

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

ESTELA DE OLIVEIRA NUNES

**POPULAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E SUA RELAÇÃO
COM MICOTOXINAS PRESENTES NA UVA E NO VINHO DE
SANTA CATARINA**

**Florianópolis - SC
2008**

ESTELA DE OLIVEIRA NUNES

**POPULAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E SUA
RELAÇÃO COM MICOTOXINAS PRESENTES NA UVA E NO
VINHO DE SANTA CATARINA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador:

Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

Co-orientadores:

Prof. Dr. Armando Albino Dias Venâncio e Prof^a. Dr^a. Vildes Maria Scussel

**Florianópolis – SC
2008**

ESTELA DE OLIVEIRA NUNES

**POPULAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS E SUA
RELAÇÃO COM MICOTOXINAS PRESENTES NA UVA E NO
VINHO DE SANTA CATARINA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Florianópolis, ___ de _____ de 2008.

Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior
Orientador

Prof. Dr. Armando Albino Dias Venâncio
Co-Orientador

Prof. Dr. Vildes Maria Scussel
Co-Orientador

“A natureza é a diferença entre a alma e Deus”.

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Doutor Agenor Furigo Júnior, que foi uma das pessoas que mais influenciou na minha carreira acadêmica, tendo sido também meu orientador de mestrado, pela confiança a mim depositada, pelo incentivo nos momentos difíceis, onde sempre me instigou a buscar alternativas para as adversidades, e que não foram poucas.

Ao Professor Doutor Armando Venâncio não tenho palavras para definir o quão lhe sou grata. A orientação desse mestre foi um divisor de águas na minha vida pessoal e profissional, me mostrou um mundo além-mar, sem o auxílio, oportunidades e desafios que por ele me foram proporcionados, tenho a certeza de que não chegaria até aqui.

A minha Co-orientadora Professora Doutora Vildes Scussel pela sua contribuição nessa etapa de minha formação e, como responsável pelo Laboratório de Micotoxicologia e Contaminantes Alimentares (CCA-UFSC) me permitiu a realização de algumas etapas deste trabalho em seu laboratório.

Aos colegas Portugueses do Laboratório de Ciência e Tecnologia Alimentar do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Rita Serra e Luís Abrunhosa que dispensaram parte de seu tempo para muitos esclarecimentos, a Sara Silva e ao Nuno Cunha pela amizade e companheirismo nas atividades diárias.

Aos colegas do Laboratório de Micotoxicologia e Contaminantes Alimentares (CCA-UFSC), José Júnior, Bárbara e Vanessa, que compartilharam de momentos de muita alegria e também de muita aflição e nunca permitiram que eu desistisse.

Aos colegas do INTELAB-UFSC, ao Professor Luismar que me recebeu de portas abertas em seu laboratório, ao Itamar e ao Claudimir Carminatti que muitas vezes dividiram o mesmo espaço físico comigo, e me apoiaram sempre que precisei.

À outras pessoas que contribuíram de forma pontual, como o Eng. Hugo Braga da Eagri-CIRAM, que me auxiliou na caracterização climática das regiões estudadas. Ao Professor Pedro Barbeta do Departamento de Informática e Estatística da UFSC, no tratamento estatístico dos dados. Aos Engenheiros agrônomos Edgar Peruzzo e Marco Dalbó da Epagri-Videira com os quais tive a oportunidade de trabalhar e que me despertaram o interesse pela cultura da videira e pela produção do vinho.

Às minhas colegas de trabalho Deyse e Bruna, pois sem a

amizade e o comportamento profissional exemplar delas, essa conquista seria ainda mais difícil. À Marcieli e a Raquel que também me auxiliaram nessa caminhada.

Ao Edeilson, Secretário do Departamento de Pós-graduação do Departamento de Engenharia Química da UFSC, um profissional competente que sempre teve uma palavra amiga e partilhou comigo cada conquista.

Aos membros da banca, Professor Aparecido Lima da Silva (CCA-UFSC), Marco Dalbó (Epagri-Videira), Gildo Almeida da Silva (Embrapa Uva e Vinho) e Mara Quadri (EQA-UFSC) que contribuíram para o aprimoramento desse trabalho.

A UNOESC e ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC pela oportunidade que me foi dada.

Agradeço aos vitivinicultores e vinícolas da Região do Meio Oeste e Planalto que me facultaram as uvas para que esse estudo pudesse ser realizado.

A minha família que apesar da distância, sempre partilharam da busca aos meus objetivos, em especial ao meu marido Domingos pela compreensão e apoio incondicional durante toda essa jornada.

Agradeço à Deus, por ter me dado fé para superar todos os obstáculos e por me permitir mais essa conquista.

RESUMO

Mudanças expressivas no perfil do consumidor de alimentos e bebidas são notórias, dentre os vários aspectos que primam pela qualidade, está a preocupação com a segurança alimentar. Essa mudança no mercado consumidor tem estimulado os vitivinicultores do mundo todo a agregarem novos elementos de qualidade aos vinhos. Com a introdução de novas práticas agrícolas, a presença de substâncias prejudiciais à saúde, tais como: resíduos de pesticidas e micotoxinas, tem sido investigada em várias matérias-primas vegetais e em seus derivados, como é o caso das uvas e vinhos. A produção de uvas e vinhos na América Latina em relação à produção mundial, representa cerca de 6,6 e 10%, respectivamente, onde o Brasil é terceiro maior produtor. A vitivinicultura brasileira, nos últimos anos tem voltado sua atenção à produção de vinhos finos, sendo a região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) a maior produtora de uvas destinadas ao processamento de sucos e vinhos. Quanto à produção de vinhos, o Estado de Santa Catarina divide-se em 3 regiões: tradicional, nova e super nova (BRDE, 2005). O presente trabalho buscou o estabelecimento de um panorama sob o ponto de vista micotoxicológico, em relação à qualidade das uvas produzidas e processadas em 2 das regiões catarinenses: tradicional (Meio Oeste) e super nova (Planalto). Para tanto, foram investigadas uvas obtidas durante as vindimas de 2005/2006. Analisou-se os seguintes parâmetros: micobiota, capacidade produtora de ocratoxina A (OTA) dos isolados de *Aspergillus* da secção *Nigri* (OTA) em cultura pura, níveis de OTA e patulina e de ácido glucônico nas uvas. Foram isoladas e identificadas 1492 estirpes de fungos filamentosos, das quais 82 pertencentes à secção *Nigri*, todos os exemplares de *A. japonicus* foram OTA (-) e 15,9% das estirpes de agregado *A. niger* foram OTA (+). Dos 2 exemplares de *A. carbonarius* recuperados, apenas um foi hábil para produzir OTA. A ocorrência das micotoxinas OTA e patulina nas uvas foi estudada, onde 100% das amostras foram negativas para a patulina, enquanto a OTA foi detectada em 40,6% do total de uvas amostradas. Os níveis médios de OTA foram: 0,124 µg.Kg-1 (Meio Oeste) e 0,076 µg.Kg-1 (Planalto), refletindo uma estreita relação entre os níveis de OTA e a incidência de representantes do grupo agregado *A. niger* e de *A. carbonarius*. A concentração de ácido glucônico foi determinada nas uvas e a relação com os níveis de OTA e a incidência de *Botrytis* sp. foi investigada. A correlação entre os níveis de ácido glucônico e de OTA foi fraca, sugerindo ineficiência na predição do rastreio à OTA. Porém, a incidência de *Botrytis* sp. apresentou uma correlação significativa, comportando-se como um bom indicador para a contaminação das uvas por *Botrytis*, a qual muitas vezes, não é observada no exame visual. A capacidade de degradação de OTA em meio de uva sintético por meio da atividade residual de uma protease ácida de uso comercial foi avaliada sob as seguintes condições: pH (3,5 e 4,5), temperatura (20 e 350C) e concentrações iniciais de OTA (2,0 e 0,2 µg.L-1), com concentração fixa da enzima. A formação de ocratoxina alfa

(OT α) mediada pela enzima confirmou a atividade na hidrólise de OTA. A formação de OT α foi discretamente favorecida na maior temperatura (350C), independente do pH e das concentrações iniciais de OTA. No entanto, a atividade específica da enzima foi muito baixa e as concentrações de OT α ao final de 114 horas de ensaio foram similares para ambas concentrações iniciais do substrato. Esse fato leva a constatação de que a enzima não possui como atividade principal a hidrólise da OTA e, sim que apresenta uma ação colateral. A hipótese de que o meio de uva possa apresentar algum componente que venha a colaborar para a redução da hidrólise da OTA também é sugerida. A evolução dos níveis de OTA durante o processo de microvinificação de uvas tintas provenientes da safra de 2006, foi monitorada através do seu controle nas principais operações unitárias. Realizou-se 2 ensaios: o primero a partir de uvas visualmente sãs (ensaio 1) e outro contendo $\pm 1/3$ de uvas com podridão (ensaio 2). A concentração de OTA observada no mosto fresco do ensaio 2 foi 9,9 vezes superior ao observado no mosto fresco do ensaio 1. Para os dois ensaios a remoção da OTA no vinho foi superior a 80%. A fermentação alcoólica foi a operação mais representativa na redução dos níveis de OTA (50%). Isso permite definir sob o ponto de vista de análise de risco, que a realização do controle apresenta 2 pontos críticos: mosto fresco e após a fermentação alcoólica, pois o nível de OTA continuou decrescendo até o final do processo de vinificação.

Palavras-chave: Micotoxinas; Segurança alimentar; Uva.

ABSTRACT

Expressive changes in the food and drinks consumer profile are notorious. Among several aspects that stand out by the quality, its the preoccupation with food safety. This change in the consuming market has been stimulating vitiviniculturnists worldwide to aggregate quality new elements to the wines. With the introduction of new agricultural practices, the presence of harmful substances to the health, such as: mycotoxins and pesticides residues, it has been being investigated in several vegetable, raw materials and in their derivatives, as it is the grapes and wines case. The grapes and wines production in Latin America regarding the world production, it represents about 6.6 and 10%, respectively, where Brazil is third largest producer. The Brazilian viticulture, in the last years has been returning its attention to the production of table wines, being Southern region (Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul) the biggest grapes producer destined to the juices and wines processing. Santa Catarina State it divides into 3 regions, regarding the wines production in: Traditional, New and Super New (BRDE, 2005). The present work sought the establishment of a landscape under the micotoxicologic point of view, regarding the grapes quality produced and processed in 2 of the producer regions of Santa Catarina: Traditional (Meio Oeste) and Super New (Planalto). For so much, were investigated grapes obtained during the vintages of 2005/2006. It analyzed the following parameters: mycobiota, ochratoxin A (OTA) capacity producer of the isolated of *Aspergillus* of the section Nigri in pure culture, levels of OTA and patulin and of gluconic acid in the grapes. Were isolated and identified 1492 filamentous fungus strains, of what 82 belonging to the Nigri section, all the patterns of *A. japonicus* were OTA (-) and 15,9% of *A. niger* aggregate isolated were OTA (+). Of the two *A. carbonarius* recovered, just one was able to produce OTA. Mycotoxins - OTA and patulin occurrence in the grapes was studied, 100% of the samples were negatives for the patulin, while, OTA was detected in 40.6% from the grapes sampled. The average levels of OTA were: 0.124 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ (Meio Oeste) and 0.076 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ (Planalto), reflecting a narrow relation between OTA levels and representatives incidence of the *A. niger* aggregate group and of *A. carbonarius*. Gluconic acid concentration was determined in the grapes and the relation with OTA levels and *Botrytis* sp.' incidence was investigated. The correlation between gluconic acid levels and of OTA was weak, suggesting inefficiency in the prediction in tracing to OTA. However, *Botrytis* sp.' Incidence presented a significant correlation, behaving as a good indicator for the grapes contamination by *Botrytis*, which, many times, is not observed in the visual exam. The degradation capacity of OTA in synthetic grape media, through of the residual activity of a acid protease of commercial use, was evaluated under the following conditions: pH (3,5 and 4,5), temperature (20 and 350C) and initial concentrations of OTA (2.0 and 0.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$), with fixed concentration of the enzyme. Ochratoxin alfa (OT α) formation mediated by enzymes confirmed

the residual activity in the hydrolysis of OTA; this formation was favored in the highest temperature (350C), independent of pH and initial concentration of OTA. However, the specific activity of the enzyme was very low and the OTA concentrations at the end of 114 assay hours were similar for both initial concentrations of the substrate. That fact carries to the verification that the enzyme does not own hydrolysis of OTA as main activity, but that presents a collateral action. The hypothesis that the grape media can present some component that comes to also collaborate for the hydrolysis reduction of OTA is suggested. The evolution of OTA levels during the microvinification of red grapes proceeding from harvest of 2006; it was monitored through the control of main unitary operations. It accomplished 2 assays: The first from grapes containing about $\pm 1/3$ of grapes with rot (assay 1) and another with visually healthy grapes (assay 2). The evolution of OTA levels during the microvinification of red grapes proceeding from harvest of 2006; it was monitored through the control of main unitary operations. It accomplished 2 assays: The first, from grapes containing about $\pm 1/3$ of grapes with rot (assay 1) and another with visually healthy grapes (assay 2). The concentration of OTA observed in fresh must of the assay 1, was 9.9 times superior to the observed fresh in must of the assay 2. For both assays, the removal of OTA in the wine was higher to 80%. Alcoholic fermentation was the most representative operation in the levels reduction of OTA (50%). That allows defining under the risk analysis point of view, that the control accomplishment introduces 2 critical points: Fresh must and after alcoholic fermentation, because the level of OTA continued decreasing until the final vinification process.

Keywords: Mycotoxins; Food safety; Grape.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Objetos de estudo das principais ciências de base da micotoxicologia e interações entre diversas áreas de investigação.....	29
Figura 3.1 - Distribuição anual da temperatura do ar - média, máxima e mínima (°C), precipitação precipitação pluviométrica (mm) e insolação (h) de regiões vitivinícolas produtoras de uvas viníferas na região do Alto Vale do Rio do Peixe no estado de Santa Catarina	40
Figura 3. 2 - Distribuição anual da temperatura do ar - média, máxima e mínima (°C), precipitação pluviométrica (mm) e insolação (h) de regiões vitivinícolas produtoras de uvas viníferas na região de São Joaquim no Estado de Santa Catarina.....	40
Figura 3.3 - Períodos evolutivos da produção vitivinícola comercial no Brasil: quatro gerações de vinhos brasileiros.....	42
Figura 3.4 - Diagrama da fermentação alcoólica a partir da glicose e da frutose.	44
Figura 3. 5 - Formas comuns de vesículas de conidóforos dos <i>Aspergillus</i> :	56
Figura 3. 6 - Conidóforo de (a) <i>A. flavus</i> (bisseriado) e (b) <i>A. clavatus</i> (unisseriado).....	56
Figura 3.7 - Conidóforos do gênero <i>Penicillium</i> : (a) monoverticilado; (b) biverticilado; (c) terverticilado; (d) quaternverticilado.	58
Figura 3.8 - Estrutura das ocratoxinas A, B, 4-hidroxiocratoxina A e ocratoxina α	63
Figura 3.9 - Fórmula estrutural da OTA.	64
Figura 3. 10 - Biossíntese de ocratoxina A	67
Figura 3. 11 - Cromatograma de uma estirpe de <i>A. niger</i> var. <i>niger</i> após 7 dias de incubação em CYA ($12,3\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), usando metanol como solvente. Tempo de retenção da OTA = 6,5 min, em detecção por fluorescência.....	68
Figura 3.12 - Representação estrutural da OTA e dos produtos de hidrólise em $\text{OT}\alpha$ e fenilalanina.	82
Figura 3.13 - Fórmula estrutural da patulina.	85
Figura 3. 14 – Via biossintética da patulina e seus intermediários	85
Figura 3.15 - Reações envolvidas na biossíntese do ácido glucônico..	91

Figura 4.1 - Localização das regiões de estudos no Estado de Santa Catarina.	93
Figura 4.2 - Esquema da coleta das sub-amostras das uvas na carga do veículo de transporte.	98
Figura 4.3 - Parâmetros a serem analisados nas uvas amostradas.	99
Figura 4.4 – Técnica de plaqueamento direto demonstradas em SDA e DRBC.....	101
Figura 4.5 – Fluxograma da avaliação do potencial ocratoxigênico das estirpes	105
Figura 4. 6 – Reações enzimáticas envolvidas na determinação de ácido D-glucônico	113
Figura 4.7 - Definição dos pontos de amostragem no processo de vinificação.....	119
Figura 5.1 – Micobiota predominante nas uvas das regiões do Meio Oeste e Planalto de Santa Catarina.....	122
Figura 5.2 – <i>Aspergillus</i> “negros” crescidos sobre uva após 4 dias de cultivo em DRBC a 25 ⁰ C.....	125
Figura 5. 3 – <i>Botrytis cinerea</i> crescida em superfície de uva observada ao estereomicroscópio.....	126
Figura 5.4 – Frequências dos gêneros: <i>Aspergillus</i> , <i>Alternaria</i> e <i>Botrytis</i> em uvas (relação ao número de bagas) do Meio Oeste e Planalto de Santa Catarina.....	127
Figura 5.5 – Condições climáticas do Planalto (brotação à colheita) versus [OTA].....	134
Figura 5. 6 – Condições climáticas do Meio Oeste (brotação à colheita) versus [OTA].....	136
Figura 5.7 – Concentração média de OTA x Condições climáticas do Meio Oeste e Planalto (2005/2006).....	137
Figura 5. 8 - Dispersão entre a população de <i>Botrytis</i> sp. e a concentração de ácido glucônico nas uvas.....	142
Figura 5. 9 - Dispersão entre a população de <i>Botrytis</i> sp. versus [ácido glucônico] nas uvas: a: (Safra 2005) e b: (Safra 2006).....	143
Figura 5. 10 – Correlação entre a [Ácido glucônico] e as condições climáticas (Safra 2005).	144
Figura 5. 11 – Correlação entre a [Ácido glucônico] e as condições climáticas (Safra 2006).	145
Figura 5.12 – Dispersão entre as concentrações de OTA e Ácido glucônico em uvas de Santa Catarina, provenientes das Safras (2005 e 2006)	146

Figura 5.13 – Concentrações médias de OTA e de Ácido D-glucônico nas uvas de Santa Catarina, provenientes das Safras de 2005 e 2006.....	147
Figura 5.14 – Cromatograma de degradação de OTA x formação OT α em meio de uva sintético (T=35°C, pH 3,5 e [OTA inicial = 0,2 μ g.mL ⁻¹], mediada pela enzima Prolive PAC [®] após 114 horas; (a) = com adição de enzima e (b) = Sem adição de enzima. Tempos de retenção para OTA=16 minutos e OT α =6 minutos).....	149
Figura 5.15 – a) Hidrólise de OTA [inicial = 0,2 μ g.mL ⁻¹] e b) Formação da OT α [ng.mL ⁻¹] em meio de uva sintético (pH 3,5), temperaturas (20 e 35°C) com enzima protease de uso comercial (Prolive PAC [®]).....	151
Figura 5.16 - a) Hidrólise de OTA [inicial = 0,2 μ g.mL ⁻¹] e b) Formação da OT α [ng.mL ⁻¹] em meio de uva sintético (pH 4,5), temperaturas (20 e 35°C) com enzima <i>protease</i> de uso comercial (Prolive PAC [®]) .	152
Figura 5.17 – Hidrólise de OTA [inicial = 0,2 μ g.mL ⁻¹] sob temperaturas de a) 20°C e b) 35°C e Formação da OT α [ng.mL ⁻¹] c) 20°C e d) 35°C, em meio de uva sintético em pH 3,5 e 4,5, com enzima <i>protease</i> comercial (Prolive PAC [®])	153
Figura 5.18 - a) Hidrólise de OTA [inicial = 0,2 μ g.mL ⁻¹] e b) Formação da OT α [ng.mL ⁻¹] em meio de uva sintético (pH 3,5), temperaturas (20 e 35°C) com enzima <i>protease</i> de uso comercial (Prolive PAC [®]) .	155
Figura 5.19 - a) Hidrólise de OTA [inicial = 0,2 μ g.mL ⁻¹] e b) Formação da OT α [ng.mL ⁻¹] em meio de uva sintético (pH 4,5), temperaturas (20 e 35°C) com enzima <i>protease</i> de uso comercial (Prolive PAC [®]) .	156
Figura 5.20 - Hidrólise de OTA [inicial = 0,2 μ g.mL ⁻¹] sob temperaturas de a) 20°C e b) 35°C e Formação da OT α [ng.mL ⁻¹] c) 20°C e d) 35°C, em meio de uva sintético em pH 3,5 e 4,5, com enzima <i>protease</i> comercial (Prolive PAC [®]) .	157
Figura 5.21 – Percentuais de remoção de OTA entre as etapas de vinificação referentes às uvas que continham 1/3 de podridão (ensaio 1).	164
Figura 5.22 – Evolução da OTA durante o processo de vinificação em tinto, a partir de uvas naturalmente contaminadas (ensaio 1).....	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Principais deteriorações de frutas e relação dos fungos envolvidos.	50
Tabela 3.2 - Principais espécies fúngicas responsáveis pela produção de micotoxinas.	51
Tabela 3.3 - Classificação do gênero <i>Aspergillus</i> de acordo com subgêneros e seções.	57
Tabela 3.4 - Classificação de <i>Penicillium</i> em subgêneros e seções. ...	59
Tabela 3.5 - Ocorrência de fungos filamentosos na biota normal de uvas no período da vindima em alguns países.	70
Tabela 3.6 – Distribuição da micobiota em amostras de uvas brasileiras e argentinas (safras 1997/1998).	73
Tabela 3.7 – Distribuição de estirpes dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> isolados de amostras de uvas brasileiras e argentinas (Safras 1997-1998).	73
Tabela 3.8 - OTA em amostras de vinhos brancos e tintos procedentes da França, Alemanha e Itália.(adaptação de Otteneder e Majerus (2000)).	75
Tabela 3.9 - Ocorrência e frequência de OTA em vinhos tintos do Brasil e de outros países.	76
Tabela 3.10 - Revisão bibliográfica dos métodos usados para determinação de OTA no vinho.	78
Tabela 3.11 – Sintomas agudos e crônicos e alterações celulares provocados pela patulina.	87
Tabela 3.12 – Níveis de contaminação de patulina ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de um total de 324 amostras de sucos e mostos de uva, procedentes da Áustria, Bélgica e Alemanha.	88
Tabela 3.13 - Química de mostos de vinho Riesling da Virgínia x tipo de fungo contaminante presente nas uvas.	92
Tabela 4.1 - Referência das sub-regiões estudadas do Planalto e Meio Oeste em relação ao ZAE/SC.	94
Tabela 4.2 – Condições climáticas referentes às localizações dos vinhedos estudados nas regiões do Planalto (3A; 4A e 5) e Meio Oeste (3A e 4B) de acordo com a zona agroecológica	95
Tabela 4.3 - Estrutura da bateria de ensaios para adição da enzima Prolive PAC [®]	115

Tabela 5.1 – Condições climáticas do Meio Oeste nas vindimas (2005/2006)	121
Tabela 5.2 – Número de isolados recuperados das uvas de duas regiões catarinenses (safras 2005 e 2006) por plaqueamento direto.....	124
Tabela 5.3 – Índices climáticos médios das regiões do Meio Oeste e Planalto de Santa Catarina no período das vindimas de 2005 e 2006.	124
Tabela 5.4 – Distribuição das espécies de <i>Penicillium</i> presentes em uvas do Planalto e Meio Oeste de Santa Catarina durante o período das vindimas de 2005/2006.	128
Tabela 5.5 – Distribuição das espécies de <i>Aspergillus</i> presentes em uvas do Planalto e Meio Oeste de Santa Catarina no período das vindimas de 2005 e 2006.....	129
Tabela 5.6 – Recuperação de OTA adicionada em CYA usando metanol como solvente.	131
Tabela 5.7 – Estirpes de <i>Aspergillus</i> negros recuperados durante as vindimas de 2005 e 2006 nas regiões do Planalto e Meio Oeste de Santa Catarina.	132
Tabela 5.8 – Parâmetros de controle para determinação de OTA para [2 $\mu\text{g.L}^{-1}$].....	133
Tabela 5.9 - Concentração de OTA e Patulina nas uvas do Meio Oeste e Planalto de Santa Catarina nas vindimas (2005/2006). 135	
Tabela 5.10 – Concentração de OTA e frequência do gênero <i>Aspergillus</i> nas uvas do Meio Oeste e Planalto Catarinenses.....	138
Tabela 5.11 – Parâmetros de controle para determinação de patulina para [20 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$].	139
Tabela 5.12 - Concentração de ácido glucônico em uvas produzidas em Santa Catarina (Safra 2005/2006).....	141
Tabela 5.13 – Concentrações de OTA, OTA hidrolisada e de OT α , utilizando enzima comercial (<i>protease</i> ácida) em meio de uva sintético: [OTA inicial = 2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$], pH 3,5 nas temperaturas de 20 e 35 ⁰ C.....	150
Tabela 5.14 – Concentrações de OTA, OTA hidrolisada e de OT α , utilizando enzima comercial (<i>protease</i> ácida) em meio de uva sintético: [OTA inicial = 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$], pH 4,5 nas temperaturas de 20 e 35 ⁰ C.....	151
Tabela 5.15 – Parâmetros de controle da hidrólise de OTA e formação de OT α , utilizando uma enzima comercial (<i>protease</i> ácida)	

	em meio de uva sintético: [OTA inicial = 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$], pH 3,5 e 4,5 nas temperaturas de 20 e 35 ⁰ C.....	153
Tabela 5.16	– Concentrações de OTA, OTA hidrolisada e de OT α , utilizando enzima comercial (<i>protease</i> ácida) em meio de uva sintético: [OTA inicial = 0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$], pH 3,5 nas temperaturas de 20 e 35 ⁰ C.....	155
Tabela 5.17	– Concentrações de OTA, OTA hidrolisada e de OT α , utilizando enzima comercial (<i>protease</i> ácida) em meio de uva sintético: [OTA inicial = 0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$], pH 4,5 nas temperaturas de 20 e 35 ⁰ C.....	156
Tabela 5.18	– Parâmetros de controle da hidrólise de OTA e formação de OT α , utilizando uma enzima comercial (<i>protease</i> ácida) em meio de uva sintético: [OTA inicial = 0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$], pH 3,5 e 4,5 nas temperaturas de 20 e 35 ⁰ C.....	158
Tabela 5.19	– Percentual de hidrólise da OTA em meio de uva sintético ao final de 24 horas, com concentrações iniciais de 2,0 e 0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pH 3,5 e T = 35 ⁰ C.....	160
Tabela 5.20	– Recuperação da OTA para as concentrações iniciais de 2,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ensaio 1) e de 0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ensaio 2), nas principais etapas de vinificação, os valores são expressos em porcentagem.	162
Tabela 5.21	– Níveis de OTA detectados nas etapas da vinificação de uvas sãs e de uvas com 1/3 de podridão visível	162

SIMBOLOGIA

BEN	-	nefropatia endêmica Bálcan
CEN	-	Comitê europeu para normatização
CFB	-	clima temperado constantemente úmido
CYA	-	ágar Czapek extrato de levedura
CYB	-	caldo Czapek extrato de levedura
DOC	-	denominação de origem controlada
DHGCP	-	Diretoria geral de saúde e proteção ao consumidor
DRBC	-	dicloran rosa bengala com cloranfenicol
EN	-	norma européia
EPS	-	poliestireno expandido
FL	-	fluorescência
HPLC	-	cromatografia líquida de alta resolução
EN	-	norma européia
IAC	-	coluna de imunoafinidade
OIV	-	Organização internacional do vinho
OTA	-	ocratoxina A
OTB	-	ocratoxina B
OTC	-	ocratoxina C
OT α	-	ocratoxina alfa
PEG	-	polietilenoglicol
RSDr	-	desvio padrão relativo de repetibilidade
RSDR	-	desvio padrão relativo de reprodutibilidade
SDA	-	ágar sabouraud dextrose
SPE	-	extração em fase sólida
UV	-	ultra-violeta
ZAE-SC	-	zoneamento agroecológico de Santa Catarina
λ	-	comprimento de onda
\varnothing	-	diâmetro
T	-	temperatura
γ	-	velocidade de hidrólise

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
2 OBJETIVO GERAL.....	33
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
3.1 Vitivinicultura.....	34
3.1.1 Histórico da vitivinicultura no Brasil.....	34
3.1.2 Aspectos ecofisiológicos da videira.....	35
3.1.3 Variedades de uvas	36
3.1.4 Composição da uva.....	36
3.1.5 Doenças fúngicas da videira	37
3.1.6 Clima.....	38
3.1.7 Vinificação.....	41
3.2 Importância Biotecnológica dos Fungos.....	46
3.2.1 Metabolismo fúngico	46
3.2.2 Micotoxinas em Produtos alimentícios.....	47
3.3 Produção e presença de Micotoxinas em alimentos.....	48
3.3.1 Pré-colheita	48
3.3.2 Pós-colheita.....	49
3.3.3 Processamento	49
3.4 Frutas X Micotoxinas.....	49
3.5 Fungos Produtores de Micotoxinas.....	50
3.5.1 Ecofisiologia	51
3.6 Taxonomia Fúngica	53
3.7 Identificação dos Gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	54
3.7.1 Características morfológicas importantes na classificação das espécies do gênero <i>Aspergillus</i>	55
3.7.2 Características morfológicas importantes na classificação do gênero <i>Penicillium</i>	58
3.8 Detecção, enumeração e identificação de fungos filamentosos em alimentos	59
3.8.1 Métodos para enumeração de fungos em alimentos	59
3.8.2 Métodos rápidos para detecção de fungos em alimentos.....	60
3.9 Determinação de micotoxinas.....	61

3.9.1 Determinação de micotoxinas em alimentos.....	61
3.10 Ocratoxina A.....	63
3.10.1 Riscos à saúde frente a exposição à OTA.....	64
3.10.2 Espécies fúngicas e biossíntese da OTA.....	65
3.10.3 Determinação da produção de OTA por fungos.....	67
3.10.4 Micobiota e espécies ocratoxigênicas em uvas.....	69
3.10.5 Micobiota e incidência de OTA em uvas viníferas produzidas na América do Sul.....	72
3.10.6 Ocratoxina A em vinhos.....	74
3.10.7 Ocratoxina A em uvas e vinhos: Panorama na América Latina.....	75
3.10.8 Detecção de ocratoxina A em uvas e vinhos.....	76
3.10.9 Degradação da Ocratoxina A.....	82
3.11 Patulina.....	84
3.11.1 Biossíntese da patulina.....	85
3.11.2 Riscos à saúde frente a exposição à patulina.....	86
3.11.3 Presença de patulina em frutas.....	87
3.11.4 Degradação da patulina.....	89
3.11.5 Detecção de patulina.....	89
3.12 Ácido Glucônico.....	90
3.12.1 Concentração de ácido glucônico nas uvas.....	92

4 MATERIAL E MÉTODOS..... 93

4.1 Rastreio Micológico em uvas Vitiviníferas Catarinenses.....	93
4.1.1 Região de Estudo.....	93
4.1.2 Amostras.....	97
4.1.3 Plano de amostragem.....	98
4.1.4 Meios de detecção, cultivo e manutenção.....	99
4.1.5 Equipamentos.....	100
4.1.6 Procedimentos microbiológicos.....	100
4.1.7 Avaliação estatística dos dados.....	103
4.2 Potencial Ocratoxigênico dos Isolados.....	103
4.2.1 Estirpes.....	103
4.2.2 Reagentes e materiais.....	103
4.2.3 Equipamentos.....	104
4.2.4 Avaliação das estirpes quanto à produção de OTA.....	104
4.2.5 Estudos de recuperação.....	105
4.3 Determinação de Micotoxinas nas Uvas.....	107
4.3.1 Amostra.....	108
4.3.2 Reagentes e materiais.....	108
4.3.3 Equipamentos.....	108

4.3.4	Determinação de OTA nas uvas	108
4.3.5	Determinação de patulina nas uvas.....	110
4.4	Determinação da Concentração de Ácido D-Glucônico nas Uvas.....	112
4.4.1	Amostra.....	112
4.4.2	Reagentes e materiais.....	112
4.4.3	Técnica analítica	112
4.4.4	Preparo da amostra.....	113
4.4.5	Procedimento analítico.....	113
4.5	Degradação da Ota e Formação de $OT\alpha$ por uma <i>Protease</i> em meio de Uva Sintético.....	113
4.5.1	Enzima	114
4.5.2	Reagentes e materiais.....	114
4.5.3	Equipamentos.....	114
4.5.4	Ensaio de degradação.....	114
4.5.5	Amostragem.....	116
4.5.6	Quantificação da OTA e $OT\alpha$	116
4.5.7	Conversão de OTA hidrolisada em $OT\alpha$	116
4.5.8	Ensaio cinéticos.....	116
4.6	Avaliação do perfil da Ota na Microvinificação em Tinto	117
4.6.1	Amostra.....	117
4.6.2	Reagentes e materiais.....	117
4.6.3	Equipamentos.....	117
4.6.4	Ensaio de vinificação.....	117
4.6.5	Amostragem.....	118
4.6.6	Determinação da OTA.....	119
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	121
5.1	Rastreamento Micológico das Uvas de Santa Catarina.....	121
5.1.1	Incidência fúngica em uvas no Planalto e Meio Oeste Catarinense	123
5.1.2	Ocorrência das espécies de <i>Penicillium</i>	127
5.1.3	Ocorrência das espécies de <i>Aspergillus</i>	128
5.1.4	Potencial produtor de OTA dos <i>Aspergillus</i> negros em cultura pura	130
5.2	Micotoxinas nas Uvas	132
5.2.1	Ocratoxina A.....	133
5.2.2	Patulina	139
5.3	Ácido D-Glucônico e sua Relação com a Micobiota de uvas produzidas em Santa Catarina.....	140
5.3.1	<i>Botrytis</i> sp. versus [Ácido D-glucônico].....	142

5.3.2 [OTA] versus [Ácido D-glucônico]	146
5.4 Degradação de Ota e formação de Ota em meio sintético de uva através da atividade de uma <i>Protease</i> ácida comercial	148
5.4.1 Influência do pH e da temperatura na hidrólise de OTA e formação de Ota em meio de uva com [OTA inicial = 2,0 µg.mL ⁻¹]	149
5.4.2 Influência do pH e da temperatura na hidrólise de OTA e formação de Ota em meio de uva com [OTA inicial = 0,2 µg.mL ⁻¹]:	154
5.5 Perfil da Ota na microvinificação de uvas tintas naturalmente contaminadas.....	161
5.5.1 Ensaio de Recuperação da OTA	161
5.5.2 Evolução dos níveis de OTA durante a vinificação	162
6 CONCLUSÕES.....	167
REFERÊNCIAS.....	170
ANEXOS.....	194
Anexo A - Formulação dos meios de cultura.....	195
Anexo B - Ficha técnica: enzima Prolive PAC [®]	196
Anexo C - Formulação do meio de uva sintético	198

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido internacionalmente como grande produtor de matérias-primas vegetais, por apresentar condições de clima e solo favoráveis ao desenvolvimento da agricultura. Mas, a necessidade de destaque também à nível de produção industrial é evidente, agregando valores aos produtos primários, aumentando a produção interna, com excedentes para a exportação. A vitivinicultura apesar de recente no Brasil, tem apresentado evolução tanto na produção de uvas para consumo *in natura*, quanto no seu processamento. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2007) a produção de uvas nas safras agrícolas de 2006 e 2007 foi de 1.220.187 e 1.341.164 toneladas, respectivamente, ou seja, um aumento de 9,91%. A Região Sul é a maior produtora no país, enquanto o Estado de Santa Catarina foi responsável pela produção de 54.122 toneladas em 2007, com um aumento de 13,26% em relação ao ano anterior. Em 2006, 38,32% da uva produzida no Brasil foi destinada à elaboração de vinhos, sucos, destilados e outros derivados (MELLO, 2006).

A vitivinicultura brasileira, nos últimos anos tem voltado sua atenção à produção de vinhos finos, expandindo-se em outras áreas do Rio Grande do Sul (Campanha e Serra do Sudoeste) e da Região do Sub-Médio Vale do São Francisco (Pernambuco e Bahia). Em Santa Catarina o desenvolvimento de vinhedos de *Vitis vinifera*, vem sendo particularmente observado nas regiões do Meio Oeste e Planalto.

O Estado de Santa Catarina divide-se em três regiões com relação à produção de vinhos: tradicional, nova e super nova. São consideradas regiões tradicionais o Alto Vale do Rio do Peixe (Pinheiro Preto, Tangará, Videira, Iomerê) - maior produtora de Santa Catarina – e a Região Carbonífera (Criciúma, Urussanga), na qual se destaca a produção de vinhos coloniais e comuns e uma pequena porcentagem (em crescimento) de vinhos finos. Nas regiões consideradas novas, há uma mescla de produção: em Rodeio, destaca-se a produção de vinhos comuns e finos (fase inicial); em Nova Trento, coloniais e comuns; e em Chapecó, vinhos artesanais. As regiões consideradas supernovas (de altitude) são as de São Joaquim e Água Doce, concentradas na produção de vinhos finos (BRDE, 2005).

No segmento de vinhos finos, o processo de abertura do mercado brasileiro tem resultado forte concorrência, registrando-se taxas significativas de crescimento das importações. O aumento no consumo dos denominados “Vinhos do Novo Mundo” já preocupa os produtores

das regiões vinícolas mais tradicionais. Enquanto as exportações dos vinhos europeus cresceram em torno de 20% nos últimos vinte anos, países não tradicionais neste setor, como Nova Zelândia, Estados Unidos, Chile, Austrália, Argentina e África do Sul, contabilizaram um crescimento de mais de 50% no mesmo período (NOVAKOSKI e FREITAS, 2003). Com a globalização da economia o mercado tornou-se ainda mais competitivo e exigente, onde a oferta de produtos e serviços que apresentem a melhor relação custo-benefício é um fator primordial. Para que a indústria nacional de bebidas possa atender essa nova demanda, se faz necessário o estabelecimento de regras que atendam os interesses da cadeia vitivinícola, órgãos fiscalizadores, consumidores nacionais e internacionais.

No Brasil a Lei nº 7.678/1988 do Ministério da Agricultura regulamentada pelo Decreto nº 99.066/1990 regulariza a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados do vinho e da uva no país (Brasil, 1990). Porém, não prevê parâmetros quanto ao perfil microbiológico, nem mesmo limites para compostos decorrentes do metabolismo microbiano, como é o caso das micotoxinas.

A maioria das avaliações de vinhos tem sido ao longo dos anos através das características organolépticas. Mas, o desenvolvimento de novas práticas agrícolas e aumento do controle de qualidade analítico, associado ao aumento de resolução instrumental possibilitaram a detecção de muitos elementos traço e compostos em pequenas concentrações. Entre essas substâncias encontradas e que podem atualmente caracterizar a seguridade alimentar de uvas e vinhos estão os metais pesados, resíduos de pesticidas, amins biogênicas, etil-carbamato e micotoxinas (RATOLA *et al.* 2004). Ênfase especial deve ser dada ao risco de patulina e OTA, além de outras micotoxinas oriundas de exposição a novos sistemas de manutenção de frutos frescos (JELINEK, 1989).

A micotoxicologia é descrita de modo geral, como sendo o estudo das micotoxinas. Porém, SERRA (2005) define como sendo uma linha da área científica ou do saber que se dedique ao estudo da produção, implicações, bem como, a prevenção ou minimização da contaminação à níveis considerados seguros. Trata-se de ciência multidisciplinar e como tal, possui a sua base em diversas áreas sob diversos objetos de estudo, conforme indicado na Figura 1.

