções padrão com concentrações de 0,001; 0,01; 0,025; 0,1 e 0,15 µg/g. Regularmente, novos padrões foram preparados e injetados, de forma a verificar e ajustar a curva de calibração.

4 RESULTADOS

4.1 Ocorrência das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*

Das amostras de uvas estudadas foram isolados, no total, 272 *Aspergillus* Seção *Nigri*, identificados nas espécies *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. niger* Agregado, *A. foetidus*, *A. aculeatus* e *A. japonicus*. Na Figura 2 apresenta-se a frequência de ocorrência dessas espécies nas uvas da região vitivinícola estudada. Ao considerar *A. niger*, *A. foetidus* e *A. niger* Agregado como pertencentes ao mesmo grupo, pode-se afirmar que o grupo *A. niger* Agregado (114/272) foi o de maior frequência nas uvas (42%). Também foi observada uma elevada ocorrência da espécie *A. carbonarius* (103/272), com frequência de 38%, semelhante ao grupo de espécies *A. niger* Agregado. As espécies unisseriadas (*A. aculeatus* e *A. japonicus*) foram detectadas em baixo número nas uvas da região (55/272), representando 20% do total de *Aspergillus* Seção *Nigri*.

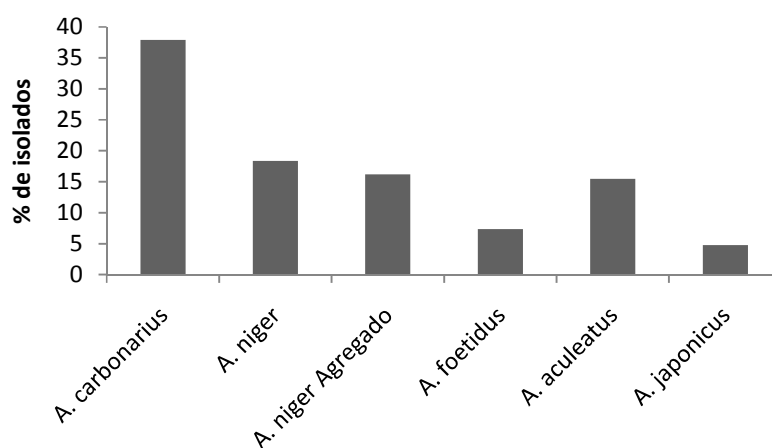


Figura 2 Frequência de ocorrência das espécies em relação ao total de *Aspergillus* Seção *Nigri* isolados das uvas

4.2 Distribuição das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* entre as cultivares de uva

A porcentagem dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* isolados de cada cultivar de uva está descrita na Figura 3. Todas as cultivares estudadas apresentaram-se contaminadas com estes fungos, embora a porcentagem de isolados obtidos tenha sido diferente entre elas. Do total de *Aspergillus* Seção *Nigri*, 44% foi isolado da cultivar Petit Verdot, seguindo-se da ‘Syrah’ (27%), ‘Cabernet Sauvignon’ (16%), ‘Chenin Blanc’ (8%) e ‘Merlot’ (5%). O fato de a maior porcentagem de isolados fúngicos ter sido obtida a partir da uva ‘Petit Verdot’ pode ser um indicativo regional de maior susceptibilidade desta cultivar à contaminação com os fungos *Aspergillus* Seção *Nigri*. Considerando que as cultivares foram coletadas na mesma região vitivinícola, sob as mesmas condições climáticas e ambientais, a diferença no percentual de isolados obtidos entre elas, provavelmente, está relacionada com as características da cultivar associadas com as características da região, tornando-a mais susceptível à infecção fúngica.

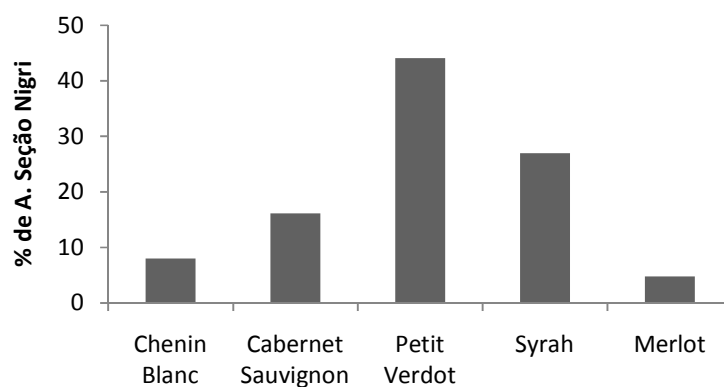


Figura 3 Porcentagem de *A. Seção Nigri* isolados das diferentes cultivares de uva. Os valores representam a média do número de isolados obtidos em cada cultivar

A distribuição das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* isoladas de cada cultivar de uva pode ser observada na Figura 4. A cultivar Syrah apresentou-se contaminada com todas as espécies identificadas neste estudo, com similar frequência de ocorrência dos isolados de cada espécie: *A. carbonarius* (18,3%), *A. niger* (19,2%), *A. niger* Agregado (20,5%), *A. foetidus* (13,9%), *A. aculeatus* (19,2%) e *A. japonicus* (8,8%). Entretanto, ao considerar o grupo *A. niger* Agregado (*A. niger*, *A. niger* Agregado e *A. foetidus*), pode-se dizer que este foi predominante entre os demais *Aspergillus* ssp., com ocorrência de 53,6% nas uvas ‘Syrah’. Nas cultivares Cabernet Sauvignon e Petit Verdot, a espécie *A. carbonarius* se destacou entre as demais, representando, respectivamente, 96,3% e 63,5% do total de isolados de *Aspergillus* Seção *Nigri* obtidos. Assim, é possível observar que a contaminação fúngica na uva ‘Cabernet Sauvignon’ foi expressivamente determinada pelo fungo *A. carbonarius*. Na cultivar Petit Verdot, embora com menor frequência, também foram isoladas as espécies *A. niger* (21,6%) e as unisseriadas *A. aculeatus* e *A. japonicus* (13,5%). Das cultivares Chenin Blanc e Merlot foram obtidos poucos isolados de *Aspergillus* Seção *Nigri*, o que indica serem as mais resistentes à infecção por estes fungos na região vitivinícola estudada. Isolados da espécie *A. carbonarius* foram obtidos de todas as cinco cultivares, entretanto, a maior incidência deste fungo ocorreu na uva ‘Petit Verdot’. Do total médio de *A. carbonarius*, 55,75% foram isolados da cultivar Petit Verdot, seguida da ‘Cabernet Sauvignon’ (30,8%), ‘Syrah’ (9,8%), ‘Chenin Blanc’ (2,4%) e ‘Merlot’ (1,2%). A espécie *A. niger* também foi detectada com maior frequência na uva ‘Petit Verdot’, embora o número de isolados tenha sido expressivamente inferior ao de *A. carbonarius*.

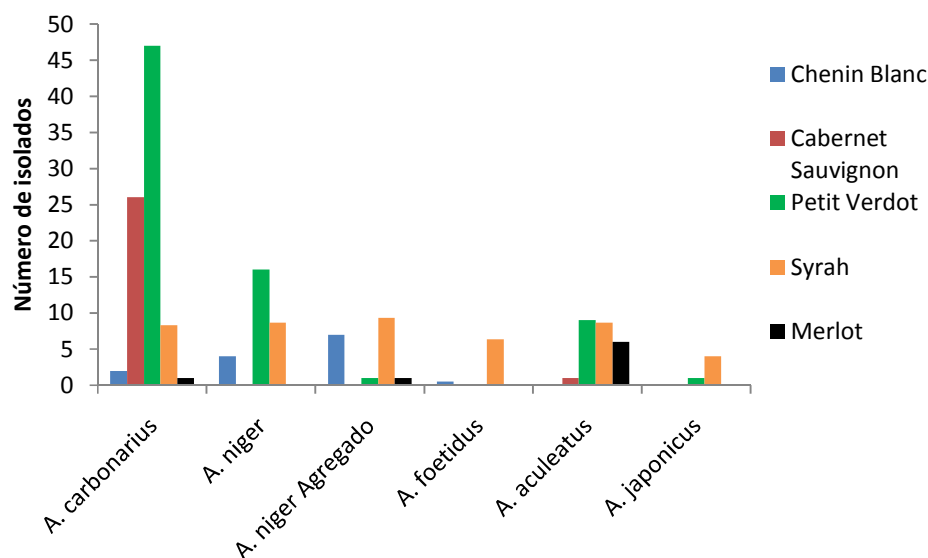


Figura 4 Distribuição das espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* entre as diferentes cultivares de uva. Valores representam o número médio de isolados das espécies obtidos das cultivares

4.3 Potencial ocratoxigênico das espécies

Todos os 272 isolados de *Aspergillus* Seção *Nigri* obtidos (103 *A. carbonarius*, 114 grupo *A. niger* Agregado e 55 unisseriados) foram testados quanto à capacidade ocratoxigênica após cultivo em meio CYA, a 25 °C, por 7 dias. Neste estudo, além do elevado número de isolados da espécie *A. carbonarius* obtidos, 100% (103/103) foram produtores de OTA, enquanto nenhum dos isolados do grupo *A. niger* Agregado e das espécies unisseriadas foi considerado ocratoxigênico. Na Tabela 1 observa-se a frequência de distribuição das concentrações de OTA obtidas dos isolados de *A. carbonarius*. Os níveis de OTA produzidos variaram entre uma ampla faixa de 0,04 a 169,97 (min-max μg OTA/g CYA), o que indica que os *A. carbonarius* apresentaram alto potencial para produção de OTA. Com relação aos níveis de OTA obtidos, pode-se

agrupar os isolados em baixa (<LD - 5), mediana (5 - 20) e alta (> 20) capacidade de produção de OTA. Assim, os dados mostram que 23,3% dos isolados produziram níveis baixos, 43,7% foram medianos e 33% apresentaram alta capacidade ocratoxigênica. No presente estudo, a maioria dos *A. carbonarius* produziu OTA em níveis médios e altos.