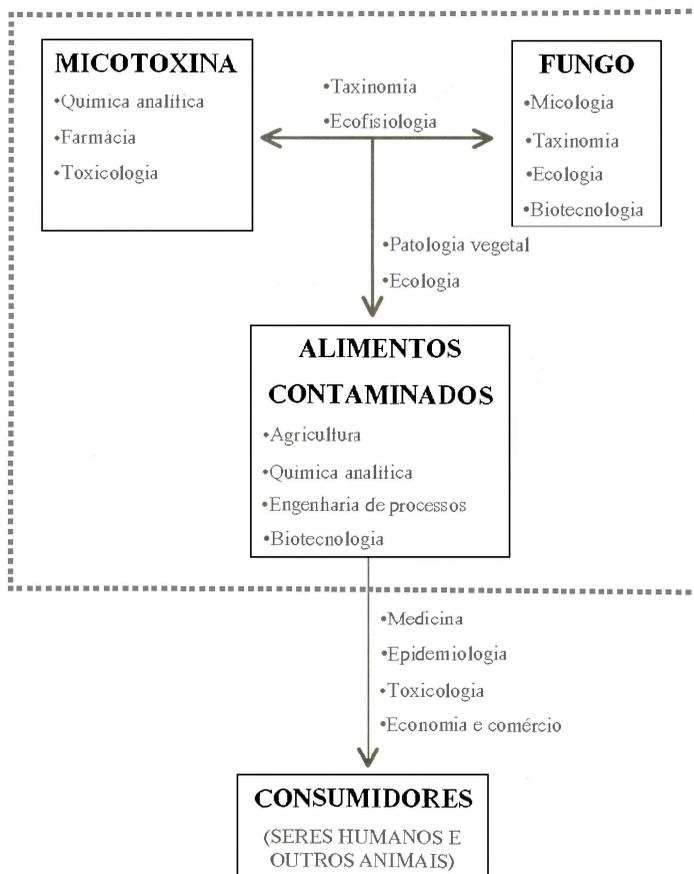


Figura 1.1 - Objetos de estudo das principais ciências de base da micotoxicologia e interações entre diversas áreas de investigação.

Fonte: Serra, (2005)

Há centenas de micotoxinas, porém, um número relativamente pequeno delas é frequentemente detectado em alimentos e são consideradas relevantes para a saúde humana. As mais relevantes de acordo com o *Council of Agricultural Science and Technology* (CAST) são: aflatoxinas, OTA, patulina, deoxynivalenol (DON), fumonisinas, nivelanol (NIV), T2-toxina e zearalenona, porém, são continuamente revisadas (CAST, 2003).

A preocupação com fungos filamentosos em vinhedos tem sido tradicionalmente relacionada ao desenvolvimento de doenças fúngicas

em uvas. Segundo MENDONÇA et al. (2003), além da *Botrytis cinerea* (podridão cinzenta) outras espécies de fungos filamentosos, de forma isolada ou em conjunto, podem causar podridões nas uvas como é o caso do *Penicillium* (podridão verde) e *Aspergillus negros* (podridão negra). Espécies desse último grupo foram identificadas como responsáveis pela produção de OTA nas uvas.

No entanto, trabalhos realizados na última década reportam a presença de OTA em vinhos aumentando o interesse e atenção com relação à investigação de fungos produtores de micotoxinas em uvas (LASRAM et al. 2007, ABRUNHOSA et al. 2006, DELAGE et al. 2003 e BRAUSE et al. (1996). Todas as micotoxinas são produtos naturais de baixo peso molecular, produzidos como metabólitos secundários por fungos filamentosos que têm sido detectados em muitas matérias-primas. Níveis que ofereçam riscos para a população são inaceitáveis, por fazerem parte de um conjunto de metabólitos química e toxigenicamente heterogêneos, agrupados por causarem doenças e morte em seres humanos e outros vertebrados. O Brasil estabelece limites apenas para aflatoxinas totais ($20\mu\text{g/Kg}$) em alimentos e aflatoxina M1 ($0,5\mu\text{g/Kg}$) no leite, a partir do Mercosul (FAO, 2004).

A produção de micotoxinas pode ocorrer no campo e/ou no período de pós-colheita, como é o caso da OTA, que pode ocorrer na uva e estar presente no vinho (SERRA et al. 2005, ROSA et al. 2004 e DA ROCHA ROSA et al. 2002). Por ser o vinho a segunda maior fonte de OTA em alimentos, a atenção ao rastreio a OTA em uvas tem sido uma constante a nível mundial. A União Européia - (CE) N. 123/2005, estabelece limites de OTA em $2,0\ \mu\text{g kg}^{-1}$ para mostos de uvas e derivados. Porém, outras micotoxinas, como a patulina, podem estar presentes na uva e, regularmente estarem ausentes no vinho, em função da degradação pela fermentação por leveduras (SCOTT, 1977). Apesar disso, a patulina pode representar um risco em produtos não-fermentados, como uvas frescas e suco de uvas, indicando matéria-prima de baixa qualidade. Portanto, é relevante para a microbiota de uvas e o potencial micotoxigênico determinar a presença de micotoxinas no vinho e outros produtos derivados de uva.

A OTA é um metabólito secundário produzido por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Espécies ocratoxigênicas pertencentes ao gênero *Aspergillus* das seções *Nigri* (*A. niger*, *A. Carbonarius*), *Flavi* (*A. alliaceus*) e *Circumdati* (*A. ochraceus*) têm sido observadas em regiões de clima temperado e tropical. A OTA tem sido reportada por ser uma potente nefrotóxica, hepatotóxica e por suas propriedades imunossupressoras. A International Agency for Research on Câncer

(IARC, 1993) classifica a OTA no Grupo 2B – potencialmente carcinogênica para humanos. A patulina, é classificada no Grupo 3, por causa da insuficiente evidência de carcinogenicidade em animais experimentais e em humanos, embora existam muitos trabalhos relatando a sua toxicidade em animais; produzida por espécies dos gêneros *Byssochlamis*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

Para a América Latina até a presente data, nenhum estudo foi relatado quanto à investigação de OTA e patulina em uvas, sendo portanto, essa a primeira investigação a ser realizada em toda essa área de abrangência. Em relação à micobiota das uvas apenas um trabalho foi encontrado, o mesmo foi realizado por DA ROCHA ROSA et al. (2002) em parceria com a Argentina, onde apenas a micobiota de uvas provenientes da região da Campanha no Estado Rio Grande do Sul foi avaliada. A investigação de OTA em derivados de uva ainda é bastante limitada, sendo encontrado apenas dois trabalhos, que avaliam sucos de uvas e vinhos, sendo eles: ROSA et al. 2004 e SHUNDO et al. 2006. Segundo COELHO et al. (2003) com exceção das investigações direcionadas para *A. ochraceus* nos frutos de café, devido ao questionamento sobre contaminação por OTA no café brasileiro, a exposição de contaminação a fungos adaptados às mais diversas condições climáticas brasileiras, especialmente ao caráter tóxico de espécies de *Aspergillus*, ainda está longe de estudo sobre micotoxinas em frutos. No entanto, na Europa e Ásia muitos trabalhos relacionados à presença de OTA em uvas e vinhos vêm sendo desenvolvidos desde a detecção da toxina em suco de uvas e vinhos por ZIMMERLI & DICK, (1996 e 1995).

A concentração de ácido glucônico é um parâmetro extremamente útil como parâmetro de avaliação do grau de sanidade das uvas. De acordo com PÉREZ et al. (1991) o ácido glucônico em mostos e vinhos é decorrente da sua produção por fungos e/ou bactérias. O ácido glucônico não é utilizado pelas leveduras ou bactérias (ZOCKLEIN, 2006).

A investigação de parâmetros que indiquem a qualidade da matéria-prima como é o caso do ácido glucônico e os níveis de determinados contaminantes em uvas e vinhos, aliados ao controle de fontes potenciais relacionadas a formação de compostos decorrentes do metabolismo microbiano durante o processo e/ou estocagem, como é o caso da OTA e patulina visam a melhoria da qualidade do produto final, obtendo dessa forma a seguridade do ponto de vista do consumidor e a conquista de novos mercados consumidores.

Diante do exposto, uvas viníferas provenientes de duas

importantes regiões vitivinícolas: Meio Oeste e Planalto de Santa Catarina obtidas durante as vindimas de 2005 e 2006, foram avaliadas através da determinação de ácido glucônico e um rastreio quanto à presença das micotoxinas OTA e patulina, bem como, a investigação da microbiota dessas uvas. A habilidade produtora de OTA foi testada em estirpes fúngicas isoladas, para avaliar o potencial de síntese da micotoxina nas uvas. A OTA é um composto muito estável que oferece resistência à diversas formas de processamento das uvas, sendo observada em vinhos, vinagres e sucos. Foram realizados ensaios de remoção utilizando enzima comercial de uso enológico em meio de uva sintético e, também, ensaios de microvinificação, a fim de, avaliar a remoção da OTA durante o processo de elaboração do vinho.

2 OBJETIVO GERAL

Investigar a população de fungos filamentosos e a presença de micotoxinas em uvas tintas viníferas produzidas nas regiões Meio Oeste e Planalto de Santa Catarina durante as vindimas de 2005 e 2006.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ⇒ Isolar e identificar a micobiota de uvas tintas viníferas das principais regiões produtoras em Santa Catarina.
- ⇒ Rastrear a presença de estirpes fungos ocratoxigênicos dos gêneros *Aspergillus* (secções *Circumdati*, *Flavus* e *Nigri*) e *Penicillium* (espécie *verrucosum*) na micobiota de uvas tintas viníferas das safras de 2005 e 2006, provenientes de vinhedos do Meio Oeste e Planalto serrano. E, avaliar a incidência desses fungos por região produtora das uvas.
- ⇒ Investigar a presença da OTA e patulina em uvas tintas *Vitis vinífera*, produzidas em Santa Catarina.
- ⇒ Determinar as concentrações de Ácido D-glucônico nas uvas e verificar a relação com os níveis de OTA e com a população de *Botrytis* sp.
- ⇒ Estudar o efeito do processo de vinificação em tinto sobre a concentração de OTA, bem como, estabelecer taxas de remoção de OTA no processo.
- ⇒ Estudar o efeito de compostos enzimáticos comerciais de uso enológico na degradação da OTA.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Vitivinicultura

3.1.1 Histórico da vitivinicultura no Brasil

A viticultura brasileira começou por volta de 1535 na Capitania de São Vicente, atual Estado de São Paulo, e alguns anos depois estabeleceu-se nos Estados da Bahia e Pernambuco (POMMER, 2003). As missões que vieram da Argentina, em meados do século XVII, plantaram as primeiras mudas de videira na então Capitania de Rio Grande. Eles pretendiam se fixar naquela área, criando comunidades para a catequese, e acreditavam que o plantio e o cultivo de vinhedos os ajudariam nessa tarefa. Os vinhos seriam usados nas cerimônias religiosas. Mas as cultivares de *Vitis vinifera* espanholas que os jesuítas trouxeram não eram resistentes e os primeiros resultados foram desanimadores. Anos depois, com a chegada da primeira leva de imigrantes açorianos, o potencial daquela região para a produção de vinhos se confirmaria (NOVAKOSKI & FREITAS, 2003). Por volta de 1830-1840, surgiram as variedades americanas, principalmente Isabel, mais rústicas que as variedades de *Vitis vinifera*, as quais, juntamente com a chegada de imigrantes italianos, provocaram o ressurgimento da viticultura no Estado de São Paulo, adquirindo significativa importância econômica na segunda metade do século XIX.

De modo geral, a viticultura de Santa Catarina teve a mesma evolução da viticultura de todo o Brasil, firmando-se como atividade econômica a partir da segunda metade do século XIX, com o aparecimento da variedade Isabel e com o incremento da colonização européia. O Estado de Santa Catarina tem uma importante destinação das uvas para fins industriais sendo o segundo produtor nacional de vinhos e derivados (POMMER, 2003). Somente a partir da década de 70, com o investimento de grandes empresas estrangeiras na produção de uvas e vinhos no Rio Grande do Sul, houve um significativo aumento da área cultivada com uvas viníferas, destinadas à elaboração de bebidas finas. Mesmo assim, atualmente a porcentagem de vinhos finos fabricados no Brasil em relação ao total do que é produzido é de cerca de 10% (BRDE, 2005).

GUERRA & BARNABÉ (2005), descrevem a disposição geográfica da vitivinicultura a nível nacional, onde a Serra Gaúcha (RS) é a principal região vitivinícola do país. Outras regiões tradicionais são

o Alto Vale do Rio do Peixe (SC), Caldas e Andradas (MG) e Jundiá (SP). Além destas, novas regiões estão em fase de consolidação, todas baseadas exclusivamente em cultivares *Vitis vinifera*. As principais são: Campanha (RS), Serra do Sudoeste (RS), Planalto Catarinense (SC) e Vale do Sub-médio São Francisco (PE e BA).

A maior concentração de produtores de uva e vinho do Estado de Santa Catarina está na Sub-região do Alto Vale do Rio do Peixe, em Videira e municípios vizinhos, que produz cerca de 150 milhões de litros de vinhos por ano, embora a cultura seja encontrada em todo o Estado. Em âmbito nacional, Santa Catarina ocupa o terceiro lugar em produção de uva e o segundo na produção de vinho. Há um estreito relacionamento entre os produtores de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, com a comercialização de uvas e vinhos a granel entre produtores dos dois Estados. Vem crescendo nos últimos anos, a compra de uva do Rio Grande do Sul para suprir a necessidade da indústria catarinense e do mercado consumidor em crescente expansão (ZENARO & MUGNOL, 2004).

3.1.2 Aspectos ecofisiológicos da videira

A videira pertence à família *Vitaceae*, gênero *Vitis*, sub-gênero *Euvitis* (GIOVANNINI, 1999). De acordo com FREGONI (1985) é muito difícil estabelecer com absoluta certeza sua região de origem. Entretanto, é comum levantar-se que o gênero *Vitis* tem três grandes centros de origem, ou seja: o primeiro localizado na América Setentrional; o segundo situado na Ásia Oriental incluindo Nepal, China e Japão; o terceiro e mais importante o euro-asiático, incluindo neste grupos as videiras européias (*Vitis vinifera*). SIMÃO, (1971) define classicamente a videira como sendo um arbusto sarmentoso, munido de gavinhas opostas às folhas. As folhas são alternadas e pecioladas. As flores são pequenas, esverdeadas, opostas às folhas, a princípio eretas e depois pendentes. O fruto é uma baga (uva), ovóide ou globosa, preta ou esbranquiçada.

Em relação ao clima, a videira prefere o subtropical, semi-árido, inverno úmido e frio, com verão quente e seco. A videira é cultivada entre as latitudes 34° N e 49° S. As cultivares de *Vitis vinifera* adaptam-se melhor em áreas de verão longo e seco e de invernos brandos. Em regiões de verões úmidos, devido à sua susceptibilidade a doenças causadas por fungos, deixa a desejar. A espécie americana aclimata-se bem em ambientes quentes e úmidos e de invernos rigorosos, porém não

se adaptam bem aos climas semi-áridos. De todos os fatores ambientais, a temperatura é a que exerce ação determinante na qualidade da uva, quer para mesa, vinho ou passa. Uma seca moderada na maturação favorece a qualidade dos frutos da videira. A videira pode ser cultivada sem irrigação a partir de uma precipitação anual de 500 a 600mm por ano. Precipitação durante o período de florescimento causa falhas na frutificação e, durante a maturação, causa apodrecimento dos frutos e perda de qualidade (SIMÃO, 1971). A chuva e o tempo nublado no período de floração podem produzir uma má formação das bagas e abortamento das flores. Além disso, a chuva durante a maturação facilita danos aos cachos através do ataque de podridões (WINKLER, 1976).

3.1.3 Variedades de uvas

Para WESTWOOD (1982), as espécies de videiras vão desde as resistentes ao frio (*Vitis labrusca*) - Americanas, às sensíveis (*Vitis rotundifolia*), passando pelas parcialmente resistentes (*Vitis vinifera*). As espécies de *Vitis* mais importantes para processamento são: *vinifera*, *labrusca* e os seus híbridos. As variedades de *V. vinifera* são destinadas principalmente, à produção de vinhos finos, espumantes e licorosos. No Brasil, atualmente as variedades de *vinifera* tintas mais cultivadas são: Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Tannat e Pinot Noir (GUERRA & BARNABÉ, 2005). Os vinhos comuns são produzidos a partir das espécies que apresentam maior resistência às pragas e a outras moléstias, a *Vitis labrusca* e *Vitis bourquina* (videiras americanas), e ainda a partir das chamadas videiras híbridas (BRDE, 2005).

Segundo ROSIER (2003), a maior quantidade de uvas viníferas produzidas em Santa Catarina pertencem às varietais: Cabernet Sauvignon, Merlot e Chardonnay. Experimentalmente estão sendo observados os comportamentos vitícolas e enológicos de outras variedades de origem européia (França, Itália, Espanha e Portugal).

3.1.4 Composição da uva

O cacho de uva é composto pela ráquis (engajo) e bagas. Na uva madura a ráquis representa 4 a 10% do peso total. A baga é constituída de casca (20 a 40%), sementes (2 a 8%) e polpa (52 a 78%). A casca é revestida pela pruína (substância cerosa protetora). O peso relativo da polpa varia segundo a cultivar e fenômenos de diluição ou dessecação

devido ao regime de precipitações pluviométricas durante o processo de maturação (GUERRA & BARANBÉ, 2005).

3.1.5 Doenças fúngicas da videira

A videira quando cultivada em condições climáticas favoráveis (elevada umidade e temperaturas amenas) ao desenvolvimento de fungos, fica exposta a uma série de doenças, as quais poderão acarretar graves prejuízos se não forem devidamente controladas. O controle fitossanitário nos parreirais de *V. vinífera* deve ser redobrado, segundo WESTPHALEN e MALUF (2000) as variedades *Vitis vinífera* são mais susceptíveis à doenças e mais valorizadas no mercado de uva de mesa e vinho. As doenças fúngicas mais comuns às variedades de *vinífera* são, segundo GARRIDO & SONEGO (2003):

- Míldio (*Plasmopara vitícola*): quando o fungo ataca as bagas mais desenvolvidas, estas são infectadas pelos pedicelos e o fungo se desenvolve no interior da baga, tornando-as escuras, duras, com superfícies deprimidas, provocando a queda das mesmas.
- Oídio (*Uncinula necator*): nas condições climáticas do sul do Brasil onde normalmente a pluviosidade é alta durante todo o ciclo da cultura, este fungo não tem causado grandes perdas, com exceção de alguns anos em que ocorrem períodos de seca.
- Antracnose (*Elsinoe ampelina*): A doença ataca todos órgãos verdes da planta (folhas, gavinhas, ramos, inflorescência e frutos), Nas bagas também aparecem manchas circulares de cor cinza no centro e preta nas bordas, comumente chamada de "olho-de-passarinho"
- Podridão cinzenta da uva (*Botrytis cinerea*): essa podridão existe em todos os países vitícolas do mundo, reduzindo qualitativa e quantitativamente a produção. É considerada a mais importante das podridões do cacho. As perdas podem ser significativas nas cultivares viníferas, especialmente nas de cacho compacto.
- Podridão da uva madura (*Glomerella cingulata*): o sintoma principal é o apodrecimento dos frutos maduros. Sobre as bagas inicialmente, aparecem manchas marrom-avermelhadas, que atingem todo o fruto, escurecendo-o. Em condições de alta umidade aparecem as estruturas do fungo na forma de pontuações cinza-escuras, das quais exsuda uma massa rósea, que são os conídios. Esta massa rósea serve também para diferenciar da podridão amarga.
- Podridão Amarga (*Melanconium fuligineum* = *Greeneria uvicola*): A ocorrência mais séria é sobre as bagas causando podridões

e destruição dos pedicelos. Nos cachos, quando afeta o engaço, impede o livre fluxo da seiva para as bagas. Estas tornam-se enrugadas e mumificadas e caem com facilidade. O ataque direto do fungo sobre as bagas faz com que elas adquiram, inicialmente, coloração marrom-avermelhada, sem entretanto alterar-lhes a conformação. Pode-se observar, posteriormente, pontuações negras constituídas por estruturas típicas do fungo (acérvulos). As bagas restantes que permanecem no cacho, murcham, tornam-se múmias pretas, duras e secas.

- Doenças da madeira: podem ser causadas por diversos fungos, os quais colonizam a parte interna da planta ocasionando podridão descendente, o que pode levar a planta à morte se não controlada adequadamente.

Fusariose (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium herbemontis*): A doença reduz o crescimento dos brotos, e provoca escurecimento interno da madeira, murchamento de folhas e de cachos. Os cachos murcham ainda verdes ficando aderidos aos ramos. As plantas infectadas podem morrer subitamente.

3.1.6 Clima

O clima, o solo, a nobreza da variedade e o manejo do parreiral é que irão definir a tipicidade das uvas produzidas em uma determinada região. De acordo com TONIETTO (2003), existem 03 conceitos básicos para diferenciar escalas climáticas de interesse da viticultura:

⇒ **Macroclima**: corresponde ao clima médio ocorrente num território relativamente vasto (clima regional), exigindo para sua caracterização, dados de um conjunto de postos meteorológicos; em zonas com relevo acentuado os dados macroclimáticos possuem um valor apenas relativo, especialmente no que se refere à viticultura. Porém, um mesmo macroclima poderá englobar áreas de planície muito extensas.

⇒ **Mesoclima**: corresponde a uma situação particular do macroclima. Normalmente é possível caracterizar um mesoclima (clima local) através dos dados de uma estação meteorológica, permitindo avaliar as possibilidades da cultura da uva. A superfície abrangida por um mesoclima pode ser muito variável mas, nas regiões vitícolas, trata-se normalmente de áreas relativamente pequenas podendo fazer referência a situações bastante particulares do ponto de vista de

exposição, declividade ou altitude, por exemplo. Muitas vezes o termo topoclima é utilizado para designar um mesoclima onde a topografia constitui um dos critérios principais de identificação, como por exemplo, o clima de um vale ou de uma encosta de montanha.

⇒ **Microclima:** corresponde às condições climáticas de uma superfície realmente pequena. Pode-se considerar dois tipos de microclima: - microclima natural - que corresponde a superfícies da ordem de 10 m a 100 m; e - microclima da planta - o qual é caracterizado por variáveis climáticas medidas por aparelhos instalados na própria videira. O termo genérico de bioclima é utilizado para essa escala que visa o estudo do meio natural e das técnicas de cultivo.

3.1.6.1 O clima das principais regiões vitivinícolas de Santa Catarina

No Brasil, os tipos de clima ocorrentes nas regiões vitivinícolas produtoras de vinhos finos com uma colheita anual são de tipo temperado e subtropical. No Sul do Brasil, o clima temperado, de invernos rigorosos e longos períodos de sol no verão, é considerado uma das melhores regiões para o cultivo da uva (NOVAKOSKI & FREITAS, 2003).

O Estado de Santa Catarina é um celeiro de oportunidades, a diversidade geográfica e climática, aliada à diversidade cultural, tem criado condições para a geração de oportunidades. Uma dessas oportunidades é a fabricação de vinhos de castas nobres (BRDE, 2005).

As regiões do Alto Vale do Rio do Peixe e Planalto Serrano são normalmente referenciadas pelas estações meteorológicas dos municípios de Videira e São Joaquim, respectivamente. As condições climáticas são descritas por TONIETTO (2003), a partir da avaliação do histórico climático dos últimos 30 anos dessas 02 estações representados pelas Figuras 3.1 e 3.2. Nelas observam-se que o regime térmico é bastante distinto em função da região, sendo as mais amenas em São Joaquim (Figura 3.2). A distribuição das chuvas ocorre de forma bastante homogênea ao longo do ano nas regiões do Alto Vale do Rio do Peixe (Figura 3.1) e São Joaquim, com valores médios superiores a 100 ou 120 mm mensais.

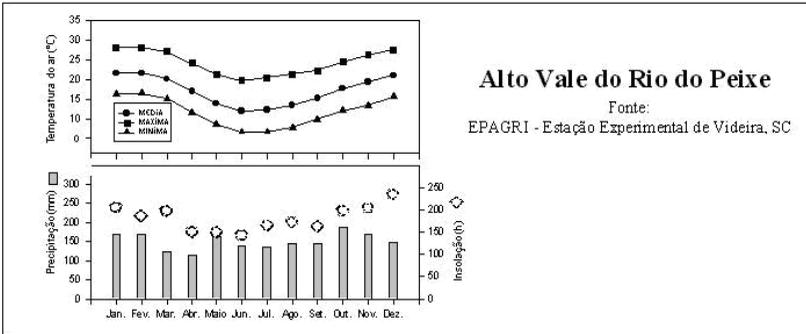


Figura 3.1 - Distribuição anual da temperatura do ar - média, máxima e mínima (°C), precipitação pluviométrica (mm) e insolação (h) de regiões vitivinícolas produtoras de uvas viníferas na região do Alto Vale do Rio do Peixe no estado de Santa Catarina

Fonte: (Tonietto e Mandelli, 2001 – em Tonietto, 2003).

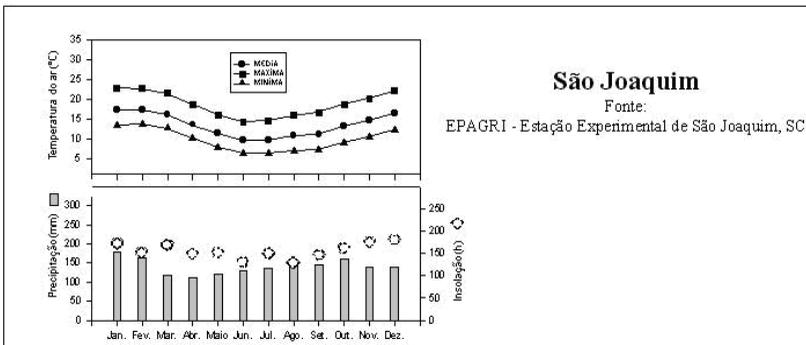


Figura 3.2 - Distribuição anual da temperatura do ar - média, máxima e mínima (°C), precipitação pluviométrica (mm) e insolação (h) de regiões vitivinícolas produtoras de uvas viníferas na região de São Joaquim no Estado de Santa Catarina

Fonte: (Tonietto e Mandelli, 2001 - em Tonietto, 2003).

O quadro revela condições macroclimáticas diferenciadas, com importantes reflexos sobre o comportamento fisiológico da videira e sobre o potencial qualitativo das uvas produzidas em cada região. Tais características indicam também que cada região encontrará melhores condições para a produção de certas variedades, bem como tipos de vinhos (TONIETTO, 2003).

3.1.7 Vinificação

O vinho é uma bebida alcoólica obtida por meio da fermentação do mosto de uvas frescas, maduras e com bom grau de sanidade. De acordo com a legislação do Mercosul, a classificação obedece os seguintes critérios:

- Cor: tinto, rosado e branco.
- Classe: mesa (no Brasil *V. labrusca*), leve, fino (*V. vinifera*), espumante, frisante, gaseificado, licoroso e composto.
- Teor de açúcar: varia de acordo com a classe considerada.

A distinção dos vinhos (de mesa e finos) no Brasil é feita em função da variedade e marca comercial, porém, em função da sua extensão territorial e diversidade climática, produz vinhos de uma mesma variedade com diferentes perfis. A busca pela excelência em vinhos passa pela definição de sua origem, sendo a tipicidade uma particularidade muito interessante.

Na Europa, as castas não costumam ser identificadas no rótulo, mas as denominações de origem dos vinhos, sim. Lá existe um rigoroso sistema de avaliação até que a denominação seja autorizada. Dentro do sistema de denominações, há um complexo sistema de classificações, o que significa que mesmo os vinhos produzidos numa mesma região são divididos de acordo com o nível de qualidade. Na França, o sistema de identificação e regulamentação das regiões produtoras é conhecido pela sigla AOC – *Appellation d’Origine Contrôlée* (Denominação de Origem Controlada). Na Itália, o sistema de classificação dos vinhos tem a sigla DOC – *Denominazione de Origine Controllata* (Denominação de Origem Controlada). Ambos os sistemas têm o objetivo de garantir a qualidade dos vinhos originários destas regiões, o que contribui para a manutenção e ampliação de sua participação no mercado de vinhos finos (BRDE, 2005). O Estado do Rio Grande do Sul o que mais tem avançado nessa área. Em relação aos demais Estados, esse processo ainda é muito incipiente e Santa Catarina é um exemplo dessa realidade.

TONIETTO (2003), avaliou os períodos evolutivos da vitivinicultura brasileira, verificando a caracterização pela produção de vinhos qualitativamente diferenciados ao longo dos últimos 120 anos, demonstrada na Figura 3.3. Os "Vinhos de 3ª Geração" consolidam-se a partir dos anos 1970, através de um significativo aumento da superfície cultivada com variedades de *Vitis vinifera* L., destinadas à elaboração de vinhos finos. As variedades viníferas de origem francesa (Cabernet Franc, Merlot, Chardonnay, etc.) ganharam espaço em detrimento de

algumas uvas de origem italiana (Barbera, Bonarda, Sangiovese, etc.). A indústria vinícola, impulsionada pela chegada de empresas estrangeiras, realizou transformações importantes de modernização e investimentos: transporte de uvas em caixas plásticas, vinícolas, equipamentos, tecnologias de vinificação. Estas transformações estabeleceram um novo referencial de qualidade para os vinhos brasileiros. Este período corresponde ao período de produção de vinhos finos, com uma filosofia similar àquela dos países produtores do Novo Mundo, centrada nos vinhos varietais.

A Figura 3.3 mostra as etapas de evolução dos vinhos brasileiros e, ainda indica um quarto período (transição).



Figura 3.3 - Períodos evolutivos da produção vitivinícola comercial no Brasil: quatro gerações de vinhos brasileiros.

Fonte: Tonietto & Mello, 2001 – em Tonietto 2003

3.1.7.1 Processo de vinificação em tinto para vinhos de qualidade

O conjunto de operações unitárias para a transformação de uvas maduras em vinhos é denominado de processo de vinificação. A vinificação em tinto diferencia-se das demais pelo tempo de maceração e compreende as seguintes etapas de acordo com GUERRA &

BARNABÉ (2005):

↳ **Vindima, transporte e recepção:** a colheita das uvas se faz de forma manual, sem chuva, preferencialmente nas primeiras horas da manhã. O transporte às vinícolas se faz em caixas plásticas com capacidade de 20 Kg. Na recepção se faz a pesagem e o grau glucométrico é determinado.

↳ **Desengace e esmagamento:** a máquina esmagadora/desengaçadora separa o engaço e esmaga as uvas, sem triturar as cascas e sementes (limitando a adstringência e a propriedade sensorial de herbáceo).

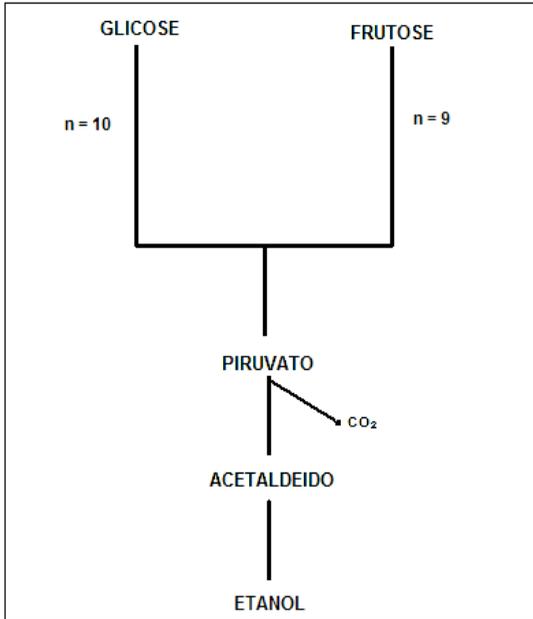
↳ **Sulfitação do mosto:** o metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) deve ser adicionado logo após o esmagamento. As quantidades a serem adicionadas ao mosto variam de 1 a 1,5 g.L⁻¹ (dependendo do grau de sanidade da uva) O íon bissulfito (HSO_3^-) pode reagir com aldeídos, dextrinas, substâncias pécnicas, proteínas, cetonas e certos açucars formando SO₂ livre ou fixo. As principais funções do SO₂: ação seletiva sobre leveduras, ação antioxidante, ação antioxidásica, ação reguladora da temperatura e ação conservante).

↳ **Adição de enzimas pectinolíticas:** os preparados enzimáticos comerciais possuem ação de extração de matéria corante das cascas e clarificação do mosto. O principal inconveniente é a possibilidade do aumento da concentração de metanol no vinho.

↳ **Adição de leveduras:** através da preparo do pé de cuba (diluição de um inóculo comercial de *Sacch. cerevisae*, na concentração de 2 a 5% do volume total de mosto a ser fermentado). O pé de cuba deve ser previamente preparado (24-48hs, quando já se encontra com leveduras em torno de 10⁹ células.mL⁻¹) antes de ser inoculado no volume total de mosto.

↳ **Chaptalização:** para a obtenção de 1^oGL de álcool são necessários 18g.L⁻¹ de açúcar na uva. Para uma boa conservação, o vinho deve ter cerca de 12^oGL, ou seja, 200 g.L⁻¹ (± 22^o Brix). Caso a uva não possua esse teor, adiciona-se açúcar de cana ou beterraba. A correção do açúcar se faz 2 a 4 dias após o início da fermentação (crescimento exponencial das leveduras). A legislação nacional estabelece que a correção não deverá ultrapassar da adição de 45 g.L⁻¹.

↳ **Fermentação alcoólica:** tem seu início com a glicólise de uma molécula de glicose (duas outras oses abundantes – frutose e galactose, também são importantes fontes de energia, podendo convergir para a via glicolítica) para obtenção de 2 moléculas de piruvato. A Figura 3.4 apresenta um diagrama geral da fermentação alcoólica a partir da glicose e da frutose.



n = número de reações enzimáticas envolvidas na fermentação alcoólica

Figura 3.4 - Diagrama da fermentação alcoólica a partir da glicose e da frutose.

Na via metabólica (Figura 3.4), as moléculas de piruvato são convertidas a acetaldeído, única etapa em que ocorre a liberação de CO_2 . As 2 moléculas de acetaldeído são reduzidas por NADH na formação de 2 moléculas de etanol. A transformação da glicose em álcool envolve doze reações enzimáticas, enquanto a frutose envolve onze reações (BERG *et al.* 2004 e TORTORA *et al.* 2000).

Na vinificação em tinto essa operação divide-se em 02 fases: fermentação tumultuosa e lenta. Na fase tumultuosa as leveduras estão em plena atividade, elevando a temperatura e com elevada produção de CO_2 , provocando flotação, conhecida como “chapéu-de-bagaço”. Enquanto, na fase lenta as leveduras já apresentam limitações em função da elevação da graduação alcoólica e redução de açúcar, essa fase tem duração de 10 a 30 dias.

↳ **Maceração:** é uma das etapas mais importantes, visto que se busca refletir as qualidades da uva no vinho. Portanto, as variáveis a serem consideradas são: a relação da fase sólida/líquida, tempo de maceração, temperatura, número e frequência das remontagens, sistema

de remontagem e volume de líquido remontado. Existe ainda um outro processo chamado maceração carbônica, trata-se de uma técnica distinta da maceração tradicional que pode ser também utilizada em tinto.

↳ **Remontagens:** trata-se da forma de homogeneização das fases sólida e líquida durante a fermentação. Independente do sistema utilizado, o delineamento preconiza efetuar o remonte em 2 a 4 vezes o volume do líquido a cada 24 horas durante a fermentação tumultuosa. E, na fermentação lenta remontar de meia a uma vez o volume do líquido a cada 24 horas até o final da maceração.

↳ **Primeira trasfega:** essa etapa inclui a descuba que deve ser efetuada com oxigenação. A descuba é seguida pela prensagem do bagaço. Com a descuba obtém-se o vinho superior. A prensagem possibilita um aumento de rendimento de 10 a 15% sendo que, o produto obtido possui qualidade ligeiramente inferior ao vinho da descuba, podendo ser misturado ao vinho da descuba.

↳ **Fermentação malolática:** consiste na transformação do ácido málico em láctico. Os vinhos tintos são beneficiados com essa transformação adquirindo maior complexidade aromática, suavidade e maciez gustativa. Deve-se iniciar ao final da fermentação alcóolica quando a autólise das leveduras se intensifica, podendo ocorrer de forma espontânea ou através da inoculação de bactérias lácticas.

↳ **Segunda trasfega:** transferência para o atesto (manutenção dos recipientes de estocagem completamente cheios, evitando oxidação pelo ar).

↳ **Estabilização tartárica, polifenólica e proteica:** compreende duas etapas: polifenólica (os materiais em suspensão são induzidos à decantação via métodos químicos ou físicos; a colagem é efetuada com gelatina, caseína, cola de peixe ou clara de ovo) e estabilização à frio (tartárica), que evita a formação de sais; o vinho deve permanecer por três a quatro semanas a temperaturas negativas de -2°C e -6°C . Esse processo resulta na redução da acidez fixa.

↳ **Sulfitagem:** consiste na correção do SO_2 livre em torno de 30 mg/L^{-1} , de maneira geral, cerca de 1/3 permanece na forma combinada, essa correção é efetuada ao final da estabilização.

↳ **Filtração:** A filtração, por mais precisa que seja, retira boa parte dos atributos do vinho, sendo uma prática dispensada para muitos vinhos de qualidade.

↳ **Cortes:** os vinhos monovarietais podem ser misturados (ao final da estabilização e antes da sulfitagem) quando se deseja um produto mais harmônico.

↳ **Estabilização em barricas de madeira:** é recomendada para

vinhos que possuam estrutura química suficientemente complexa e ausente de qualquer defeito ou alteração. A transferência lenta do oxigênio contribui para estabilidade da cor redução da adstringência e aumento da complexidade aromática.

↳ **Engarrafamento:** para grandes volumes de vinho, utilizam-se engarrafadoras com controle de nível (13-15 mm, para eventual dilatação do volume de líquido), seguido de adição de nitrogênio gasoso, para evitar oxidação. As rolhas de cortiça são, ainda hoje, a melhor escolha para tapar as garrafas de vinho e devem ser protegidas com um involúcro para evitar a desidratação e o desenvolvimento fúngico. As garrafas de vidro de 750 mL são utilizadas por excelência em todo o mundo.

↳ **Envelhecimento na garrafa:** o vinho passa de um ambiente oxidante para redutor, desenvolvendo o aroma de envelhecimento (buquê) e alteração de cor. Após o envase recomenda-se que as garrafas fiquem de pé por um dia (tempo de ajuste da rolha ao gargalo) e em seguida sejam armazenadas na posição horizontal. O tempo de envelhecimento é determinado para cada vinho, variando de alguns meses a vários anos.

3.2 Importância Biotecnológica dos Fungos

O estudo sistemático dos fungos nos últimos anos tem trazido inúmeros avanços na medicina diagnóstica e no desenvolvimento de processos biotecnológicos, principalmente nas áreas da saúde, agrícola e de alimentos. ALEXOPOLUS *et al.* (1996) citam que os fungos nos afetam positivamente através de biotransformações, produção de metabólitos úteis e atividade enzimática. E, que podem nos afetar negativamente causando doenças em plantas, produção de micotoxinas e deterioração em alimentos, provocando alergias, micoses e micotoxicoses em animais e humanos.

3.2.1 Metabolismo fúngico

Os fungos são heterotróficos e exibem nutrição absorptiva, fazendo simplesmente com que eles não fixem carbono. As enzimas digestivas são liberadas para o meio externo para clivagem e aumento da solubilidade de moléculas grandes e relativamente insolúveis (ex: carboidratos, polissacarídeos, proteínas e lipídeos) para que possam ser

finalmente absorvidas (ALEXOPOLUS *et al.* 1996).

Os eventos metabólicos que são importantes para o metabolismo fúngico em culturas puras são denominados de metabolismo primário e são amplamente distribuídos entre os fungos. Os fungos também podem produzir muitos compostos, tais como, micotoxinas, antibióticos e outros de função desconhecida que podem ser secretados no meio em quantidades consideráveis. Esses metabólitos e as enzimas necessárias para sua formação constituem o metabolismo secundário; eles são limitados na sua distribuição e, muitas vezes, para uma espécie em particular. O metabolismo secundário é dependente do primário para obtenção de energia e de intermediários-chave (GRIFFIN, 1994).

3.2.2 Micotoxinas em Produtos alimentícios

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, que podem estar presentes em produtos agrícolas (no campo ou durante o armazenamento) e em alimentos sempre que houverem condições básicas favoráveis de umidade, temperatura e pH. E, que possam demonstrar toxicidade quando introduzidos por via natural (geralmente por ingestão) aos seres humanos e animais.

A forma direta de exposição decorre da utilização do produto contaminado na alimentação humana ou de animais. Já, a forma indireta resulta do emprego de subprodutos e derivados contaminados na elaboração do alimento. A exposição aguda do indivíduo às micotoxinas, em concentrações elevadas, pode levar desde a manifestação de sintomas agudos até a morte. Enquanto, a exposição prolongada, em baixas concentrações, leva ao efeito cumulativo, podendo apresentar sintomas obscuros, como é o caso imunossupressão, até problemas crônicos de saúde. Em 1993, a IARC (*International Agency for Research on Cancer*) classifica as micotoxinas como carcinogênicos (1), potenciais carcinogênicos (2B) e não classificáveis quanto à carcinogenicidade em humanos (3).

As micotoxinas consideradas mais relevantes para a saúde humana pelo CAST (*Council of Agricultural Science and Technology*) são aflatoxinas, alcalóides do *ergot*, fumonisinas, tricotecenos, OTA e zearalenona (CAST, 2003). Outras micotoxinas são consideradas menos importantes, devido à incidência limitada ou carência de evidências de sua toxicidade em humanos. Para alguns casos, são importantes indicadores do uso de alimentos crus de baixa qualidade, como a patulina em produtos de maçã (PITT & HOCKING, 1997). A ocorrência

de micotoxicoses vem sendo registrada há mais de um milênio. Mas, o interesse por seu estudo surgiu na década de 1960 na Inglaterra, com a doença X dos perus. A catástrofe levou a descoberta de uma aflatoxina produzida por *Aspergillus flavus*, fato que estimulou enormemente o estudo das micotoxinas e das micotoxicoses (SANTOS *et al.*, 1998).

3.3 Produção e presença de Micotoxinas em alimentos

Os fungos toxigênicos podem estar presentes nas várias etapas da produção dos alimentos até que chegam à nossa mesa: durante o cultivo, colheita, armazenamento, transporte e processamento. Não é possível descrever um único conjunto de condições que favorecem o crescimento e produção de micotoxinas, porque os fungos micotoxigênicos diferem nas suas características ecológicas, bioquímicas e nichos ecológicos. Portanto, é difícil generalizar estratégias de controle, dada a diversidade de fungos produtores de micotoxinas em diversas culturas antes e depois da colheita. Mas, a compreensão dos fatores relevantes na produção de micotoxinas por um determinado fungo, numa dada comodidade agrícola, permitem a definição de estratégias para combater o problema. Apesar dos fenômenos de contaminação pré e pós colheita serem ecologicamente distintos, a produção de micotoxinas em alimentos é freqüentemente um processo aditivo, iniciando no campo e aumentando durante a colheita e armazenamento (SERRA, 2005).

Mesmo em produtos que a contaminação não seja evidente, é importante estar atento às implicações do crescimento fúngico, mantendo programas de controle e garantia de qualidade das matérias-primas e produtos acabados. Cabe ressaltar, que é comum a ocorrência de sucessão fúngica podendo o agente etiológico primário da deterioração morrer após um período de multiplicação, sendo substituído por outra micobiota (TANIWAKI & SILVA, 2001), porém, a micotoxina quando produzida, poderá ser detectada.

3.3.1 Pré-colheita

Esse período compreende desde os estágios de brotação da planta até a colheita da cultura. A produção de micotoxinas nas plantas pode ocorrer durante todo esse processo, podendo acumular-se em diferentes concentrações nos órgãos das plantas afectadas. A presença de estirpes toxigênicas, susceptibilidade do hospedeiro e nicho agroclimático

favorável, são condições essenciais para a produção de micotoxinas nesse estágio (BILGRAMI & CHOUDHARY, 1998).

3.3.2 Pós-colheita

Nas etapas de acondicionamento, transporte e armazenagem, caso não haja nenhum tipo de processamento, o inóculo de fungos micotoxigênicos continuará presente no produto agrícola. Podendo também, haver outras fontes de inóculo decorrentes de instalações de transporte e armazenagem. As condições ambientais de armazenagem são distintas das condições observadas no campo, favorecendo o desenvolvimento dos chamados “fungos de armazenamento”. A produção de micotoxinas dependerá da presença de fungos toxigênicos com capacidade de crescimento e de produção de micotoxina no substrato, dentro dessas condições ambientais. Outros fatores, como o tempo de incubação, a temperatura, a atmosfera e o potencial redox, bem como pH e comunidades microbianas são relevantes (ABRAMSON, 1998 e SMITH *et al.* 1998).

3.3.3 Processamento

Nos alimentos processados, as fontes de micotoxinas são advindas da matéria-prima durante o processamento e pós-processamento (decorrente de problemas de acondicionamento e/ou armazenagem). As micotoxinas presentes na matéria-prima podem ser eliminadas, reduzidas ou elevadas, dependendo do tipo de processamento adotado. De acordo com SCOTT *et al.* (1977), a patulina é um exemplo de destruição por fermentação, haja vista a sua presença em sucos de frutas e a não-deteção em vinhos. HOCKING *et al.* (2003) verificaram a redução dos níveis de OTA sempre que houve separação de material sólido do vinho.

3.4 Frutas X Micotoxinas

KHURDIYA (1995) apresenta o enquadramento das frutas como, produtos de alta perecibilidade, sendo imprescindível que não apresentem qualquer tipo de deterioração na pós-colheita. A susceptibilidade dos tecidos vegetais é um dos principais fatores de predisposição ao ataque

fúngico. Os fungos toxigênicos de maior interesse para a saúde humana são pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Fusarium* são encontrados em diversos produtos agrícolas. A Tabela 3.1 apresenta os principais fungos responsáveis pela deterioração de frutas.

Tabela 3.1 - Principais deteriorações de frutas e relação dos fungos envolvidos.

Gênero	Características da deterioração	Referências
<i>Alternaria</i> spp.	Mancha marrom a preta em maçã, cereja, pêssego, pêra, damasco, ameixa e figo.	Beuchat (1987). Fundação Cargill (1983).
<i>Aspergillus</i> spp.	Podridão negra em frutas cítricas.	Nelson (1979); Heerden et al. (2002).
<i>Botrydiodiplodia</i> spp.	Podridão negra e amolecimento em manga e banana.	Mascarenhas et al. (1995).
<i>Botrytis</i> spp.	Podridão em uvas de mesa. Podridão cinza em maçã, pêra, framboesa, morango, uva, figo, cereja, pêssego, nectarina, damasco, ameixa e frutas cítricas.	Nelson (1979). Beuchat (1987).
<i>Colletotrichum</i> spp.	Mancha marrom a preta (antracnose) em frutas cítricas, abacate, manga e mamão.	Rezende e Fancelli (1997).
<i>Diplodia</i> spp.	Podridão negra em frutas cítricas, abacate, manga e mamão.	Beuchat (1987); Fundação Cargill (1983).
<i>Fusarium</i> spp.	Podridão marrom em frutas cítricas e abacaxi; amolecimento em figos.	Beuchat (1987).
<i>Geotrichum</i> spp.	Rancidez em frutas cítricas.	Eckert e Eaks (1989).
<i>Penicillium</i> spp.	Podridão azul e verde em frutas cítricas; podridão marrom em abacaxi. Podridão azul em maçã, uva, pêra, banana e cereja.	Beuchat (1987); Eckert et al. (1994). Scott et al. (1972); Lindroth e Niskanen (1978); Taniwaki e Bleinroth e Martin (1989); Burda (1992).
<i>Rhizopus</i> spp.	Deterioração de uvas de mesa. Amolecimento em mamão, maçã, pêra, cereja, pêssego, damasco, nectarina, ameixa, uva, morango, abacate e figo.	Nelson (1979). Beuchat (1987).

Fonte: COELHO et al. (2003)

Os conjuntos taxonômicos aos quais encontram-se espécies produtoras de patulina e ocratoxina A, parecem demonstrar predileção a substratos constituintes de frutas frescas (MOAKE et al. 2005, PARDO et al. 2005, SERRA et al. 2003 e JELINECK et al. 1996), como é o caso dos mono e oligossacarídeos presentes em altas concentrações (BEUCHAT, 1987). As frutas, seus sucos e polpas não concentrados são consideradas alimentos de elevada atividade de água ($a_w > 0,90$); as uvas classificam-se como alimentos de alta acidez ($pH < 3,7$).

3.5 Fungos Produtores de Micotoxinas

Sabe-se que uma mesma espécie fúngica é capaz de produzir mais de um tipo de micotoxina, bem como, a mesma toxina ser

produzida por mais de um gênero. A patulina e a OTA são exemplos de micotoxinas produzidas por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Porém, em uma mesma espécie nem todas as estirpes são produtoras de toxinas. Há, ainda a particularidade de que numa mesma sub-espécie nem todas as estirpes são produtoras de micotoxinas. O substrato é um dos fatores decisivos, visto que, estirpes produtoras em culturas puras podem não produzir a toxina na presença do substrato natural (uvas) e vice-versa (ABRUNHOSA, 2001; ABRUNHOSA *et al.* 2001). Os fungos toxigênicos são classificados em fungos de campo e fungos de armazenamento, de acordo com a atividade de água.

As principais espécies de fungos filamentos produtores de micotoxinas em alimentos são apresentadas na Tabela 3.2:

Tabela 3.2 - Principais espécies fúngicas responsáveis pela produção de micotoxinas.

Micotoxina	Espécies produtoras
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i>
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> ; <i>A. alliaceus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. carbonarius</i> <i>Penicillium verrucosum</i> ; <i>P. nordicum</i>
Tricotecenos	<i>Fusarium spp.</i>
Zearalenona	<i>F. graminearum</i> e outras <i>Fusarium spp.</i>
Fumonisinias	<i>F. moniliforme</i> (= <i>F. verticillioides</i>); <i>F. proliferatum</i>
Citrinina	<i>P. citrinum</i> ; <i>P. expansum</i> ; <i>P. verrucosum</i> ; <i>A. alliaceus</i>
Ácido penicílico	<i>A. ochraceus</i> ; <i>P. aurantiogriseum</i> ; <i>P. viridicatum</i>
Patulina	<i>P. expansum</i> ; <i>P. griseofulvum</i> ; <i>A. clavatus</i>
Esterigmatocistina	<i>Aspergillus versicolor</i> ; <i>Emericella nidulans</i>
Ácido tenuazônico	<i>Alternaria alternata</i>
Penitrem A	<i>Penicillium crustosum</i>
Alcalóides do ergot	<i>Claviceps spp.</i>
Ácido ciclopiazônico	<i>A. flavus</i> ; <i>A. tamarii</i> ; <i>P. commune</i>

Fonte: SERRA (2005a).

3.5.1 Ecofisiologia

O desenvolvimento de fungos e de seu potencial toxigênico,

depende também das características peculiares da espécie. As micotoxinas sofrem efeito cumulativo ao longo da cadeia produtiva pela produção de micotoxinas por fungos de campo, com consecutiva elevação em função da ação de fungos de armazenagem (BEUCHAT, 1987). Os principais fatores de crescimento de fungos em alimentos são definidos por PITT & HOCKING (1997) em:

- Atividade de água: significa a quantidade de água em um alimento, não comprometida com ligações químicas, dissolução de solutos e outros. Os fungos de campo só crescem com elevada atividade de água ($>0,90$), como é o caso do gênero *Fusarium*. Os fungos capazes de crescer com atividade de água $<0,85$ são definidos como xerofílicos e são enquadrados nos fungos de armazenamento, estando inseridos os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. É importante ressaltar que os mesmos podem ser encontrados no campo e, inclusive, com produção de micotoxinas.

- Solutos específicos: cloreto de sódio, cloreto de magnésio, glicose e glicerol são solutos que mesmo adicionados em concentrações que resultem na mesma atividade de água podem interferir no desenvolvimento do fungo. Esse fator não parece ter grandes implicações sobre os *Aspergillus* e *Penicillium*.

- pH: esse é um fator que afeta pouco os fungos, visto que apresentam uma tolerância bem maior a variações (3,0 a 8,0), quando comparados a bactérias. Portanto, quando um alimento apresenta uma elevada atividade de água, o pH representa um fator limitante de deterioração.

- Atmosfera de armazenamento: a maior parte dos problemas de deterioração de alimentos por fungos filamentosos ocorre na presença de oxigênio. Elevadas concentrações de gás carbônico são prejudiciais ao crescimento fúngico.

- Temperatura: de forma geral, os fungos apresentam baixa resistência ao calor; a temperatura ótima de crescimento encontra-se na faixa de 25 a 28°C. Esse fator associado à atividade de água é o mais estudado na produção de micotoxinas. As espécies de *Aspergillus* são capazes de crescer a baixa atividade de água e elevadas temperaturas.

- Consistência do alimento: os fungos são favorecidos por substratos firmes, onde o acesso ao oxigênio é favorecido, porém, podem deteriorar alimentos líquidos.

- Características nutricionais: o metabolismo fúngico é favorecido nos substratos ricos em carboidratos. Quando a única fonte de carbono for os não-carboidratos, os mesmos deverão ser convertidos à glicose pela gliconeogênese, para formação dos precursores das paredes

celulares e outros materiais derivados das hexoses. Dos três gêneros citados, o *Penicillium* é o que apresenta menor exigência nutricional.

- Conservantes: os mais utilizados para prevenir o desenvolvimento fúngico em sucos, polpas são: dióxido de enxofre, ácidos benzóico, sórbico e propiônico.

3.6 Taxonomia Fúngica

De acordo com ALEXOPOULOS *et al.* (1996) os fungos são divididos, em 4 filos, definidos principalmente quanto à reprodução sexual: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota* e *Ascomycota*. PITT & HOCKING (1997) dividem os fungos deteriorantes em alimentos em três sub-reinos: *Zygomycotina*, *Ascomycotina* e *Deuteromycotina*. Porém, os *Deuteromycetes* não existem como grupo taxonômico e não representam nenhum grupamento natural e o reconhecimento desse grupo artificial justifica abordagens taxonômicas puramente pragmáticas (SERRA, 2005). As principais características dos filos são descritas a seguir:

1. *Zygomycotina*: crescimento rápido em altas atividades de água (não xerofílicos), desenvolvimento de micélio não septado e, geralmente, sem obstrução apresenta reprodução assexuada por esporangiosporos, dentro de uma estrutura especializada (esporângio) no final de uma hifa diferenciada, pouco resistentes à ação de tratamentos térmicos ou químicos.

2. *Ascomycotina*: os fungos produtores de micotoxinas pertencem a essa divisão. Os “ascomicetos” possuem suas estruturas reprodutivas (ascosporos) dentro de estruturas especializadas (ascos). Esses fungos apresentam maior proeminência a produção de micélio septado, logo o seu crescimento é mais lento, com algumas excessões. Quase todos os fungos xerofílicos pertencem aos “ascomicetos” e “deuteromicetos”.

3. *Deuteromycotina*: apresentam micélio septado, sem produção de esporos sexuados, sendo chamados “fungos imperfeitos”. Os seus esporos são denominados conídeos, sendo formados em estruturas especializadas (conidióforos). Porém, há complexidade das hifas diferenciadas e ampla variedade morfológica dos conídios, quanto ao tamanho, formato e ornamentação.

A interligação ascomiceto-deuteromiceto é estabelecida porque vários fungos dispõem de genes para produção tanto de ascosporos quanto de conídios. O estágio ascomiceto é chamado de teleomorfo; quando ocorre a presença concomitante do estágio conidial é conhecido

como holomorfo, mas o nome teleomorfo predomina. Os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são pertencentes a esse grupo.

3.7 Identificação dos Gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*

Tradicionalmente, a identificação de fungos filamentosos avalia, principalmente, as características morfológicas das estruturas reprodutivas (sexuada e assexualda). PARMASTO & PARMASTO (1992) demonstraram que diferenças morfológicas por mudanças de conformação genética entre espécies iguais surgem lentamente, e espécies ecologicamente distintas apresentam diferenças morfológicas qualitativas e quantitativas sutis. SERRA, (2005) comenta a sobreposição nas características quantitativas mais usadas, como o tamanho dos esporos, sendo que esses problemas refletem na classificação dos principais gêneros produtores de micotoxinas, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*.

Portanto, para identificação das estruturas, os isolados (culturas puras) devem ser cultivados em meios de cultura apropriados e corados com técnicas apropriadas para manutenção e melhor observação das estruturas. Em muitos casos, pode não ocorrer a produção de estruturas reprodutivas, sendo necessário assim alterar as condições de cultivo. Para induzir a esporulação pode ser utilizado meio de cultura seletivo, aumento da iluminação da cultura, irradiação com doses reduzidas de luz ultra violeta. Havendo também, necessidade da preparação para observação microscópica das estruturas. As estruturas observadas devem ser comparadas com as literaturas de referência, por meio de chaves de identificação.

Foram publicados manuais de identificação claros e concisos para *Aspergillus* e *Penicillium*, que enfatizam as principais características de cada espécie e as suas afinidades com outros taxa. As espécies descritas nos manuais de referência de *Aspergillus*, por Raper e Fennell no ano de 1965 e *Penicillium*, por Raper e Thom em 1949, consideradas válidas foram tipificadas, as espécies de *Aspergillus* (por Samson & Gams, 1985) e, as espécies de *Penicillium* (por Pitt em 1979, e GAMS *et al.* (1985)). Esses autores dispuseram uma nova classificação de *Aspergillus* baseada em subgêneros e secções, substituindo o termo equivocado “grupo”, novos manuais de *Aspergillus* foram elaborados, onde esses avanços são considerados (KLICH & PITT, 1988 e KLICH, 2002). Os manuais de identificação para *Fusarium* de uso mais

frequente são os de NELSON *et al.* (1983) e BURGESS *et al.* (1988). Segundo SERRA (2005), a taxonomia ainda está em evolução e muitas espécies não estão tipificadas.

Com a elucidação dos sistemas de classificação, o refinamento dos conceitos de espécie e o estabelecimento de meios de cultura e condições de incubação padronizadas, a identificação morfológica tornou-se uma tarefa mais simples. Para identificações rotineiras de grandes números de estirpes, a identificação morfológica baseada em manuais e chaves ainda é a escolha de eleição. No entanto, certas espécies de fungos não são passíveis de identificação até à espécie apenas com base na morfologia, visto que constituem agregados de diferentes espécies definidas molecularmente e/ou com base no seu perfil metabólico. Após a identificação morfológica do agregado ou espécie *lato sensu*, é necessário usar outras técnicas de identificação específicas para discriminar as espécies num dado agregado (SERRA, 2005).

3.7.1 Características morfológicas importantes na classificação das espécies do gênero Aspergillus

Aspergillus é um gênero anamórfico, com reprodução pela produção de fialosporos (conídio produzido nas fiálides). Algumas espécies anamórficas também podem apresentar um estágio sexuado (teleomórfico), mas, isso é reportado a oito ou mais espécies. As características morfológicas consideradas nesse trabalho são reportadas por KLICH (2002).

O conidióforo é constituído pela cabeça conidial e pelo estipe. O estipe geralmente apresenta a forma de “T” ou “L” no ponto de conexão com a hifa vegetativa, essa porção é conhecida como “célula basal”, porém não é uma célula separada. As vesículas podem apresentar diferentes formas, o que é esquematizado na Figura 3.5.

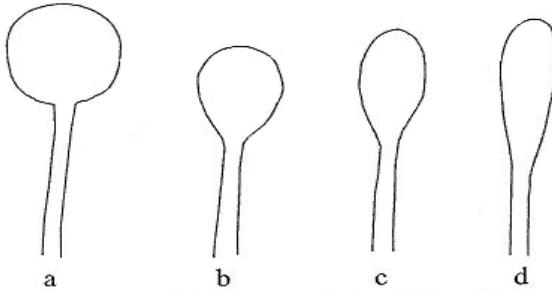


Figura 3.5 - Formas comuns de vesículas de conidióforos dos *Aspergillus*:
a) globosa, ou esférica; **b)** piriforme; **c)** espatulada e **d)** clavada.
 Fonte: Klich (2002)

A cabeça conidial pode apresentar-se de duas formas: unisseriada (a fiálide sai diretamente da vesícula) e bisseriada (há uma disposição celular em paliçada entre a fiálide e a vesícula, chamada metula). Essa é uma importante característica na distinção entre espécies semelhantes. A vesícula pode apresentar diferentes formas características, esquematizadas na Figura 3.6.

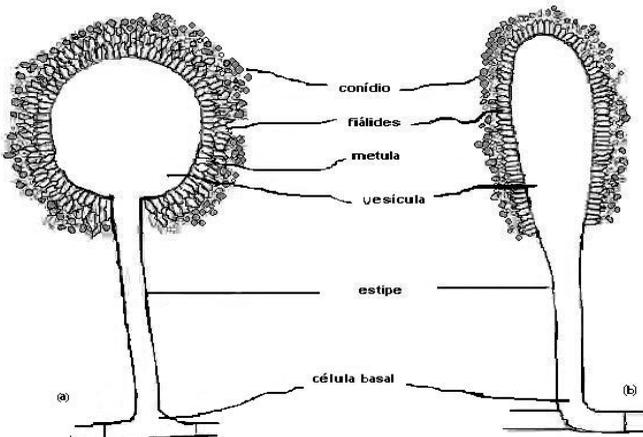


Figura 3.6 - Conidióforo de **(a)** *A. flavus* (bisseriado) e **(b)** *A. clavatus* (unisseriado).
 Fonte: Klich, 2002

As características macromorfológicas devem observadas a olho nú ou com auxílio de lupa, consideradas importantes para a identificação são as seguintes: cor do conídio, diâmetro da colônia, cor do micélio,

exudato, cor do reverso da colônia, pigmento solúvel, esclerócio e cleistotécio. Enquanto, as micromorfológicas são: seriação, vesícula, conídio, estipe. Para identificação dos teleomorfos é importante observar a parede cleistotecial (ascoscarpo), células de Hülle e os acosporos.

A classificação apresentada na Tabela 3.3, contém a reclassificação dos grupos de *Aspergillus* em sub-gêneros e secções, efetuada por GAMS *et al.* (1985) de acordo com o *Botanic Code*.

Tabela 3.3 - Classificação do gênero *Aspergillus* de acordo com subgêneros e secções.

Sub-gêneros	Secção	Conidióforo	
		Unisseriado (U)	Bisseriado (B)
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> ^a	U	verde a cinzento
	<i>Restricti</i> ^b	U	
<i>Fumigati</i> ^c	<i>Fumigati</i>	U	verde-cinzento a azul-cinzento
	<i>Cervini</i>	U	laranja a laranja-cinzento
<i>Ornati</i>		U	verde cinzento, verde, amarelo ou castanho-oliva
<i>Clavati</i> ^d	<i>Clavati</i>	U	verde a cinzento
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i> ^e	B	verde
	<i>Versicolores</i>	B	verde a azul esverdeado
	<i>Usti</i>	B	rubro sombrio, castanho ou oliva
	<i>Terrei</i>	B	bege a castanho-alaranjado
	<i>Flavipedes</i>	B	branco a bege
	<i>Wentii</i>	U/B	bege, amarelo-castanho ou castanho-oliva
<i>Circumdati</i> ^f	<i>Flavi</i>	U/B	amarelo esverdeado a castanho-oliva
	<i>Nigri</i>	U/B	negros ou quase pretos
	<i>Circumdati</i>	B	bege, amarelo ou ocre
	<i>Candidi</i>	B	branco ou quase branco
	<i>Cremeri</i>	U/B	castanho, amarelo ou verde azulado
	<i>Sparsi</i>	B	cinza claro a bege-oliva
<i>Stilbothammium</i> ^g			

^a crescimento em CYA20S>CYA25; ^bbaixo crescimento; ^cvesículas piriformes; ^dvesículas clavadas; ^ecéls. de Hülle frequentes, estipes curtas; ^fvesículas esféricas a piriforme; ^gnão considerado no livro referenciado.

Fonte: Klich (2002)

3.7.2 Características morfológicas importantes na classificação do gênero *Penicillium*

No gênero *Penicillium*, o conidióforo é reconhecido por apresentar sua estrutura típica, densa em “forma de pincel” chamada “penicilo”. O penicilo é simples ou subdividido e finaliza com um *cluster* de fiáldes. Essa característica é importante na identificação das espécies. Os conídios surgem diretamente das fiáldes e se dispõem em cadeia. As fiáldes surgem em verticilos, dispostas diretamente no estipe (monoverticilado) ou por meio da metula (biveriticilado), através de metula e rami (terverticilado), e quando há ainda, ramulas denomina-se quaterverticilado, a Figura 3.7 apresenta as estruturas.

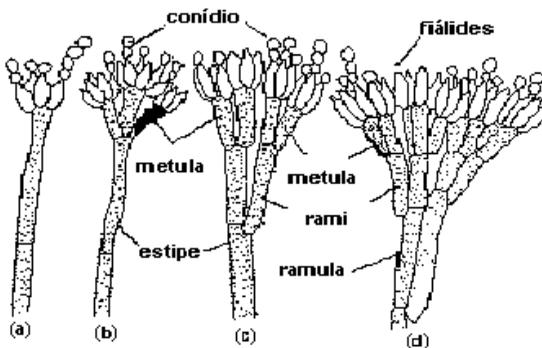


Figura 3.7 - Conidióforos do gênero *Penicillium*: (a) monoverticilado; (b) biveriticilado; (c) terverticilado; (d) quaterverticilado.

Fonte: Adaptado de Samson *et al.* 1984

O enquadramento taxonômico desse gênero obedece aqui ao manual de identificação de PITT (1988). As espécies estritamente anamórficas dividem-se em quatro sub-gêneros, como apresentado na Tabela 3.4:

Tabela 3.4 - Classificação de *Penicillium* em subgêneros e secções.

Subgênero	Penicilo	Seção	Observações
<i>Aspergilloides</i>	monoverticilados	<i>Aspergilloides</i>	estipe vesiculado
		<i>Exicaulis</i>	estipe não vesiculado
<i>Furcatum</i>	biverticilados com fiálides ampuliformes	<i>Divaricatum</i>	penicilli irregulares
		<i>Furcatum</i>	penicilli regulares
<i>Biverticillium</i>	biverticilados com fiálides acerosas	<i>Coremigena</i>	penicilli em corémios ou synnemata
		<i>Simplicia</i>	penicilli sem synnemata
<i>Penicillium</i>	terverticilados a quaterverticilados	<i>Penicillium</i>	penicilli multiramulados
		<i>Coronatum</i>	
		<i>Inordinate</i>	penicilli irregularmente ramulados
		<i>Cylindrosporium</i>	Conídios cilíndricos

Fonte: SERRA (2005)

3.8 Detecção, enumeração e identificação de fungos filamentosos em alimentos

A concepção de população total à bolores e leveduras, como se aplica às bactérias (tradicionalmente utilizado), oferece muito poucas infomações com relação a qualidade do alimento, pois não se avalia a microbiota particular do alimento. A enumeração de células viáveis, ao contrário do observado para bactérias, não corresponde ao potencial de crescimento, deterioração ou produção de toxinas no alimento (PITT, 1989). Fungos filamentosos não crescem em número de células, mas por meio de alongação do sistema hifal, com aumento em volume, número de núcleos e citoplasma (GRIFFIN, 1994). Portanto, a presença de um elevado número de fragmentos não reflete de maneira direta a biomassa fúngica (NUNES, 2001 e PITT, 1989). Os propósitos da investigação é quem irão definir a metodologia que melhor se aplica ao processo.

3.8.1 Métodos para enumeração de fungos em alimentos

Os métodos descritos a seguir são recomendados pela ICFM (*International Commission on Food Mycolgy*), e dispostos em SAMSON *et al.* (1992):

↳ Plaqueamento por diluição: indicado para alimentos líquidos ou em pó, ou para casos em que o estabelecimento da micobiota global é um fator essencial. Os resultados são expressos em elementos viáveis por grama de amostra.

↳ Plaqueamento direto: é a melhor técnica para alimentos particulados. Aqui os resultados são expressos em porcentagem ou número de partículas colonizadas.

↳ Em muitas situações há desinfecção prévia (hipoclorito de sódio) da superfície do produto, a fim de estabelecer a micobiota invasiva no alimento.

3.8.2 Métodos rápidos para detecção de fungos em alimentos

Técnicas rápidas de detecção de espécies fúngicas com potencial micotoxigênico vêm sendo desenvolvidas. São métodos que avaliam e correlacionam produtos do metabolismo fúngico com o crescimento ou a produção de micotoxinas. A determinação de compostos orgânicos voláteis (VOCs) possibilita em alguns casos, identificar as espécies presentes (MAGAN & EVANS, 2000). A detecção de VOCs por meio de narizes eletrônicos foi desenvolvida por OLSSON *et al.* (2002). A técnica de VOCs é recomendada para aplicação em ambientes fechados, como em armazéns. Métodos genéticos e imunológicos específicos para espécies produtoras de micotoxinas foram desenvolvidos para a detecção rápida de fungos em diversos alimentos (NIESSEN *et al.* 2004; DEWEY & MEYER, 2004).

Outros métodos de detecção rápida de fungos em partículas individualizadas envolvem espectroscopia de infravermelhos com transformadas de *Fourier* (FT-IR). Estes métodos não são destrutivos, e têm aplicações na análise de partículas sólidas secas, como por exemplo grãos de milho (GORDON *et al.* 1997 e KOS *et al.* 2002).

A observação direta da partícula alimentar através de técnicas de microscopia óptica ou eletrônica pode ser de grande utilidade para ver de que forma os fungos estão no substrato. Em caso de crescimento fúngico visível, a inspeção visual ao esteromicroscópio pode fornecer elementos sobre as espécies envolvidas ou sobre o modo de infecção (SERRA, 2005). Um manual de práticas microscópicas foi desenvolvido por LÜTHI & VETSCH (1992) para avaliação de vinhos e sucos de frutas.

3.9 Determinação de micotoxinas

As técnicas de detecção e quantificação de micotoxinas são comumente, são seguidas de 03 etapas: amostragem, preparação da amostra e procedimento analítico. A definição do método analítico empregado irá depender do intuito da investigação. No presente referenciamento, serão levantadas informações relacionadas à avaliação da determinação geral de micotoxinas em alimentos.

3.9.1 Determinação de micotoxinas em alimentos

A amostragem é apontada como a principal fonte de variação dos resultados na detecção e quantificação de micotoxinas em alimentos, devido a heterogeneidade de distribuição do inóculo. Via de regra, a contaminação concentra-se em um pequeno número de partículas, o que geralmente não ocorre com produtos líquidos ou homogêneos em função da dispersão.

A produção de micotoxinas em alimentos quando ocorre de forma direta, apresenta distribuição irregular e circunstancial em alimentos, com conseqüente heterogeneidade na amostra. E, se torna necessário emprego de um plano de amostragem estratificado, ou seja, a seleção de pontos distintos (estrato); uma amostra aleatória simples deverá ser retirada de cada estrato (sub-amostra), a fim de, compor a amostra completa (representativa). A amostra composta deve ser encaminhada ao laboratório para que se faça a homogeneização e retirada da amostra analítica.

O preparo da amostra irá depender da natureza do alimento, enquanto à homogeneização, dependerá do plano de amostragem efetuado. Nos alimentos sólidos, após redução do tamanho das partículas em moinhos ou trituradores, com ou sem utilização de solventes é que se retira a alíquota para o procedimento analítico.

A extração de alimentos sólidos se faz a partir da transferência da micotoxina do sólido para uma fase líquida. Para tanto, taxas de recuperação devem ser estabelecidas. Solventes orgânicos e/ou misturas de solventes orgânicos com água são os compostos de escolha para extração de alimentos sólidos. A homogeneização do solvente no soluto (alimento) é um fator primordial na eficiência do processo, que varia de alguns minutos até 2 horas. Procedimentos que envolvem misturadoras são mais rápidos, mas tem de se assegurar que a totalidade da amostra está continuamente em contato com o solvente e que não há zonas

mortas ou estagnadas. Se um número considerável de amostras é analisado, o processo de agitação é o de escolha (CAST, 2003).

A limpeza é feita após a extração, para remoção de impurezas do extrato. Ou seja, consiste no isolamento da micotoxina e, também é útil na concentração da toxina de interesse. Trata-se de uma etapa indispensável quando se busca boa seletividade e sensibilidade. A limpeza de extratos é efetuada basicamente com colunas de extração em fase sólida (SPE). O enchimento das colunas SPE é normalmente de sílica porosa, cuja superfície foi modificada para permitir uma adsorção selectiva do analito ou das impurezas. Se o alvo da retenção é o analito, as impurezas são lixiviadas. O analito é então removido seletivamente por alteração da solução de lavagem. Se a coluna retém as impurezas, o analito permanece no extrato líquido, não havendo a necessidade dessa última fase.

As colunas de imunoafinidade (IAC) são uma forma de colunas SPE. Neste caso, anticorpos específicos para o analito são fixados em material inerte. O analito é removido da coluna com auxílio de solvente capaz de desnaturar o anticorpo. Existem colunas de imunoafinidade disponíveis para aflatoxinas, OTA, fumonisinas, zearelanona e DON. Normalmente, as IACs são muito eficientes para remover impurezas. Interferências na coluna irão influenciar na capacidade de ligação dos anticorpos à toxina. Portanto, em relação às especificações do fabricante, algumas condições deverão ser observadas tais como: volume de extrato, força do solvente e velocidade de percolação.

A determinação consiste em dois tipos: métodos de rastreio e métodos confirmatórios. Os métodos de rastreio são de determinação rápida, mas pouco rigorosos na quantificação, tem-se como exemplo: os *kits* de ELISA (Enzima Imuno Ensaio) e a cromatografia de camada delgada (TLC).

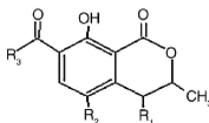
Os métodos confirmatórios permitem maior exatidão na determinação das concentrações e confirmação da identidade da micotoxina (comparação com padrão e processos de derivatização). As técnicas cromatográficas e de espectrometria como HPLC, GC e LC-MS/MS é que são as ferramentas de preferência.

A escolha da metodologia analítica deverá ser baseada em alguns critérios, como a especificidade do alimento, validação do método e sempre que possível seguir protocolos oficiais (Associação Oficial dos Analistas químicos (AOAC), Comitê Europeu para Normatização (CEN) ou Organização Internacional para Normas (ISO). Para controle do laboratório, critérios de desempenho e aceitação devem ser observados: determinação da taxa de recuperação, repetibilidade (r),

desvio padrão da repetibilidade (s_r), desvio padrão relativo da repetibilidade (RSD_r), reprodutibilidade (R), desvio padrão da reprodutibilidade (s_R), desvio padrão relativo da reprodutibilidade (RSD_R).

3.10 Ocratoxina A

As ocratoxinas constituem um grupo de metabólitos secundários produzidos por fungos do gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*; pertencem a este grupo a ocratoxina A (OTA), ocratoxina B (OTB), ocratoxina C (OTC), 4-hidroxiocratoxina A (4-OH OTA) e ocratoxina α ($OT\alpha$). Essas micotoxinas são compostas basicamente de 2 grupamentos: uma di-hidroxi isocumarina ligada através do seu grupo 7-carboxi a amida do grupamento L- β -fenilalanina (essa ligação é muito estável em relação à hidrólise e temperatura), com exceção da $OT\alpha$ em que o grupamento fenilalanina está ausente. A Figura 3.8 apresenta a estrutura das ocratoxinas.



Ochratoxins	R1	R2	R3
OTA	H	Cl	-NH-CH(COOH)-CH ₂ - Phenyl
OTB	H	H	-NH-CH(COOH)-CH ₂ - Phenyl
OTC	H	Cl	-NH-CH(COOC ₂ H ₅)-CH ₂ - Phenyl
4-hydroxyochratoxin A	OH	Cl	-NH-CH(COOH)-C ₂ H- Phenyl
$OT\alpha$	H	Cl	-OH

Figura 3.8 - Estrutura das ocratoxinas A, B, 4-hidroxiocratoxina A e ocratoxina α .

Fonte: Ringot *et al.* (2006)

A OTA é a representante mais tóxica do grupo. Isso tem sido atribuído a presença do átomo de cloro na posição C5 adicionado a presença de um grupo OH fenólico (CHU *et al.* 1972). O isolamento da OTA produzida pelo fungo *Aspergillus ochraceus* Wilh. foi descrito pela primeira vez por VAN DER MERWE *et al.* (1965).

A OTA apresenta alta solubilidade em solventes orgânicos polares e solubilidade moderada em solução aquosa de bicarbonato de sódio; exibe adsorção UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} = 333\text{nm}$ (POHLAND *et al.* 1982). Possui emissão máxima em fluorescência a 428 e 467 nm em etanol

absoluto e etanol (96%), respectivamente (KUIPPER-GOODMAN & SCOTT, 1989). Apresenta caráter de ácido fraco, com valores de pKa de 4,2-4,4 para o grupo carboxila da fenilalanina e 7,0 - 7,3 para o grupamento hidroxila da isocumarina (VALENTA, 1998).

De acordo com CHU (1974), a ocratoxina B é considerada dez vezes menos tóxica que a OTA. Acredita-se que isso se deva a remoção do radical cloro na dissociação do grupamento fenólico e a propriedade ferro-quelante da molécula. A Figura 3.9 representa a fórmula estrutural [7- (L-β-fenilalanilcarbonyl) - carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3*R*-metilisocumarina] da OTA, sendo que o grupamento fenilalanina se encontra destacado em vermelho.

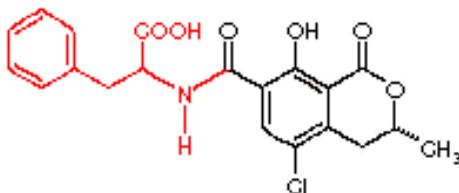


Figura 3.9 - Fórmula estrutural da OTA.

3.10.1 Riscos à saúde frente a exposição à OTA

A OTA tem demonstrado atividade nefrotóxica, hepatotóxica, teratogênica e imunotóxica em várias espécies de animais, causando tumoração hepática e renal em ratos e camundongos (WHO, 1996). Estudos feitos por LEA *et al.* (1989) indicam ação imunossupressora em humanos.

Na década de 1950 uma patologia renal foi observada na Bulgária, Romênia e Iugoslávia e ficou conhecida como Nefropatia Endêmica dos Bálcans (BEN), caracterizada por degeneração tubular, fibrose intersticial e hialinização do glomérulo acompanhada por enzimúria, insuficiência renal com nefrotoxicidade degenerativa (CASTEGNARO *et al.* 1987). Ao longo dos últimos anos tem-se sugerido que a BEN esteja associada à elevada concentração de OTA detectada em alimentos e no nível sérico da população daquela região (VRABCHEVA *et al.* 2000). Porém, GROSSO *et al.* (2003) apresentam resultados discrepantes em um estudo realizado na Tunísia em 62 pacientes hospitalizados, onde os níveis séricos de OTA foram determinados, e não houve correlação entre os níveis da micotoxina e a lesão renal.