Tabela 1 Frequência de distribuição da concentração de OTA dos isolados de *A. carbonarius* em CYA

Faixa de concentração (µg OTA/g CYA)	Número de isolados	Média (µg OTA/g CYA)
<LD ^a - 5	24	2,86
5,0-20,0	45	10,91
20,0-50	19	32,66
50,0-100,0	12	67,27
100,00-150,0	2	130,30
150,00-200,00	1	169,97

^aLD: Limite de detecção

5 DISCUSSÃO

Espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* foram isoladas de todas as cultivares de uva, conforme relatado em estudos anteriores, realizados em diferentes países no mundo. Estes fungos são considerados a microbiota predominante de uvas, principalmente na época de colheita (SAGE et al., 2002; BELLÍ et al., 2006; LASRAM et al., 2007; LASRAM et al., 2012; LEONG et al., 2006b; LUCCHETTA et al., 2010). Durante a fase de maturação, ocorrem o amolecimento da casca das uvas e o aumento no teor de açúcar, tornando as bagas mais susceptíveis à infecção por *Aspergillus* Seção *Nigri*, principalmente quando as uvas estão danificadas (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006;

LEONG; HOCKING; SCOTT, 2006; LEONG; HOCKING; SCOTT, 2007). Em geral, estes fungos apresentam elevada resistência aos raios UV e a forte insolação (JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 2008), devido à espessura da parede dos esporos e a presença de alta quantidade de melanina como pigmento dos esporos (ROTEM; AUST, 1991). Assim, as condições ambientais durante o cultivo de uvas na região estudada, com temperatura média de 27 °C e insolação média de 8 h/dia, podem proporcionar uma vantagem competitiva para os *Aspergillus* Seção *Nigri*.

Os *A. niger* Agregado são considerados como sendo o grupo de espécies mais comumente encontradas nas vinícolas, com frequência de ocorrência bem superior à da espécie *A. carbonarius*. Na Itália, os *A. niger* Agregado foram os fungos predominantes nas uvas (LUCCHETTA et al., 2010). Em um estudo com uvas da Tunísia, do total de *A. Seção Nigri* obtidos, 72% pertenciam ao grupo *A. niger* Agregado e somente 22% foram identificados em *A. carbonarius* (LASRAM et al., 2012). Sage et al. (2002) também encontraram poucos isolados da espécie *A. carbonarius* em uvas na França. Entretanto, no presente estudo, o total de *A. carbonarius* obtido das uvas foi semelhante ao de *A. niger* Agregado, com elevada ocorrência na região vitivinícola.

Em estudos realizados na Europa foi demonstrado que, durante o processo de secagem de uvas ao sol, ocorre um aumento significativo na contaminação com *A. carbonarius* (CORAVELLI et al., 2012; MAGAN; ALDRED, 2005). Neste processo ocorrem concentração dos açúcares e redução do teor de água. A elevada incidência de insolação durante o cultivo de uvas na região vitivinícola do Nordeste do Brasil contribui para a aceleração desse processo e algumas uvas no campo atingem teores de açúcares mais elevados, o que pode favorecer a contaminação por *A. carbonarius*. Assim, o atraso da colheita de frutos maduros também pode ser considerado um dos fatores

relevantes para o aumento da contaminação das uvas com os fungos ocratoxigênicos (GAMBUTI et al., 2005).

Dentre as cultivares de uva, a 'Petit Verdot' foi a que apresentou maior contaminação com os *A. Seção Nigri*, principalmente com a espécie *A. carbonarius*, o que indica ser esta a cultivar mais susceptível aos fungos ocratoxigênicos na região vitivinícola estudada. Segundo Leong et al. (2006b), a maior incidência de colonização das uvas por espécies de *Aspergillus* ocorre quando estas apresentam algum rompimento em sua película. Assim, de acordo com Martínez-Rodríguez e Carrascosa (2009), uma das principais medidas a serem tomadas para evitar o desenvolvimento de fungos potencialmente ocratoxigênicos é aquela aplicada para evitar danos na baga, por meio do controle de fungos patogênicos e insetos, durante o cultivo da uva. Além disso, Lasram et al. (2012) sugerem outros fatores, além das condições climáticas, que podem influenciar a incidência de fungos nas uvas, como as cultivares e as diferentes práticas agrícolas, que incluem os tratamentos fitossanitários e o sistema de irrigação. Ao considerar que as cultivares que apresentaram as maiores incidências dos fungos *Aspergillus Seção Nigri* foram coletadas sob as mesmas práticas agrícolas e condições climáticas, pode-se dizer que a maior ocorrência destes fungos na uva 'Petit Verdot', provavelmente, está relacionada com as características da cultivar, que envolve desde composição físico-química, tempo de maturação até estrutura do cacho.

Battilani et al. (2004) relataram diferenças entre as cultivares de uva quanto à susceptibilidade à infecção fúngica e à produção de OTA *in vitro*. Os autores sugerem que estas tendências devem ser cuidadosamente aplicadas às vinhas, visto que as diferenças na contaminação com OTA entre as cultivares estão mais fortemente associadas com as variações sazonais do clima e do tempo de maturação das uvas do que com as características inerentes a cada cultivar (BATTILANI et al., 2006; LEONG et al., 2006a). Entretanto, em estudos

recentes foi relatado que diferenças de contaminação entre as cultivares de uva podem estar relacionadas com as propriedades físicas e químicas das mesmas (JIANG; SHI; ZHU, 2013). Além disso, deve-se ressaltar a importância da espessura da casca para evitar danos nas bagas e dificultar a infecção fúngica (BATTILANI et al., 2004; VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006). A estrutura do cacho e a concentração de taninos também contribuem para a resistência das uvas à contaminação (GABLER et al., 2003). De acordo com Leong et al. (2006a), algumas cultivares, como a Sunmuscat, apresentam a estrutura do cacho de maneira a permitir uma maior aeração entre as uvas e minimizar o contato dos danos entre bagas, principalmente nas partes internas do cacho, local a partir do qual os fungos são comumente isolados. Assim, algumas cultivares podem ser menos susceptíveis a esta contaminação do que outras, em função do tipo de cacho, visto que a proximidade das bagas é também uma característica relevante.

Além da elevada incidência de *A. carbonarius*, 100% dos isolados foram produtores de OTA e a maioria deles em níveis, considerados neste estudo, medianos (5-20 µg OTA/g CYA) e alto (> 20 µg OTA/g CYA). Esta espécie é considerada a principal fonte de OTA para as uvas, em função da porcentagem de isolados positivos e dos níveis de OTA detectados *in vitro* (HOCKING et al., 2007; LASRAM et al., 2008; LEONG et al., 2006a; CORAVELLI et al., 2012; LASRAM et al., 2012;). Para a região vitivinícola estudada, o potencial risco de contaminação das uvas com OTA pode ser atribuído à presença da espécie *A. carbonarius*.

Embora tenha sido detectada elevada incidência de *A. carbonarius* nas uvas, com alta capacidade de produção de OTA, em estudos anteriores foi demonstrado que os vinhos e os sucos de uva produzidos no nordeste do Brasil apresentam baixos níveis dessa micotoxina (TERRA et al., 2013). Este fato indica que, provavelmente, as condições ambientais desta região favorecem a

colonização das uvas com *A. carbonarius*, entretanto, não são favoráveis para a produção de OTA pelo fungo no campo. Terra et al. (2013) sugerem que o clima tropical semiárido, em que elevadas temperaturas são observadas durante o ano todo, é um dos principais fatores relacionados aos baixos níveis de OTA detectados nos vinhos elaborados na região vitivinícola tropical. Além disso, em outros estudos mostrou-se que a espécie *A. carbonarius* apresenta maior habilidade para produção de OTA em temperaturas que variam de 15 a 20 °C (BELLÍ et al., 2005; ESTEBAN et al., 2004; MITCHELL; ALDRED; MAGAN, 2003; TASSOU et al., 2007; LASRAM et al., 2010), o que difere das condições observadas na região. De acordo com Battilani et al. (2004), a temperatura durante a maturação das uvas no campo é um fator crítico tanto para o desenvolvimento do fungo quanto para a produção de OTA.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que a cultivar de uva pode influenciar a incidência dos fungos *Aspergillus* Seção *Nigri* na região vitivinícola tropical do Brasil, principalmente da espécie *A. carbonarius*. Além disso, para a região, o potencial risco de contaminação das uvas com OTA está relacionado com *A. carbonarius*, em função da alta frequência de ocorrência e dos níveis produzidos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17. ed. Washington: AOAC, 2002.

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

BATTILANI, P. et al. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 13, p. 1736–1740, Oct. 2004.

BATTILANI, P.; MAGAN, N.; LOGRIECO, A. European research on ochratoxin A in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 52-54, Sept. 2006.

BAU, M. et al. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 125-130, 2005.

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

BELLÍ, N. et al. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 40-45, 2006.

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

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

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

COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION. **Foodstuffs-determination of ochratoxin A in wine and beer**. Brussels: Comité Européen de Normalisation, 2003.

COVARELLI, L. et al. A review on the occurrence and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A in dehydrated grapes, non-fortified dessert wines and dried vine fruit in the Mediterranean area. **Food Control**, Guildford, v. 26, n. 2, p. 347-356, Aug. 2012.