As propriedades toxicocinéticas e toxicodinâmicas da OTA são revisadas por RINGOT *et al.* (2006), indicando a OTA como um modulador de sinalização celular e não uma toxina clássica. Interações por meio de ligações específicas interferindo na via metabólica clássica da fenilalanina (provocando alterações nas vias metabólicas dos carboidratos). A inibição da síntese de proteínas é considerada o maior efeito tóxico da OTA, porém, existem outros efeitos como a peroxidação de lipídeos, alterações no DNA e desmembramento do cálcio na homeostasia. A inibição da cadeia respiratória é outro efeito da OTA. A elucidação dos mecanismos de genotoxicidade e formação de adução no DNA ainda é obscura e confusa. Efeitos na apoptose e transdução de sinais com consequente morte celular têm sido demonstrados em vários estudos, principalmente, em casos de toxicidade aguda. RANALDI *et al.* (2007) apontam para uma possível sinergia entre a ação da OTA e de alguns componentes do vinho, tal como, os polifenóis na indução apóptica da morte celular.

Efeitos antagônicos ou sinérgicos podem ser observados nas interações entre diferentes micotoxinas. A associação de OTA e citrinina potencializa a ação nefrotóxica em suínos, frangos, ratos e camundongos (SPEIJERS & SPEIJERS, 2004 e POHLAND *et al.*, 1992). A interação de OTA e ácido penicílico tem efeito sinérgico na mortalidade de frangos, camundongos e ratos (KOSHINSKY & KHAKHATOURIANS, 1994).

Determinados componentes de alimentos parecem ter um efeito protetor contra os efeitos nocivos da OTA, como a fenilalanina, aspartame, vitamina C e outros compostos antioxidantes (STOEV *et al.*, 2002; ATROSHI *et al.*, 2000; CREPPY *et al.*, 1998; VERMA & SHALINI, 1997). Esse fato, parece estar associado à inibições competitivas dessas substâncias em relação a OTA, quando se avaliam os dados tóxicocinéticos e toxicodinâmicos fornecidos sobre a OTA até o presente momento.

3.10.2 Espécies fúngicas e biossíntese da OTA

Segundo FRISVAD & FILTENBBORG, (1989) existem 02 gêneros capazes de produzir OTA: *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo que teleomorfos do gênero *Aspergillus* estão inclusos (*Petromyces* e *Neopetromyces*).

Para o gênero *Penicillium*, a única espécie acordada como produtora de OTA é o *P. verrucosum* (LUND & FRISVAD, 1994;

SVENDEN & FRISVAD, 1994; FRISVAD & FILTENBORG, 1989 e PITT, 1987). Porém, investigações efetuadas por CASTELLÁ *et al.* (2002) e LARSEN *et al.* (2001) resultaram na descoberta de outra espécie produtora *P. nordicum*, sendo os únicos produtores da micotoxina no gênero, até o presente momento. Essas espécies são consideradas produtoras de OTA em climas frios e temperados.

No gênero *Aspergillus*, as espécies ocratoxigênicas encontram-se disseminadas por várias seções. Até o início da década de noventa acreditava-se que a produção de OTA estava circunscrita à seção *Circumdati* (*A. ochraceus* e espécies afins como *A. sulphureus* e *A. sclerotiorum*) e *A. alliaceus* (e seu teleomorfo, *Petromyces alliaceus*), mas UENO *et al.* (1991) descobriram uma estirpe ocratoxigênica de *A. foetidus*, da seção *Nigri* do subgênero *Circumdati*. ABARCA *et al.* (1994) isolaram duas estirpes de *Aspergillus niger*, outra espécie da seção *Nigri*, capazes de produzir OTA em cultura. *A. carbonarius* foi citado por HORIE em 1995, como produtor de OTA. Samson e colaboradores descreveram duas espécies novas na seção *Nigri* capazes de produzir OTA: *A. sclerotioniger* e *A. lacticoffeatus*, (provisoriamente aceitas na seção *Nigri*), ambas isoladas de café (SAMSOM *et al.*, 2004). Vários estudos confirmam a biossíntese da OTA a partir de espécies referentes à seção *Nigri* (MITCHEL *et al.*, 2004; SAMSON *et al.*, 2004; TANIWAKI *et al.*, 2003; DALCERO *et al.*, 2002; ACCENSI *et al.*, 2001; URBANO *et al.*, 2001; VARGA *et al.*, 2000; TÉREN *et al.*, 1996).

De acordo com RINGOT *et al.* (2006) a via biossintética para OTA ainda não está completamente estabelecida. Porém, experimentos utilizando precursores marcadores C¹⁴ e C¹³ mostraram que a fenilalanina é originada a partir do ácido shikímico (via shikimato) e da dihidro-isocumarina (via do pentacetídeo). A Figura 3.10 descreve a biossíntese da OTA.

A primeira etapa na síntese da isocumarina consiste na condensação de uma unidade de acetato (Acetil-CoA) com quatro unidades de malonato. CALAGHAN *et al.* (2003) mostraram que essa etapa requer a ação de uma *policetídeo sintase*. A partir da acetil-CoA ocorre a formação da meleína, com a adição de uma carboxila temos a síntese da OTβ. Em seguida, com a ação da *cloroperoxidase*, um átomo de cloro é incorporado formando a OTα. Finalmente, a *ocratoxina A sintase* catalisa a ligação da OTα à fenilalanina.

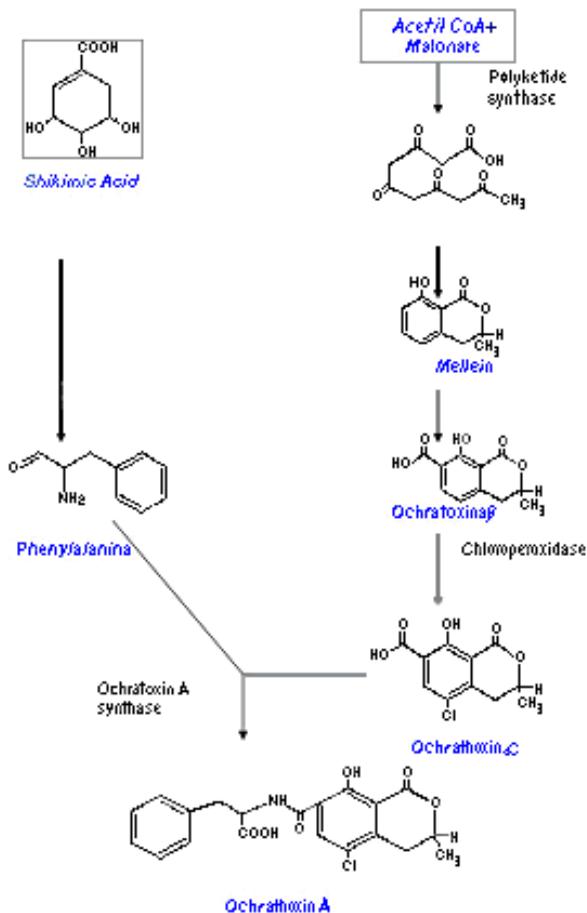


Figura 3. 10 - Biossíntese de ocratoxina A
 Fonte: Ringot *et al.* (2006)

3.10.3 Determinação da produção de OTA por fungos

A produção de micotoxinas por estirpes fúngicas em cultura pura é efetuada em condições padronizadas, tanto para estudo taxonômico quanto para realizar um rastreio. Os meios de cultura comumente utilizados são YES ou CYA, com incubação a 25 °C, durante 07 dias (SAMSOM & PITT, 2000 e KLICH, 2002).

Para o rastreio de fungos por metabolitos secundários, os métodos

cromatográficos são os mais populares, em particular a cromatografia em camada delgada (TLC) e a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) ou a cromatografia gasosa (GC). O GC é usado principalmente para análise de tricotecenos tipo A. Em TLC a identificação dos compostos se dá pelo seu factor de retenção (Rf), que é dado pela razão entre a distância (cm) migrada pelo composto e a distância total migrada pelo solvente, e pela cor dos metabólitos a diferentes comprimentos de onda (visível, UV). Existem bases de dados com o Rf e cor dos metabólitos, que podem ser usadas para identificações presuntivas (PATERSON & BRIDGE, 1994), bem como padrões para algumas micotoxinas, que são usadas para fins comparativos. As principais vantagens do TLC são o seu baixo custo e a sua rapidez. As principais limitações são: limite de detecção relativamente elevado, a falta de precisão e quantificação limitada. Estas limitações são compensadas quando se faz a determinação por HPLC com detecção por fluorescência ou UV.

A Figura 3.11 apresenta dois fatores relevantes para o uso de método cromatográfico, com relação à avaliação do cromatograma, que é a limpeza do extrato da cultura e a ausência de interferentes.

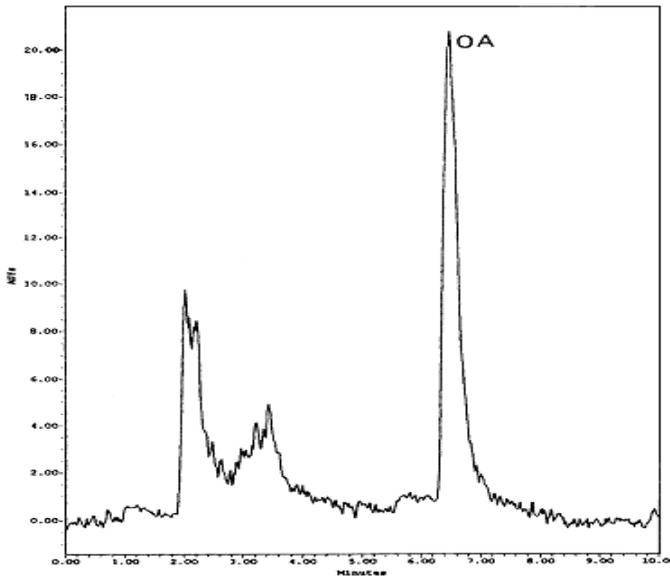


Figura 3. 11 - Cromatograma de uma estirpe de *A. niger* var. *niger* após 7 dias de incubação em CYA ($12,3\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), usando metanol como solvente. Tempo de retenção da OTA = 6,5 min, em detecção por fluorescência.

Fonte: Bragulat *et al.* (2001)

3.10.4 Micobiota e espécies ocratoxigênicas em uvas

DA ROCHA ROSA *et al.* (2002) após avaliação de uvas brasileiras e argentinas, registram a presença de estirpes de *A. niger*, *A. carbonarius* e *A. ochraceus* (este último somente no Brasil), *P. verrucosum* não foi isolado.

Na Espanha e França *A. carbonarius* foi a única espécie da seção *Nigri* produtora de OTA (BAÚ *et al.* 2005; SAGE *et al.* 2002, 2004). Na Itália durante as safras 1999-2000, nove vinhedos foram rastreados com uma baixa incidência do gênero *Penicillium* spp. (não houve registro de *P. verrucosum*), em relação ao gênero *Aspergillus* (seção *Fumigati*, *Circumdati* e *Nigri*), houve o predomínio da seção *Nigri* e produção de OTA pelas espécies *A.niger* e *A. carbonarius*, a presença de *A. ochraceus* foi observada; (BATTILANI *et al.* 2003a; BATTILANI & PIETRI, 2002). Em Portugal em avaliação de vinhedos nas safras de 2001 a 2003 observou-se a seguinte frequência dos gêneros: *Cladosporium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Penicillium* e *Aspergillus*. *Epicoccum nigrum*, *Aureobasidium pullulans*, *Rhizopus*, *Stemphylium*, *Ulocladium*, sendo que *Trichoderma* e *Trichothecium roseum* foram detectados em menos de 1% das bagas analisadas. A habilidade de produção de OTA foi detectada nas culturas de *A. alliaceus*, *A. carbonarius* e agregados *A. niger*. A produção de OTA foi predominante para *A. carbonarius* (SERRA *et al.* 2005).

A Tabela 3.5 elenca uma série de trabalhos realizados em diversos países com relação à incidência fúngica nas uvas no período da vindima, (com exceção do estudo feito por ROMERO *et al.* (2005) que avaliou uva passa); utilizando principalmente o ágar DRBC como meio de cultivo e a técnica de semeadura direta sem desinfecção. Observou-se um mínimo de 6 e um máximo de 27 gêneros isolados, com predomínio de *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Botrytis*.

Tabela 3.5 - Ocorrência de fungos filamentosos na biota normal de uvas no período da vindima em alguns países.

Referência	País de origem (safra)	Gêneros isolados (total)	Fungos de maior incidência (ordem decrescente)	Técnica de isolamento e meio de cultivo
Abrunhosa L. <i>et al.</i> (2001)	Portugal (1999)	08	<i>Botrytis</i> <i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i> <i>Alternaria</i> <i>Fusarium</i> <i>Auerobasidium</i> <i>Aspergillus</i>	Bagas com desinfecção (semeadura direta) Polpa (dilução - H ₂ O peptonada) DRBC + cloranfenicol DRYES + cloranfenicol
Da Rocha Rosa <i>et al.</i> (2002)	Argentina (1997-1998) Brasil (1997-19980)	Argentina 08 Brasil 08	Brasil <i>Aspergillus</i> <i>Botrytis</i> <i>Penicillium</i> <i>Geotrichum</i> <i>Cladosporium</i> <i>Phytophthora</i> <i>Moliniella</i> <i>Fusarium</i> <i>Alternaria</i> <i>Cladosporium</i>	Bagas sem desinfecção (semeadura por diluição - H ₂ O peptonada) DRBC + cloranfenicol DG18 + cloranfenicol
Magnoli C. <i>et al.</i> (2003)	Argentina (2001)	06	<i>Alternaria</i> <i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Ulocladium</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Penicillium brevicompactum</i> <i>Penicillium expansum</i>	Bagas com desinfecção (semeadura direta) DG18 Bagas sem desinfecção semeadura por diluição - H ₂ O estéril c/ SDS (0,05p/v)] MEA + cloranfenicol
Sage L. <i>et al.</i> (2004)	França (2000)	Dados não apresentados	<i>Alternaria</i> <i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Mucorales</i>	Bagas sem desinfecção (semeadura direta)
Baú, M. <i>et al.</i> (2005)	Espanha (2001)	Dados não apresentados	<i>Alternaria</i> <i>Cladosporium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Auerobasidium</i> <i>Rhizopus</i> <i>Epitococcum</i>	DRBC + (cloranfenicol) MEA+ (cloranfenicol+ estreptomicina)
				Continua...

Referência	País de origem (safra)	Gêneros isolados (total)	Fungos de maior incidência (ordem decrescente)	Técnica de isolamento e meio de cultivo
Continuação				
Serra R. <i>et al.</i> (2005b)	Portugal (2001-2003)	27	<i>Cladosporium</i> <i>Botrytis</i>	Bagas sem desinfecção (semeadura direta) DRBC + cloranfenicol
Romero, S. M. <i>et al.</i> (2005)	Argentina (2001-2002)	12	<i>Aspergillus</i> <i>Eurotium</i> <i>Penicillium</i> <i>Alternaria</i> <i>Cladosporium</i> <i>Aureobasidium</i> <i>Rhizopus</i>	Bagas (uva passa) com desinfecção (semeadura direta) DRBC + cloranfenicol
Belli, N. <i>et al.</i> (2006)	Espanha (2001-2003)	Dados não apresentados	<i>Alternaria</i> ** <i>Aspergillus</i> ** <i>Cladosporium</i> ** <i>Rhizopus</i> ** <i>Penicillium</i> **	Bagas sem desinfecção (semeadura direta) DRBC + cloranfenicol
Gomez C. <i>et al.</i> (2006)	Argentina (2003)	Dados não apresentados	<i>Aspergillus</i> <i>Alternaria</i> <i>Penicillium</i> <i>Cladosporium</i>	Bagas sem desinfecção (semeadura direta) DRBC + (cloranfenicol) MEA+ (cloranfenicol)+ Estreptomicina)
Melki Ben Fredj <i>et al.</i> (2007)	Tunísia (2003)	10	<i>Aspergillus</i> <i>Botrytis</i> <i>Alternaria</i> <i>Penicillium</i> <i>Cladosporium</i>	Bagas (uva mesa) sem desinfecção (semeadura direta) MEA + cloranfenicol

* decréscimo do % na época da colheita.

** aumento do % na época da colheita.

3.10.5 Micobiota e incidência de OTA em uvas viníferas produzidas na América do Sul

O maior número de referências encontradas com relação a micobiota de uvas, com conseqüente ênfase em investigação a estirpes produtoras de OTA é procedente da Argentina. MAGNOLI *et al.* (2003), avaliaram a micobiota e o potencial para produção de OTA em 50 amostras de uvas de *vinífera*, incluindo Malbec, Chardonnay, Merlot, Cabernet e Bonarda, provenientes da região de *Mendoza* na vindima de 2001; A presença de sete gêneros de fungos filamentosos foi observada com predomínio de espécies de *Alternaria alternata* em 80% das amostras e espécies de *Aspergillus* em 70% das uvas amostradas, as espécies preponderantes foram: *A. niger* var. *niger* e *A. flavus*, com incidência de 61 e 17%, respectivamente. Outras espécies incluindo: *A. niger* var. *awamori*, *A. foetidus* e *A. candidus* foram isoladas em menor frequência. De um total de 63 estirpes de *Aspergillus*, section *Nigri* isoladas, 26 apresentaram perfil ocratoxigênico, as concentrações detectadas variaram de 2 a 45 ng.mL⁻¹.

Magnoli *et al.* (2004) realizaram um rastreio em 50 amostras de uvas-passa (31 tintas e 9 brancas) obtidas em mercados nas Províncias de *San Juan* e *Mendoza*. Nesse estudo as espécies do gênero *Aspergillus* foram predominantes. Seis espécies da seção *Nigri* foram isoladas de ambos tipos de frutas, com maior frequência nas uvas tintas.

Para o Brasil, até o presente momento, a única avaliação foi efetuada em parceria por pesquisadores brasileiros e argentinos, sendo apresentado por DA ROCHA ROSA *et al.* (2002) que relatam o rastreio à micobiota de uvas *V.vinífera* nas vindimas de 1997-1998, na regiões da Campanha (Brasil) e de Mendoza (Argentina). Os gêneros detectados para ambas regiões, encontram-se classificados em ordem decrescente e são apresentados na Tabela 3.6:

No mesmo trabalho, a incidência de estirpes ocratoxigênicas foi avaliada, onde a produção de OTA foi observada nas seguintes concentrações: que variaram de 18 a 2900 µg.mL⁻¹ (isolados de uvas brasileiras) e 32 a 77 µg.mL⁻¹ (isolados de uvas argentinas). A distribuição das espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas e identificadas para os dois países (regiões da Campanha- Brasil e Mendoza- Argentina) é demonstrada na Tabela 3.7:

Tabela 3.6 – Distribuição da micobiota em amostras de uvas brasileiras e argentinas (safras 1997/1998).

BRASIL (Campanha)	ARGENTINA (Mendoza)
<i>Aspergillus spp.</i>	Leveduras
<i>Botrytis spp.</i>	<i>Aspergillus spp.</i>
<i>Penicillium spp.</i>	<i>Botrytis spp.</i>
<i>Phytophthora spp.</i>	<i>Penicillium spp.</i>
<i>Moniliella spp.</i>	<i>Geotrichum spp.</i>
<i>Fusarium spp.</i>	<i>Cladosporium spp.</i>
<i>Alternaria spp.</i>	<i>Fusarium spp.</i>
<i>Cladosporium spp.</i>	<i>Moniliella spp.</i>
	<i>Alternaria spp.</i>

Tabela 3.7 – Distribuição de estirpes dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* isolados de amostras de uvas brasileiras e argentinas (Safras 1997-1998).

BRASIL (Campanha)	ARGENTINA (Mendoza)
<i>A.niger</i>	<i>A.niger</i>
<i>A. carbonarius</i>	<i>A. flavus.</i>
<i>A. flavus</i>	<i>A. uestus</i>
<i>A. ochraceus</i>	<i>P. chrysogenium</i>
<i>A.terreus</i>	<i>P. decubens</i>
<i>P. decubens</i>	<i>P. glabrum</i>
<i>P. citrinum</i>	

CHULZE *et al.* (2006) relatam que um levantamento foi efetuado no Uruguai para avaliar a micobiota de 2 variedades de *vinífera*, sendo elas: Tannat e Cabernet Sauvignon durante os diversos estágios da produção da safra de 2003 - 2004 (Bettucci, comunicação pessoal), espécies de *Aspergillus* foram isoladas com baixa frequência e as maiores espécies isoladas foram: *A. alternata*, *Cladosporium cladosporioides* and *Epicoccum purpurascens*. Entre as espécies de *Penicillium*: *P.chrysogenum*, *P. minoluteum* e *P. decumbens* foram as mais frequentemente isoladas. *Botrytis cinerea* foi encontrada com alta frequência na vindima.

Quando estudos relacionados à micobiota das uvas, sob o ponto de vista do potencial ocratoxigênico são avaliados, percebe-se que o

gênero *Aspergillus* predomina na micobiota do campo. Espécies de *A. ochraceus* são encontradas com baixa incidência e, estirpes pertencentes à seção *Nigri* são os maiores colaboradores. O *A. carbonarius*, entre as espécies dessa seção, é quem tem apresentado melhor perfil ocratoxigênico quando avaliado *in vitro*.

3.10.6 Ocratoxina A em vinhos

A descoberta de OTA em vinhos foi feita por ZIMERLI e DICK (1995), quando vários alimentos foram analisados quanto à presença de OTA, entre os quais cerveja (7 amostras), vinhos (18 amostras: 10 tintos, 6 rosé e 2 brancos) e café (20 amostras). Reportando a OTA em vinhos, principalmente em vinhos tintos, nas concentrações de 10 - 20 ng/L. confirmaram a presença deste contaminante em sucos de uva e vinhos. Novamente, ZIMMERLI & DICK (1996) confirmaram a presença da micotoxina em suco de uvas e em vinhos; a OTA foi detectada em níveis de 3 a 451 ng/L.

MIRAGLIA & BRERA (2002) relatam um estudo feito para estabelecer a exposição diária da população europeia à OTA. Entre os treze países da União Europeia, dez registram dados de presença de OTA no vinho em 59% de um total de 1.470 amostras analisadas. O Norte Europeu apresentou 50,3% de amostras positivas em um total de 835 amostras, enquanto o Sul Europeu foi responsável por 72,3% do total de 625 amostras. Vinhos tintos apresentaram valores de OTA superior em relação às outras classes de vinho.

SHUNDO *et al.* (2006) analisaram 34 amostras de vinhos importados (Argentina, Chile, Uruguai, Itália, Portugal, Espanha e África do Sul) adquiridos em lojas especializadas em São Paulo, das quais 18 foram positivas, onde observaram alta incidência com baixos níveis de OTA, com níveis variando entre 0,03 a 0,32 ng.mL⁻¹.

OTTENEDER & MAJERUS (2000) analisaram várias amostras de vinho e confirmaram as observações prévias de Zimmerli e Dick, de que a frequência de contaminação e elevação dos níveis de OTA do vinho branco para o tinto, sendo os vinhos tintos originários do sul da Europa os mais contaminados. A Tabela 3.8 descreve o número de amostras analisadas, bem como o país de origem.

Tabela 3.8 - OTA em amostras de vinhos brancos e tintos procedentes da França, Alemanha e Itália.(adaptação de Otteneder e Majerus (2000)).

País de origem	Branco		Tinto		
	Alemanha e França	Itália	Alemanha	França	Itália
Nº amostras	44	18	30	108	71
Amostras com níveis detectáveis (%)	15	44	23	32,5	70
Valor médio (µg/l)	0,012	0,054	0,022	0,065	0,673
Mínimo (µg/l)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Máximo (µg/l)	0,04	1,36	0,23	0,625	2,93

3.10.7 Ocratoxina A em uvas e vinhos: Panorama na América Latina

O referenciamento sobre a condição da OTA em uvas e vinhos na América Latina é ainda pouco conciso, visto que o número de relatos ainda é pequeno e regionalizado. A Argentina é o país que mais realizou trabalhos em relação a presença de OTA em uvas, porém, os trabalhos encontrados referem-se, somente a região de Mendoza. Quando referimo-nos ao Brasil a condição da investigação em uvas é ainda mais escassa, como citado no ítem 3.10.4., apenas uma referência foi encontrada. Quanto ao Chile e Uruguai, nenhuma referência foi observada até o presente momento.

Em relação à investigação de OTA em derivados de uva foram encontradas somente duas até o presente momento, a primeira foi a de ROSA *et al.* (2004) que realizaram um levantamento em 106 amostras (sucos, polpas congeladas e em vinhos branco, tinto e rosê), de produtos de origem brasileira, chilena e argentina, obtidos em mercados no Rio de Janeiro. A OTA foi detectada em 29% dos sucos e em 12,5% das polpas congeladas, os níveis oscilaram entre 21 a 100 ng.L⁻¹. Entre as amostras de vinho, os tintos apresentaram níveis mais altos. Cerca de 24% das amostras foram positivas para OTA, com concentrações na faixa de 28,3 a 70 ng.L⁻¹ (o limite de detecção do método foi de 21 ng.L⁻¹). As amostras de origem chilena foram as que apresentaram os valores mais elevados de OTA.

A segunda referência é de SHUNDO *et al.* (2006) que analisaram OTA em 38 amostras de suco de uva (onde 100% das amostras foram

negativas). Os mesmos autores analisaram um total 45 amostras de vinhos tintos produzidos na América do Sul, onde para um total de 29 vinhos brasileiros, nove foram positivas, sendo duas da Região Sul ($0,10 - 0,24 \text{ ng.mL}^{-1}$) e sete da Região Norte ($0,36 - 1,33 \text{ ng.mL}^{-1}$), representando 6,9% e 100%, respectivamente, do total amostrado por região. Os vinhos da América do Sul apresentaram baixa frequência e incidência, porém, quando as amostras do Brasil são comparadas às do Chile (não detectado), Uruguai ($>0,03 \text{ ng.mL}^{-1}$) e Argentina ($>0,03 \text{ ng.mL}^{-1}$) observa-se que os índices brasileiros são muito superiores. Porém, mesmo estando com valores bem inferiores ao preconizado pela União Europeia que é de $2,0 \text{ ng.mL}^{-1}$, sendo clara a necessidade um rastreio a OTA nas uvas e o monitoramento do processo de elaboração do vinho nas regiões brasileiras em questão.

A Tabela 3.9 apresenta de forma mais detalhada os níveis de ocratoxina A detectados nas 101 amostras de vinhos acima descritos:

Tabela 3.9 - Ocorrência e frequência de OTA em vinhos tintos do Brasil e de outros países.

País	Amostras analisadas (N ^o)	Amostras detectadas (%)	Varição de OTA (ng.mL^{-1})	
Brasil	Região Sul	22	02 (6,9)	0,10 - 0,24
	Região Nordeste	07	07 (110)	0,36 - 1,33
Chile	07	0	ND	
Argentina	06	01 (16,7)	$>0,03$	
Uruguai	03	01 (33,3)	$>0,03$	
França	05	03 (60)	0,20 - 0,29	
Itália	05	05 (100)	0,03 - 0,32	
Portugal	05	05 (100)	0,03 - 0,25	
Espanha	02	02 (100)	0,07 - 0,12	
África do Sul	01	01 (100)	$>0,03$	

3.10.8 Detecção de ocratoxina A em uvas e vinhos

A metodologia referência para vinhos EN14133 encontra-se descrita no European Comunittee Standard (2003) e compreende a metodologia de análise da OTA envolvendo os estágios de extração (efetuada com solventes orgânicos em meio ácido), purificação (colunas

de extração em fase sólida (SPE) ou por colunas de imunoafinidade), análise por HPLC de fase reversa, principalmente na detecção por fluorescência. Há três métodos usuais para confirmação de identidade de OTA: metilação (formação de metil-éster), formação derivativa de amônia e confirmação por LC-MS. As diferentes metodologias utilizadas por diversos pesquisadores encontram-se citadas na Tabela 3.10 que foi elaborada por SERRA (2005):

Tabela 3.10 - Revisão bibliográfica dos métodos usados para determinação de OTA no vinho.

Diluição/ Extração	Limpeza	Separação Fase móvel	Deteção	Confirmação	LD (ng/ml)	LQ (ng/ml)	TR (%)	RSD	Referência
ácido ortofosfórico 3,4% e NaCl/ Clorofórmio	IAC	HPLC	Derivatização com amônia pós-coluna FL	Derivatização com metanol/HCl	0,003 ¹	0,005	82	10	Zimmerli & Dick, 1996
Tolueno	SPE	HPLC Acetonitrila/água/ácido acético (98:98:4, v/v/v) 0-15min: 90% fase móvel; 10% Água 15-25min: 100% fase móvel 25-30min: 90% fase móvel; 10% Água	FL	-	-	-	87	7	Ospital <i>et al.</i> , 1998
Clorofórmio	IAC	HPLC-	Derivatização com amônia pós-coluna FL	-	0,003	-	-	-	Burdaspal & Legarda, 1999
Clorofórmio acidificado NaHCO ₃	IAC	HPLC Acetonitrila/água/ácido acético (445:445:10, v/v/v)	FL	BF ₃ -metanol	-	-	84	6	Lehtonen, 1999
5% NaHCO ₃ + 1% PEG	IAC	HPLC Acetonitrilo/água/ácido acético (99:99:2, v/v/v)	FL	BF ₃ -metanol	0,01 ¹	-	96	5	Visconti <i>et al.</i> , 1999

Continua...

Diluição/ Extração	Limpeza	Separação Fase móvel	Deteção	Confirmação	LD (ng/ml)	LQ (ng/ml)	TR (%)	RSD	Referência
Continuação									
Clorofórmio		HPLC Acetonitrila/água/ácido acético (66,0:33,2:0,8, v/v/v)	FL	-	0,013	-	102	5	Tateo <i>et al.</i> , 1999 em Bellí <i>et al.</i> , 2002
NaOH 4M	IAC	HPLC 52% acetato de sódio- 4mM ácido acético (19:1)/48% acetonitrila	FL	-	0,005	n.i.	n.i.	n.i.	Bezzo <i>et al.</i> , 2000 em Bellí <i>et al.</i> , 2002
Tolueno	SPE-PC	HPLC Idem –(Bezzo <i>et al.</i> , 2000)	FL	Adição de padrão	0,02		97	6	Festas <i>et al.</i> , 2000
	C18-SPE	HPLC Idem –(Bezzo <i>et al.</i> , 2000)	FL	-	5 ³	-	80	10	Jornet <i>et al.</i> , 2000
Tolueno	SPE	Acetonitrilo/água/ácido acético (45:54:1, v/v/v)	FL	-	0,01	-	-	-	Majerus <i>et al.</i> , 2000 em Bellí <i>et al.</i> , 2002
PBS	IAC	Acetonitrilo/água/ácido acético (45:54:1, v/v/v)	FL	-	0,01	-	-	9	Otteneeder & Majerus, 2000
	RP18-SPE	LC-MS Metanol/água/ácido acético (70:30:2,5, v/v/v)	MS	MS	0,05	0,15	100	-	Zollner <i>et al.</i> , 2000
MgCl2 0,4 M. e HCl 2N/Tolueno	SPE	HPLC Idem –(Bezzo <i>et al.</i> , 2000)	FL	Carboxipeptida se em tampão Tris-HCl	-	0,01	83		Filali <i>et al.</i> , 2001
Continua...									

Diluição/ Extração	Limpeza	Separação Fase móvel	Deteção	Confirmação	LD (ng/ml)	LQ (ng/ml)	TR (%)	RSD	Referência
Continuação									
Clorofórmio	IAC	HPLC	FL	-	0,002		91	-	Markaki <i>et al.</i> , 2001
	SPE	HPLC	<i>Diode-array</i>	BF ₃ -metanol	0,05	0,1	88	6	Soleas <i>et al.</i> , 2001
Ácido ortofosfórico/ Clorofórmio	IAC	HPLC Acetonitril/ácido acético 2% (43:57, v/v)	FL	Metanol/HCl	0,0006	0,001	92	7	Pietri <i>et al.</i> , 2001
Clorofórmio acidificado	IAC	HPLC Metanol/acetonitril/acetat o de sódio 5mM (29:29:42)	FL	-	0,05 ⁴	0,07 ⁵	101	4,1	Lopez de Cerain <i>et al.</i> , 2002
NaCl-HCl 10M Dietil-eter NaHCO3	SPE	HPLC Acetonitrilo/água/ácido acético (50:49:1, v/v/v)	Derivatização com amônia pós-coluna FL	-	0,02	0,05	76	13	Hocking <i>et al.</i> , 2003
		Visconti <i>et al.</i> , 1999			0,01 ⁴		97	1	Shephard <i>et al.</i> , 2003
		Visconti <i>et al.</i> , 1999			0,05 ¹	-	94	5	Stefanaki <i>et al.</i> , 2003
	IAC	HPLC Acetonitrilo/água/ácido acético (98:98:4, v/v/v) 0-10min: 80% fase móvel; 20% Água 10-25min: 90% fase móvel, 10% Água 25-27,5min: 100% fase móvel 27,5min: 80% fase móvel; 20% Água	-	-	0,02	-	-	-	Soufberos <i>et al.</i> , 2003
Continua...									

Diluição/ Extracção	Limpeza	Separação Fase móvel	Deteccção	Confirmação	LD (ng/ml)	LQ (ng/ml)	TR (%)	RSD	Referência
Continuação									
PBS	IAC	HPLC = Hocking et al., 2003	FL	Metanol/HCl	0,01 ¹	0,05 ²	92	4	Blesa et al., 2004b
		HPLC Acetonitrilo/tampão de amónia (NH ₄ Cl)/NH ₃ 20mM, pH 9,8) (15:85, v/v)	FL	MS	0,05	-	95	3	Dall'Asta et al., 2004
LPME 1-Octanol		HPLC (=Lopez de Cerain et al., 2002)	FL	-	0,2	-	77	-	Gonzalez- Peñas et al., 2004
		Visconti et al., 1999			0,084 ⁶	-	112	5	Ratola et al., 2004
		HPLC 0-5min: ACN/MeOH/água (20:25:55); 5-17min: ACN/MeOH/água (30:25:45); 17-22min: ACN/MeOH/água (50:25:25)	FL	-	-	-	83,5	1,3	Berente et al., 2005
		Bezzo et al., 2000			0,05 ¹	-	-	-	Belli et al., 2004a

LD = limite de detecção;

LQ = limite de quantificação;

TR = taxa de recuperação (quando reportado mais que um valor, indicada a média);

RSD = desvio padrão relativo (quando reportado mais que um valor, indicada a média);

- dados não indicados ou não obtidos; célula vazia = não efectuado)

1 critério: razão sinal/ruído (S/N) 3; 1; 2 S/N 10; 1; 3 valor em conflito com outros dados no artigo; provavelmente, unidades erradas; 4 S/N 2; 1; 5 menor

concentração do padrão com bons resultados de precisão e exactidão; 6 soma da interceptação da recta na origem e 3*Sy/x

Fonte: SERRA, (2005).

3.10.9 Degradação da Ocratoxina A

A OTA é um composto muito estável que pode ser hidrolisada completamente através do aquecimento sob refluxo por 48 horas em HCl 6M (VAN DER MERVE *et al.* 1965) ou pela enzima *carboxipeptidase* (PÉTERI *et al.* 2007; ABRUNHOSA *et al.* 2006) em L-β-fenilalanina e ocratoxina alfa (OTα).

Vários autores reportam que OTα apresenta menor toxicidade. Por exemplo, XIAO *et al.* (1996) observaram esse fenômeno em células de ratos e camundongos. LI *et al.* (1997) verificaram que a meia-vida da OTA no corpo é de 103 horas, enquanto a meia-vida da OTα é de 9,6 horas. A OTα mostrou-se pelo menos 100 vezes menos tóxica que a OTA em cultura de células cerebrais.

A OTA (C₂₀H₁₈NCIO₆) possui uma massa molecular de 403,0823 g, enquanto a OTα (C₁₁H₉ClO₅) tem uma massa molecular correspondente a 256,0139 g. (NIELSEN & SMEDS GAARD, 2003). A Figura 3.12 apresenta as fórmulas estruturais da OTA e dos produtos da hidrólise em OTα e fenilalanina:

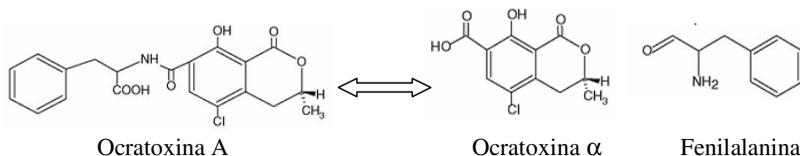


Figura 3.12 - Representação estrutural da OTA e dos produtos de hidrólise em OTα e fenilalanina.

Visando a remoção de OTA em escala laboratorial, vários métodos físicos, químicos e físico-químicos tem sido propostos: uso de adsorventes como carvão ativo e aluminossilicatos (HUWIG *et al.* 2001), ozônio (McKENZIE *et al.* 1997), peróxido de hidrogênio (FOULER *et al.* 1994). Muitas dessas alternativas são de pouca aplicabilidade prática, por serem de alto custo, baixa efetividade ou ainda, por provocarem alterações significativas nas propriedades nutricionais e sensoriais nos produtos submetidos à descontaminação.

3.10.9.1 Degradação da OTA por meios biológicos

A degradação da OTA em escala laboratorial por meio de recursos biológicos, utilizando diferentes microrganismos ou suas

enzimas tem sido relatada vários autores, dentre eles estão as bactérias (HWANG & DRAUGHON (1994), leveduras (PÉTERI *et al.* 2007 e SCHATZMAYR *et al.* 2003) e fungos filamentosos (VARGA *et al.* 2005 e ABRUNHOSA *et al.* 2002). Bactérias lácticas têm tido sua habilidade de degradação testada em produtos lácteos (SKRINJAR *et al.* 1996).

A capacidade de degradação de OTA por enzimas comerciais tem sido relatada em alguns estudos. STANDER e colaboradores (2000) que efetuaram um rastreio em 23 *lipases* e *esterases* comerciais, mostrando que somente a *lipase A* do *A. niger* (Amano) foi hábil em hidrolisar OTA em OT α e fenilalanina. ABRUNHOSA *et al.* (2006), investigaram 14 *proteases* comerciais, quanto à capacidade de hidrolisar OTA em OT α , em sistema tampão. Dentre elas, apenas três apresentaram essa atividade, sendo elas: Protease A[®] do *A. niger* (Amano), Pancreatina[®] (Biocatalystis) e Prolive PAC[®] do *A. niger* (Lyven). A enzima prolive PAC apresentou uma inibição (68,3%) na hidrólise de OTA pelo PMSF (fenil-metil-metano-sulfonil), sugerindo que a atividade da enzima na OTA se deva a uma *serina-protease*.

3.10.9.2 Remoção da OTA em derivados de uva

A OTA em função da sua estabilidade, oferece resistência à diversas formas de processamento das uvas, inclusive à processos fermentativos, sendo encontrada em vários de seus derivados, tais como: vinhos, vinagres e sucos.

Os sucos de uva, principalmente quando elaborados com uvas tintas, podem também apresentarem níveis de OTA superiores aos observados em vinhos. O suco de uva pode ser uma importante fonte de ingestão de OTA, tendo em vista que o seu consumo é bem maior que o de vinhos, e as crianças representam o maior número de consumidores (VARGA & KOZAKIEWICZ, 2006; MIRAGLIA & BRERA, 2002 e ZIMMERLI & DICK, 1996).

BEJAoui *et al.* (2004) registram que nenhum estudo prévio sobre a remoção de OTA por meio biológico, de produtos de uvas havia sido encontrado até o momento de seus experimentos. A remoção de OTA em meio YPG (levedura peptona glucose – pH 5,0) e em meio sintético de uva (ambos com [OTA inicial] = 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ – pH 3,8) foi testada utilizando 6 cepas de *S. cerevisiae* de uso enológico. A melhor performance de remoção ocorreu para todas as cepas em YPG (máximo

de remoção = 45%) quando comparadas ao meio de uva sintético (máximo de remoção = 35%), porém, ressaltam que nenhum produto de degradação foi observado, sugerindo que a remoção se deu por adsorção. Eles ainda relatam que o aumento na adsorção da OTA pode estar explicado pela ionização do grupamento amino da molécula de OTA, que é favorecida no meio ácido usado.

A remoção da OTA por processo de adsorção em vinho por 8 cepas de *S. cerevisiae* de uso enológico foi obtida com percentuais de remoção entre 52,1% e 70,13% para os vinhos tintos (CECCHINI *et al.* 2006).

BEJAOU *et al.* (2006b) investigaram a capacidade de 40 estirpes de *Aspergillus* da seção *Nigri* em degradar OTA em CYB (caldo czapeck extrato de levedura) e em suco de uva sintético, contendo concentrações iniciais de OTA = 2,0 mg.L⁻¹. A capacidade de degradação de OTA das distintas estirpes foi diferente para o mesmo isolado, dependendo do meio. A degradação foi maior no meio de uva sintético do que em CYB e, pode estar atribuída ao melhor crescimento fúngico no meio sintético. Os autores salientam que nenhum dado tem sido mostrado na literatura relacionado a presença da enzima *carboxipeptidase* (hábil em hidrolisar OTA em OTα) em representantes do gênero *Aspergillus*.

3.11 Patulina

A patulina é uma micotoxina produzida por espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Bissoclamys*, comumente presentes em frutas cítricas e produtos de origem vegetal, particularmente, maçãs e seus derivados (PIEMONTESE, 2005). Na década de 1940, esse metabólito secundário foi isolado inicialmente como um antibiótico, porém, estudos posteriores apontaram que a patulina não apresentava toxicidade somente para fungos e bactérias, mas também para plantas superiores e animais. Estudos investigativos relacionados aos efeitos nocivos da patulina sobre a saúde humana têm sido inconclusivos, mas poucas são as dúvidas quanto ao risco potencial inerente a contaminação de produtos alimentícios pela patulina (MOAKE *et al.* 2005).

A patulina [4-hydroxi-4H-furo[3,2c] pirano-2(6H)-lactona] é uma substância cristalina incolor com peso molecular de 154 Daltons e ponto de fusão a 111°C. É solúvel em água, etanol, acetona, acetato de etila, acetato de éter e clorofórmio, mas é insolúvel em éter de petróleo e benzeno, e é estável ao calor de processamento a pH <6,0 (MAJERUS

& KAPP, 2002). A fórmula estrutural da patulina é demonstrada na Figura 3.13.

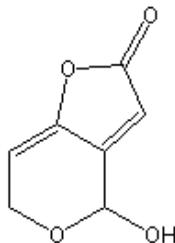


Figura 3.13 - Fórmula estrutural da patulina.

3.11.1 Biossíntese da patulina

A patulina é produzida principalmente por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (SABATER-VILAR *et al.* 2004), embora possa ser produzida por outros gêneros como *Byssoschlamis* (SAMSON *et al.* 1996; ROLAND & BEUCHAT, 1984) e *Alternaria* (GILBERT & POHLAND, 2003). *Penicillium expansum* é seguidamente referido como a maior responsável pela produção de patulina (FRISVAD & THRANE, 1996). A Figura 3.14 descreve a via sintética da micotoxina mostrando os metabólitos intermediários e enzimas relevantes envolvidos na sua biossíntese.

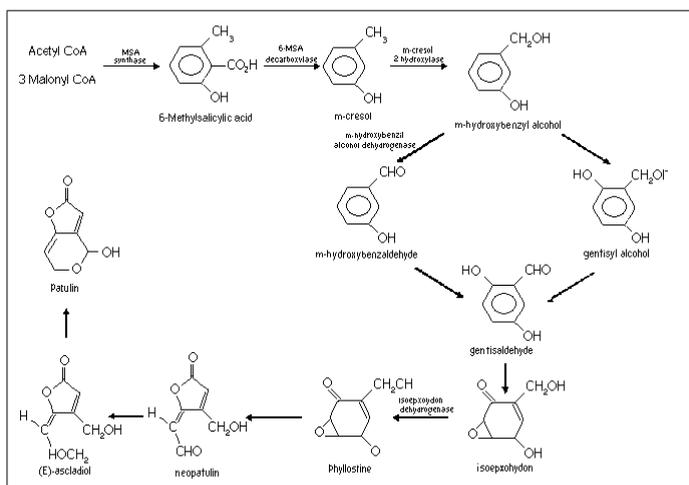


Figura 3.14 – Via biossintética da patulina e seus intermediários
Fonte: Adaptado de MOAKE *et al.* (2005)

De acordo com MOAKE *et al.* (2005) a biossíntese da patulina está bem elucidada e envolve uma série de reações redox e de condensação, muitas, senão todas são catalisadas por enzimas. A síntese é iniciada com a condensação de 1 unidade Acetil Co-A (coenzima A) e 3 unidades de Malonil Co-A em ácido-6-metilsalicílico (6-MSA) pela enzima *6-MSA sintetase*. O próximo estágio envolve a conversão de 6-MSA em m-Cresol via ação da *6-MSA descarboxilase*. O m-cresol é então convertido em m-Hidroxibenzil álcool pela *M-cresol 2-hidroxilase*. A próxima etapa é considerada entre dois mecanismos principais. Ambas concordam que m-Hidroxibenzil álcool é eventualmente convertido em Gentisaldeído ou m-Hidroxibenzaldeído. Segundo GAUCHER (1975), ambas reações são possíveis, com favorecimento para m-Hidroxibenzaldeído. O Gentisaldeído tendo sido formado é então convertido a Isoepxidon por uma *Isoepxidon desidrogenase*. Isoepxidon é transformado em Fillostina, Neopatulina, E-ascladiol e finalmente em Patulina.

3.11.2 Riscos à saúde frente a exposição à patulina

Nos últimos 50 anos a avaliação dos riscos representados pela patulina à saúde humana está baseada em um amplo número de estudos realizados. A toxicidade da patulina tem sido comprovada para animais, mas para humanos ainda não está completamente elucidada. Os efeitos agudos, crônicos e ao nível celular, encontram-se resumidos na Tabela 3.11:

Sintomas agudos, como: agitação, congestão pulmonar, inflamação e hemorragia intestinal (MAHFOUD *et al.* 2002; HAYES *et al.* 1979). Efeitos neurotóxicos, imunossupressores, teratogênicos e carcinogênicos, têm sido reportados como sintomas crônicos (WICHMANN *et al.* 2002; HOPKINS, 1993 e ROLL *et al.* 1990). SABATER-VILAR *et al.* (2004) relatam a ocorrência simultânea de uma neurotoxicose fatal em diferentes rebanhos de gado de corte na região de Flanders – Bélgica associada a contaminação por patulina da alimentação destinada à nutrição desses animais, onde a espécie fúngica predominante foi o *A. clavatus*.

Em função das evidências contínuas dos efeitos negativos da patulina, muitas agências reguladoras estabeleceram limites para a sua concentração em alimentos, na União Europeia o limite permitido é de $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (MAJERUS & KAPP, 2002). O Brasil infelizmente ainda não dispõe de regulação para patulina em frutas e seus derivados.

Tabela 3.11 – Sintomas agudos e crônicos e alterações celulares provocados pela patulina.

Sintomas agudos	Sintomas crônicos	Alterações à nível celular
Agitação, convulsões, dispneia, congestão pulmonar, edema, hiperemia, distensão do trato gastrintestinal, náusea, degeneração de células epiteliais, inflamação intestinal, hemorragia intestinal e ulceração	Genotoxicidade, neurotoxicidade, imunotoxicidade, imunossupressão, carcinogenicidade e teratogenicidade	Rompimento da membrana plasmática, inibição da síntese de proteínas, interrupção da transcrição e tradução, inibição da síntese de DNA, inibição do transporte de Na ⁺ acoplado aminoácido, inibição da produção de de <i>interferon-γ</i> , inibição de várias enzimas (<i>RNA polimerase</i> , <i>Aminoacil-tRNA sintetases</i> , <i>músculo aldolase</i> , <i>NA-K ATPase</i> , <i>urease</i>), perda de glutatona livre, formação de <i>crosslink</i> entre proteínas, inibição da prenilação de proteínas

Fonte: Adaptado de MOAKE *et al.* (2005).

3.11.3 Presença de patulina em frutas

Com relação à incidência de patulina em frutas, a *Food and Drug Association* (FDA), reserva especial atenção à maçãs e seus derivados não-fermentados (USFDA, 2004) em função da frequência com que é detectada. Porém, Estirpes produtoras de patulina têm sido isoladas de uma série de vegetais e frutas incluindo maçãs, uvas, cerejas, pêras, damascos, pêssego, ameixa (LUGAUSKAS *et al.* 2005; HARWIG *et al.* 1978 e HARVEY *et al.* 1972).

SCOTT *et al.* (1977) detectaram patulina em suco de uvas elaborados a partir de uvas podres, sendo uma das primeiras micotoxinas a serem detectadas em sucos de uva. A toxina foi detectada em uvas passa originárias do Chile na concentração de 12,0 µg.Kg⁻¹ (DELAGE *et al.* 2003).

MAJERUS & KAPP (2002) em uma avaliação da ingestão de

patulina pela população dos membros da União Européia reportam que as categorias sidra e mosto fresco de uvas não são homogêneas, onde diferentes graus de fermentação e adição de dióxido de enxofre podem ter um importante papel; valores extremos podem ser somente de importância local e sazonal. Os mesmos autores relatam que em um total de 324 amostras de sucos e mosto de uva que foram analisadas por 3 países: Áustria, Bélgica e Alemanha, 39,5 % das amostras foram positivas. Os valores observados estão dispostos na Tabela 3.12:

Tabela 3.12 – Níveis de contaminação de patulina ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de um total de 324 amostras de sucos e mostos de uva, procedentes da Áustria, Bélgica e Alemanha.

Produto	Nº amostras	Nº amostras 25-50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(%) amostras > 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Nº amostras > 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	(%) amostras > 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Suco de uva	160	14	8,8	0	0
Mosto de uva	164	14	23	24	15

Fonte: Adaptado de MAJERUS & KAPP (2002)

ABRUNHOSA *et al.* (2001) testaram a habilidade de estirpes de *P. expansum* isoladas de uvas portuguesas, em ágar YES (sacarose extrato de lavedura), onde uma pequena percentagem dos isolados (20%) foi positiva, porém quando testadas em ágar GJ (suco de uva) o percentual de isolados positivos (65%) foi significativamente maior. Outros autores também relatam a capacidade de produção de patulina por estirpes do gênero *Penicillium* isoladas de uvas (HARWIG *et al.* 1978 e SOMMER *et al.* 1974).

IHA & SABINO (2007) realizaram um rastreio em 130 amostras de bebidas a base de maçãs (sucos, néctar e bebidas a base de soja), onde observaram baixa incidência (3%) e níveis nas amostras (3 a 7 $\mu\text{g.L}^{-1}$), nenhuma apresentou concentração superior a 7 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Porém, uma fiscalização constante é recomendada, tendo em vista que a ocorrência dessa micotoxina depende de muitos fatores.

Embora a presença da patulina esteja mais comumente associada à maçãs e seus derivados, os estudos devem continuar a investigar e monitorar outras variedades de frutas e produtos vegetais para garantir

que medidas de controle de patulina sejam aplicadas a todos os produtos onde uma ameaça existe (MOAKE *et al.* 2005).

3.11.4 Degradação da patulina

Estudos biológicos demonstraram que a patulina é quase totalmente degradada durante o processo de fermentação por leveduras, atingindo taxas de remoção de até 90%. (KARLOVSKY, 1999; BURROUGHES, 1977 e HARVIG *et al.* 1973). Mas, esse controle efetivo é limitado à produtos que são submetidos à fermentação. Portanto, a determinação de patulina em uvas, serve como indicador no controle qualidade de matéria-prima para vinificação e de controle de produto final para uvas-passa e de mesa.

McKENZIE *et al.* (1997) em uma investigação quanto a degradação de patulina por processo de oxidação utilizando solução aquosa de ozônio a 10% relataram a completa degradação em 15 segundos. A toxina é gradualmente destruída durante a estocagem na presença de sulfitos, grupos sulfidril e ácido ascórbico (TRUCKSESS & TANG, 1999). A redução significativa do crescimento de *Bissochlamys nivea* e da produção de patulina através da adição de 75 mg.L⁻¹ de SO₂, 150 mg.L⁻¹ de sorbato de potássio e 500 mg.L⁻¹ de benzoato de sódio em sucos de maçã foi observado por ROLAND & BEUCHAT (1984). VARGA *et al.* (2005) relatam em um estudo sobre a degradação de micotoxinas por fungos filamentosos que, além de isolados de *Rhizopus*, a patulina também foi degradada por isolados de *A. niger* e *A. fumigatus* (dados não mostrados para as espécies de *Aspergillus*). MOSS & LONG (2002) sugeriram que o produto de degradação seja ascladiol.

3.11.5 Detecção de patulina

Os primeiros métodos para a determinação de patulina em suco de maçã utilizavam TLC (cromatografia em camada delgada) e o método de TLC oficial da AOAC (método 974.18) se baseia na extração com acetato de etila e limpeza em coluna de sílica gel, com um limite de detecção de aproximadamente 20 mg.L⁻¹. Os métodos de TLC vêm sendo substituídos por técnicas de HPLC, por consumir menos tempo, apresentar maior resolução de um contaminante comum, 5-hydroxymethylfurfural (HMF) e alcançar maior sensibilidade. Essas

considerações foram efetuadas em revisão de metodologia de patulina realizada por KUBACKI em 1986, *apud* SHEPHARD & LEGGOTT (2000).

De acordo com MOAKE *et al.* (2005) para detecção de patulina em frutas e seus derivados a metodologia mais utilizada é preconizada pela AOAC para suco de maçã (995.10). Essa metodologia envolve os seguintes procedimentos: extração (com acetato de etila), limpeza (com extração em líquido-líquido utilizando uma solução de carbonato de sódio), purificação (o acetato de etila contido é extraído com sulfato de sódio anidro, os solventes são evaporados em corrente de azoto e o resíduo seco ressuspenso em água acidificada a pH 4, com ácido acético) e detecção (através de HPLC, com detector UV a 276 nm) ou DAD (disposição fotoelétrica). O uso de DAD serve para distinguir a patulina de compostos co-extraídos (5-hidroxi-metil-furfural – MHF) .

SHEPHARD & LEGGOTT (2000) definem que o método de HPLC com detecção de UV é rápido e confiável, e tem sido aplicado a um número diferente de matrizes. Como tal, é o método geral de escolha para determinação e monitoramento rotineiro de níveis de patulina, embora métodos de TLC e GC sejam utilizados. Os aperfeiçoamentos futuros provavelmente serão apontados para confirmação de baixos níveis de patulina por espectrometria de massa e no desenvolvimento de anticorpos específicos para patulina para aplicação de ensaios empregando immunosorbentes ou em colunas de immunoafinidade para limpeza.

3.12 Ácido Glucônico

O ácido glucônico e seus sais são amplamente empregados em vários ramos da indústria, tais como: farmacêutica, alimentícia, química, têxtil entre outras, portanto, apresenta grande relevância nesses setores.

CARIDIS *et al.* (1991) descrevem a biotransformação de β -D-glicose ($C_6H_{12}O_6$) para ácido glucônico ($C_6H_{12}O_7$), que ocorre a partir de uma reação oxidativa catalisada pela enzima *glucose oxidase* (GOD) através de oxigênio molecular para D-glucono-1,5-lactona ($C_6H_{12}O_7$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é decomposto em água e oxigênio pela ação da enzima *catalase* presente em células vivas. O mecanismo global descrito por Chmurny & Chmurny (1996) *apud* LIU *et al.* (1999) é apresentado pela Figura 3.15:

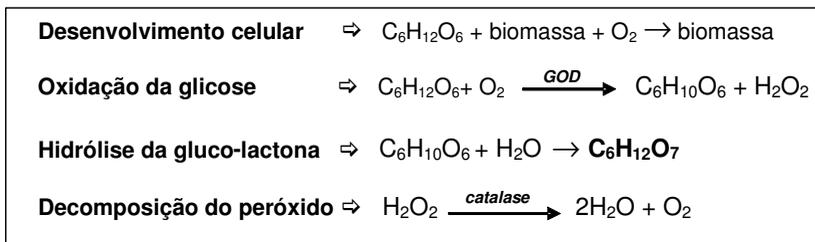


Figura 3.15 - Reações envolvidas na biossíntese do ácido glucônico.

As fontes mais comuns da enzima *GOD* nos fungos filamentosos pertencem aos seguintes gêneros: *Aspergillus* (*A. niger*), *Penicillium*, *Alternaria* (*A. alternata*) e *Botrytis* (CARIDIS *et al.* 1991 e BULIT & DUBOS, 1988).

A elaboração de um excelente vinho passa pela obtenção de uvas de boa qualidade, esse quesito diminui quando infecções de diferentes procedências ocorrem. Os fungos filamentosos (tais como: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* e *B.cinerea*) podem ser uma dessas causas, implicando em problemas no processo de vinificação (SUÁREZ & IÑIGO, 1990). A determinação da qualidade real das uvas é feita de forma subjetiva através da inspeção visual das uvas, tendo a desvantagem de que infecções fúngicas só podem ser identificadas quando já ocorreu a frutificação, porém, seu impacto negativo pode ter ocorrido em uma etapa inferior a essa (FISCHER & BERGER, 2007).

De acordo com PÉREZ *et al.* (1991) a concentração de ácido glucônico em mostos e vinhos é própria de fontes ácidas, sendo produzidos por fungos e/ou bactérias. O ácido glucônico não é utilizado pelas leveduras ou bactérias (ZOCKLEIN, 2006). Por essa razão é que muitas indústrias vinícolas utilizam o ácido glucônico como parâmetro de controle em relação ao grau de sanidade das uvas.

FISCHER & BERGER (2007) a fim de definir porque não conseguiram obter um resultado satisfatório entre as análises laboratoriais e a inspeção visual em um experimento realizado em mostos elaborados a partir de uvas do sul da França e da Espanha, observou que as uvas que haviam sido avaliadas visualmente quanto à podridão, os parâmetros de ácido glucônico e glicerol utilizados para determinar a podridão por meios químicos variaram em até 40% dependendo do grau de infecção por *Botrytis*.

ZOECKLEIN (2006) demonstra que tanto a *Botrytis cinerea* quanto a podridão amarga têm influência significativa na química do vinho, conforme demonstra a Tabela 3.13. As maiores alterações

quantitativas que ocorrerem na fruta em função do crescimento de *Botrytis* está relacionada aos açúcares e ácidos orgânicos.

Tabela 3.13 - Química de mostos de vinho Riesling da Virgínia x tipo de fungo contaminante presente nas uvas.

Parâmetro	Uvas “limpas”	<i>Botrytis cinerea</i>	Podridão amarga
°Brix	18,5	21,0	16,0
Acidez fixa	8,0	6,5	5,0
pH	3,3	3,5	>3,4
Ácido glucônico (g.L ⁻¹)	0,5	1 - 5	>0,5
Ácido acético (g.L ⁻¹)	0	1,1	>1,5
Glicerol (g.L ⁻¹)	traços	1 - 10	traços
Etanol (% v/v)	0	0 - traços	>0,2
<i>Laccase</i> (µg.mL ⁻¹)	0	0,1 – 8,0	traços a 0,5
Glucanos (mg.L ⁻¹)	0	247,0	65,0

Fonte: ZOECKLEIN (2006)

3.12.1 Concentração de ácido glucônico nas uvas

Os níveis de ácido glucônico em uvas “limpas” e em seus vinhos são próximos 0,5 g.L⁻¹ considerando que em vinhos produzidos a partir de uvas contaminadas com *B. cinerea* os níveis variam de 1 até 5 g.L⁻¹. No caso de podridão amarga ou podridões comuns, onde crescimento bacteriano acontece juntamente com o crescimento do fungo, podem atingir níveis superiores a 5 g.L⁻¹. FISCHER & BERGER (2007) no que se refere à sanidade das uvas consideram que a concentração de ácido glucônico apresenta um limite aceitável de até 1,0 g.L⁻¹. PÉREZ *et al.* (1991) consideraram que concentrações de ácido glucônico de 1 a 2 g.L⁻¹ indicam baixos níveis de contaminação.

McCLOSKEY (1974) observou índices de ácido glucônico em vinhos californianos de 0,0 a 3,09 g.L⁻¹. FISCHER & BERGER (2007) apresentam uma análise comparativa de 3 amostras de uvas, Riesling, Pinot Noir e Pinot Blanc, onde as concentrações de ácido glucônico foram : 3,2; 0,1 e 0,0 g/L, respectivamente. Em uma investigação em 40 amostras de mostos e vinhos originários de “La Mancha” e “Montilla-Moriles” efetuada por CUADRADO *et al.* (2005) onde os níveis obtidos foram de 0,4 a 1,2 g.L⁻¹, salientam que as condições climáticas da safra avaliada (2004) foram boas para ausência de infecção por *Botrytis*.

Resultados promissores com relação à produção de ácido glucônico a partir da utilização de mosto fresco de uvas como substrato têm sido obtidos (SINGH *et al.* 2005 e BUZZINI *et al.* 1993).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Rastreio Micológico em uvas Vitiviníferas Catarinenses

4.1.1 Região de Estudo

As regiões vitícolas de Santa Catarina estudadas foram determinadas em função das diferenças climáticas e importância econômica para o Estado dentro do contexto vitivinícola (ROSIER, 2003; ROSIER & LOSSO, 1997). Os vinhedos do Meio Oeste situam-se entre os paralelos $26^{\circ}46'31''$ e $27^{\circ}06'17''$ (latitude sul), os meridianos $51^{\circ}00'54''$ e $51^{\circ}33'22''$ (longitude oeste) e uma altitude entre 641 a 920 metros de altitude. Enquanto os vinhedos do Planalto estão entre os paralelos $27^{\circ}24'06''$ e $28^{\circ}17'38''$ (latitude sul), os meridianos $49^{\circ}55'54''$ e $51^{\circ}13'30''$ (longitude oeste) e uma altitude entre 884 a 1353 metros de altitude¹.

As regiões estudadas obedecem aqui a classificação do Zoneamento Agroecológico e Socioeconômico do Estado de Santa Catarina - ZAE/SC (Epagri-CIRAM). A localização das mesmas é apresentada na Figura 4.1.

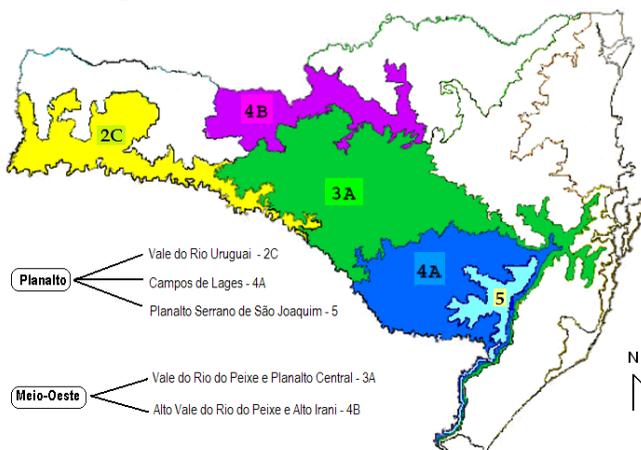


Figura 4.1 - Localização das regiões de estudos no Estado de Santa Catarina.

¹ <http://www.urbanizacao.cnpem.embrapa.br/conteudo/uf/sc.html>04/05/06

A Tabela 4.1 referencia as regiões do Planalto e e Meio Oeste de acordo com o percentual da extensão territorial dos municípios pertencentes às classificações das sub-regiões no zoneamento agroecológico (2C, 3A, 4A, 4B e 5):

Tabela 4.1 - Referência das sub-regiões estudadas do Planalto e Meio Oeste em relação ao ZAE/SC.

Região	Município	Zona Agroecológica [área (%)]				
		2C	3A	4A	4B	5
Planalto	Campos Novos	12	88	-	-	-
	São Joaquim	-	-	70	-	30
	Lages	-	-	100	-	-
Meio Oeste	Água Doce	-	-	-	100	-
	Caçador	-	46	-	54	-
	Iomerê	-	100	-	-	-
	Pinheiro Preto	-	100	-	-	-
	Tangará	-	100	-	-	-
	Videira	-	100	-	-	-

A) REGIÃO DO PLANALTO CATARINENSE

A localização dos vinhedos estudados nessa região encontra-se de acordo com a divisão política nas sub-regiões de Campos Novos e São Joaquim. Ambas são classificadas segundo Köeppen, como clima de cfb ou seja, temperado constantemente úmido, (temperatura média do mês mais quente <22,0C).

A.1) Campos Novos

O município de Campos Novos possui 88% da sua extensão territorial situada na zona agroecológica 3A, onde se encontra o local de avaliação.

A.1.1) *Vale do Rio do Peixe e Planalto Central* (3A): BRAGA & GHELLRE (1999) classificam o clima como: mesotérmico brando (temperatura do mês mais frio entre 10⁰C e 15⁰C), com isoterma do mês mais frio entre 11,5⁰C e 13,0⁰C. Podem ocorrer em termos normais de 12 a 22 geadas por ano; outras condições climáticas são apresentadas na Tabela 4.2:

Tabela 4.2 – Condições climáticas referentes às localizações dos vinhedos estudados nas regiões do Planalto (3A; 4A e 5) e Meio Oeste (3A e 4B) de acordo com a zona agroecológica

Zona	Temperatura anual ($^{\circ}\text{C}$)		Precipitação pluviométrica (mm/ano)	Dias de chuva (soma)	Umidade relativa (%)	Horas de frio		Insolação (horas/ano)	
	Média	Mínima				Abril - Outubro	<7,2($^{\circ}\text{C}$) <13,0($^{\circ}\text{C}$)		
3A	15,8 - 17,9	22,3 - 25,8	10,8 - 12,9	1430 - 1908	129 - 144	76,3 - 77,7	437 - 642	1653 - 2231	2137 - 2373
4A	13,8 - 15,8	19,43 - 22,3	10,8 - 12,9	1430 - 1908	129 - 144	76,3 - 77,7	437 - 642	1653 - 2231	2137 - 2373
4B	14,4 - 16,3	20,7 - 23,7	9,1 - 10,8	1490 - 2100	114 - 138	78,1 - 82,9	642 - 778	2231 - 2615	2011 - 2193
5	11,4 - 13,8	16,9 a 19,4	7,6 a 9,2	1450 a 1650	135	80,5	847 - 1120	2808 - 3578	1824

A.2) Lages

O município de Lages possui 100% da sua extensão territorial situada na zona agroecológica (4A).

A.2.1. Campos de Lages (4A): De acordo com BRAGA & GHELLRE (1999), o clima é classificado como: mesotérmico brando (temperatura do mês mais frio entre 10⁰C e 15⁰C), com isoterma do mês mais frio entre 10,0⁰C e 11,5⁰C. Podem ocorrer em termos normais de 20 a 29 geadas por ano; mais condições climáticas são apresentadas na Tabela 4.3.

A.3) São Joaquim

Essa sub-região possui 70% de sua extensão referenciada na zona agroecológica 4A (vide descrição no item A.2.1), e 30% na zona 5, os vinhedos em avaliação estão distribuídos nas duas zonas.

A.3.1. Planalto Serrano de São Joaquim (5): Segundo BRAGA & GHELLRE (1999) o clima dessa sub-região é classificado como: mesotérmico brando (temperatura do mês mais frio entre 10⁰C e 15⁰C), com isoterma do mês mais frio entre 10,0⁰C e 11,5⁰C. Podem ocorrer em termos normais de 29 a 36 geadas por ano, mais condições climáticas são apresentadas na Tabela 4.2

B) REGIÃO DO MEIO OESTE CATARINENSE

A localização dos vinhedos nessa região obedece a seguinte divisão política nas sub-regiões: Água Doce, Caçador, Iomerê, Pinheiro Preto, Tangará e Videira. Todas estão localizadas no Alto Vale do Rio do Peixe. Todas são classificadas segundo Köppen, como clima de cfb, ou seja, temperado constantemente úmido, (temperatura média do mês mais quente <22⁰C).

B.1) Água Doce

A sub-região apresenta 100% de sua extensão territorial na zona agroecológica 4B. De acordo com BRAGA & GHELLRE (1999), o clima é mesotérmico brando (temperatura do mês mais frio entre 10 e 15⁰C, com isoterma do mês mais frio entre 10,0⁰C e 11,5⁰C. Podem ocorrer, em termos normais, de 22 a 30 geadas por ano, outras condições climáticas estão presentes na Tabela 4.2.

B.2) Caçador

O município de Caçador possui 46% de sua extensão territorial na

zona agroecológica 3A (descrito no item A.1.1) e 56% na zona 4B (descrito no item B.1).

B.3) Iomerê, Pinheiro Preto, Tangará e Videira

Esses municípios possuem 100% de suas extensões territoriais na zona agroecológica 3A (descrito no item A.1.1).

4.1.1.1 Caracterização climática dos anos de estudo

A caracterização climática dos anos de estudo foi observada para a região do Meio Oeste através da Estação Meteorológica de Videira, nos seguintes períodos: Abril de 2004 a Março de 2005 e Abril de 2005 a Março de 2006. Enquanto, para a região do Planalto se fez através da Estação Meteorológica de São Joaquim, nos períodos que compreendem: Maio de 2004 a Abril de 2005 e Maio de 2005 a Abril de 2006.

4.1.2 Amostras

Foram recolhidas 50 amostras de uvas tintas provenientes das safras de 2005 e 2006 destinadas à produção de vinhos finos, obedecendo o plano de amostragem (referido no item 4.1.3). O período das vindimas compreendeu o seguinte: primeira quinzena de Março à primeira quinzena de Abril (Meio Oeste) e segunda quinzena de Março a segunda quinzena de Abril (Planalto), de acordo com a chegada dos lotes para vinificação nas cantinas.

Para a realização desse trabalho foram selecionadas somente castas tintas, porque estudos demonstraram que a OTA tem sido mais freqüentemente encontrada em vinhos tintos (WALKER, 1999; OTTENDER & MAJERUS, 2000). Já, o critério de seleção para as variedades se deu em função da busca da maior representatividade possível, visto que, nessas regiões os vinhedos de viníferas são ainda jovens e muitas variedades estão implantadas ainda em escala piloto. As variedades consideradas foram as seguintes: *Cabernet Sauvignon* (23), *Merlot* (7), *Sangiovese* (05), *Tannat* (2), *Syrah* (2), *Cabernet Franc* (2), *Pinot Noir* (2), *Nebiolo* (2), *Montepulciano* (1), *Malbec* (1), *Primitiva* (1), *Ancellota* (1) e *Tempranillo* (1).

4.1.3 Plano de amostragem

a) Coleta e tratamento das amostras:

A coleta das amostras das uvas obedeceu a uma adaptação do método de SCUSSEL (1998), para alimentos do Tipo I (grãos), onde o tamanho mínimo da amostra é de 5Kg em lote de até 50 toneladas. Os lotes aqui amostrados não excederam a 5 toneladas cada. Para cada lote de interesse duas amostras representativas do mesmo veículo. Cada amostra representativa foi composta de 5 sub-amostras ($\pm 0,5\text{Kg}$ cada – totalizando $\pm 5\text{Kg/Lote}$) foram recolhidas da carga no momento da chegada à cantina no momento da recepção das uvas para a vinificação. As amostras foram coletadas de forma individual em sacos de papel kraft e acondicionadas em caixas de poliestireno expandido (EPS), previamente refrigeradas. Foi amostrado um total de 50 lotes durante o período de estudo (2005/2006).

As sub-amostras foram retiradas das caixas da carga em diferentes níveis: 2 amostras da porção superior (pontos 1 e 3), 01 amostra na altura intermediária (ponto 2) e 2 amostras na porção inferior (pontos 4 e 5), de acordo com o esquema representado na Figura 4.2.

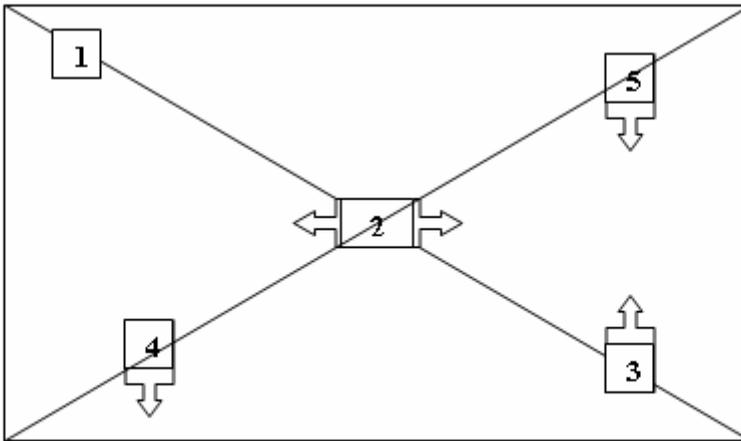


Figura 4.2 - Esquema da coleta das sub-amostras das uvas na carga do veículo de transporte.

b) Transporte das amostras:

O transporte das amostras ao laboratório ocorreu de forma imediata, com intervalo máximo de 1 hora. Isso foi válido para as uvas provenientes de vinhedos próximos a serem vinificadas nas cantinas da

região do Alto Vale do Rio do Peixe. Já, as amostras de vinhedos distantes a serem vinificadas na Região do Planalto Catarinense foram transportadas imediatamente após a colheita das mesmas nas mesmas condições, porém, o tempo de chegada ao laboratório variou de 4 a 8 horas.

c) Tratamento das amostras:

O tratamento das amostras ocorreu imediatamente após a chegada ao laboratório e obedeceram os critérios de acordo com os parâmetros a serem analisados conforme a Figura 4.3.

c.1) Análises Micológicas: a alíquota da amostra destinada a essa análise (enumeração de fungos filamentosos) foi dividida em 2 frações de uvas frescas, onde a primeira fração de bagas foi utilizada *in natura* e, a segunda fração sofreu prévia desinfecção superficial em solução de NaHClO_4 a 0,04%.

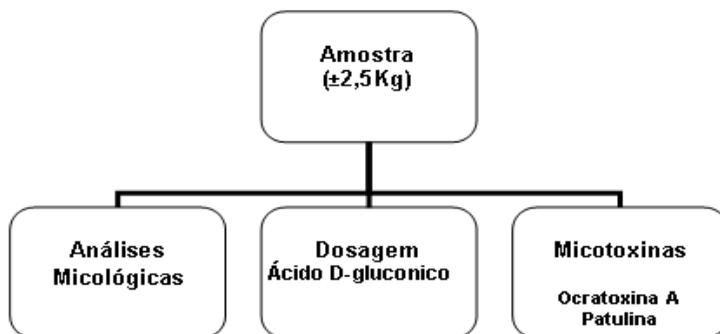


Figura 4.3 - Parâmetros a serem analisados nas uvas amostradas.

4.1.4 Meios de detecção, cultivo e manutenção

Para a detecção foram utilizados 2 meios de cultura:

- Ágar Dicloran Rosa Bengala com cloranfenicol - DRBC (OXOID[®])
- Ágar Sabouraud Dextrose + cloranfenicol (sigma aldrich[®]) - SDA (DIFCO[®])

Para o isolamento e identificação foram utilizados os seguintes meios:

- Ágar Dicloran Rosa Bengala (DRBC – OXOID®)
- Ágar Czapek (CZ - OXOID®)
- Ágar Czapeck extrato Levedura – CYA
- Ágar Extrato de Malte (MEA)
- Ágar Agua Torneira – TWA c/ papel filtro

A manutenção das estirpes foi efetuada em:

- Ágar Batata Dextrose (PDA - DIFCO®)

Observação: A formulação de todos os meios de cultura utilizados no presente estudo encontram-se descritos no Anexo A.

4.1.5 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos na detecção, cultivo, identificação e manutenção das estirpes: estereomicroscópio (TEcNIVAL® - resolução de 10x), estufa B.O.D. ELETROlab®-101M e microscópio óptico (Eclipse E200 – Nikon).

4.1.6 Procedimentos microbiológicos

A amostra representativa foi composta de 8 a 10 cachos em média, da qual foram selecionados em duas séries de quatro cachos para realização dos testes em duplicata, respeitando a homogeneidade da amostra, das quais foram retiradas aleatoriamente um total de 20 bagas de cada série.

Para a semeadura foi adotada a técnica utilizada por SERRA (2005): plaqueamento direto de 5 bagas cortadas ao meio em placas de Petri estéreis ($\varnothing = 94\text{mm}$ e $h = 16\text{mm}$) como mostra a Figura 4.4, o que foi efetuado de forma asséptica (sob a chama, com auxílio de bisturi e pinças flambados), obedecendo os 2 procedimentos a seguir:

- Plaqueamento direto sem desinfecção superficial: Inoculação asséptica (efeutada em duplicata) de 5 bagas cortadas ao meio diretamente nas placas, contendo os meios: DRBC e SDA e, incubadas em Estufa B.O.D. a 25oC por um período de 7 a 14 dias.
- Plaqueamento direto sob desinfecção superficial: As 10 bagas

foram colocadas em frascos de Erlenmeyer contendo 500mL de uma solução de Hipoclorito de sódio (NaHClO – 0,04%) onde permaneceram por 2 minutos, durante esse período o frasco sofreu agitação manual por algumas vezes. Após esse período as bagas foram decantadas e, imediatamente cortadas ao meio e inoculadas de forma asséptica nos referidos meios de cultivo.

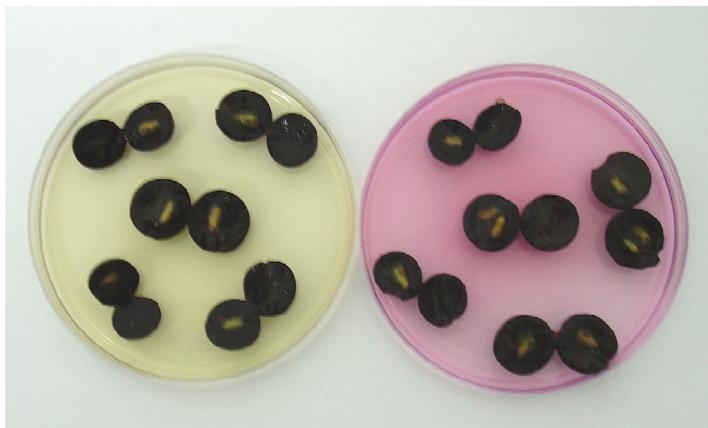


Figura 4.4 – Técnica de plaqueamento direto demonstradas em SDA e DRBC.

↳ Incubação: As placas foram incubadas (voltadas para cima) por um período aproximado de 7 dias em estufa B.O.D. a 25^o C ao abrigo de luz.

↳ Deteccção dos gêneros de fungos filamentosos observados:

As placas foram monitoradas sob o estereomicroscópio a partir do segundo dia e sempre que possível a identificação dos gêneros foi efetuada a este nível com base na presença de estruturas de reprodução especializadas (SERRA *et al.* 2003). Quando isso não foi possível os isolados foram identificados de acordo com suas características macro e micromorfológicas nas culturas. Para a identificação os seguintes manuais foram utilizados: SERRA, (2005); KLICK (2002); SAMSON e PITT (2000); PITT & HOCKING (1997); SAMSON *et al.* (1996); SAMSON *et al.* (1992); BURGGES *et al.* (1988), KLICK e PITT, (1988); PITT, (1988) e NELSON *et al.* (1983). Estirpes representativas foram submetidas à Micoteca da Universidade do Minho (Portugal) para confirmação da identidade.