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

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

GABLER, F. M. et al. Correlations of morphological, anatomical, and chemical features of grape berries with resistance to *Botrytis cinerea*. **American Phytopathological Society**, Saint Paul, v. 93, n. 10, p. 1263-1273, Oct. 2003.

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

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

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**: volume 56. Lyon: IARC, 1993.

JIANG, C.; SHI, J.; ZHU, C. Fruit spoilage and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in the berries of different grape cultivars. **Food Control**, Guildford, v. 30, n. 1, p. 93-100, Mar. 2013.

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

KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. **Toxins**, For Collins, v. 2, n. 4, p. 461-493, Mar. 2010.

KLICH, M. A. **Identification of common aspergillus species**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultuur, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

LEONG, S. L.; HOCKING, A. D.; SCOTT, E. S. Survival and growth of *Aspergillus carbonarius* on wine grapes before harvest. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, suppl. 1, p. 83–87, Sept. 2006.

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

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

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

MATEO, R. et al. An overview of ochratoxin A in beer and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 79-83, Oct. 2007.

MITCHELL, D.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* from different regions of Europe. **Aspects of Applied Biology**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 109-116, 2003.

PALUMBO, J. D. et al. Isolation and identification of ochratoxin A-producing *Aspergillus* section *Nigri* strains from California raisins. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 330-336, Apr. 2011.

ROTEM, J.; AUST, H. J. The effect of ultraviolet and solar radiation and temperature on survival of fungal propagules. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 133, n. 1, p. 76-84, Sept. 1991.

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

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

SAMSON, R. A.; VARGA, J. *Aspergillus* systematics in the genomic era. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, p. 01-06, 2007.

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

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

TERRA, M. F. et al. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 93, n. 4, p. 890-894, Mar. 2013.

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

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

CAPÍTULO 3

Efeito de fungicidas no crescimento e na produção de ocratoxina A por *Aspergillus carbonarius* isolado de uvas viníferas cultivadas no Brasil

RESUMO

A prevenção, no campo, do crescimento de fungos produtores de micotoxinas é a estratégia mais efetiva para controlar a presença dessas toxinas nos alimentos. Com a frequente utilização de fungicidas para proteção das culturas, seus efeitos sobre a produção de micotoxinas devem ser considerados. Portanto, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de fungicidas sobre o crescimento de *A. carbonarius* e a produção de OTA. Três experimentos foram desenvolvidos na seguinte sequência: i) *screening* de cinco fungicidas comumente utilizados na cultura da uva no Brasil em meio CYA inoculado com *A. carbonarius* com posterior incubação a 25 °C e avaliação diária do diâmetro da colônia durante dez dias. A OTA foi extraída no décimo dia e quantificada por HPLC; ii) determinação da concentração mínima inibitória do crescimento do fungo e os efeitos sobre a produção de OTA em meio semissintético à base de uva, com incubação a 15, 20 e 30 °C, durante 20 dias e iii) avaliação do efeito dos fungicidas diretamente nas uvas. Na dose comercial recomendada, a maioria dos fungicidas testados foi efetiva no controle do crescimento de *A. carbonarius* e na produção de OTA *in vitro*, sendo este efeito influenciado pelo tipo de fungicida, a dose e a temperatura. A temperatura foi considerada fator determinante que influencia a efetividade dos fungicidas sobre o crescimento de *A. carbonarius* e a produção de OTA, sendo a maior redução do crescimento e a maior produção de OTA detectados a 15 °C. As doses dos fungicidas testadas não foram efetivas no controle de *A. carbonarius* em uvas. Assim, o efeito direto dos fungicidas nas uvas deve ser mais estudado, a fim de se obter uma maior aproximação das condições que ocorrem no campo.

Palavras-chave: Segurança alimentar. Controle. Ocratoxina A. *Aspergillus carbonarius*.

1 INTRODUÇÃO

Micotoxinas são substâncias naturalmente produzidas por fungos toxigênicos que comumente se desenvolvem em diversas culturas e causam efeitos adversos quando consumidos por seres humanos e animais (TIRADO et al., 2010). O grupo das ocratoxinas inclui a ocratoxina A (OTA), a toxina mais relevante e prevalente do grupo, e as ocratoxinas B e C, que representam menores riscos (GARCÍA-CELA et al., 2011). Devido a isso, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou a OTA como um possível carcinogênico humano do grupo 2B, baseada em evidências de diversos estudos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2002).

A biossíntese de micotoxinas é determinada por uma ampla faixa de fatores físicos, biológicos e químicos, assim como pela interação entre eles. Condições ambientais, como temperatura e disponibilidade de água, são fatores primários que afetam o desenvolvimento e a produção de micotoxinas pelos fungos. Sabe-se que as condições ótimas para a produção de OTA diferem das do crescimento fúngico. A temperatura ótima para o crescimento se encontra entre 25 °C a 30 °C (PERRONE et al., 2008), enquanto o ótimo para a produção de OTA ocorre entre 15 °C e 20 °C (BELLI et al., 2007; LEONG et al., 2006).

Os fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, principalmente a espécie *Penicillium verrucosum*, e os *Aspergillus* das seções *Circumdati* e *Nigri* são considerados como as fontes de OTA para diversos alimentos. Em uvas, vários estudos relataram os *Aspergillus* Seção *Nigri*, particularmente a espécie *Aspergillus carbonarius*, como o principal responsável pela presença desta micotoxina (BATTILANI et al., 2004; CABAÑES et al., 2002), em função da elevada proporção de isolados produtores e dos altos níveis produzidos (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; PERRONE et al., 2006). No

Brasil foi detectada a presença de *A. carbonarius* como contaminantes de uvas, entretanto, os níveis de OTA dos vinhos produzidos estavam abaixo do limite de 2 µg/L, estabelecido pela legislação para vinhos e derivados (TERRA et al., 2013).

A prevenção no campo do crescimento de fungos produtores de micotoxinas é a estratégia mais efetiva para controlar a presença dessas toxinas nos alimentos. O manejo sanitário adequado de uvas é um ponto crítico na estratégia de controle da presença de OTA em vinhos, uma vez que os fungos patogênicos que incidem sobre a cultura expõem os frutos, direta ou indiretamente, a injúrias que possibilitam a colonização por fungos potencialmente produtores de micotoxinas.

Com a frequente utilização de fungicidas para a proteção das culturas no campo, seus efeitos sobre a produção de micotoxinas devem ser considerados. Tem sido relatado que alguns fungicidas influenciam positivamente e outros, negativamente na produção de micotoxinas pelos fungos (BOYACIOGLU; HETTIARACHCHY; STACK, 1992; GAREIS; CEYNOWA, 1994; BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; BELLÍ et al., 2006).

Embora o uso de fungicidas sintéticos seja considerado a maneira mais eficiente e custo-efetiva para evitar a contaminação de fungos patogênicos e o desenvolvimento de doenças nas culturas (GARCÍA-CELA et al., 2011), não se têm registros no Brasil do efeito dos fungicidas comumente aplicados na cultura da uva sobre o crescimento e produção de OTA por fungos ocratoxigênicos oportunistas, como *A. carbonarius*. Nesse sentido, os objetivos, neste estudo, foram (i) realizar o *screening* de fungicidas utilizados em vinhas no Brasil e testar a eficiência sobre o crescimento de *A. carbonarius* e a produção de OTA; (ii) detectar a concentração mínima inibitória (CMI) dos fungicidas para o crescimento de *A. carbonarius* em meio semissintético à base de uva e (iii)

avaliar o efeito da CMI sobre o crescimento de *A. carbonarius* inoculados em uvas.

2 OBJETIVO GERAL

Neste trabalho, o objetivo geral foi avaliar *in vitro* a eficiência de diferentes fungicidas utilizados em uvas no Brasil sobre o crescimento de *A. carbonarius* e a produção de OTA.

2.1 Objetivos específicos

- a) realizar o *screening* de fungicidas utilizados em vinhas no Brasil e testar a eficiência sobre o crescimento de *A. carbonarius* e a produção de OTA em meio CYA;
- b) detectar a concentração mínima inibitória (CMI) dos fungicidas para o crescimento de *A. carbonarius* em meio semissintético à base de uva;
- c) avaliar o efeito das doses que apresentaram efetiva redução do crescimento em meio semissintético à base de uva sobre o crescimento de *A. carbonarius* inoculados em uvas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados fúngicos

Para o estudo foram selecionados dois isolados de *A. carbonarius* (CDCA 01145 e CDCA 01146) capazes de produzir OTA, obtidos de uvas viníferas cultivadas na região vitivinífera tropical do Brasil e estão depositados na Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais, Brasil.

3.2 Obtenção do inóculo

Para a reativação dos isolados, estes foram transferidos para placas de petri contendo o meio czapek dox agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e incubados, a 25 °C, por 7 dias. Em seguida, esporos foram suspensos em água destilada estéril contendo 0,05% Tween 80 (Sigma-Aldrich) e filtrados em gaze estéril (Nexcare, 3M, São Paulo, Brasil). Em seguida, uma alíquota de 10 µl da suspensão foi transferida para a câmara de Neubauer (Sigma, São Paulo, Brasil) para determinar a concentração final de esporos. A suspensão de 10⁶ esporos/ml de cada isolado foi utilizada para inocular o centro de placas de Petri, sob condições estéreis, em todos os tratamentos.