↳ Meios de cultivo para isolamento das estirpes: As formulações

dos meios CYA, MEA e CZ estão descritas por KLICH (2002). O meio de TWA com papel filtro encontra-se em SANTOS *et al.* (1998). As formulações encontram-se descritas no Anexo A. Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

↳ Identificação e caracterização:

A identificação das estirpes foi baseada na observação das características macro e micromorfológicas das culturas:

a) Macromorfologia: a cultura foi observada através de exame direto com auxílio de estereomicroscópio (TECNIVAL[®] - resolução de 10x), a fim de verificar a extensão da esporulação, localização e o tipo das estruturas reprodutoras. Os aspectos visuais das culturas (cor do conídio, diâmetro da colônia, cor do micélio, exudato, cor do reverso da colônia, pigmento solúvel, esclerócio e cleistotécio) também foram também observados.

b) Micromorfologia: após a observação da pureza da cultura através do estereomicroscópio, foram preparadas lâminas para observação das estruturas reprodutoras especializadas com o auxílio de microscópio óptico (Eclipse E200 –Nikon).

↳ Preparo das lâminas para exame ao microscópio:

As lâminas foram preparadas de acordo com SANTOS *et al.* (1998). Uma gota do corante (azul de algodão, azul de lactofenol) foi colocada sobre a lâmina, em seguida transferiu-se uma pequena quantidade do material retirado da cultura com uma agulha de inoculação previamente esterilizada e resfriada na extremidade da placa. Com o auxílio de uma segunda agulha o material foi removido aproveitando a mesma para dissociar quando necessário, seguido da sobreposição da lâminula.

↳ Preparo das lâminas de estirpes *Penicillium* e *Aspergillus*:

Essas espécies normalmente possuem um grande número de esporos, que dificultam a visualização das estruturas, portanto, o material foi colocado na lâmina e lavado previamente com álcool (96%), para remoção dos esporos. Deixou-se secar e, em seguida uma gota do corante foi adicionada e coberta com a lamínula. Nos casos em que o micélio aéreo foi raro, foi utilizada a técnica da fita-adesiva, pressionando-se a superfície adesiva sobre o fungo e, colocada em uma lâmina, adicionando uma gota de azul de lactofenol e cobrindo-a com a lâminula (SANTOS *et al.*, 1998).

↳ Manutenção das estirpes isoladas: Somente foram preservadas as estirpes dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo mantidas sob refrigeração a 4°C em meio PDA (DIFCO®) em tubo inclinado e repicadas a cada 45 dias.

4.1.7 Avaliação estatística dos dados

O teste de análise de variância (ANOVA), foi utilizado para as variáveis que diferem significativamente quando as variáveis seguem uma distribuição normal, e o teste Quiquadrado como teste de significância, quando a distribuição não foi normal.

Para investigar eventuais relações lineares entre as variáveis, fizeram-se correlações bivariadas com o coeficiente de correlação de Spearman, visto que a distribuição dos fungos nas amostras geralmente não foi normal. As análises estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

O programa utilizado foi o Microsoft Office Excel 2003®, seguindo as instruções de LOPES (2001).

4.2 Potencial Ocratoxigênico dos Isolados

4.2.1 Estirpes

Foram analisados todos os exemplares das estirpes isoladas das uvas durante o período de amostragem (safra 2005-2006) pertencentes aos gênero *Aspergillus*, descritas como potencialmente produtoras de OTA, ou seja, algumas espécies desse gênero.

4.2.2 Reagentes e materiais

Foram utilizados solventes grau HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*), filtros de seringa com $\varnothing = 0,45\mu$ (milipore®). Foram utilizados frascos âmbar com capacidade de 4 mL com tampas de teflon. O meio de cultivo utilizado foi CYA + Concentrado de Czapeck (a formulação do meio de cultivo está no Anexo A).

4.2.3 Equipamentos

Para a determinação foi utilizado o cromatógrafo líquido HPLC - Gilson 710[®] em fase reversa com detector de fluorescência modelo 121 (com comprimentos de onda: 333nm de excitação e 430-460nm de emissão). Para separação cromatográfica utilizou-se uma coluna Phenomenex[®] ODS 2 (4,6mm x 25,0 mm: 5µm).

4.2.4 Avaliação das estirpes quanto à produção de OTA

As estirpes isoladas foram testadas de acordo com o método de BRAGULAT *et al.* (2001), seguindo o esquema demonstrado na Figura 4.5. Após a inoculação em CYA e incubação por 7 dias a 25°C ao abrigo de luz, foram removidas e pesadas 3 porções do ágar de cada uma das colônias e, colocadas em frasco âmbar com capacidade de 4mL, onde a extração foi efetuada com auxílio de 500µL de metanol. Após 1 hora os extratos foram filtrados (0,45µm, Ø=13mm - Schleicher & Schuell[®]), evaporado em corrente de nitrogênio, ressuspensão em fase móvel (H₂O:acetonitrila:ácido acético – 99:99:2; v/v/v) e injetado (20µL) em HPLC com detector de fluorescência. As análises referentes à safra de 2005 foram realizadas no Laboratório de Ciência e Tecnologia Alimentar do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho. Enquanto, as da safra de 2006 foram realizadas no Laboratório de Micotoxicologia e Contaminantes Alimentares (Departamento de Ciências dos Alimentos - CCA/UFSC - LABMICO).

A Figura 4.5 apresenta as etapas para a extração e avaliação do potencial para produção de OTA das estirpes.

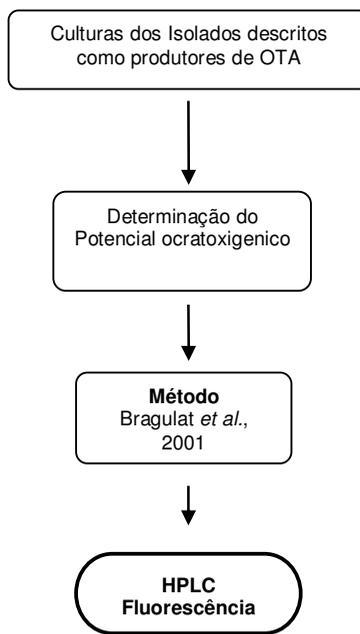


Figura 4.5 – Fluxograma da avaliação do potencial ocratoxigênico das estirpes

4.2.5 Estudos de recuperação

Para a recuperação da OTA nas culturas seguiu-se o descrito por BRAGULAT *et al.* (2001), porém, foram adicionados 10mL de ágar (CYA) em placas de Petri estéreis ($\varnothing = 94\text{mm}$ e $h = 16\text{mm}$). Antes da solidificação do meio de cultura foram adicionados assepticamente 100uL de clorofórmio, contendo 20ug de padrão de OTA (Sigma Aldrich[®]), para obtenção da concentração final de $2,0 \text{ ug.mL}^{-1}$. Foram removidas e pesadas 3 porções do ágar solidificado da placa e, colocadas em frasco âmbar com capacidade de 4mL, onde a extração foi efetuada com auxílio de 500 μL de metanol.

Para os ensaios de recuperação utilizou-se a inclinação da reta obtido a partir da curva de calibração. As seguintes equações foram empregadas:

$$Y = bx + a \quad (1)$$

onde:

y = altura do pico

b = inclinação da reta

x = concentração de OTA na amostra ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

a = ordenada na origem

$$[\text{OTA}_2] = [\text{OTA}_1] \times V \quad (2)$$

onde:

$[\text{OTA}_2]$ = concentração absoluta de OTA no metanol

V = volume de metanol (mL)

$$[\text{OTA}_3] = \frac{[\text{OTA}_2]}{M_b} \quad (3)$$

onde:

$[\text{OTA}_3]$ = concentração de OTA nos blocos de ágar ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

M_b = massa dos blocos (g)

A taxa de recuperação (equação 4) é a razão entre a concentração de OTA detectada na amostra $[\text{OTA}_3]$, calculada pela equação 3, e a concentração de OTA conhecida $[\text{OTA}_4]$ expressa em percentagem.

$$\text{TR} = \frac{[\text{OTA}_3]}{[\text{OTA}_4]} \times 100 \quad (4)$$

onde:

TR = taxa de recuperação (%)

$[\text{OTA}_4]$ = concentração de OTA adicionada inicialmente

Os ensaios foram efetuados em triplicata (3 réplicas com uma concentração de OTA adicionada de $2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) realizados em dois dias distintos, a fim de determinar a taxa de recuperação média (TR) e valores de precisão: desvio padrão relativo em condições de repetibilidade (RSD_r) e de reprodutibilidade (RSD_R). O RSD é calculado

com base na razão do desvio padrão e do valor médio e , expresso em porcentagem.

4.2.5.1 Ensaios de calibração

As soluções padrão foram preparadas em fase móvel, em quatro concentrações: 0,05; 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g/L}$ e aplicadas diariamente. As curvas de calibração foram obtidas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados usando a altura do pico do padrão como relação da sua concentração. Os coeficientes de correlação (R^2) da curva de calibração foram iguais ou superiores 0,9999.

O limite de detecção de OTA nas amostras de HPLC foi estabelecido em 0,15 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de blocos de ágar (peso fresco), determinado como a soma de a (ordenada na origem) representado a partir da equação (1), com três vezes o desvio padrão dos y -residuais da curva de calibração ($S_{y/x}$) apresentado na equação (5), de acordo com o recomendado por Miller e Miller (1993) *apud* SERRA (2005).

$$S_{1/2} = \left(\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 1} \right)^{1/2} \quad (5)$$

onde:

$S_{y/x}$ = desvio padrão dos y -residuais da curva de calibração;

$(y_i - \hat{y}_i)^2$ = os y residuais, em que y_i é a altura do pico de OTA da amostra com concentração onhecida x_i e \hat{y}_i é o valor calculado de y em que x é substituído por x_i na reta de calibração;

n = número de pontos de calibração.

O limite de quantificação foi o menor valor quantificado (menor valor utilizado na curva de calibração), ou seja 0,05 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$.

4.3 Determinação de Micotoxinas nas Uvas

A presença das micotoxinas OTA e Patulina nas uvas procedentes do Meio Oeste e Planalto de Santa Catarina, referentes às safras de 2005 e 2006 foi aqui investigada.

4.3.1 Amostra

Para as determinações de OTA e Patulina foram analisadas 32 amostras do total de amostras de uvas que estão referenciadas no item 4.1.2.

4.3.1.1 Coleta e pré-tratamento das amostras

A coleta e o pré-tratamento das amostras para as determinações de OTA e patulina seguiram o plano de amostragem exposto no item 4.1.3. As uvas, ainda frescas foram desengaçadas, trituradas em liquidificador industrial e fracionadas em alíquotas de 50g, que foram congeladas e mantidas a -30°C para as referidas determinações. No momento das análises amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e homogeneizadas.

4.3.2 Reagentes e materiais

Foram utilizados solventes grau HPLC e reagentes grau P.A. (pró-análises) Merck[®] e J.T. Baker[®], filtros Whatman GF/A1(1,6 μm), colunas de imunoafinidade (Ochra Test - Vicam[®]), padrões de patulina e OTA (Sigma Aldrich[®]).

4.3.3 Equipamentos

Na determinação de OTA foi utilizado cromatógrafo líquido HPLC - Gilson 710[®] em fase reversa com detector de fluorescência modelo 121 (com comprimentos de onda 333 nm de excitação e 460 nm de emissão), Para as determinações de patulina foi utilizado cromatógrafo líquido HPLC-Varian[®] com detector UV-276nm e para separações cromatográficas, coluna Phenomenex[®] ODS 2 (4,6mm x 25,0 mm: 5 μm) e coluna Phenomenex[®] (4,6mm x 15,0mm: 5 μm).

4.3.4 Determinação de OTA nas uvas

As amostras foram preparadas (extração, limpeza) e analisadas

em HPLC de acordo com SERRA *et al.* (2004), é importante ressaltar que esse método não utiliza solventes orgânicos, sendo muito menos impactante ao meio ambiente:

4.3.4.1 Preparo da amostra

As amostras foram preparadas de acordo com os itens 4.1.3 e 4.3.1.1.

4.3.4.2 Extração

Uma alíquota de 50 g homogeneizada de uvas foi pesada em béquer graduado de 250 mL e em seguida foi adicionado 150 mL da solução A (NaHCO_3 a 5% e PEG 8000 a 1%); a mistura foi centrifugada a 8.000 rpm por 20 minutos.

4.3.4.3 Limpeza

Para limpeza, o sobrenadante obtido no passo anterior foi filtrado com Whatman ($\varnothing=1,6\mu\text{m}$), 20 mL do filtrado foi passado por uma coluna de imunoafinidade (Ochra Test[®] - Vicam) e a coluna lavada com 5mL da solução B (NaCl a 2,5%, NaHCO_3 a 0,5%), seguido de 5mL de água deionizada. A OTA foi eluída com 2mL de metanol e completamente evaporada em corrente de azoto.

4.3.4.4 Quantificação

A OTA foi ressuspensa em 1mL da fase móvel e injetada em HPLC com detecção de fluorescência. A fase móvel consistiu de um sistema isocrático de H_2O :acetonitrila:ácido acético (99:99:2; v/v/v) a uma taxa de fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 20 μL . As análises foram efetuadas no Laboratório de Micotoxicologia e Contaminantes Alimentares (Departamento de Ciências dos Alimentos - CCA/UFSC).

4.3.4.5 Estudos de Recuperação:

Estes ensaios foram feitos para a concentração inicial de OTA = $2,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$. determinar a taxa de recuperação de OTA e desvios padrões relativos em condições de repetibilidade (RSD_r), e de reprodutibilidade (RSD_R).

Seguiu-se o procedimento estabelecido por SERRA (2005), a OTA foi adicionada em 1 ml de metanol a 0,5 kg de uvas homogeneizadas previamente analisadas e com resultado negativo quanto à presença de OTA no copo da misturadora, então a amostra permaneceu em repouso por 1 hora. Em seguida, misturou-se por cerca de 1 minuto e retirou-se 6 alíquotas de 50 g cada. Três foram analisadas imediatamente, e as outras 3 foram congeladas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ e analisadas em data posterior.

O limite de detecção de OTA foi estabelecido em $0,04 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, foi determinado de acordo com o item (4.2.5.1), e o limite de quantificação foi o menor valor quantificado (menor valor utilizado na curva de calibração), ou seja $0,05 \mu\text{g.Kg}^{-1}$.

4.3.5 Determinação de patulina nas uvas

As amostras foram preparadas (extração, limpeza) e analisadas em HPLC, de acordo com o método 995.10 - AOAC, para patulina em suco de maçã descrito por BRAUSE *et al.* (1996).

4.3.5.1 Preparo da amostra

As amostras foram preparadas de acordo com os itens 4.1.3 e 4.3.1.1.

4.3.5.2 Extração

Com auxílio de uma espátula foram removidos 5 gramas da amostra para um tubo de ensaio de vidro – $20 \times 150 \text{ mm}$ (1) e 10 mL de acetato de etila foram adicionados. A solução foi agitada vigorosamente (agitador vortex) por 1 minuto. A fase superior foi ser removida para um outro tubo de ensaio (2). Novamente, 10 mL de acetato de etila foram adicionados ao tubo e repetido o processo, a fase superior foi adicionada

ao tubo 2 (fração orgânica). 2mL de uma solução de carbonato de sódio -1,5% foram adicionados ao tubo 1 e submetido à agitação, o acetato de etila (fase superior) foi transferido para um outro tubo limpo (3). 5 mL de acetato de etila foram juntado ao tubo 2 contendo o carbonato de sódio e agitado. A porção superior foi removida para o tubo 3 (fundo cônico), descartando o tubo 2.

4.3.5.3 Limpeza

A limpeza foi efetuada com adição de 1 g. de sulfato de sódio anidro ao tubo que contém o extrato (3); o tubo foi agitado por inversão vigorosa durante 30 segundos. O extrato evaporado sob corrente de nitrogênio, em bloco aquecido a 40⁰C (foram evaporados 5 mL do extrato).

4.3.5.4 Quantificação

A patulina foi resuspensa em 0,5mL de uma solução ácido acético (preparada com adição de H₂O até pH 4,0). A fase móvel consistiu de um sistema isocrático de Acetonitrila:H₂O (10:90 v/v). A taxa de fluxo foi de 0,5mL/min e o volume de injeção de 20μL. As análises referentes à safra de 2005 foram realizadas no Laboratório de Ciência e Tecnologia Alimentar do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho. Enquanto, as da safra de 2006 foram realizadas no Laboratório de Micotoxicologia e Contaminantes Alimentares (Departamento de Ciências dos Alimentos - CCA/UFSC - LABMICO).

4.3.5.5 Estudos de Recuperação:

Para determinar a taxa de recuperação e desvios padrões relativos em condições de repetibilidade (RSD_r), e de reprodutibilidade (RSD_R). Estes ensaios foram feitos para a concentração de Patulina = 20,0 μg.kg⁻¹. Seguiu-se o mesmo procedimento estabelecido para a OTA (item 4.3.4.4).

4.4 Determinação da Concentração de Ácido D-Glucônico nas Uvas

O ácido glucônico em uvas, mostos e vinhos é próprio de fontes ácidas, sendo produzidos por fungos e/ou bactérias (PÉREZ *et al.* 1991). Pelo fato de não ser utilizado pelas leveduras ou bactérias (ZOCKLEIN, 2006) o ácido glucônico foi utilizado como parâmetro de controle em relação ao grau de sanidade das uvas.

4.4.1 Amostra

O referenciamento das amostras das uvas aqui analisadas está descrito nos itens 4.1.3 e 4.3.1.1.

4.4.2 Reagentes e materiais

Para as dosagens foi utilizado o kit enzimático-colorimétrico *D-Gluconic acid/D-Glucono- δ -lactone* (R-Biopharm[®]), filtros Whatman[®] GF/A1(1,6 μ m). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro - UV/VIS JASCO (V-560).

4.4.3 Técnica analítica

A dosagem de ácido glucônico nas uvas foi efetuada através do método enzimático-colorimétrico/UV (R-Biopharm[®]) para determinação de ácido D-glucônico e D-gluco- δ -lactona em produtos alimentícios.

4.4.3.1 Princípio do método

O presente método envolve duas etapas de reação (Fig. 4.6), ocorrendo a fosforilação do ácido D-glucônico (D-gluconato) a D-gluconato-6-fosfato na presença da enzima *Gluconato kinase*. Na sequência, há a catálise da enzima *6-fosfogluconato desidrogenase* e o D-gluconato-6-fosfato é oxidativamente descarboxilado pela nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) a ribulose 5-fosfato com formação de NADP reduzida (NADPH). A concentração de NADPH formada é estequiométrica a concentração de D-gluconato. O

aumento da concentração de NADPH foi então medido por meio luz UV a 340nm.

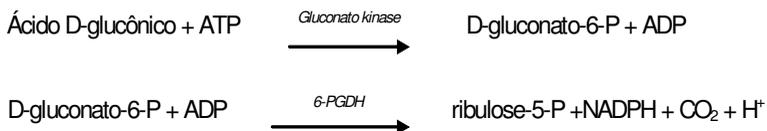


Figura 4. 6 – Reações enzimáticas envolvidas na determinação de ácido D-gluconico

4.4.4 Preparo da amostra

Para efetuar a hidrólise da D-glucono- δ -lactona e convertê-la a ácido D-gluconico, a amostra foi ajustada para um pH de 10-11 com KOH (2M), e a amostra incubada por 5-10 minutos entre 20-25⁰C. Um volume adequado da amostra foi centrifugado e filtrado em filtro Whatman ($\varnothing=1,6\mu\text{m}$).

4.4.5 Procedimento analítico

Para cada amostra analisada preparou-se uma série de 03 tubos: branco de cor, branco reagente e amostra. O branco de cor foi preparado com 0,1 mL amostra+ 3,010 mL H₂O destilada ou 2,0 mL amostra + 1,020mL H₂O destilada. Os tubos branco reagente e amostra seguiram o protocolo do método que obedece duas etapas. Ao final da reação, a concentração da amostra foi determinada por espectrofotômetro UV a 340nm. As análises referentes à safra de 2005 foram efetuadas no Laboratório de Ciência e Tecnologia Alimentar do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho - Portugal. As dosagens do ano de 2006 foram realizadas na no Laboratório de Videira da Universidade do Oeste de Santa Catarina - Brasil.

4.5 Degradação da Ota e Formação de Ota α por uma *Protease* em meio de Uva Sintético

A ação hidrolítica residual de uma enzima comercial do tipo *protease* foi investigada na degradação de OTA em meio de uva

sintético. A influência do pH e temperatura na atividade de hidrólise foi avaliada. Os parâmetros de controle foram a formação de ocratoxina- α e o consumo de OTA.

4.5.1 Enzima

Foi utilizada a enzima comercial - Prolzyme PAC[®], na forma de pó solúvel. Trata-se de uma protease ácida obtida de estirpes selecionadas de *A. niger*, que possui algumas atividades residuais como: amilases, celulases e hemicelulases. As propriedades da enzima encontram-se descritas na ficha técnica, apresentada no Anexo B.

4.5.2 Reagentes e materiais

Foram utilizados solventes grau HPLC, reagentes grau P.A. (pró-análises), azida sódica e padrão de OTA (sigma aldrich[®]).

4.5.3 Equipamentos

Foi utilizado cromatógrafo líquido fase reversa HPLC-Varian[®] com detector fluorescência JASCO - FP-920 (Tokyo, Japan) ($\lambda_{em} = 333$ nm; $\lambda_{ex} = 460$ nm) e um *Marathon Basic autosampler*. Coluna Waters Spherisorb ODS2 - Alltech, Lexington, KY, USA (4.6 mm x 250 mm; 5 μ m), provida de pré-coluna com a mesma fase estacionária.

4.5.4 Ensaios de degradação

4.5.4.1 Elaboração do meio de uva sintético: 500 mL de meio de uva sintético foi elaborado de acordo com o especificado no Anexo C, em seguida foram divididos em volumes iguais. Uma fração teve o pH ajustado a 3,5 e a outra a 4,0. Azida sódica a 0,1% foi adicionada a fim de evitar contaminação. O meio de uva, bem como, todo material utilizado foi autoclavado e trabalhado sob condições assépticas.

4.5.4.2 Preparação da OTA: A partir de uma solução estoque de OTA (25 μ g/mL em tolueno/ácido acético- 99/1,v/v), uma solução de uso de 2

$\mu\text{g/mL}$ em metanol foi preparada. Dessa solução adicionou-se $100\ \mu\text{L}$ a cada *vial* utilizado; a OTA foi evaporada em corrente de azoto. Então, $1\ \text{mL}$ do suco sintético (item 4.5.4) foi adicionado a cada *vial* e submetidos a agitação vigorosa por 30 segundos (*vortex*).

4.5.4.3 Preparação da enzima: Foi preparada uma solução utilizando água deionizada estéril como solvente, para uma concentração de $100\ \text{mg/mL}$ da enzima Prolyve PAC®

4.5.4.4 Adição da enzima: Para cada amostra foram utilizados 05 vials, sendo 02 brancos e 03 testes, onde efetuou-se a adição da enzima de acordo com o esquema apresentado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Estrutura da bateria de ensaios para adição da enzima Prolyve PAC®.

pH/Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Enzima (μL)	Vials
pH 3,5 20	-	Branco
	-	Branco
	100	T1
	100	T2
	100	T3
pH 3,5 35	-	Branco
	-	Branco
	100	T1
	100	T2
	100	T3
pH 4,5 20	-	Branco
	-	Branco
	100	T1
	100	T2
	100	T3
pH 4,5 35	-	Branco
	-	Branco
	100	T1
	100	T2
	100	T3

Após a adição da enzima, os *vials* foram ao sonificador por 30 minutos e em seguida, submetidos a temperatura preconizada.

4.5.5 Amostragem

Foram retirados 20 μ L de cada um dos *vials* e diluídos em 980 μ L de fase móvel. A tomada de amostras foi efetuada nos seguintes intervalos de tempo: zero hora ; 12; 24; 48; 72 e 114 horas.

4.5.6 Quantificação da OTA e OT α

Após a diluição, as amostras foram injetadas no HPLC, a fase móvel isocrática consistiu de H₂O:acetonitrila:ácido acético (99:99:2; v/v/v) a uma taxa de fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 100 μ L. As análises foram efetuadas no Laboratório de Ciência e Tecnologia Alimentar do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho - Portugal. A OT α foi identificada através da hidrólise da OTA pela enzima carboxipeptidase A e quantificada em equivalentes de OTA utilizando a curva de calibração anterior.

4.5.7 Conversão de OTA hidrolisada em OT α

Segundo NIELSEN & GAARD (2003), a massa molecular da OT α (C₁₁H₉ClO₅) corresponde a 63,51% da massa da OTA (C₂₀H₁₈NCIO₆). Portanto, a conversão foi efetuada considerando esses percentuais em relação à concentração de OTA hidrolisada e de OT α formada.

4.5.8 Ensaios cinéticos

A transformação da OTA com o tempo (0 a 114 horas) pela enzima Prolive PAC[®] foi estudada sob os efeitos das seguintes condições: concentração inicial de substrato (2,0 e 0,2 μ g.mL⁻¹), condições físicas de pH (3,5 e 4,5) e temperatura (20 e 35^oC). A velocidade de hidrólise da OTA e de formação de OT α , foi estabelecida com a função do gênero:

$$\gamma = \frac{d[\text{OTA}]}{dt} = \frac{d[\text{OT}\alpha]}{dt} \quad (6)$$

4.6 Avaliação do perfil da Ota na Microvinificação em Tinto

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina que tem sido, atualmente, a maior questão na segurança nos vinhos. A União Européia - (CE) N. 123/2005, estabelece limites de OTA para vinhos em 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Devido a importância da investigação de técnicas que promovam a remoção da OTA dos vinhos, o presente estudo avaliou o comportamento da OTA na microvinificação.

4.6.1 Amostra

Foram selecionados dois lotes (± 15 Kg cada) de uvas tintas de *vinífera* (Cabernet sauvignon, Cabernet franc e Syrah) da safra de 2006. O primeiro com uvas aparentemente sãs e o segundo contendo um terço de uvas visivelmente doentes. As uvas continham uma média de 21⁰ Babo.

4.6.2 Reagentes e materiais

Para a microvinificação foram utilizados os produtos de uso enológico: enzima pectinolítica Rapidase[®], inóculo *Sacch. cerevisae* - Fermol Cryoaromae[®]. Para a determinação de OTA os reagentes serão os mesmos indicados no ítem 4.3.2.

4.6.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados para determinação de OTA nas uvas indicados no ítem 4.3.3.

4.6.4 Ensaios de vinificação

As microvinificações foram efetuadas de acordo com o processo empregado no Brasil para vinificação em tinto, com exceção das etapas

de chaptalização e filtração (GUERRA & BARNABÉ, 2005).

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Videira da Universidade do Oeste de Santa Catarina. O desengace e esmagamento foram efetuados de forma manual; seguido da sulfitagem do mosto utilizando 1,5 gramas de metabissulfito de potássio. Então, foi efetuada adição de 0,35 mL da enzima pectinolítica.

O passo seguinte consistiu na inoculação do mosto com levedura comercial de acordo com as orientações do fabricante (*S.cerevisae* - Fermol Cryoaromae®). A etapa de maceração ocorreu associada à fermentação alcoólica e o tempo de maceração foi de 9 dias; nessa etapa as remontagens foram efetuadas uma vez ao dia durante a fase tumultuosa da fermentação.

A primeira trasfega foi efetuada ao término da fermentação alcoólica, em função da descuba (separação sólido/líquido). A fermentação malolática foi efetuada a uma temperatura de $\pm 18^{\circ}\text{C}$, o que ocorreu num período de 30 dias.

A 2ª trasfega foi realizada, com nova adição de metabissulfito na mesma concentração adicionada inicialmente. Os vinhos passaram para a etapa de estabilização a frio ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), onde permaneceram por 30 dias.

Após a estabilização a frio efetuou-se a 3ª trasfega. O vinhos não foram filtrados antes do envase, a fim de preservar as propriedades aromáticas.

4.6.5 Amostragem

Alíquotas de 50 gramas foram coletadas em 5 etapas durante o processamento, ou seja: mosto fresco (MF), pós-fermentação alcoólica (PF), pós-primeira trasfega (PT1), após a fermentação malolática, ou seja, pós-segunda trasfega (PT2) e após a estabilização à frio, ou seja, pós-terceira trasfega. O plano de amostragem encontra-se descrito no esquema apresentado na Figura 4.7.

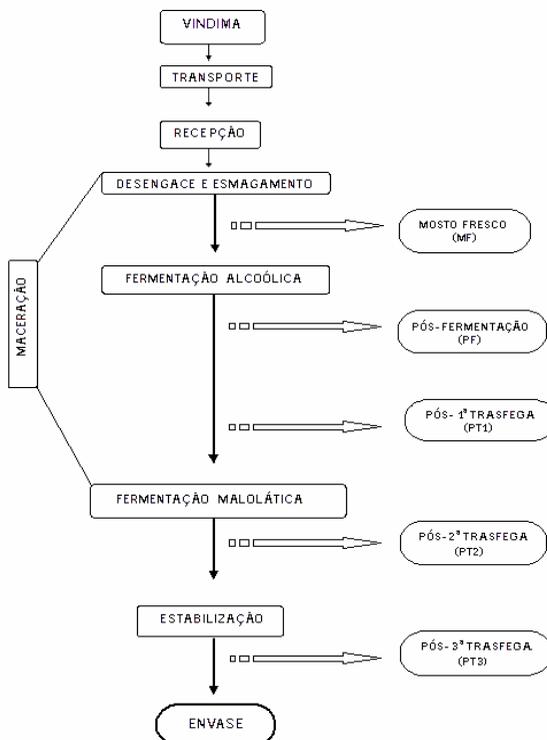


Figura 4.7 - Definição dos pontos de amostragem no processo de vinificação.

4.6.6 Determinação da OTA

As amostras foram preparadas (extração, limpeza) e analisadas em HPLC de acordo com a metodologia de SERRA *et al.* (2004) para o mosto fresco e, para as demais amostras utilizou-se a referência para vinhos EN14133 descrita no *European Comunittee Standard* (2003).

4.6.6.1 Preparo da amostra: As amostras do mosto inicial (MI) foram preparadas de acordo com os itens 4.1.4 e 4.3.1. Enquanto, as demais amostras foram coletadas em sacos plásticos próprios para congelamento e mantidas em -30°C até o momento da análise, onde foram descongeladas à temperatura ambiente.

4.6.6.2 Extração: As amostras foram extraídas da seguinte maneira: um volume de 10 mL da amostra foi adicionado em erlenmeyer de 100 mL, seguido da adição de 10 mL da solução A (NaHCO_3 a 5% e PEG 8000 a 1%) e vigorosamente homogeneizado. A mistura foi filtrada com filtro Whatman (1,6 μ). Porém, para a amostra do mosto fresco (MF) o processo de extração foi o mesmo descrito para uvas no item 4.3.4.1.

4.6.6.3 Limpeza: Para limpeza, 10 mL do filtrado obtido no passo anterior, pós filtração com Whatman ($\varnothing=1,6\mu\text{m}$), foi novamente filtrado passando por uma coluna de imunoafinidade (Ochra Test[®] - Vicam) a 1 gota/segundo. A coluna foi lavada com 5mL da solução B (NaCl a 2,5%, NaHCO_3 a 0,5%), seguido de 5mL de água deionizada. A OTA foi eluída com 2mL de metanol e completamente evaporada em corrente de nitrogênio.

4.6.6.4 Quantificação: A quantificação da ocratoxina A nas amostras foi efetuada do mesmo modo descrito no item 4.3.4.3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rastreo Micológico ds Uvas de Santa Catarina

Durante os anos de 2005 e 2006 foram isoladas e identificadas um total de 1.492 estirpes de fungos filamentosos de um total de 50 amostras de uvas tintas viníferas, nas regiões estudadas.

Via de regra, as uvas analisadas estavam em boas condições de fitossanidade, com exceção do observado na vindima de 2006, onde a podridão amarga causada pelo agente *Melanconium fuligineum*, esteve presente em ambas áreas avaliadas, porém, em muito menor extensão nas uvas provenientes do Planalto. A Tabela 5.1 apresenta a média das condições climáticas do período das vindimas (Fevereiro/Março) de 2005 e 2006 para a região do Meio Oeste, representada pela Estação Experimental de Videira da Epagri (Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina):

Tabela 5.1 – Condições climáticas do Meio Oeste nas vindimas (2005/2006)

Vindima (safra)	Temperatura média (°C)	Umidade (%)	Precipitação (mm)
2005	21,97	65,98	93,00
2006	21,28	73,57	174,65

A condição climática observada no período de 2006 reflete o favorecimento ao desenvolvimento do fungo, ou seja, a elevação considerável dos índices pluviométricos (46,75%) e de umidade relativa (10,3%) com discreta oscilação da temperatura média (0,69 °C) mantendo-se na faixa de 21°C. O *M. fuligineum* é um parasita com alta capacidade saprofítica, que exige calor e umidade relativa elevada, e em anos chuvosos recomenda-se a aplicação de defensivos agrícolas nas videiras, por ocasião da maturação. A podridão amarga é uma doença típica de frutos maduros. (AMORIN & KUNIYUKI, 2005).

No rastreo à micobiota normal das uvas referentes às vindimas dos anos de 2005 e 2006 efetuado nas regiões do Meio Oeste e Planalto

Catarinenses, foram recuperadas 1492 estirpes distribuídas em 14 gêneros. A Figura 5.1 apresenta os gêneros isolados com maior frequência: *Cladosporium* (31,6% do total de bagas analisadas), *Alternaria* (31,3%), *Aspergillus* (23,0%), *Penicillium* (22,2%), *Botrytis* (22,3%), *Aureobasidium* (6,9%) e *Rhizopus* (5,0%). Os gêneros *Trichoderma*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Nigrospora* e *Mucor* estiveram presentes em mais de 1% das bagas, enquanto, *Nigrospora*, *Trichotecium* e *Curvularia* tiveram frequência inferior a 1%.

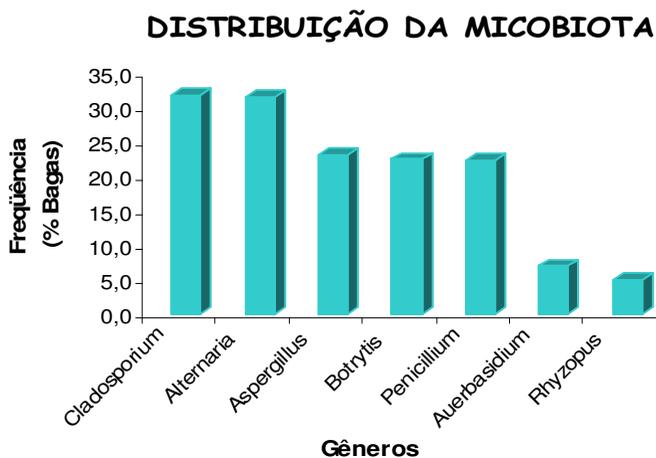


Figura 5.1 – Micobiota predominante nas uvas das regiões do Meio Oeste e Planalto de Santa Catarina

As incidências e os gêneros isolados são concordantes com o observado por outros investigadores em análises realizadas em uvas na época das vindimas. Todos os 14 gêneros aqui isolados, já foram encontrados em uvas (MELKI BEN FREDJI *et al.* 2007; BELLÍ *et al.* 2006, ROMERO *et al.* 2005, SERRA *et al.* 2005 e ABRUNHOSA *et al.* 2001). Com exceção de *Trichotecium* e *Mucor*, os demais já foram isolados de uvas da América do Sul, (GOMEZ *et al.* 2006, ROMERO *et al.* 2005; CHULZE *et al.* 2006, MAGNOLI *et al.* 2003 e DA ROCHA ROSA *et al.* 2002).

Cladosporium foi o gênero mais incidente, BAÚ *et al.* (2005) e ABRUNHOSA *et al.* (2001) registram o gênero como o segundo maior em incidência. SERRA *et al.* (2005) encontraram resultados similares onde os 3 gêneros de maior incidência foram em ordem decrescente: *Cladosporium*, *Botrytis* e *Alternaria*. O intervalo de tempo de

verificação das bagas se deu a cada 02 dias, isso reforça o descrito por SERRA (2005). Quando a autora compara a sua investigação a de outro autor que relata a observação somente ao final de 7 dias (período de incubação), observando também, o crescimento mais lento das colônias de *Cladosporium*, quando relacionado a outros fungos, principalmente *Aspergillus*, mascarando com freqüência a presença do fungo podendo haver uma subestimação da incidência de *Cladosporium* nas bagas.

5.1.1 Incidência fúngica em uvas no Planalto e Meio Oeste Catarinense

Em relação aos gêneros dos fungos filamentosos, a incidência diferiu entre duas regiões para uma significância de resultado ($p < 0,05$) para *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Aureobasidium*, *Rhizopus*, *Fusarium* e *Epicoccum*. Houve diferença para um nível de significância ($p < 0,01$) para *Trichoderma*, *Mucor*, *Nigrospora* e *Trichotecium*. A inferência estatística revela diferenças significativas entre as populações. Para a região do Meio Oeste a predominância em relação ao número de bagas colonizadas foi de: *Cladosporium* (34,2%), *Aspergillus* (26,6%), *Alternaria* (24,2%), *Penicillium* (20,5%), *Botrytis* (20,0%), *Aureobasidium* (7,9%) e *Rhizopus* (6,9%), representando 94,9% de fungos isolados. Enquanto, no Planalto os gêneros de maior incidência foram: *Alternaria* (42,9%), *Cladosporium* (27,4%), *Botrytis* (26,1%), *Penicillium* (25,0%), *Aspergillus* (17,1%), e *Aureobasidium* (5,3%), representando 94,7% dos fungos isolados nessa região. A Tabela 5.2 apresenta a distribuição dos gêneros isolados no rastreamento à micobiota normal das uvas referentes às vindimas dos anos de 2005 e 2006, efetuado nas regiões do Meio Oeste e Planalto Catarinenses:

O gênero *Alternaria* apresentou a maior incidência na região do Planalto, alguns estudos semelhantes realizados em outros países da América do Sul (GOMEZ *et al.* 2006 e MAGNOLI *et al.* 2003), Espanha e França (BAU, *et al.* 2005 e SAGE *et al.* 2004), também revelaram essa ocorrência. A Tabela 5.3 apresenta os dados climatológicos no período das vindimas de 2005/2006, para as regiões do Meio Oeste (Fevereiro/Março) e Planalto (Março/Abril):

Tabela 5.2 – Número de isolados recuperados das uvas de duas regiões catarinenses (safras 2005 e 2006) por plaqueamento direto.

Gêneros	Regiões de Santa Catarina		Total
	Meio Oeste	Planalto	
<i>Alternaria</i> Ness:Fr.	150	163	313
<i>Aspergillus</i> Fr.:Fr.	165	65	230
<i>Aureobasidium</i> Viala & Boyer	49	20	69
<i>Botrytis</i> P. Micheli : Fr.	124	99	223
<i>Cladosporium</i> Link	212	104	316
<i>Curvularia</i> Boedijn	2	0	2
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	6	8	14
<i>Fusarium</i> Link	9	5	14
<i>Mucor</i> Micheli : Fr	9	1	10
<i>Nigrospora</i> Zimm.	4	2	6
<i>Penicillium</i> Link	127	95	222
<i>Rhizopus</i> Ehrenb	43	7	50
<i>Trichoderma</i> Pers.	14	5	19
<i>Trichotecium</i> Pers.	2	2	4
Total de estirpes isoladas	920	572	1492
Total de amostras analisadas	31	19	50
Total de bagas analisadas	620	380	1000

Tabela 5.3 – Índices climáticos médios das regiões do Meio Oeste e Planalto de Santa Catarina no período das vindimas de 2005 e 2006.

Região	Temperatura média (°C)	Umidade relativa (%)	Pluviosidade (mm)	Velocidade do vento (m/s)	Insolação (horas)
Meio Oeste	21,6	69,8	133,8	0,9	210,3
Planalto	15,0	82,2	98,5	1,8	179,1

A região do Planalto quando comparada ao Meio Oeste, apresentou umidade relativa mais elevada em cerca de 15,1%, velocidade de vento superior em 100% (favorecendo a disseminação do fungo), e temperatura inferior em 6,6°C. MASSOLA JR. *et al.* (2005) demonstram que, a *Alternaria porri* sobrevive de uma estação para outras sendo disseminada principalmente pelo vento. A umidade é o fator ambiental mais importante para o desenvolvimento, tendo 21 a

30°C como faixa ótima de temperatura para o desenvolvimento do fungo. Portanto, é possível considerar que os fatores limitantes da podridão por *Alternaria* nas uvas do Planalto foram: a integridade das bagas e à baixa temperatura observada.