3.3 *Screening* de fungicidas em CYA 3 *Screening* de fungicidas em CYA

Foram selecionados cinco fungicidas comumente utilizados na cultura da uva no Brasil. Na Tabela 1 encontram-se o nome comercial, a empresa fabricante, o ingrediente ativo e a dose comercial recomendada para cada um deles. Eles foram diluídos em água destilada estéril e volumes apropriados foram

asépticamente adicionados ao meio CYA, quando o mesmo atingiu uma temperatura de, aproximadamente, 45 °C, de forma a se obter as seguintes concentrações decrescentes: para os fungicidas F1 e F2 (2D, 2xD; D, dose comercial recomendada pelo fabricante; D2, 0,5xD; D3, 0,25xD; D4, 0,125xD e D4,1, 0,0625xD) e para os fungicidas F3, F4 e F5 (4D, 4xD; 2D, 2xD; D, dose comercial recomendada pelo fabricante; D2, 0,5xD; D3, 0,25xD e D4, 0,125xD). Não foram adicionados fungicidas nas placas de controle. O meio foi vigorosamente agitado e 16 ml foram asépticamente colocados em placas de Petri. Inoculou-se 0,1 ml da suspensão de esporos do isolado CDCA 01146 (10^6 esporos/ml) no centro das placas. A temperatura de incubação foi de 25 °C, por 10 dias. A taxa de extensão micelial foi avaliada todos os dias, durante o período de incubação. OTA foi extraída no décimo dia, de acordo com o método modificado de Bragulat, Abarca e Cabanes (2001). Para cada tratamento, três placas foram preparadas e dois diâmetros de cada colônia foram mensurados. A soma dos dois diâmetros foi dividida por 4, para a obtenção dos raios. O raio médio (mm) foi obtido a partir das três placas mensuradas. A curva de regressão linear do raio (mm) *versus* tempo foi utilizada para determinar a taxa de crescimento (mm/dia).

Tabela 1 Fungicidas estudados, empresa fabricante, ingrediente ativo e dose comercial recomendada

Código	Fungicida	Empresa	Ingrediente Ativo	Dose
F1	Bravonil Ultrex	Syngenta	Clorotalonil 82,5%	1,5 g/L
F2	Manzate 800	United Phosphorus	Mancozebe 80%	3 g/L
F3	Kocide WDG Bioactive	Du pont	Hidroxido de cobre 53,8%	1,8 g/L
F4	Cuprocarb 500	Oxiquímica	Oxicloreto de cobre 84%	2,5 g/L
F5	Folicur 200EC	Bayer	Tebuconazol 20%	1 ml/L

3.4 Efeito de fungicidas sobre o desenvolvimento de *A. carbonarius* e sobre a produção de OTA em meio semissintético à base de uva

Os fungicidas que inibiram o crescimento de *A. carbonarius* na dose comercial recomendada (D) no experimento prévio foram selecionados para o experimento *in vitro*, utilizando o meio semissintético à base de uva, a fim de determinar a concentração mínima inibitória do crescimento do fungo e os efeitos sobre a produção de OTA. Para o preparo do meio de cultura, uvas da cultivar Syrah, sob condições ideais para a produção de vinho, foram coletadas na região vitivinícola tropical do Brasil, situada no Vale do Submédio São Francisco (PE, Brasil). Utilizaram-se 175 ml do suco de uva adicionados a 825 ml de água destilada e 20 g de ágar (Merck, São Paulo, Brasil). Para todos os tratamentos, o pH do meio foi ajustado para 6,2 com 2 N NaOH, sendo o valor de pH verificado em PHmetro (Digimed, Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil). A atividade de água do meio foi mensurada a 0,99, sendo verificada no AquaLab CX-2 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA). No meio autoclavado, em temperatura em torno de 45 °C, adicionaram-se, assepticamente, volumes apropriados dos fungicidas, a fim de se obter as seguintes concentrações decrescentes: D, dose comercial recomendada pelo fabricante; D1, 0,75xD; D2, 0,5xD; D3, 0,25xD; D4, 0,125xD; D5, 0,0125xD e D6, 0,006xD. Não foram adicionados fungicidas nas placas de controle. O meio foi vigorosamente agitado e 16 ml foram assepticamente colocados em placas de Petri. Em todos os tratamentos foi inoculado 0,1 ml da suspensão de esporos dos isolados CDCA 01145 e CDCA 01146 (10^6 esporos/ml) no centro das placas. As temperaturas de incubação foram de 15, 20 e 30 °C, com base em informações que indicam que a temperatura ótima para a produção de OTA ocorre entre 15 °C e 20 °C, enquanto para o crescimento é próximo de 30 °C. A taxa de extensão micelial foi avaliada a cada dois dias, durante o período de incubação de 20 dias. OTA

foi extraída no vigésimo dia, de acordo com o método modificado de Bragulat, Abarca e Cabanes (2001). Para cada tratamento, três placas foram preparadas e dois diâmetros de cada colônia foram mensurados. A soma dos dois diâmetros foi dividida por 4, para a obtenção dos raios. O raio médio (mm) foi obtido a partir das três placas mensuradas. A curva de regressão linear do raio (mm) *versus* tempo foi utilizada para determinar a taxa de crescimento (mm/dia).

3.5 Extração e análise de OTA

A OTA foi extraída no final do período de incubação de acordo com o método de Bragulat, Abarca e Cabanes (2001) com algumas modificações. Para isto, três plugs da cultura foram removidos do centro, do meio e da borda de cada colônia. Após serem pesados em tubos de ensaio, foi adicionado 1 ml de metanol. Os tubos foram homogeneizados vigorosamente durante 5 segundos e mantidos, a 25 °C, por 60 minutos. Os extratos foram filtrados em membranas de politetrafluoroetileno (0,22 mm; Millipore Corp., Billerica, MA) e, em seguida, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em Shimadzu acoplado com duas bombas de alta pressão (modelo SPD-M20A), degaseificador DGU 20A₃, interface CBM-20A, autoinjeter SIL-10AF e detector de fluorescência RF-10 A_{XL} (Shimadzu, Kyoto, Japan). A coluna utilizada foi a Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) conectada a uma pré-coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5 mm, 5 µm; Agilent). As condições cromatográficas de comprimento de onda foram de 332 nm para excitação e 476 nm de emissão. O fluxo utilizado foi de 0,8 mL/min e o volume injetado das amostras e do padrão foi de 20 µL. A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (metanol:acetonitrila:água:ácido acético). O tempo de retenção médio obtido para OTA foi de 11±0,1 minutos. A quantificação da OTA nas amostras foi

realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear ($y = 1,11756 \times 10^7 x = 2592,1485$, em que y = área do pico e x = concentração de OTA). O coeficiente de determinação (r^2) obtido foi de 0,9999. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, sendo calculados pelas respectivas relações matemáticas: $LD = 3DP/m$ e $LQ = 10DP/m$ (em que DP = estimativa do desvio padrão da linha de regressão e m = coeficiente angular da linha de calibração) (Harris, 2008). Os valores obtidos para LD e LQ foram de 0,0004 e 0,0016 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e as soluções padrão de OTA foram injetadas em triplicata.

3.6 Ensaio de recuperação

Os ensaios de recuperação foram realizados para garantir a qualidade analítica dos resultados. O meio de cultura semissintético foi fortificado com concentrações iguais a 1,0 $\mu\text{g/g}$; 3,0 $\mu\text{g/g}$ e 6,0 $\mu\text{g/g}$, em triplicata. As amostras foram extraídas com metanol e analisadas de acordo com o método de Bragulat, Abarca e Cabanes (2001). A OTA foi recuperada do meio de uva em 82%, 87% e 91%, respectivamente. Os resultados de recuperação ficaram dentro dos padrões regulamentados pelo Codex Alimentarius para métodos analíticos (70% a 110%) (CODEX ALIMENTARIUS, 2008), o que comprova a satisfatória reprodutibilidade do método.

3.7 Efeito de fungicidas nas uvas inoculadas com *A. carbonarius*

A concentração mínima inibitória do crescimento de *A. carbonarius* obtida em experimento prévio com os fungicidas F1, F2 e F5 em meio semissintético à base de uva foi utilizada para avaliar o efeito direto em uvas.

Bagas sadias da cultivar Syrah, coletadas na região vitivinícola tropical do Brasil, foram superficialmente desinfetadas pela imersão em etanol (700 mL/L), por 1 minuto, em seguida em solução NaClO (1% Cl), por 30 segundos e em água destilada estéril, por 2 minutos. As bagas foram colocadas em capela de fluxo laminar, por 10 minutos, para remoção do excesso de água. Para cada tratamento, 20 bagas foram dispostas sob grades (para prevenir o contato entre as bagas) e colocadas dentro de caixa plástica com 300 ml de água para garantir umidade relativa (90%-100%) dos tratamentos. As grades e as caixas plásticas foram previamente desinfetadas com etanol (700 mL/L) e colocadas sob luz ultravioleta em fluxo laminar por 15 minutos. As bagas foram borrifadas com as soluções dos fungicidas ou com água destilada estéril (controle). Todas as bagas foram feridas com agulha estéril para facilitar a infecção fúngica e borrifadas com suspensão de esporos (10^6 esporos/ml) dos isolados de *A. carbonarius* (SOV 02 e PVDU 11). As caixas com as uvas foram hermeticamente fechadas e incubadas, a 25 °C, durante sete dias. Após o período de incubação, o crescimento visível de fungos foi avaliado e a porcentagem de infecção foi calculada com base na comparação entre os tratamentos com fungicidas e o controle. Foram realizadas duas repetições por tratamento.

3.8 Análises estatísticas

O efeito dos fungicidas no crescimento micelial e na produção de OTA nos meios CYA e semissintético à base de uva foi estatisticamente analisado no software SAS (SAS Institute, version 2.0, Inc., Cary, N.C., USA.) por análise de variância (ANAVA), seguida do teste de comparação múltipla Tukey. Foi efetuada a transformação logarítmica dos dados para aumentar a homogeneidade de variância, conforme a seguinte equação: $2 + \log (y)$, sendo y a variável resposta. A significância estatística foi definida a $P < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Screening* de fungicidas em CYA

O crescimento dos isolados de *A. carbonarius* foi significativamente afetado pelos fatores fungicidas, doses, tempo (dias) de incubação e suas interações mútuas (Tabela 2), a $P < 0,05$. Os efeitos dos fungicidas no crescimento diferiram entre si pelo teste multifatorial de Tukey. Comparado ao crescimento médio do fungo obtido no tratamento controle, observa-se que todos os fungicidas testados foram efetivos, sendo F1 e F2 os mais eficientes, com total inibição do crescimento, seguindo-se do F5, em que ocorreu expressiva redução média do crescimento e, em sequência, o F4 e o F3, que foi o de menor eficiência (Tabela 3). Os fungicidas F1 e F2 apresentam como ingrediente ativo Clorotalonil 82,5% e Mancozebe 80%, respectivamente. Em estudos realizados na Europa, fungicidas com o composto ativo mancozebe também atuaram na completa inibição de *A. carbonarius* em meio sintético de uva (BELLÍ et al., 2006).

Os fungicidas F1 e F2 inibiram completamente o crescimento de *A. carbonarius* em todas as doses testadas. Para o F5, foi detectado crescimento fúngico somente nas doses inferiores à dose comercial recomendada (D2, D3 e D4), enquanto que em todos os tratamentos com os fungicidas à base de cobre (F3 e F4) o crescimento foi observado. Em geral, fungicidas com o mesmo ingrediente ativo apresentam efeitos similares com a redução de doses (BELLÍ et al., 2006).

Tabela 2 Efeito das variáveis estudadas sobre o crescimento de *A. carbonarius* em meio CYA a 25 °C (P<0,05)

FV	GL	QM
fungicida	4	95844,2795*
dose	6	15277,5077*
dias	9	4663,5924*
fung*dose	19	5205,8748*
fung*dias	36	2090,0534*
dose*dias	54	302,3661*
fung*dose*dias	171	145,4665*
Erro	600	15,7563
CV	23,91196	
R-Square	0,987033	

*Valores significativos a P<0,05.

FV: fonte de variação; GL: grau de liberdade; QM: quadrado médio do erro; CV: coeficiente de variação.

Tabela 3 Crescimento médio de *A. carbonarius*, mensurado pelo diâmetro da colônia, obtido a partir dos diferentes fungicidas testados. Valores são representados pela média dos dois isolados e das repetições \pm erro padrão

Fungicidas	Diâmetro médio (mm)	Grupo*
Controle	68,18 \pm 4,63	e
F3	50,93 \pm 2,49	d
F4	28,29 \pm 2,21	c
F5	3,77 \pm 0,38	ab
F2	0 \pm 0	a
F1	0 \pm 0	a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0.05).

O crescimento de *A. carbonarius*, avaliado pelo diâmetro da colônia obtido com as diferentes doses dos fungicidas F5, F4 e F3 em meio CYA, pode ser observado na Figura 1. Na comparação com o controle, observa-se que o aumento das doses do fungicida F5 influenciou positivamente a redução do diâmetro da colônia, não sendo detectado crescimento na dose comercial recomendada e em doses superiores (4D e 2D) (Figura 1A). Foi possível observar que o tempo de duração da fase lag de crescimento aumentou com o aumento da concentração do fungicida no meio, o que é um fato esperado, visto que esta é a fase de adaptação celular do microrganismo ao novo meio de crescimento que, no caso, apresenta substâncias químicas antifúngicas. Para o fungicida F4 (Figura 1B), comparado ao controle, nota-se que as doses superiores a D2 apresentaram maior efetividade na redução do diâmetro da colônia. A dose de menor concentração (D4) não foi efetiva. Na Figura 1C observa-se que o fungicida F3 somente reduziu o crescimento fúngico em doses superiores à dose comercial recomendada (2D e 4D).

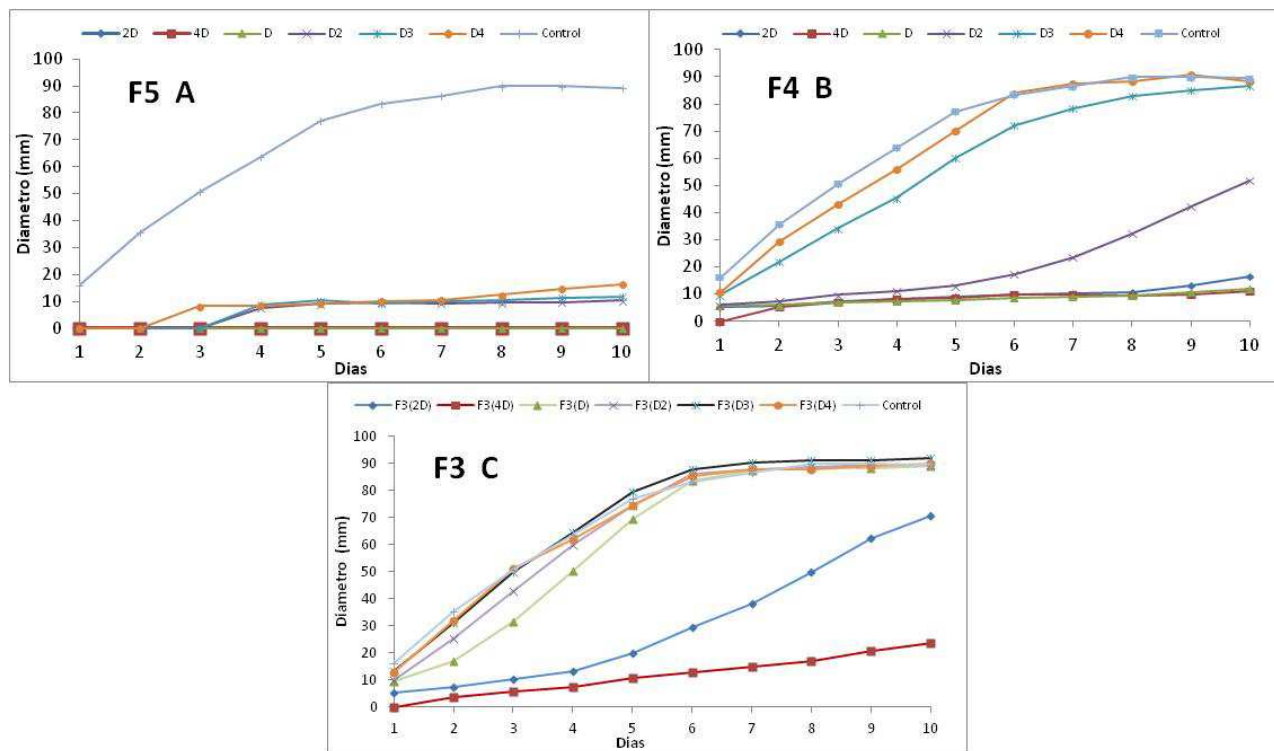


Figura 1 Efeito das diferentes doses dos fungicidas F5 (Folicur), F4 (Cuprogard) e F3 (Kocide) sobre o crescimento de *A. carbonarius* em meio CYA, durante dez dias de incubação a 25 °C. Valores são representados pela média dos dois isolados e das repetições

A taxa de crescimento (mm/dia) obtida dos tratamentos com diferentes doses dos fungicidas F3, F4 e F5 está descrita na Figura 2. Nos tratamentos com doses inferiores à D do F5, a taxa de crescimento foi reduzida em torno de 3 mm/dia, em comparação com o controle, tornando-se zero na dose D e em doses superiores. Para o F4, o crescimento diário reduziu-se a partir da dose D2 e, em doses superiores, tornou-se próximo de zero. Significativa redução na taxa de crescimento ao utilizar o F3 somente foi observada na dose mais elevada (4D).

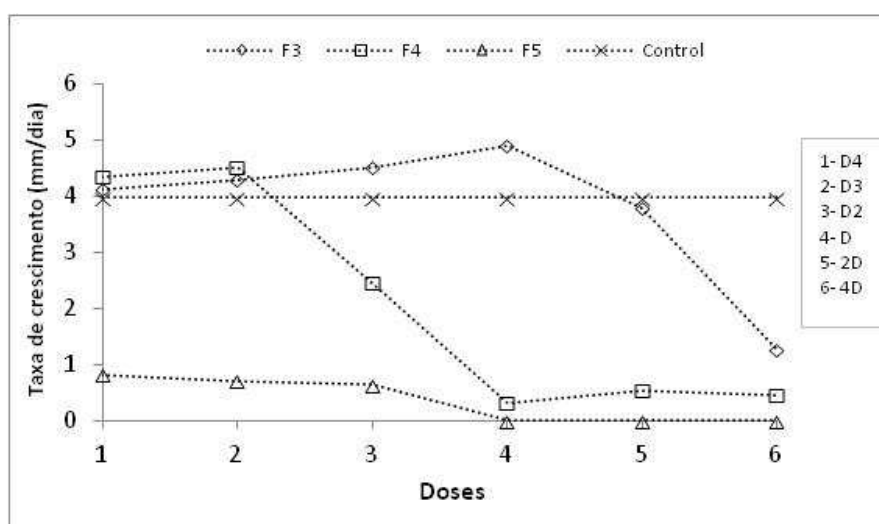


Figura 2 Efeito dos três fungicidas na taxa de crescimento de *A. carbonarius* cultivado em CYA a 25 °C

A produção de OTA somente foi detectada nos tratamentos com os fungicidas F3, F4 e F5, visto que nos demais não houve crescimento fúngico. O efeito dos fungicidas, da dose e da interação fungicida-dose sobre a produção de OTA por *A. carbonarius* foi estatisticamente significativo a $P < 0,05$. Na Tabela 4 são apresentados os valores de OTA obtidos dos tratamentos com os fungicidas F3, F4 e F5, nas diferentes doses testadas. Neste estudo observou-se que, com a diminuição das concentrações das doses, ocorreu um aumento na produção da

toxina, sendo a mesma correlação observada para o crescimento do fungo. Na dose D2 e nas inferiores (D3 e D4), o fungicida F4 influenciou positivamente a produção de OTA, sendo detectados valores superiores ao observado para o controle. O mesmo ocorreu na dose mais baixa (D4) do fungicida F5. Na dose comercial recomendada, o F4 atuou na redução da produção de OTA, enquanto o F3 estimulou a produção da toxina pelo fungo. Entretanto, nas doses mais elevadas, os fungicidas influenciaram negativamente a produção de OTA. O contrário foi observado por Medina et al. (2007), que encontraram influência positiva do fungicida carbedazim no acúmulo de OTA, com os maiores valores da toxina detectados nos tratamentos com os maiores níveis do fungicida. Batilani et al. (2003) também detectaram fungicidas capazes de estimular a produção de OTA por fungos *Aspergillus* Seção *Nigri*.