O Meio Oeste que teve o predomínio de *Cladosporium* apresentou um índice pluviométrico médio superior em 26,4% ao observado no Planalto; no Brasil, em regiões de alta pluviosidade espécies de *Cladosporium* têm sido descritas como causador de podridões em frutas como acerola (PAPA, 2005), maracujá (FISCHER *et al*, 2005), ameixa, pêssego e nectarina (MARTINS, 2005) e em olerícolas: tomate (KUROZAWA & PAVAN, 2005). Em Santa Catarina tem sido detectada em diversas lavouras de cebola (MASSOLA JR. *et al*. 2005). Em uvas, espécies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Stemphylium* podem causar podridão, podendo ocorrer associados a infecção por *Botrytis* (LOPES, 2002).

A Figura 5.2 apresenta uma placa de Petri com uvas doentes (com podridão) cultivadas em DRBC após 4 dias de incubação, onde é possível verificar, a olho nú, o desenvolvimento de *Aspergillus* negros.



Figura 5.2 – *Aspergillus* “negros” crescidos sobre uva após 4 dias de cultivo em DRBC a 25°C.

O gênero *Aspergillus* foi o quinto em ocorrência no Planalto, sugerindo que ocorram condições menos favoráveis para o seu desenvolvimento, parecendo ser a temperatura e a ventilação, fatores

limitantes ao seu estabelecimento. Situação semelhante foi observada por SERRA (2005) para uma determinada vinha na região do Douro em que a incidência de *Aspergillus* foi significativamente menor, enquanto, a incidência de *Alternaria* foi significativamente maior, a autora sugere que a ventilação e as condições excepcionais do local favoreçam o desenvolvimento da *Alternaria*.

No Meio Oeste a segunda maior incidência foi de *Aspergillus* e, de acordo com SERRA (2005) os *Aspergilli*, em particular os pertencentes a secção *Nigri*, são capazes de crescer a temperaturas mais elevadas e com menos umidade.

Em relação à *Botrytis*, representada na Figura 5.3, observou-se uma inversão entre as ocorrências nas regiões estudadas quando comparadas aos *Aspergilli*, provavelmente pela razão supracitada é que o Meio Oeste apresentou maior incidência desse gênero em relação à *Botrytis*. Para o Planalto, como esperado a incidência de *Botrytis* foi superior ao Meio Oeste pela sua condição climática mais amena (Tabela 5.3), segundo AMORIN & KUNIYUKI (2005) esse fungo é problemático em regiões com temperaturas amenas (15 a 20°C) e com alta umidade na ocasião da maturação da uva.

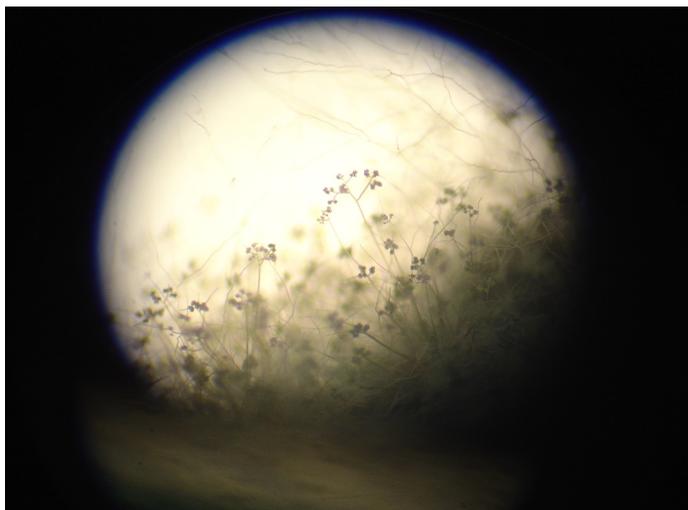


Figura 5.3 – *Botrytis cinerea* crescida em superfície de uva observada ao estereomicroscópio.

A relação entre as frequências relativas dos gêneros *Aspergillus*, *Alternaria* e *Botrytis* para as regiões do Planalto e Meio Oeste durante o

período avaliado (2005/2006) é apresentada através da Figura 5.4:

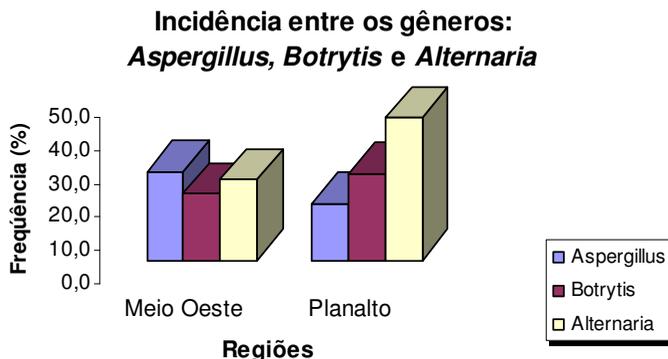


Figura 5.4 – Frequências dos gêneros: *Aspergillus*, *Alternaria* e *Botrytis* em uvas (relação ao número de bagas) do Meio Oeste e Planalto de Santa Catarina.

Analisando a frequência das estirpes (Figura 5.4) percebe-se que, as condições climáticas, parecem ser o determinante para o desenvolvimento desses gêneros. A ocorrência dos *Aspergilli* está intimamente relacionada à capacidade de crescimento em temperaturas mais elevadas e em menor umidade, com uma incidência de 26,6% na Região Meio Oeste em relação ao Planalto que foi de 17,1%. Para *Botrytis*, a frequência foi de 26,1% para o meio Oeste, portanto, superior ao Planalto, onde a umidade mais elevada e temperatura mais amena são favoráveis ao seu desenvolvimento (Tabela 5.3). A umidade e velocidade do vento, certamente, são os fatores mais importantes para o estabelecimento do gênero *Alternaria* que teve uma incidência 18,7% maior na Região Planalto.

5.1.2 Ocorrência das espécies de *Penicillium*

A distribuição das espécies de *Penicillium* em uvas provenientes das regiões do Planalto e Meio Oeste Catarinenses está descrita a seguir na Tabela 5.4:

Tabela 5.4 – Distribuição das espécies de *Penicillium* presentes em uvas do Planalto e Meio Oeste de Santa Catarina durante o período das vindimas de 2005/2006.

Espécies	Regiões de Santa Catarina		Total
	Planalto	Meio Oeste	
<i>P. brevicompactum</i> Dierckx	21	28	49
<i>P. citrinum</i> Thom	10	14	24
<i>P. crustosum</i> Thom	11	15	26
<i>P. digitatum</i>	0	2	2
<i>P. expansum</i> Thom	2	9	11
<i>P. funiculosum</i> Thom	5	7	12
<i>P. griseofulvum</i> Dierckx	0	1	1
<i>P. roqueforti</i> Thom	16	14	30
<i>P. thomii</i> Maire	30	37	67
Total estirpes identificadas	95	127	222
Total bagas analisadas	380	620	1000

Embora, entre os gêneros tenha apresentado distribuição diferente, a frequência das espécies de *Penicillium* entre as regiões não apresentou diferenças significativas. As espécies predominantes foram: *P. thomii* e *P. brevicompactum*, representando 52,2% dos isolados.

A única espécie que apresentou frequências relativas distintas foi *P. roqueforti*, com 4,2% e 2,3% para o Planalto e Meio Oeste, respectivamente, esta foi a terceira em ocorrência, SAGE *et al.* (2004) referiram as espécies de *P. brevicompactum* e *P. roqueforti* como espécies mais ocorrentes em uvas francesas.

Das 9 espécies encontradas nas uvas de Santa Catarina, 08 foram isoladas em uvas portuguesas por SERRA *et al.* (2005) e por BAU *et al.* (2005) em uvas espanholas. Na América do Sul, DA ROCHA ROSA *et al.* (2002) registram a ocorrência de apenas 03 espécies para uvas argentinas (*P. chrysogoneum*, *P. glabrum* e *P. decumbens*).

5.1.3 Ocorrência das espécies de *Aspergillus*

No presente trabalho foram recuperadas 11 espécies (incluindo o teleomorfo *E. nidulans*), dentre essas oito foram referidas por BAU *et al.* (2005) em uvas da Espanha e dez foram expostas por SERRA *et al.* (2005).

A ocorrência das espécies de *Aspergillus* foi divergente entre as

regiões do Planalto e Meio Oeste, onde a incidência foi em ordem decrescente: agregado *A. niger* ($p < 0,05$), *A. fumigatus* ($p < 0,05$), *A. flavus* ($p < 0,05$), *A. terreus* ($p < 0,05$), *A. japonicus* ($p < 0,01$), *A. oryzae* ($p < 0,01$), *A. ustus* ($p < 0,01$) e *A. flavipes* ($p < 0,01$). e *A. carbonarius*, *A. clavatus* e *E. nidulans*, estiveram presentes em menos de 1% dos bagos (Tabela 5.3).

Dentre as 230 estirpes de *Aspergillus* isoladas, 71,1% foram detectadas na região do Meio Oeste, indicando que deva ter sido a temperatura média de 15,0°C (Tabela 5.2) registrada no período das vindimas no Planalto o principal fator determinante.

A Tabela 5.5 mostra as espécies de *Aspergillus* recuperadas durante as vindimas de 2005/2006 das regiões vitícolas avaliadas:

Tabela 5. 5 – Distribuição das espécies de *Aspergillus* presentes em uvas do Planalto e Meio Oeste de Santa Catarina no período das vindimas de 2005 e 2006.

Espécies	Regiões de Santa Catarina		Total
	Planalto	Meio Oeste	
<i>A. carbonarius</i> Thom	0	2	2
<i>A. clavatus</i> Desm.	0	2	2
<i>A. flavipes</i> Thom & Church	3	7	10
<i>A. flavus</i> Link	12	31	43
<i>A. fumigatus</i> Fresen.	11	38	49
<i>A. japonicus</i> Saito	3	8	11
<i>A. niger</i> (agregado)	19	50	69
<i>A. oryzae</i> Cohn	6	5	11
<i>A. terreus</i> Thom	8	13	21
<i>A. ustus</i> Thom & Church	3	8	11
<i>Emericella nidulans</i> Vuill.	0	1	1
Total de estirpes isoladas	65	165	230
Total de bagas analisadas	380	620	1000

Em ambas as regiões as estirpes pertencentes ao agregado *A. niger* foram predominantes. Outros trabalhos revelam também o predomínio de agregado *A. niger* a altura da vindima, sugerindo o seu predomínio independente da posição geográfica (MELKI BEN FREDJI *et al.* 2007; BELLÍ *et al.* 2006; BAU *et al.* 2005 e SERRA *et al.* 2003). Esporos negros possuem proteção à luz UV e luz solar, apresentando vantagem

competitiva em climas mais quentes (PITT & HOCKING, 1997).

DA ROCHA ROSA *et al.* (2002) em um rastreio efetuado em uvas na Argentina (Mendoza) descrevem a não detecção de *A. carbonarius* e a presença do fungo em uvas do Brasil (região da Campanha) como segundo em incidência do gênero. Em nossa investigação, *A. carbonarius* foi somente observado somente no Meio Oeste de Santa Catarina e, em ocorrência inferior a 1%.

Para ambas regiões aqui estudadas a segunda espécie em incidência foi *A. fumigatus*. BAU *et al.* (2005) registraram o *A. fumigatus* como a terceira espécie em frequência no rastreio efetuado em uvas espanholas.

A. flavus foi a terceira em ocorrência para as regiões do Planalto (12,43%) e Meio Oeste (30,58%), MAGNOLI *et al.* (2003), em um estudo similar em 50 amostras de uvas vinífera da vindima de 2001 em Mendoza, incluindo variedades Malbec, Chardonnay, Merlot, Cabernet e Bonarda, observaram a presença de 7 gêneros de fungos filamentosos com o predomínio de *A. niger* var. *niger* (61%) e *A. flavus* (17%); KLICH (2002) referencia esse último fungo como produtor de aflatoxina e ácido ciclopiazônico (geralmente produzido concomitante com a aflatoxina).

A. oryzae foi aqui isolado não sendo observado em outros rastreios (Tabela 5.2). Trata-se de uma espécie frequentemente isolada de solos e partes vegetativas de plantas, KLICH (2002). *Aspergillus ochraceus* não foi isolado durante o período de avaliação em nenhuma das regiões aqui estudadas.

5.1.4 Potencial produtor de OTA dos *Aspergillus negros* em cultura pura

Todas as 82 estirpes de *Aspergillus negros* (agregado *A. niger*, *A. japonicus* e *A. carbonarius*) recuperadas durante o período de avaliação (vindimas 2005/2006) das regiões vitícolas (Planalto e Meio Oeste de Santa Catarina), foram testadas quanto a capacidade produtora de OTA em cultura pura. A Tabela 5.6 demonstra a recuperação de OTA em meio de CYA+ concentrado de Czapeck, efetuada em 2 ensaios, bem como os limites de detecção e quantificação da ocratoxina A.

Tabela 5.6 – Recuperação de OTA adicionada em CYA usando metanol como solvente.

Ensaio	TR ^a (%) 03 réplicas	TR ^a ± SD ^b (%)	RSD _r ^c (%)	RSD _R ^d (%)
Ensaio 01	98,5	93,3 ± 6,7	7,2	-
	95,8			
	85,7			
Ensaio 02	97,5	94,6 ± 6,4	6,8	-
	99,0			
	87,2			
Média dos Ensaio (01 e 02)	93,9	93,9 ± 5,9	7,0	6,3
Limite de detecção OTA	0,15 µg/Kg			
Limite de quantificação OTA	0,05 µg/Kg			

^aTaxa de recuperação; ^bDesvio padrão; ^cDesvio padrão relativo em repetibilidade; ^d Desvio padrão relativo em repetibilidade (n = 6).

Na sequência, na Tabela 5.7 são demonstradas as estirpes de *Aspergillus* da seção *Nigri* isoladas, capazes de produzir ocratoxina A em cultura pura.

Do total de 69 exemplares de agregado *A. niger* avaliados, apenas 11 foram produtoras de OTA, correspondendo a 15,9%, outros investigadores observaram os seguintes percentuais, pertencentes a esse mesmo grupo: 4% de um total de 294 isolados de uvas portuguesas (SERRA *et al.* 2003) e, 24% de 196 isolados de uvas argentinas desidratadas (MAGNOLI *et al.* 2004). DA ROCHA ROSA (2002) relata que das estirpes de *A. niger* isoladas da Argentina e do Brasil, 17 e 30%, respectivamente, produziram OTA em cultura pura.

Para o *A. carbonarius*, das duas estirpes isoladas, apenas uma foi positiva para OTA (Tabela 5.7), a capacidade produtora de OTA por esse fungo é conhecida. DA ROCHA ROSA *et al.* (2002) referem que 25% das estirpes isoladas de uvas brasileiras (região da Campanha) foram OTA (+) produzindo a micotoxina em concentrações de 18 a 234 µg.g⁻¹.

Das 11 estirpes de *A. japonicus* isoladas e avaliadas nenhuma foi produtora de OTA. Outros autores, também referem a incapacidade de produção de OTA por exemplares isolados de uvas (BEJAOU *et al.* 2006a; SERRA, 2005 e BAU *et al.* 2005). No entanto, MAGNOLI *et al.* (2003) descrevem a produção de OTA por 1 de 2 estirpes de *A.*

japonicus isoladas de uvas na Argentina, enquanto, PONSONE *et al.* (2007) detectou a produção por 22,2% de um total de 72 isolados na vindima. BATTILANI *et al.* (2003b) indicam exemplares OTA (+) isolados de uvas italianas, mas em apenas 2,77% de um total de 108 isolados.

Tabela 5.7 – Estirpes de *Aspergillus* negros recuperados durante as vindimas de 2005 e 2006 nas regiões do Planalto e Meio Oeste de Santa Catarina.

Região	Estirpes (referência)	Concentração de OTA ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Meio Oeste	agregado <i>A. niger</i> (SV3)	1,35
	agregado <i>A niger</i> (MV1)	2,56
	agregado <i>A niger</i> (CSV1)	45,14
	agregado <i>A niger</i> (CSV7)	27,65
	agregado <i>A niger</i> (CSV5)	8,51
	agregado <i>A niger</i> (CSV6)	52,36
	agregado <i>A niger</i> (MV1B)	47,23
	agregado <i>A niger</i> (CSV1B)	52,73
	<i>A. carbonarius</i> (MVD1)	87,71
Planalto	agregado <i>A niger</i> (MP4)	1,56
	agregado <i>A niger</i> (CSL8)	1,52
	agregado <i>A niger</i> (MP5)	63,31

5.2 Micotoxinas nas Uvas

O sistema agroalimentar é uma das áreas onde o Brasil vem desenvolvendo esforços na melhoria da competitividade, dentre esses, está a busca da melhoria da qualidade dos vinhos finos e a exportação de frutas frescas. A susceptibilidade de frutas à infecção fúngica é um dos fatores a serem considerados. Quando se pretende a garantia da qualidade deve-se enfatizar o potencial micotoxigênico dos fungos associados ao campo, transporte e armazenagem, como é o caso das micotoxinas: OTA e patulina.

5.2.1 Ocratoxina A

A primeira etapa desse trabalho compreendeu a avaliação do cumprimento dos critérios (taxa de recuperação, condições de repetibilidade e de reprodutibilidade) estabelecidos pela Diretriz 2002/26/EC da Comissão Européia. A taxa de recuperação foi de 94,1%, $RSD_r = 6,8$ e $RSD_R = 7,5$. Os limites foram para detecção de $0,04 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ e quantificação de $0,05 \mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ (menor valor utilizado na curva de calibração). Os valores obtidos atenderam ao exigido para a referida norma e estão presentes na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Parâmetros de controle para determinação de OTA para [2 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$].

Ensaio	TR ^a (%) 03 réplicas	TR ^a + SD ^b (%)	RSD ^c _r (%)	RSD ^d _R (%)
Ensaio 01	98,3	90,4 ± 7,8	8,7	-
	82,6			
	90,4			
Ensaio 02	92,7	97,7 ± 4,3	4,4	-
	100,5			
	99,8			
Média dos Ensaio (01 e 02)	93,9	94,1 ± 6,1	6,6	7,3
Limite de detecção OTA	0,04 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$			
Limite de quantificação OTA	0,05 $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$			

a = Taxa de recuperação; b = desvio padrão; c = desvio padrão relativo em condições de repetibilidade; d = desvio padrão em condições de reprodutibilidade

Os cromatogramas obtidos foram aceitáveis, apresentam poucos interferentes como frequentemente relatado em processos de limpeza por IAC (*Immunoaffinity Column*) devido a sua especificidade e seletividade. Em algumas amostras de uva observou-se a presença de um composto com o tempo de retenção muito próximo ao da OTA, para confirmação realizou-se a adição de padrão, não ocorrendo incremento do pico (dados não mostrados).

No presente estudo a OTA foi detectada em 40,6% (13) de um total de 32 amostras de uvas testadas, no Planalto 45,4% das uvas foram

OTA-positivas enquanto para o Meio Oeste foram 38,1%. Em um estudo similar realizado na Tunísia, LASRMAM *et al.* (2007) observaram a presença em 75% de um total de 8 amostras de uvas provenientes da vindima (4 brancas e 4 tintas). Os autores registraram positividade para a OTA em todas as exemplares tintas.

As maiores concentrações de OTA foram observadas na vindima de 2005 em ambas regiões. No Meio Oeste, o nível mais elevado foi $0,77 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de uma amostra de uva Pinot Noir proveniente do município de Água Doce, em estágio inicial de sobrematuração e, com discreta podridão por *Botrytis cinerea* e *Aspergillus carbonarius*. O máximo no Planalto foi de $0,43 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ em uma uva Cabernet Sauvignon proveniente de um vinhedo de São Joaquim, com sobrematuração e focos de podridão colonizados por *Aspergillus* da seção *Nigri* e *Botrytis cinerea*, demonstrando a importância da aplicação de boas práticas agrícolas na redução à exposição a OTA. Essas 2 amostras não foram utilizadas para avaliação estatística em função do estado fitossanitário em que se encontravam. No ano de 2006 não foram observadas amostras com sinais de deterioração e os níveis máximos detectados para OTA foram de 0,190 e $0,119 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ para as regiões do Meio Oeste e Planalto, respectivamente.

A Tabela 5.9 apresenta os resultados das determinações das micotoxinas (OTA e Patulina) nas amostras de uvas analisadas provenientes das 2 regiões investigadas.

A Figura 5.5 apresenta a concentração de OTA das uvas provenientes das safras (2004/2005) e (2005/2006), bem como, a média mensal dos principais dados climatológicos do Planalto. Os dados climatológicos compreendem o período da brotação à colheita de cada ano avaliado.

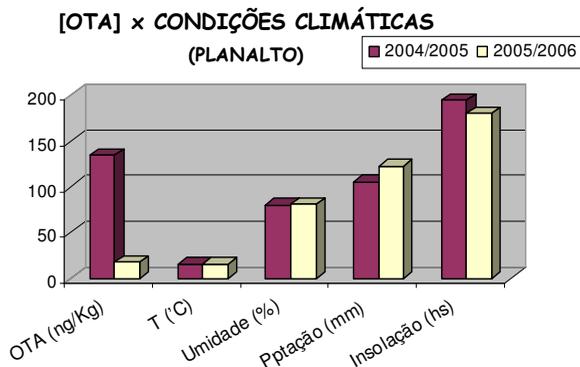


Figura 5.5 – Condições climáticas do Planalto (brotação à colheita) *versus* [OTA]

Tabela 5.9 - Concentração de OTA e Patulina nas uvas do Meio Oeste e Planalto de Santa Catarina nas vindimas (2005/2006)

Regiões	Safra	Variedade	Sub-regiões vitivinícolas	OTA ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)	Patulina ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$)
Meio Oeste	2005	Sangiovese	Água Doce	ND	ND
		Pinot noir*	Água Doce	0,77*	ND
		Cabernet Sauvignon	P. Preto	0,36	ND
		Cabernet Sauvignon	Tangará	ND	ND
		Cabernet Sauvignon	Videira	0,37	ND
		Cabernet Sauvignon	Videira	0,16	ND
		Cabernet Sauvignon	Videira	0,49	ND
	Merlot	P.Preto	ND	ND	
	2006	Sangiovese	Água Doce	0,19	ND
		Cabernet Sauvignon	Caçador	ND	ND
		Merlot	Herciliópolis	0,06	ND
		Ancellotta	Iomerê	ND	ND
		Cabernet Sauvignon	Iomerê	ND	ND
		Cabernet Sauvignon	Iomerê	0,067	ND
		Cabernet Sauvignon	P. Preto	0,081	ND
		Cabernet Sauvignon	Tangará	ND	ND
		Cabernet Sauvignon	Tangará	0,061	ND
		Merlot	Videira	0,069	ND
		Cabernet Sauvignon	Videira	0,122	ND
		Cabernet Sauvignon	Videira	ND	ND
Merlot		Videira	0,014	ND	
Planalto	2005	Cabernet Sauvignon	São Joaquim	ND	ND
		Cabernet Sauvignon	São Joaquim	0,43**	ND
		Cabernet Sauvignon	São Joaquim	0,27	ND
	2006	Cabernet Sauvignon	Lages	0,016	ND
		Cabernet Sauvignon	São Joaquim	ND	ND
		Merlot	São Joaquim	0,009	ND
		Merlot	São Joaquim	ND	ND
		Syrah	São Joaquim	ND	ND
		Sangiovese	São Joaquim	0,119	ND
		Cabernet Franc	São Joaquim	0,005	ND
Cabernet Sauvignon	São Joaquim	ND	ND		

* podridão por *Botrytis* e *Aspergillus carbonarius*;

** sobrematuração e focos de podridão por *Botrytis* e *Aspergillus* da secção Nigri

No Planalto as concentrações médias de OTA tiveram uma variação de 86,7% no período avaliado, ou seja, $0,135 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ em 2005 e $0,019 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ no ano de 2006, a insolação foi 7,1% inferior em relação ao ano anterior. A umidade e a temperatura tiveram uma variação pouco significativa a precipitação teve um aumento de 13,84% em relação ao ano anterior.

A concentração de OTA e a média mensal dos principais dados climatológicos do Meio Oeste compreendendo o período da brotação à colheita de cada ano estudado, estão dispostas na Figura 5.6.

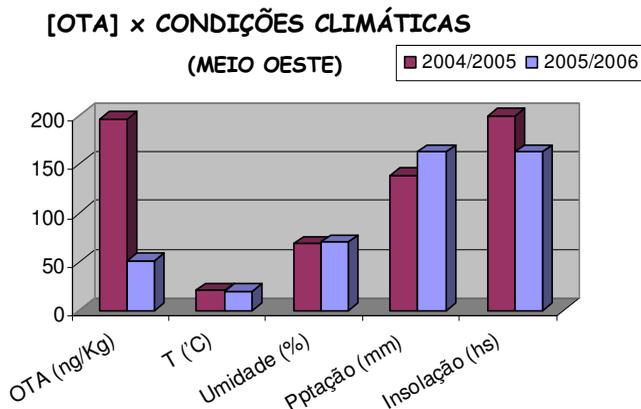


Figura 5. 6 – Condições climáticas do Meio Oeste (brotação à colheita) *versus* [OTA]

Para a Região do Meio Oeste os níveis médios de OTA apresentaram uma variação de 74,11% no período avaliado, ou seja, $0,197 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ em 2005 e no ano de 2006 foi $0,051 \mu\text{g.Kg}^{-1}$. A insolação foi inferior em 19,0%, quando comparada ao ano anterior. A umidade e a temperatura tiveram uma variação pouco significativa a precipitação teve um aumento de 14,6% em relação ao ano anterior.

As regiões estudadas apresentaram variação considerável da OTA de um ano para o outro, corroborando com o descrito por ROUSSEAU (2004) e BATILANI *et al.* (2003b) com relação verificação da variação anual da concentração de OTA em um mesmo vinhedo, sugerindo que esse fato se deva às variações meteorológicas.

A variação das condições climáticas apresentou comportamento muito similar para as duas regiões, com certa estabilidade de temperatura e de umidade, menos horas de insolação e aumento da precipitação em relação ao primeiro ano. Com isso, os níveis de OTA reduziram consideravelmente em 2006 para ambas as regiões. SERRA (2005) observou redução nos níveis de OTA em relação ao estágios anteriores no processo de maturação das uvas, onde ela cita que no momento era impossível especular se o fato se devia a uma questão de amostragem, ou outros fenômenos como degradação por fungos ou a diluição com o aumento do volume; dentre os vários fatores que

contribuem para o aumento ou redução dos níveis de OTA, fica aqui uma pergunta: “Poderá o aumento da pluviosidade influenciar na redução da concentração em função da diluição a exemplo de outros compostos da uva?”. Para BATTILANI *et al.* (2003b) o conhecimento da epidemiologia dos fungos produtores de OTA em uvas é realmente muito pobre, o patógeno está definido, mas o papel do hospedeiro, em particular de variedades de uva distintas, assim como o ambiente ainda não estão claros.

A Figura 5.7 demonstra que os níveis de OTA variaram significativamente entre as regiões, o Meio Oeste apresentou níveis médios de $0,124\mu\text{g.Kg}^{-1}$, enquanto, o Planalto revelou valores de $0,076\mu\text{g.Kg}^{-1}$, colaborando com as observações de estudos anteriores de que os fatores mais notáveis em relação à concentração de OTA nas uvas não são as práticas culturais, mas o ano e origem geográfica (SERRA, 2005; BATTILANI & PIETRI, 2002 e BATTILANI *et al.* 2001).

[OTA] X CONDIÇÕES CLIMÁTICAS EM SANTA CATARINA (2005/2006)

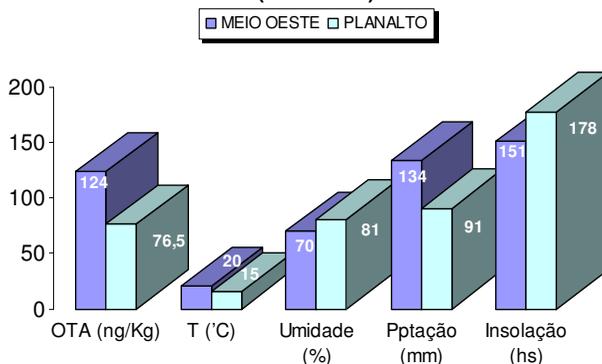


Figura 5.7 – Concentração média de OTA x Condições climáticas do Meio Oeste e Planalto (2005/2006)

Quando se faz uma avaliação da variação dos fatores climatológicos (2005/2006) em cada um dos microclimas observa-se que as principais variáveis meteorológicas que apresentaram influência na produção de OTA foram: precipitação e insolação (Figuras 5.5 e 5.6). Porém, quando essa analogia é efetuada à nível de macroclima, observa-se relação diretamente proporcional com a temperatura e precipitação e inversamente para umidade e radiação solar. A umidade atmosférica abundante é geralmente menos crítica durante a colonização do tecido da planta hospedeira, entretanto, a umidade é freqüentemente crítica

durante a esporulação (TONIETTO *et al.* 2002). De acordo com ROTEM (1978), o patossistema é um resultado de uma interação complexa biológica-ambiental, vários graus de compensação podem ocorrer nos componentes biológicos em resposta a fatores ambientais específicos.

A temperatura média mensal do biênio avaliado apresentou uma variação de 5^oC, a menor concentração de OTA nas uvas foi verificada na região de temperaturas mais amenas e com umidade relativa mais elevada, ou seja, a temperatura sobrepôs o fator umidade em relação a presença da OTA nas uvas.

A Tabela 5.10 apresenta níveis médios de OTA encontrados e a incidência do gênero *Aspergillus* em observada na micobiota das uvas:

Tabela 5.10 – Concentração de OTA e frequência do gênero *Aspergillus* nas uvas do Meio Oeste e Planalto Catarinenses.

Região	OTA ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)	Gênero <i>Aspergillus</i> em relação a micobiota (%)	Espécies de agregado <i>A.</i> <i>niger</i> em relação aos <i>Aspergilli</i> (%)	Espécies de <i>A.</i> <i>carbonarius</i> em relação aos <i>Aspergilli</i> (%)
Meio Oeste	0,124	17,9	30,0	0,8
Planalto	0,076	11,4	26,2	0,0
Média	0,100	14,65	28,1	0,4

Analisando a frequência das estirpes e os níveis de OTA, percebe-se uma estreita relação entre eles, ou seja, um coeficiente de determinação ($R^2 = 0,987$). Quando se faz a associação dessa correlação com as condições climáticas (Figura 5.8) observa-se que parecem ser o determinante para o desenvolvimento desse gênero para ambas regiões, visto que, as condições de ocorrência dos *Aspergillus* intimamente relacionada à capacidade de crescimento em temperaturas mais elevadas e em menor umidade e, conseqüentemente para produção da OTA.

BATILANI *et al.* (2006) efetuaram um estudo de 3 anos em vinhedos de diferentes regiões da Itália, confirmando o efeito da localização geográfica do vinhedo sobre a flora fúngica (*Aspergillus* negros) e sua incidência nos diferentes anos, porém as condições meteorológicas exerceram um papel importante na colonização das bagas e na produção de OTA.

5.2.2 Patulina

A taxa de recuperação obtida para a patulina nas uvas foi de 75% para uma concentração inicial de $20 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, com um $\text{RSD}_r = 13,0$ e $\text{RSD}_R = 18,7$. Os limites foram para detecção de $0,22 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e quantificação de $1,0 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ (menor valor utilizado na curva de calibração). Os valores atenderam ao proposto pela DIRETRIZ 2003/78/EC da Comunidade Européia que determina os métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos níveis de patulina em gêneros alimentícios. A Tabela 5.11 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de recuperação da patulina:

Tabela 5.11 – Parâmetros de controle para determinação de patulina para [$20 \mu\text{g.Kg}^{-1}$].

Ensaio	TR ^a (%) 03 réplicas	TR ^a + SD (%)	RSD _r ^b (%)	RSD _R ^c (%)
Ensaio 01	84,5	$68,0 \pm 14,7$	21,4	-
	63,2			
	56,4			
Ensaio 02	92,1	$82,0 \pm 11,3$	13,8	-
	69,8			
	84,1			
Média dos Ensaio (01 e 02)	75,0	$75,0 \pm 13,0$	17,6	18,7
Limite de detecção Patulina	$0,22 \mu\text{g.Kg}^{-1}$			
Limite de quantificação Patulina	$1,0 \mu\text{g.Kg}^{-1}$			

a = Taxa de recuperação; b = desvio padrão; c = desvio padrão relativo em condições de repetibilidade; d = desvio padrão em condições de reprodutibilidade

Fernandez-Trevejo *et al.* (2001), efetuaram a validação do método para determinação de patulina em sucos e purês de frutas por HPLC com detecção por UV, obtiveram taxa de recuperação mais elevada, ou seja, 82% para um *spiking* médio de $36,39 \mu\text{g.L}^{-1}$.

No presente estudo a patulina não foi detectada em 32 amostras de uvas analisadas, ou seja, 100% das amostras das vindimas (2005 e 2006). Resultados similares foram obtidos por Caldas *et al.* (2008) num levantamento em 40 amostras de uvas finas de vinhedos do Estado do Paraná na safra 2003/2004, onde todas foram patulina-negativas. Sylos & Rodrigues Amaya (1999) investigaram 111 sucos processados de

vários tipos de frutas utilizando HPLC/UV. Todas amostras de suco de uvas foram negativas para a patulina. No entanto, a *Directorate-General Health and Consumer Protection* (DGHCP, 2002), reporta um levantamento realizado em 324 amostras de suco e mostos de uvas, 39,5% foram positivas para patulina.

No rastreio à biota de fungos filamentosos nas uvas, aqui realizado, foram isoladas 1492 estirpes fúngicas, com predomínio dos gêneros *Cladosporium* e *Alternaria*. Apenas 11 estirpes de *P. expansum* foram encontradas, representando 0,73% do total de isolados, essa baixa incidência pode ser um dos fatores relacionados à não detecção de patulina nas uvas, visto que, segundo MORALES *et al.* (2007) o *P. expansum* é considerado o principal produtor dessa micotoxina em frutas. Caldas *et al.* (2008) levantam a alta incidência de *Cladosporium*, *Alternaria* e *Rhizopus* (não produtores de patulina) como uma das possibilidades para justificar a ausência da micotoxina nas uvas por eles investigadas.

5.3 Ácido D-Glucônico e sua Relação com a Micobiota de uvas produzidas em Santa Catarina

A concentração de ácido glucônico em mostos e vinhos é própria de fontes ácidas, sendo produzidos por fungos e/ou bactérias. *Aspergillus*, *Botrytis*, e *Penicillium sp.* oxidam a glucose para produzir ácido glucônico. Este não é utilizado pelas leveduras ou bactérias, podendo ser usado como um indicador de deterioração de frutas. Por essa razão a concentração de ácido glucônico foi determinada em 32 amostras de uvas tintas obtidas nas vindimas de 2005 e 2006 e está representada na Tabela 5.12:

As concentrações de ácido D-glucônico nas uvas variaram de 0,082 a 2,646 g.Kg⁻¹, porém, a média foi de 0,528 (± 0,035) g.Kg⁻¹. As concentrações médias de ácido D-glucônico foram 0,361 e 0,615 g.Kg⁻¹ nos anos de 2005 e 2006, respectivamente. Zoecklein (2006) em um estudo efetuado com mostos de uvas Riesling na Virgínia reporta que os níveis de ácido glucônico em uvas “limpas” e em seus vinhos são próximos 0,5 g.L⁻¹. Fischer e Berger (2007), apresentam uma análise comparativa de 3 amostras de uvas, Riesling, Pinot noir e Pinot blanc, onde as concentrações de ácido glucônico foram: 3,2; 0,1 e zero (g/L), respectivamente. McCLOSKEY (1974) observou índices de ácido glucônico em vinhos californianos de zero a 3,09 (g.L⁻¹).

Tabela 5.12 - Concentração de ácido glucônico em uvas produzidas em Santa Catarina (Safras 2005/2006)

Regiões	Safra	Variedade	Sub-regiões vitivinícolas	[Ácido D-glucônico] ± SD ^c (g.Kg ⁻¹)	
Meio Oeste	2005	Sangiovese	Água Doce	0,118 ± 0,029	
		Pinot noir ^a	Água Doce	0,224 ± 0,025	
		Cabernet Sauvignon	P. Preto	0,082 ± 0,024	
		Cabernet Sauvignon	Tangará	0,864 ± 0,098	
		Cabernet Sauvignon	Videira	0,094 ± 0,007	
		Cabernet Sauvignon	Videira	0,152 ± 0,021	
			Merlot	P.Preto	0,470 ± 0,056
			Sangiovese	Água Doce	0,247 ± 0,039
			Cabernet Sauvignon	Caçador	1,342 ± 0,061
			Merlot	Herciliópolis	0,091 ± 0,006
			Ancellotta	Iomerê	0,121 ± 0,033
			Cabernet Sauvignon	Iomerê	0,337 ± 0,018
			Cabernet Sauvignon	Iomerê	0,153 ± 0,018
		2006	Cabernet Sauvignon	P. Preto	1,757 ± 0,037
			Cabernet Sauvignon	Tangará	0,841 ± 0,049
			Cabernet Sauvignon	Tangará	0,277 ± 0,016
			Merlot	Videira	0,101 ± 0,023
			Cabernet Sauvignon	Videira	2,611 ± 0,064
		Cabernet Sauvignon	Videira	0,491 ± 0,031	
		Merlot	Videira	0,238 ± 0,007	
Planalto	2005	Cabernet Sauvignon	São Joaquim	0,560 ± 0,077	
		Cabernet Sauvignon ^b	São Joaquim	0,348 ± 0,037	
		Cabernet Sauvignon	São Joaquim	0,487 ± 0,094	
			Cabernet Sauvignon	Lages	2,646 ± 0,081
			Cabernet Sauvignon	São Joaquim	0,232 ± 0,006
			Merlot	São Joaquim	0,266 ± 0,023
		2006	Merlot	São Joaquim	0,111 ± 0,011
			Syrah	São Joaquim	0,115 ± 0,008
			Sangiovese	São Joaquim	0,166 ± 0,019
			Cabernet Franc	São Joaquim	0,451 ± 0,027
		Cabernet Sauvignon	São Joaquim	0,324 ± 0,017	

a = podridão por *Botrytis sp* e *Aspergillus carbonarius*

b = sobrematuração e focos de podridão por *Botrytis* e *Aspergillus* da secção *Nigri*

c = desvio padrão; (n=3)

Cuadrado *et al.* (2005) em um estudo com 40 amostras de mostos e vinhos provenientes de “La Mancha” e “Montilla-Moriles” obtiveram níveis de 0,4 a 1,2 g.L⁻¹, salientam que as condições climáticas da safra avaliada foram boas, ou seja desfavoráveis ao desenvolvimento de

infecção por *Botrytis*. Fischer e Berger (2007), após uma avaliação visual e química (ácido glucônico e glicerol) em 22 amostras de uvas contaminadas por *Botrytis*, observaram uma variação de até 40% entre os níveis de ácido glucônico e o grau de podridão, e definiram que o fator decisivo para a qualidade de um vinho não é a aparência externa das uvas e sim o efeito da podridão na sua composição e, portanto, do próprio vinho.