Tabela 4 Efeito dos fungicidas na produção de OTA por *A. carbonarius* em meio CYA após dez dias de incubação a 25 °C. Valores são representados pela média dos dois isolados e das repetições±erro padrão

Fungicida	Doses					
	4D	2D	D	D2	D3	D4
F3	1,89±0,48	2,74±2,03	6,04±0,29	4,34±0,18	4,28±0,73	3,54±0,07
F4	0,02±0,01	0,018±0,005	0,05±0,011	7,32±1,70	12,28±1,71	11,39±2,65
F5	-	-	-	0,23±0,20	1,42±0,12	7,68±0,63
Controle	3,69±0,99					

Autores relataram que a produção de micotoxinas pode ser estimulada quando condições ambientais de estresse e baixas doses de fungicidas são mantidas durante o crescimento de fungos toxigênicos (D'MELLO et al., 1998; MAGAN et al., 2002; MEDINA et al., 2007a; NESCI; RODRÍGUEZ; ETCHEVERRI, 2003). Esta hipótese foi confirmada pelos resultados do

presente estudo, o que indica que a aplicação desses fungicidas em baixas doses por tempo prolongado pode estimular o crescimento de *A. carbonarius* e a produção de OTA.

Nenhum dos fungicidas comerciais avaliados neste estudo é registrado, no Brasil, para o controle de fungos do gênero *Aspergillus*. Além disso, as doses comerciais propostas pelas empresas fabricantes são destinadas para o controle de outros fungos. Entretanto, ao considerar a dose comercial recomendada, os fungicidas F1, F2, F4 e F5 apresentaram efeitos significativos na redução do crescimento e da produção de OTA por *A. carbonarius* em meio CYA a 25 °C.

4.2 Efeito de fungicidas em meio semissintético à base de uva

Os fungicidas F1, F2 e F5, que inibiram completamente o crescimento de *A. carbonarius* na dose comercial recomendada (D) no experimento prévio, foram selecionados para o experimento *in vitro* utilizando o meio semissintético à base de uva. Doses inferiores à recomendada (D) foram testadas para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) do crescimento fúngico. Na Tabela 5 apresentam-se as doses mínimas dos fungicidas que inibiram completamente o crescimento. Nota-se que estas doses diferiram entre as temperaturas avaliadas para cada fungicida. Para o F1, nas temperaturas de 20 e 30 °C, D1 foi a CMI, enquanto, a 15 °C, a concentração D3 foi suficiente para inibir o crescimento. O mesmo ocorreu para F2 e F5, em que as CMIs do fungo a 15 °C foram, respectivamente, D4 e D2, doses inferiores às CMI observadas a 20 e a 30 °C. Isto realça as evidências de que temperaturas baixas, como de 15 °C, não são favoráveis para o crescimento de fungos desta espécie.

Assim, em regiões de cultivo de uva onde predominam temperaturas mais baixas, a aplicação de baixas doses dos fungicidas testados, provavelmente,

seria suficiente para inibir o crescimento de *A. carbonarius*, o que é bastante interessante, tanto do ponto de vista econômico como sanitário.

Tabela 5 Crescimento de *A. carbonarius*, a 15, 20 e 30 °C, em meio semissintético de uva com os fungicidas F1, F2 e F5, nas concentrações D, dose comercial recomendada; D1, 0,75xD; D2, 0,5xD; D3, 0,25xD; D4, 0,125xD; D5, 0,0125xD e D6, 0,006xD

Fungi- cidas	Doses																								
	D0			D			D1			D2			D3			D4			D5			D6			
	15°C	20°C	30°C	15°C	20°C	30°C	15°C	20°C	30°C	15°C	20°C	30°C	15°C	20°C	30°C	15°C	20°C	30°C	15°C	20°C	30°C	15°C	20°C	30°C	
Controle	+	+	+																						
F1				-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F2				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F5				-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

D0: meio sem adição de fungicida; + crescimento detectado; - ausência de crescimento.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 6, os fatores fungicida, dose, temperatura, tempo e suas interações apresentaram efeito significativo sobre o crescimento de *A. carbonarius* no meio semissintético à base de uva. De acordo com o teste de Tukey, o crescimento médio do fungo, expresso pelo diâmetro (mm), diferiu em função do tipo de fungicida testado, sendo o F1 (clorotalonil 82,5% i.a.) o fungicida de maior efeito inibitório, seguindo-se pelo F5 (tebuconazol 20% i.a.) e o F2 (mancozebe 80% i.a.). Alta efetividade do composto mancozebe foi reportada por Mateo et al. (2011), em estudos com fungos toxigênicos em meio à base de cevada.

Tabela 6 ANAVA do efeito das variáveis estudadas sobre o crescimento de *A. carbonarius* em meio CYA a 25 °C (P<0,05)

FV	GL	QM
Fungicida	2	6837,51*
Dose	6	215143,35*
Temperatura	2	150539,37*
Dias	9	18039,44*
fung*dose	12	8454,3*
fung*temp	4	950,22*
dose*temp	12	21704,41*
fung*dias	18	276,26*
dose*dias	54	2605,66*
temp*dias	18	1689,15*
Erro	3148	85,6

*Valores significativos a P<0.05.

FV, fonte de variação; GL, grau de liberdade; QM, quadrado médio do erro.

Para o fungicida F1, todas as doses testadas reduziram o crescimento de *A. carbonarius*, em comparação com o tratamento controle (Figura 3). Diversos podem ser os efeitos dos diferentes fungicidas na célula microbiana. No geral, tem-se inibição da síntese de proteínas e ácidos nucleicos, bloqueio da síntese de esteróis ou inibição da síntese da parede celular (Kathiravan et al., 2012). Para vários compostos, a germinação de esporos é considerada a fase de crescimento mais sensível à inibição (SLAWECKI, 2002). Neste estudo, os fungicidas F1 e F2 inibiram completamente a germinação na dose comercial recomendada (D) em meio de uva, nas três temperaturas avaliadas (Figuras 3 e 4). Para o F5 este efeito somente foi observado a 15 °C (Figura 5), o que difere dos resultados obtidos por Bellí et al. (2006), em que completa inibição ocorreu a 20 °C e a 30 °C, com aplicação de fungicida à base de tebuconazol.

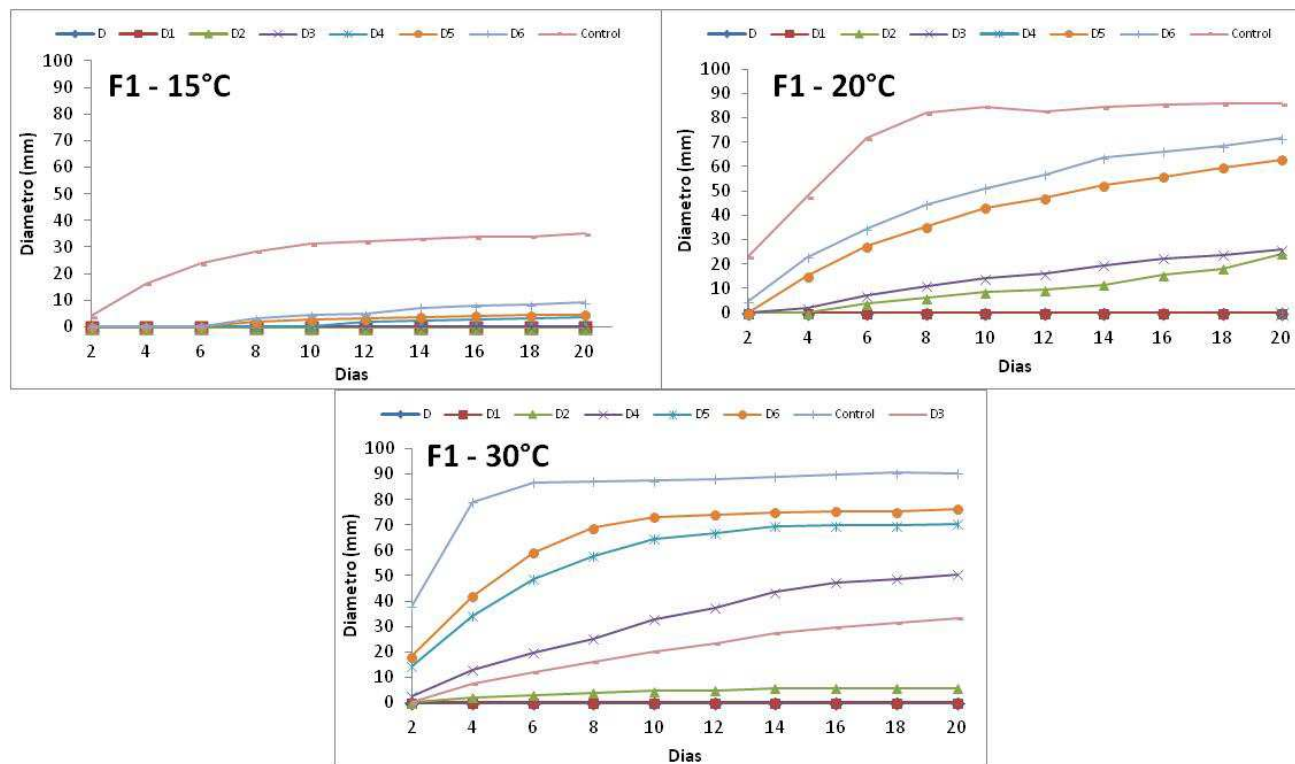


Figura 3 Efeito das diferentes doses do fungicida F1 sobre o crescimento de *A. carbonarius* cultivado em meio semissintético à base de uva, nas temperaturas de 15, 20 e 30 °C. Valores são representados pela média dos dois isolados e das repetições

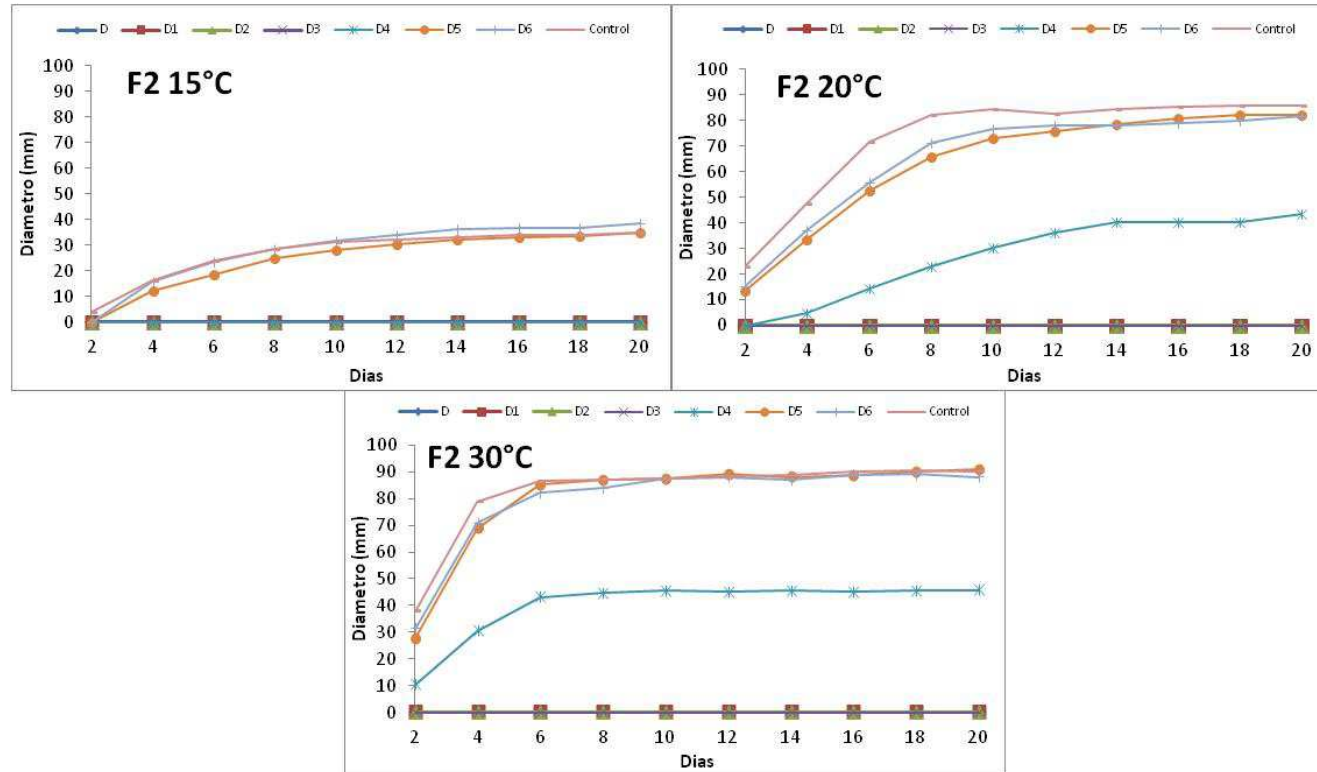


Figura 4 Efeito das diferentes doses do fungicida F2 sobre o crescimento de *A. carbonarius* cultivado em meio semissintético à base de uva, nas temperaturas de 15, 20 e 30 °C. Valores são representados pela média dos dois isolados e das repetições

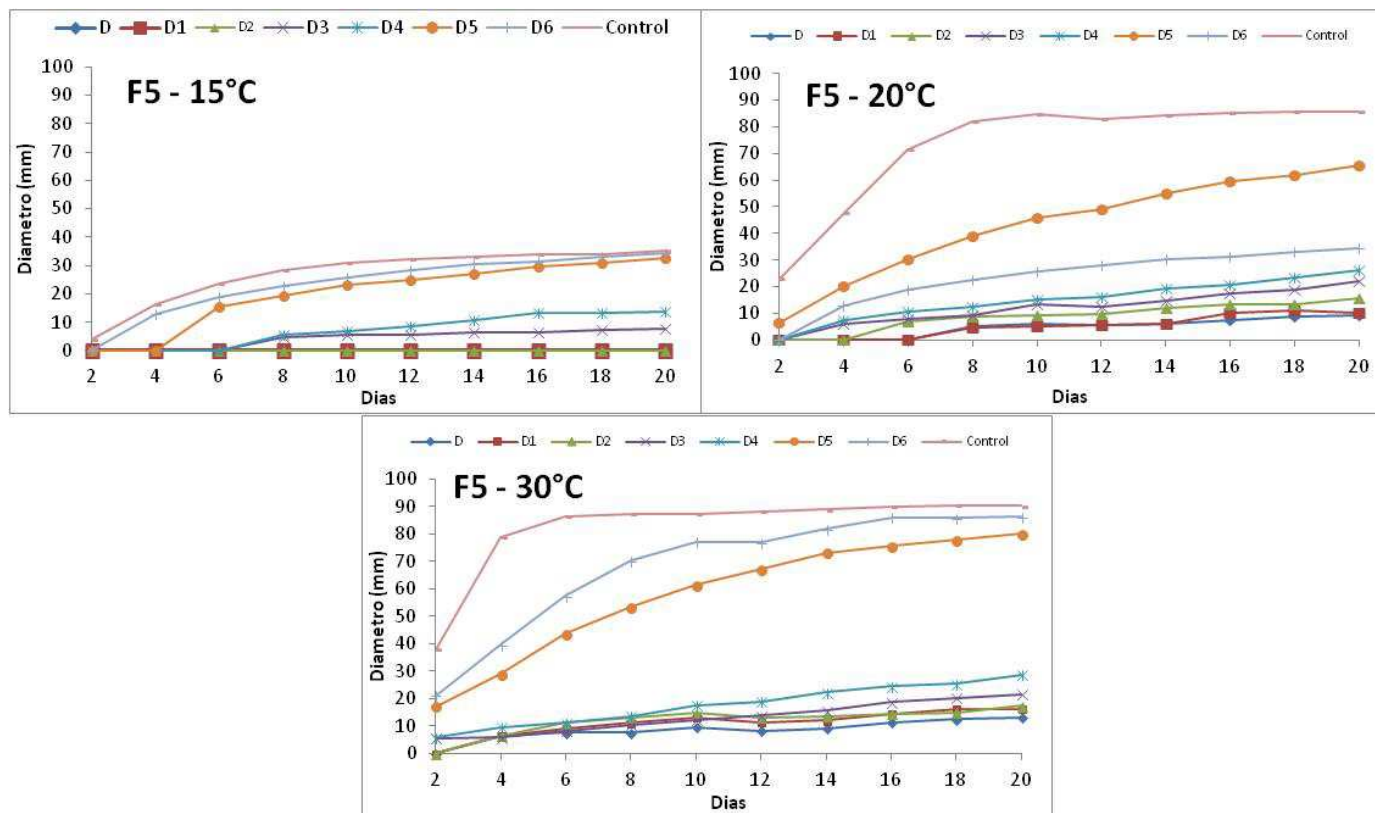


Figura 5 Efeito das diferentes doses do fungicida F5 sobre o crescimento de *A. carbonarius* cultivado em meio semissintético à base de uva, nas temperaturas de 15, 20 e 30 °C. Valores são representados pela média dos dois isolados e das repetições

Com relação à temperatura, para os três fungicidas, é possível observar, nas Figuras 3, 4 e 5, que, a 15 °C, ocorreu a maior redução do crescimento, sendo significativamente menor a 20 °C e a 30 °C, o que já era esperado, visto que a temperatura ótima para o crescimento de *A. carbonarius* ocorre entre 25 e 30 °C (PERRONE et al., 2008). Em estudo de Bellí et al. (2006) concentrações mais elevadas de fungicida foram necessárias para prevenir o crescimento deste fungo na temperatura de 30 °C em relação a 20 °C, em meio sintético de uva.

A produção de OTA, avaliada após 20 dias de incubação, foi significativamente influenciada pelo tipo de fungicida, a dose e a temperatura, a $P < 0,05$. De acordo com o teste Tukey, a produção média da toxina diferiu entre as três temperaturas avaliadas, sendo o maior valor médio detectado a 15 °C e o menor, a 30 °C. Estes resultados corroboram estudos que relatam a produção ótima de OTA por *A. carbonarius* entre 15 °C e 20 °C (BELLI et al., 2007; LEONG et al., 2006). Em estudo realizado no Brasil, a maior produção desta toxina por *A. carbonarius* também foi detectada a 15 °C, em meio à base de uva (PASSAMANI et al., 2014). Entretanto, em outros estudos com fungicidas em meio de cevada observou-se que a produção de OTA foi maior a 25 °C do que a 15 °C. Isto indica que, além do tipo de fungicida e da temperatura, o substrato também influencia o acúmulo desta toxina.

Na Tabela 7 apresentam-se os valores de OTA obtidos nas diferentes temperaturas e doses avaliadas. No geral, observa-se que a produção foi inferior ao detectado em experimento prévio, no meio de cultivo CYA. Os isolados utilizados neste estudo foram obtidos de uvas cultivadas no Brasil e os níveis de OTA em meio de cultivo otimizado para a produção desta toxina (CYA) foram inferiores ao encontrado no meio semissintético de uva. Assim, a uva não foi considerada, neste estudo, como um substrato muito favorável para OTA.

Tabela 7 Efeito dos fungicidas na produção de OTA por *A. carbonarius* cultivado em meio semissintético à base de uva, a 15, 20 e 30 °C. Valores são representados pela média dos dois isolados e das repetições±erro padrão.

Fungicida	Temperatura	Doses						
		D	D1	D2	D3	D4	D5	D6
F1	T-15	-	-	-	-	2,47±2,021	0,46±0	0,85±0,461
	T-20	-	-	0,22±0	0,22±0,047	7,35±7,166	0,06±0,022	0,05±0,0108
	T-30	-	-	0,06±0,05	0,09±0,0025	0,138±0,028	0,09±0,024	0,08±0,021
F2	T-15	-	-	-	-	-	0,82±0,244	0,46±0,094
	T-20	-	-	-	-	0,18±0,0005	0,26±0,045	0,29±0,03
	T-30	-	-	-	-	0,05±0	0,25±0,079	0,29±0,111
F5	T-15	-	-	-	0,78±0,001	1,33±0,356	1,59±0,847	0,67±0,349
	T-20	0,31±0,002	0,3±0,1303	1,05±0,537	1,28±0,579	1,84±0,93	0,53±0,036	0,46±0,033
	T-30	0,01±0	0,06±0,016	0,13±0,065	0,33±0,046	1,24±0,171	0,41±0,105	0,38±0,002
Controle	T-15				0,17±0,007			
	T-20				0,2±0,031			
	T-30				0,24±0,043			

Na temperatura de 15 °C, em doses inferiores à dose recomendada, ao comparar com o tratamento controle, os três fungicidas atuaram induzindo o aumento da produção da toxina. Efeito contrário ocorreu, nesta mesma temperatura, para o crescimento. Dessa forma, em regiões onde ocorre o predomínio de temperaturas mais baixas, a aplicação de baixas doses dos fungicidas, durante um período prolongado, pode ocasionar efeito inibitório sobre o crescimento e, ao mesmo tempo, indutor da produção de OTA.

Em doses baixas (<D3), o fungicida F5 (Tebuconazol 20%) foi o que mais favoreceu a produção de OTA em meio de uva ($P < 0,05$), em todas as temperaturas. Outros fungicidas, como os à base de enxofre, têm sido relatados como estimuladores da produção de OTA em uvas (BATTILANI; GIORNI; PIETRI, 2003; BELLÍ et al., 2006). Entretanto, neste estudo, este efeito ocorreu somente em doses subinibitórias. Assim, em doses baixas nas quais o crescimento fúngico não é inibido, a presença do fungicida pode ser considerada um fator de estresse para os fungos toxigênicos, estimulando a produção da OTA.

4.3 Efeito de fungicidas nas uvas

Para avaliar o efeito dos fungicidas nas uvas foram selecionadas doses que apresentaram efetiva redução do crescimento no experimento prévio em meio semissintético à base de uva. Foram escolhidos os resultados obtidos na temperatura de 30 °C, já que se encontra no intervalo considerado mais favorável para o crescimento de *A. carbonarius*. As doses dos fungicidas aplicadas diretamente nas bagas foram: F1 (D2, 0,5xD); F2 (D3, 0,25xD) e F5 (D, dose comercial recomendada).

Nenhum dos fungicidas testados nas doses selecionadas apresentou efeitos significativos no controle de *A. carbonarius* em uvas. Assim, comparado

com o tratamento controle, 100% de contaminação das bagas foi observada. Isso indica que a efetividade desses fungicidas em meio de cultivo difere quando aplicados diretamente nas uvas. Sabe-se que, no meio de cultura, o tempo e a intensidade de contato do fungo com os componentes químicos são maiores do que na uva, o que pode explicar os resultados obtidos para as doses avaliadas. De acordo com os resultados do presente estudo, o fungicida F5 não seria recomendado para o controle de *A. carbonarius*, visto que não foi efetivo nas uvas na dose comercial recomendada e, na aplicação de dosagens mais concentradas, provavelmente, não seria a forma mais adequada para solucionar o problema.

Outros estudos foram realizados para verificar o efeito de fungicidas diretamente em uvas. Na Espanha, Bellí et al. (2006) encontraram fungicidas que controlaram o crescimento e a produção de micotoxinas tanto no meio sintético de uva quanto nas bagas. Os antifúngicos testados em uvas no estudo de García-Cela et al. (2011), embora com ingredientes ativos diferentes dos avaliados no presente estudo, também reduziram a infecção fúngica em 40% a 84%. Assim, outros estudos devem ser conduzidos, a fim de determinar as doses efetivas para o controle de *A. carbonarius* em uvas no Brasil.

5 CONCLUSÃO

De acordo com o presente estudo, pode-se concluir que, na dose comercial recomendada, a maioria dos fungicidas testados apresentou efeito significativo no controle do crescimento de *A. carbonarius* e na produção de OTA *in vitro*, sendo este efeito influenciado pelo tipo de fungicida, a dose e a temperatura. Entretanto, em doses subinibitórias, os fungicidas estimularam a produção da toxina, o que realça a importância do conhecimento do efeito das doses dos fungicidas a serem aplicados no campo. Neste estudo, a temperatura foi considerada um fator determinante que influencia a efetividade dos fungicidas sobre o crescimento de *A. carbonarius* e a produção de OTA, sendo a maior redução do crescimento e a maior produção de OTA detectadas a 15 °C. Assim, regiões de cultivo de uva onde predominam temperaturas mais baixas são mais susceptíveis ao efeito positivo dos fungicidas na produção de OTA. O efeito direto dos fungicidas nas uvas deve ser mais estudado, a fim de se obter uma maior aproximação das condições que ocorrem no campo.

REFERÊNCIAS

- BATTILANI, P. et al. Effect of fungicides on ochratoxin producing black aspergilli. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 85, n. 1, p. 285–291, 2003.
- BATTILANI, P. et al. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 13, p. 1736–1740, Oct. 2004.
- BATTILANI, P.; GIORNI, P.; PIETRI, A. Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 715–722, Sept. 2003.
- BELLÍ, N. et al. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 40-45, 2006.
- BELLÍ, N. et al. Skin damage, high temperature and relative humidity as detrimental factors for *Aspergillus carbonarius* infection and ochratoxina A production in grapes. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 11, p. 1343-1349, Nov. 2007.
- BOYACIOGLU, D.; HETTIARACHCHY, N. S.; STACK, R. W. Effect of three systemic fungicides on deoxynivalenol (vomitoxin) production by *Fusarium graminearum* in wheat. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 72, n. 1, p. 93–101, 1992.
- BRAGULAT, R.; ABARCA, L.; CABANES, J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 2-3, p. 139-144, Dec. 2001.

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

CODEX ALIMENTARES. Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed. **Codex Stanford**, New York, n. 193, p. 01-48, 2008.
Disponível em: <www.codexalimentarius.net/download/standards/17/CXS_193e.pdf>. Acesso em: 20 jun.2013.

D'MELLO, J. P. F. et al. Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, n. 8, p. 741–751, Nov. 1998.

GARCÍA-CELA, E. et al. Ochratoxigenic moulds and effectiveness of grape field antifungals in a climatic change scenario. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 92, n.7, p. 1455-61, May 2011.

GAREIS, M.; CEYNOWA, J. Influence of the fungicide Matador (tebuconazole/triadimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmorum*. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 198, n. 3, p. 244–248, 1994.

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

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monograph on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans: some traditionally herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene**. Lyon: IARC Press, 2002.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 20, n. 19, p. 5678-5698, Oct. 2012.

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

MAGAN, R. et al. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 7, p. 685–690, Sept. 2002.

MATEO, E. M. et al. Impact of non-selective fungicides on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *A. carbonarius* in barley-based medium. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 28, n. 1, p. 86-97, Jan. 2011.

MEDINA, A. et al. Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 230–235, Nov. 2007a.

MEDINA, Á. et al. Efficacy of natamycin for control of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains under different environmental conditions. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 6, p. 2234-2239, Dec. 2007.

NESCI, A.; RODRÍGUEZ, M.; ETCHEVERRI, M. Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 2, p. 279-287, 2003.

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

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

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

SLAWECKI, C. J. Altered EEG responses to ethanol in adult rats exposed to ethanol during adolescence. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, New York, v. 26, n. 2, p. 246–254, Feb. 2002.

TERRA, M. F. et al. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 93, n. 4, p. 890-894, Mar. 2013.

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