No presente estudo observou-se um aumento de 41,3% nos níveis de ácido D-glucônico nas uvas da safra de 2006. Todas as 4 amostras que apresentaram níveis superiores a 1,0 g.Kg⁻¹ foram da variedade Cabernet Sauvignon, três delas estavam afetadas pela podridão amarga de forma bastante evidente, sendo, exatamente as amostras que apresentaram os níveis mais elevados de ácido D-glucônico, sendo duas do Meio Oeste (Videira e Pinheiro Preto) e outra do Planalto (Lages). Mesmo assim, a concentração média obtida para o ano de 2006 foi inferior a 1,0 g.Kg⁻¹ indicando um bom grau de sanidade das uvas.

5.3.1 *Botrytis sp.* versus [Ácido D-glucônico]

Dentre os efeitos da ação da *Botrytis cinerea* nas uvas está o acúmulo de ácido glucônico como metabólito secundário decorrente do seu desenvolvimento, associado ou não à presença de outros microrganismos. O ácido glucônico confere um caráter grosseiro, pesado e de falta de delicadeza aos vinhos (GOMES, 2006).

Diante das razões acima expostas a correlação entre concentrações de ácido D-glucônico e a população de *Botrytis sp* foi investigada neste estudo e é apresentada na Figura 5.8:

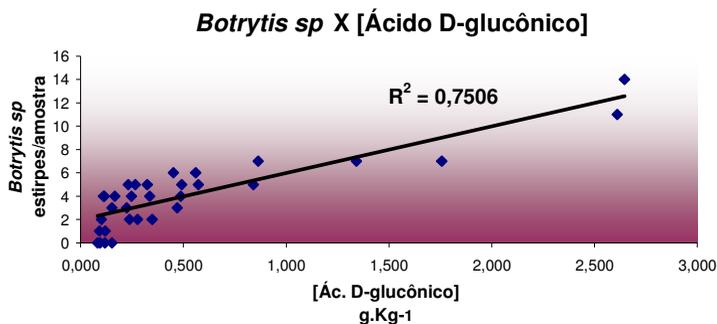


Figura 5. 8 - Dispersão entre a população de *Botrytis sp.* e a concentração de ácido glucônico nas uvas.

Para a população de *Botrytis* analisou-se todas as amostras provenientes das regiões do Planalto e Meio Oeste de Santa Catarina recolhidas durante as vindimas (2005 e 2006). Quando avaliadas em conjunto e o coeficiente determinante (R^2) foi de 0,751, onde 24,9% da variação não pôde ser explicada. Portanto, investigou-se a relação com cada safra, de maneira individual.

A partir das Figuras 5.9 que apresentam a análise de regressão referente aos dados obtidos nos anos de 2005 (Fig. 5.9a) e 2006 (Fig. 5.9b), é possível observar a dispersão entre a população de *Botrytis sp.* e a concentração de ácido D-glucônico nas uvas recolhidas durante a vindima.

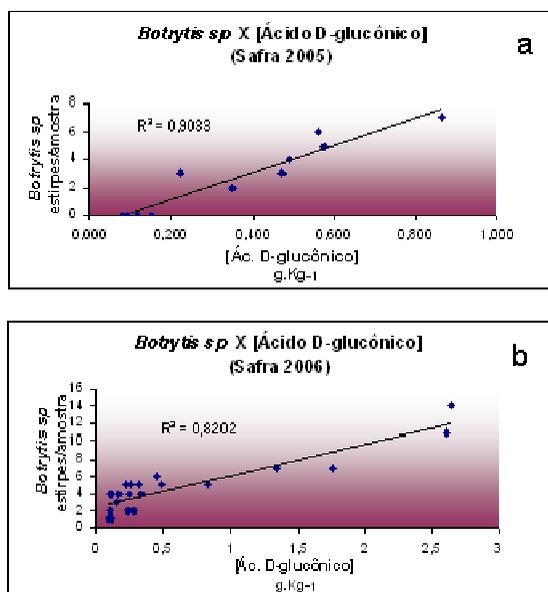


Figura 5.9 - Dispersão entre a população de *Botrytis sp.* versus [ácido glucônico] nas uvas: a: (Safra 2005) e b: (Safra 2006).

Os coeficientes de determinação (R^2) observados foram as seguintes: 0,903 para a safra de 2005 (Figura 5.10a) e 0,820 para a safra de 2006 (Figura 5.9b). Valores similares foram encontrados por MENEGUZZO et al. (2006) em estudo efetuado em vinho branco vinificado com uvas com diferentes níveis de podridão por *Botrytis*, observou uma relação de 0,882. MÍNGUEZ (2003) comenta sobre duas experiências onde, na maioria dos casos, houve uma boa correlação

entre a inexistência ou a presença de testemunhais de OTA em mostos e vinhos e estratégias de tratamento anti-*Botrytis* em vinhedos quando efetuados corretamente; um dos estudos foi efetuado na Espanha pelo próprio autor e o outro, na França por um outro pesquisador.

No ano de 2005, embora duas amostras tenham apresentado infecção visual por *Botrytis*, nenhuma delas apresentou valor igual ou superior à $1,0 \text{ g.Kg}^{-1}$ de ácido D-glucônico. Em 2006 foram observados que em 12,5% apresentaram níveis de ácido D-glucônico superiores a $1,0 \text{ g.Kg}^{-1}$, no entanto, nenhuma das amostras apresentou podridão cinzenta (Tabela 5.12), porém, a podridão amarga estava presente em 3 amostras (Planalto: $2,646 \text{ g.Kg}^{-1}$ e Meio Oeste: $2,611$ e $1,757 \text{ g.Kg}^{-1}$), apresentando certa concordância com o descrito por ZOECKLEIN (2006) que relata que a concentração de ácido D-glucônico em vinhos produzidos a partir de uva contaminada com *B. cinerea* em associação com podridão amarga ou podridões comuns, onde crescimento bacteriano acontece juntamente com o crescimento do fungo, podem atingir níveis superiores a 5 g.L^{-1} . O aumento da correlação da concentração do ácido D-glucônico com a avaliação da produção anual, evidencia a estreita relação com a interferência dos fatores climáticos. Para tanto, as condições climatológicas referentes ao período das vindimas foram avaliadas. A Fig. 5.11 demonstra as condições climáticas referentes à safra de 2005 para as regiões do Meio Oeste (Fevereiro/Março) e Planalto (Março/Abril), bem como, as concentrações de ácido D-glucônico.

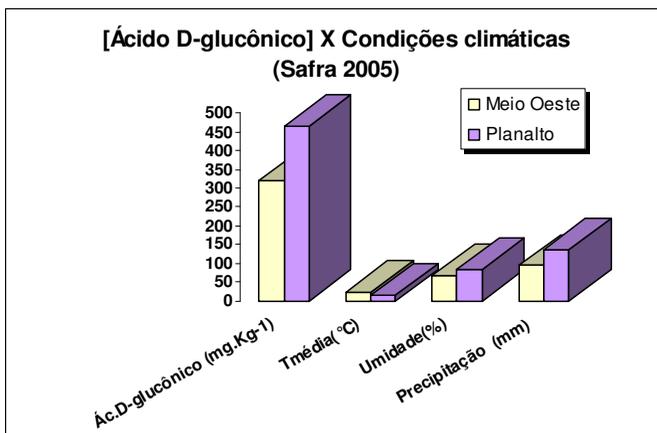


Figura 5. 10 – Correlação entre a [Ácido glucônico] e as condições climáticas (Safra 2005).

Na safra de 2005 o valor médio de ácido D-glucônico nas uvas provenientes do Planalto ($0,465 \text{ g.Kg}^{-1}$) foi superior ao observado no Meio Oeste ($0,322 \text{ g.Kg}^{-1}$), ocorrendo o mesmo com os índices de umidade (83% -Planalto e Meio Oeste - 66%) e precipitação (135mm – Planalto e Meio Oeste -93mm). A região do Planalto é uma região de altitude e, portanto, apresenta temperatura média (15°C) inferior ao Meio Oeste (22°C).

A Figura 5.11 apresenta as condições climáticas referentes à safra de 2006 para as regiões do Meio Oeste (Fevereiro/Março) e Planalto (Março/Abril), bem como, as concentrações de ácido D-glucônico.

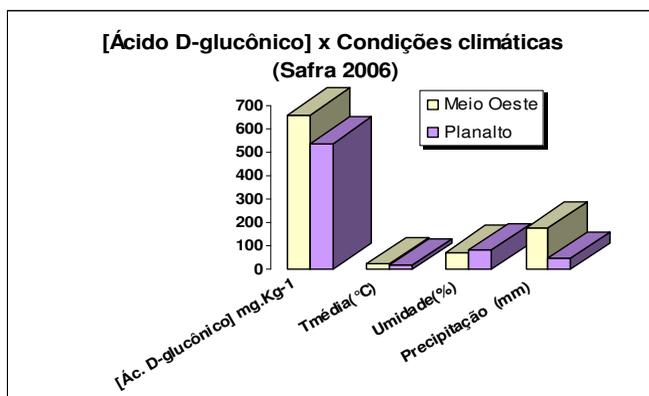


Figura 5. 11 – Correlação entre a [Ácido glucônico] e as condições climáticas (Safra 2006).

Em 2006, o panorama se deu de maneira inversa, ou seja, a concentração de ácido D-glucônico foi de $0,539 \text{ g.Kg}^{-1}$ para o Planalto e $0,662 \text{ g.Kg}^{-1}$ para o Meio Oeste, o mesmo ocorreu com os índices de umidade (74% - Planalto e 81% - Meio Oeste) e precipitação (47 mm - Planalto e 175mm – Meio Oeste). A temperatura média permaneceu a mesma para o Planalto, enquanto no Meio Oeste houve a redução em 1°C .

Comparando os dois microclimas e os níveis de ácido D-glucônico (Figuras 5.10 e 5.11) constata-se o exposto por Amorim & Kuniyuki (2005), sobre a incidência de *Botrytis cinerea* em regiões onde há predominância de temperaturas amenas e alta umidade na ocasião da maturação das uvas, ressaltam também, o Vale do Rio do Peixe (Meio Oeste Catarinense) como região favorável ao desenvolvimento da doença. Em relação ao Planalto nenhuma citação foi encontrada até o

presente momento, visto tratar-se de uma nova região vitícola. Leite (2005), relata que a infecção por *B. cinerea* atinge a máxima intensidade em temperatura entre 15 e 20°C e 90% de umidade relativa. Em geral, as infecções não progridem rapidamente em umidade abaixo de 90% e na maioria dos casos severas epidemias estão associadas com chuvas em pré-colheita (Tonietto *et al.* 2002).

5.3.2 [OTA] versus [Ácido D-glucônico]

Aspergillus carbonarius e representantes do grupo agregado *A. niger* são consideradas as principais fontes de OTA em uvas, passas e vinho (VARGA & KOZAKIEWICZ, 2006). Exemplares de *A. niger* são utilizados para a produção comercial de ácido D-glucônico (FROST & MOSS, 1987), por essa razão, a dispersão das concentrações de OTA e ácido D-glucônico nas uvas produzidas em Santa Catarina foram aqui investigadas, conforme apresentado na Figura 5.12.

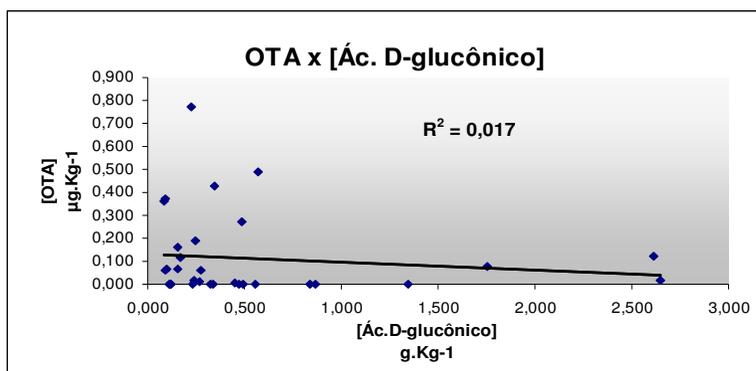


Figura 5.12 – Dispersão entre as concentrações de OTA e Ácido glucônico em uvas de Santa Catarina, provenientes das Safras (2005 e 2006)

A análise da regressão entre a concentração de OTA e do ácido glucônico para as 32 amostras de uva apresentou um $R^2 = 0,017$; onde 99,3% da variação não pôde ser explicada, sugerindo a ineficiência na predição do rastreio a OTA. A concentração média de OTA entre 2005 e 2006 variou de 0,233 a 0,035 $\mu\text{g. Kg}^{-1}$ com uma redução de 86,1%, enquanto o ácido glucônico teve um aumento de 34,3%. A baixa relação pode estar associada a vários fatores, onde um deles parece estar vinculado ao aumento da pluviosidade que favorece o desenvolvimento

da *Botrytis cinerea* e, parece também promover a redução dos níveis de OTA pelo processo de diluição. O cruzamento dos dados climatológicos para essas duas substâncias é outro fator que também colabora para a fraca relação, tendo em vista o observado por SERRA (2005) quanto à detecção de OTA nos diferentes estágios de desenvolvimento das bagas e a redução dos níveis da OTA na época da vindima de uvas portuguesas. Isso reflete a necessidade da avaliação das condições climáticas ao menos desde o início da brotação até o momento da vindima, conforme discutido no item 5.2.1.

Neste trabalho a OTA e o ácido glucônico apresentaram relação inversa quando a variação anual foi avaliada. O ácido D-glucônico apresentou concentração média inferior no ano de 2005, mas, quando se faz uma avaliação a variação nas regiões percebe-se que no período o maior valor foi obtido no Planalto ($0,46 \text{ g.Kg}^{-1}$) em 2005. No ano de 2006 o maior valor foi registrado no Meio Oeste ($0,662 \text{ g.Kg}^{-1}$), conforme demonstra a Figura 5.13.

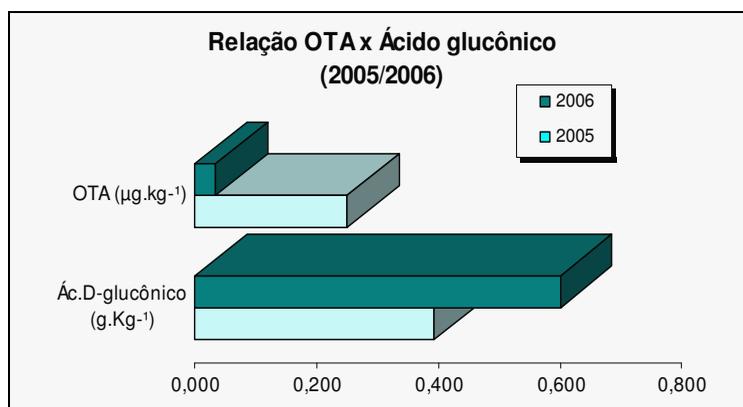


Figura 5. 13 – Concentrações médias de OTA e de Ácido D-glucônico nas uvas de Santa Catarina, provenientes das Safras de 2005 e 2006

BATILANI *et al.* (2006) efetuaram um estudo de 3 anos em vinhedos de diferentes regiões da Itália, confirmando o efeito da localização geográfica do vinhedo sobre a flora fúngica (*Aspergillus negros*) e sua incidência nos diferentes anos, porém as condições meteorológicas exerceram um papel importante na colonização das bagas e na produção de OTA. Essa mesma condição foi observada no presente estudo, onde a incidência de OTA foi inferior para o Planalto nos dois anos de estudo.

O presente estudo demonstrou que o ácido D-glucônico indicou uma fraca relação ($R^2 = 0,017$) com os níveis de OTA observados, sugerindo ineficiência na predição do rastreio a OTA. Já, em relação à *Botrytis* o coeficiente de determinação foi de 0,903 para a safra de 2005 e 0,820 para 2006 (ano em que a podridão amarga foi observada), comportando-se como um bom indicador para a contaminação por *Botrytis*, muitas vezes não observada no exame visual, colaborando com a definição de FISCHER e BERGER (2007) que o fator decisivo para a qualidade de um vinho não é a aparência externa das uvas e, sim o efeito da podridão na sua composição.

Em relação à sanidade das uvas através da avaliação ácido D-glucônico e sua relação com a microbiota, tem-se mais um indicador que reforça a tradição da região do Meio Oeste e a vocação da nova região do Planalto para a produção de uvas de excelente qualidade e conseqüentemente de bons vinhos no Estado de Santa Catarina.

5.4 Degradação de Ota e formação de Ota em meio sintético de uva através da atividade de uma *Protease* ácida comercial

Os sucos de uva, principalmente quando elaborados com uvas tintas, podem apresentar níveis de OTA superiores aos observados em vinhos, sendo uma importante fonte de ingestão de OTA, tendo em vista que o seu consumo é bem maior que o de vinhos, e as crianças representam o maior número de consumidores (VARGA & KOZAKIEWICZ, 2006; MIRAGLIA & BRERA, 2002). O processo escolhido para preparação do suco deve privilegiar a conservação do frescor, sabor e a coloração da uva de origem. Portanto, a busca por métodos de remoção de OTA que visem a preservação dessas propriedades se faz necessária.

A OTA é um composto muito estável, oferecendo resistência à diversas formas de processamento das uvas, inclusive à processos fermentativos, sendo encontrada em vários de seus derivados, tais como: vinhos, vinagres e sucos. Vários métodos biológicos, físicos e químicos para remoção de OTA em alimentos e bebidas têm sido propostos, no entanto, muitos processos físicos e químicos provocam redução dos valores nutricionais e alterações nas propriedades sensoriais. De acordo com BATA & LASZTITY (1999) a descontaminação de alimentos por biodegradação é a melhor solução para essa condição, desde que as propriedades sejam mantidas ou minimamente alteradas.

Com base nesse raciocínio é que se avaliou a capacidade da

enzima Prolive PAC[®] (protease ácida) em degradar a OTA meio sintético de uva, por meio de atividade residual. Os parâmetros de controle foram a formação de ocratoxina- α e o consumo de OTA, ambos foram determinados por cromatografia líquida com detecção por fluorescência. Os limites de detecção e quantificação foram 0,04 e 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente

A Figura 5.14 apresenta a degradação de OTA x formação OT α em meio de uva sintético, sob temperatura de 35^oC, pH 3,5 e [OTA inicial = 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] após 114 horas de ensaio. Os tempos de retenção foram: OTA =16 minutos e OT α = 6 minutos. O cromatograma (a) corresponde ao meio de uva sintético com adição de enzima e (b) = meio de uva sintético sem adição de enzima.

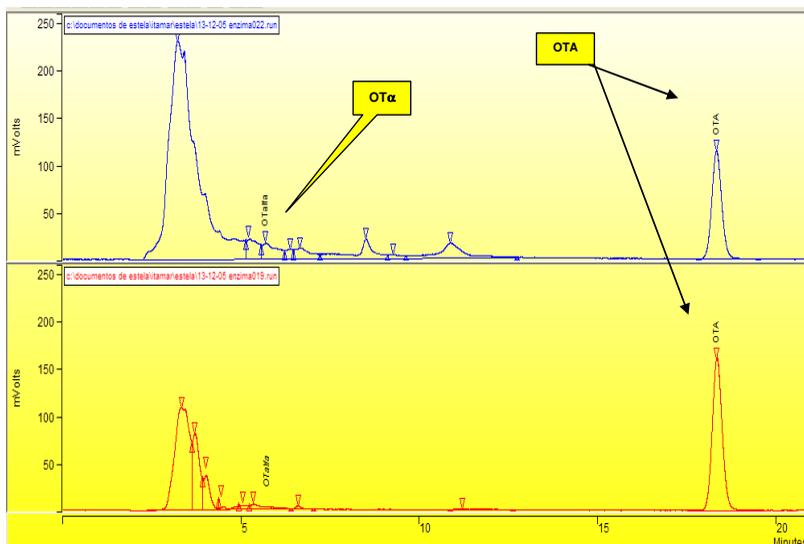


Figura 5. 14 – Cromatograma de degradação de OTA x formação OT α em meio de uva sintético ($T=35^{\circ}\text{C}$, pH 3,5 e [OTA inicial = 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$], mediada pela enzima Prolive PAC[®] após 114 horas; (a) = com adição de enzima e (b) = Sem adição de enzima. Tempos de retenção para OTA=16 minutos e OT α =6 minutos)

5.4.1 Influência do pH e da temperatura na hidrólise de OTA e formação de OT α em meio de uva com [OTA inicial = 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]

As condições de pH aqui estudadas correspondem aos valores referentes aos encontrados em sucos e vinhos. A hidrólise da OTA em

meio de uva com concentrações iniciais distintas (2,0 e 0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi avaliada em valores de pH 3,5 e 4,5, sob temperaturas de 20 e 35°C, e concentração fixa da enzima de 10mg.mL⁻¹.

5.4.1.1 pH 3,5 e temperaturas de 20 e 35°C

A hidrólise de OTA em meio de uva sintético e a formação de OT α com o uso da enzima comercial (*protease ácida*) Prolive PAC[®] sob as seguintes condições: pH 3,5; [OTA inicial = 2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$] e temperaturas (20 e 35°C) são apresentadas na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 – Concentrações de OTA, OTA hidrolisada e de OT α , utilizando enzima comercial (*protease ácida*) em meio de uva sintético: [OTA inicial = 2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$], pH 3,5 nas temperaturas de 20 e 35°C.

Parâmetros de controle	Condições de Ensaio	
	T= 20°C	T= 35°C
Concentração inicial de OTA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	2,08	2,04
OTA hidrolisada (ng.mL ⁻¹) em 114 horas	64,6	65,5
Formação de OT α (ng.mL ⁻¹) em 114 horas	38,64	40,03

A regressão da hidrólise da OTA em pH 3,5 e com concentração inicial de OTA = 2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou um comportamento linear (Figura 5.15a), enquanto a formação de OT α foi ajustada por um polinômio de segundo grau. (5.15b). A atividade de hidrólise foi baixa para ambas temperaturas.

Para as condições de temperatura de 20 e 35°C, a quantidade de OTA hidrolisada (ao final de 114 horas) em relação à concentração inicial foi de 3,1% e 3,2%, respectivamente. As velocidades médias de hidrólise foram as mesmas para os dois ensaios, ou seja, 0,5 ng.mL⁻¹.h⁻¹ para as temperaturas de 20°C e 35°C, indicando que a velocidade inicial da reação independe da temperatura.

A conversão de OTA hidrolisada em OT α (ao final de 114 horas) foi de 94,2% para a condição de temperatura de 20°C e de 96,2% sob a temperatura de 35°C. As velocidades iniciais de formação de OT α foram: 0,60 ng.mL⁻¹.h⁻¹ para as temperaturas de 20°C e 0,67 ng.mL⁻¹.h⁻¹

para 35°C, não apresentando alteração em função da temperatura. A média das velocidades iniciais para a formação de OT α em pH 3,5 foi de 0,64 ng.mL⁻¹.h⁻¹.

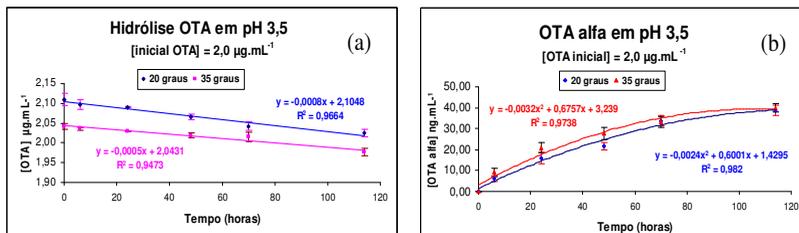


Figura 5.15 – a) Hidrólise de OTA [inicial = 0,2µg.mL⁻¹] e b) Formação da OT α [ng.mL⁻¹] em meio de uva sintético (pH 3,5), temperaturas (20 e 35°C) com enzima protease de uso comercial (Prolive PAC®).

5.4.1.2 pH 4,5 e temperaturas de 20 e 35°C:

A hidrólise de OTA em meio de uva sintético e a formação de OT α com o uso da enzima comercial (*protease* ácida) Prolive PAC® sob as seguintes condições: pH 4,5; [OTA inicial = 2,0 µg.mL⁻¹] e temperaturas (20 e 35°C) são apresentadas na Tabela 5.14.

Tabela 5.14 – Concentrações de OTA, OTA hidrolisada e de OT α , utilizando enzima comercial (*protease* ácida) em meio de uva sintético: [OTA inicial = 2 µg.mL⁻¹], pH 4,5 nas temperaturas de 20 e 35°C.

Parâmetros de controle	Condições de Ensaio [OTA inicial = 0,2µg.mL ⁻¹]	
	T= 20°C	T= 35°C
Concentração inicial de OTA (µg.mL ⁻¹)	2,11	2,04
OTA hidrolisada (ng.mL ⁻¹) em 114 horas	85,3	72,3
Formação de OT α (ng.mL ⁻¹) em 114 horas	40,39	45,67

A regressão da hidrólise da OTA em pH 4,5 apresentou, também, um comportamento linear (Figura 5.16a) e a formação de OT α foi ajustada por um polinômio de segundo grau (Figura 5.16b). A atividade de hidrólise pareceu ser melhor nesta condição de pH menos ácido, quando comparado ao mesmo ensaio efetuado em pH 3,5.

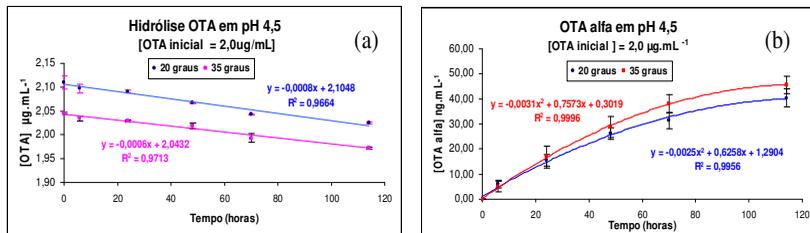


Figura 5.16 - a) Hidrólise de OTA [inicial = 0,2µg.mL⁻¹] e b) Formação da OTα [ng.mL⁻¹] em meio de uva sintético (pH 4,5), temperaturas (20 e 35°C) com enzima *protease* de uso comercial (Prolive PAC[®]).

Para as condições de temperatura de 20 e 35⁰C, a quantidade de OTA hidrolisada (ao final de 114 horas) em relação à concentração inicial foi de 4,0% e 3,5%, respectivamente. A velocidade da reação parece não sofrer alteração significativa em função da temperatura. Portanto, a média da velocidade de hidrólise foi 0,7 ng.mL⁻¹.h⁻¹.

A conversão de OTA hidrolisada em OTα (ao final de 114 horas) foi de 74,6% para a condição de temperatura de 20⁰C e de 99,4% sob 35⁰C. As velocidades iniciais de formação de OTα foram: 0,62 ng.mL⁻¹.h⁻¹ para a temperatura de 20⁰C e 0,75 ng.mL⁻¹.h⁻¹ para a temperatura de 35⁰C, com média das velocidades iniciais de 0,69 ng.mL⁻¹.h⁻¹. A velocidade da reação não apresentou alterações significativas em função da temperatura

5.4.1.3 pH 3,5 versus pH 4,5

Uma análise comparativa sobre a influência do pH na eficiência da hidrólise da ocratoxina A (OTA), nas condições de temperaturas de 20⁰C (Figura 17a) e 35⁰C (Figura 17b) e formação de OTα a partir da [OTA inicial = 2,0 µg.mL⁻¹] nas temperaturas de 20⁰C (Figura 17c) e 35⁰C (Figura 17d) é aqui apresentada.

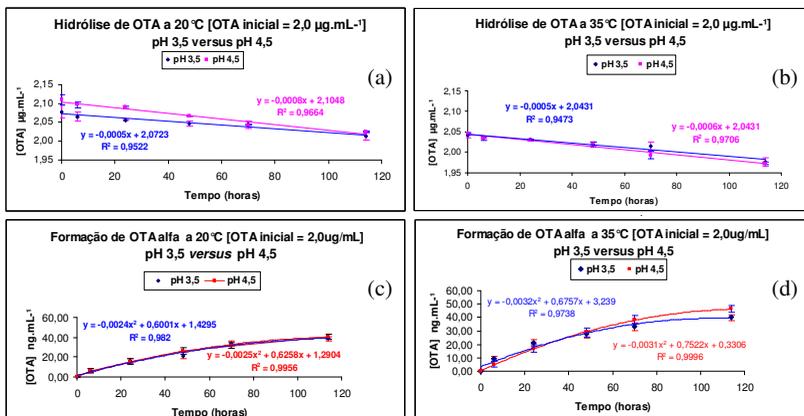


Figura 5. 17 – Hidrólise de OTA [inicial = 0,2µg.mL⁻¹] sob temperaturas de a) 20°C e b) 35°C e Formação da OTα [ng.mL⁻¹] c) 20°C e d) 35°C, em meio de uva sintético em pH 3,5 e 4,5, com enzima *protease* comercial (Prolive PAC[®])

Para melhor compreensão, os valores dos parâmetros obtidos nos ensaios e que são utilizados na análise das figuras acima e abaixo representadas encontram-se dispostos na Tabela 5.15.

Tabela 5.15 – Parâmetros de controle da hidrólise de OTA e formação de OTα, utilizando uma enzima comercial (*protease* ácida) em meio de uva sintético: [OTA inicial = 2 µg.mL⁻¹], pH 3,5 e 4,5 nas temperaturas de 20 e 35°C.

Parâmetros de controle	Condições de Ensaio			
	T= 20 ^o C		T= 35 ^o C	
	pH	pH	pH	pH
	3,5	4,5	3,5	4,5
Concentração inicial de OTA (µg.mL ⁻¹)	2,08	2,11	2,04	2,04
OTA hidrolisada (ng.mL ⁻¹) em 114 horas	64,6	85,3	65,5	72,3
Veloc. média hidrólise OTA (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	0,5	0,8	0,5	0,6
Percentual de degradação de OTA (%)	3,1	4,0	3,2	3,5
Formação de OTα (ng.mL ⁻¹) em 114 horas	38,64	40,39	40,03	45,67
Veloc. inicial formação OTα (ng.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	0,60	0,62	0,67	0,75
Conversão de OTA hidrolisada em OTα (%)	94,2	74,6	96,2	99,4

A hidrólise da OTA sob a temperatura de 20⁰C (Figura 5.17a) comportou-se de maneira mais eficiente em pH 4,5. As velocidades médias de hidrólise refletem discreta dependência do pH. Na formação de OT α (Figura 5.17c) as velocidades iniciais não demonstram dependência do pH, com uma média na velocidade de formação de 0,61 ng.mL⁻¹.h⁻¹. A conversão em OT α demonstrou ser favorecida em pH mais ácido.

Para a temperatura de 35⁰C (Figura 5.17b), a hidrólise da OTA, nos dois valores de pH, apresentou uma eficiência similar. A velocidade média de hidrólise apresentou um perfil independente do pH nessa condição de temperatura. A média na velocidade de hidrólise para essa temperatura foi de 0,5 ng.mL⁻¹.h⁻¹. Com relação à formação de OT α (Figura 5.17d) o comportamento foi similar para as velocidades iniciais, apresentando uma média de velocidade inicial de formação de 0,71 ng.mL⁻¹.h⁻¹. A conversão em OT α não demonstrou dependência com o valor de pH, mas revela que a temperatura se refletiu em um fator importante na conversão de OTA em OT α .

Efetuando uma avaliação geral dos dados contidos Tabela 5.15, é possível perceber que a hidrólise da OTA em meio sintético de uva, com uma concentração inicial de 2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou melhor performance nas seguintes condições: T = 20⁰C e pH 4,5. Já, a melhor conversão em OT α se deu em T = 35⁰C independente do pH.

5.4.2 Influência do pH e da temperatura na hidrólise de OTA e formação de OT α em meio de uva com [OTA inicial = 0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]:

5.4.2.1 pH 3,5 e temperaturas de 20 e 35⁰C:

A hidrólise de OTA em meio de uva sintético e a formação de OT α com o uso da enzima comercial (*protease* ácida) Prolive PAC[®] sob as seguintes condições: pH 4,5; [OTA inicial = 0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$] e temperaturas (20 e 35⁰C) são apresentadas na Tabela 5.16.

Tabela 5.16 – Concentrações de OTA, OTA hidrolisada e de OT α , utilizando enzima comercial (*protease* ácida) em meio de uva sintético: [OTA inicial = 0,2 μ g.mL $^{-1}$], pH 3,5 nas temperaturas de 20 e 35 $^{\circ}$ C.

Parâmetros de controle	Condições de Ensaio [OTA inicial = 0,2 μ g.mL $^{-1}$]	
	T= 20 $^{\circ}$ C	T= 35 $^{\circ}$ C
Concentração inicial de OTA (μ g.mL $^{-1}$)	0,25	0,22
OTA hidrolisada (ng.mL $^{-1}$) em 114 horas	70,6	65,1
Formação de OT α (ng.mL $^{-1}$) em 114 horas	38,85	40,57

A hidrólise da OTA apresentou um comportamento linear (Figura 5.18a). Para a formação de OT α (Figura 5.18b) também, foi realizado um ajuste linear, embora alguns pontos tenham apresentado um comportamento oscilatório. A atividade de hidrólise foi muito baixa para ambas temperaturas.

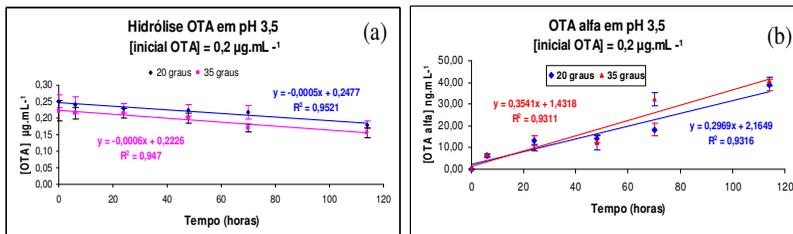


Figura 5.18 - a) Hidrólise de OTA [inicial = 0,2 μ g.mL $^{-1}$] e b) Formação da OT α [ng.mL $^{-1}$] em meio de uva sintético (pH 3,5), temperaturas (20 e 35 $^{\circ}$ C) com enzima *protease* de uso comercial (Prolive PAC $^{\text{®}}$).

Para as condições de temperatura de 20 e 35 $^{\circ}$ C, a quantidade de OTA hidrolisada (ao final de 114 horas) em relação à concentração inicial foi de 28,1% e 29,3%, respectivamente. As velocidades médias de hidrólise apresentaram um comportamento similar nessa condição de temperatura e não apresentam alterações significativas com o fator temperatura. A velocidade média de hidrólise foi de 0,5 ng.mL $^{-1}$.h $^{-1}$.

A conversão de OTA hidrolisada em OT α (ao final de 114 horas) em relação a concentração de OTA hidrolisada, foi de 86,7% para a condição de temperatura de 20 $^{\circ}$ C e de 98,1% para 35 $^{\circ}$ C. As velocidades

iniciais de formação de OT α , para ambos os ensaios, não apresentaram alteração significativa em função da temperatura. A média das velocidades iniciais para a formação de OT α foi de 0,33 ng.mL⁻¹.h⁻¹

5.4.2.2 pH 4,5 e temperaturas de 20 e 35°C:

A hidrólise de OTA em meio de uva sintético e a formação de OT α com o uso da enzima comercial (*protease* ácida) Prolive PAC[®] sob as seguintes condições: pH 4,5; [OTA inicial = 0,2 μ g.mL⁻¹] e temperaturas (20 e 35°C) são apresentadas na Tabela 5.17:

Tabela 5.17 – Concentrações de OTA, OTA hidrolisada e de OT α , utilizando enzima comercial (*protease* ácida) em meio de uva sintético: [OTA inicial = 0,2 μ g.mL⁻¹], pH 4,5 nas temperaturas de 20 e 35°C.

Parâmetros de controle	Condições de Ensaio [OTA inicial = 0,2 μ g.mL ⁻¹]	
	T= 20°C	T= 35°C
	Concentração inicial de OTA (μ g.mL ⁻¹)	0,25
OTA hidrolisada (ng.mL ⁻¹) em 114 horas	84,0	65,1
Formação de OT α (ng.mL ⁻¹) em 114 horas	40,68	42,83

A atividade de hidrólise foi muito semelhante em ambas as temperaturas. A hidrólise da OTA apresentou um comportamento linear (Figura 5.19a) e a formação de OT α foi ajustada por um polinómio de segundo grau (Figura 5.19b):

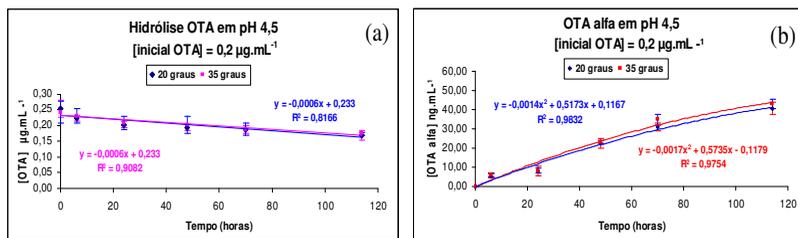


Figura 5.19 - a) Hidrólise de OTA [inicial = 0,2 μ g.mL⁻¹] e b) Formação da OT α [ng.mL⁻¹] em meio de uva sintético (pH 4,5), temperaturas (20 e 35°C) com enzima *protease* de uso comercial (Prolive PAC[®]).

Para as condições de temperatura de 20 e 35°C, a quantidade de OTA hidrolisada (ao final de 114 horas) em relação à concentração inicial foi de 33,0% e 28,4%, respectivamente. As velocidades médias de hidrólise foram idênticas para ambas as temperaturas, demonstrando que a velocidade média independe da temperatura nessas condições.

A conversão de OTA hidrolisada em OT α (ao final de 114 horas) em relação a concentração de OTA hidrolisada foi de 76,3% para a condição de temperatura de 20°C e de 97,5% para a condição de temperatura de 35°C. As velocidades iniciais de formação de OT α não apresentaram alteração significativa em relação a temperatura nessa condição. A média das velocidades de formação de OT α foi de 0,55 mL⁻¹.h⁻¹.

5.4.2.3. pH 3,5 versus pH 4,5:

Uma análise comparativa sobre a influência do pH na eficiência da hidrólise da OTA, nas temperaturas de 20°C (Figura 20a) e 35°C (Figura 20b) e formação de OT α a partir da [OTA inicial = 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] nas temperaturas de 20°C (Figura 20c) e 35°C (Figura 20d) é aqui apresentada.

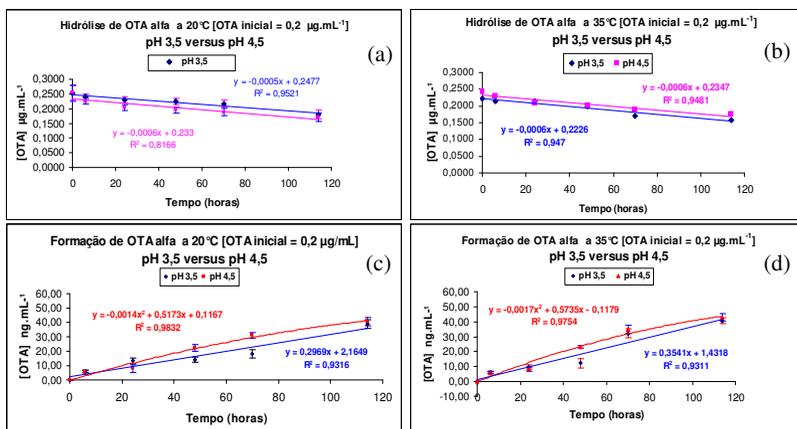


Figura 5.20 - Hidrólise de OTA [inicial = 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] sob temperaturas de a) 20°C e b) 35°C e Formação da OT α [ng.mL⁻¹] c) 20°C e d) 35°C, em meio de uma sintético em pH 3,5 e 4,5, com enzima *protease* comercial (Prolive PAC[®]).

Para melhor compreensão, os valores dos parâmetros obtidos nos ensaios e que são utilizados na análise das figuras acima e abaixo representadas encontram-se dispostos na Tabela 5.18.

Tabela 5.18 – Parâmetros de controle da hidrólise de OTA e formação de OT α , utilizando uma enzima comercial (*protease* ácida) em meio de uva sintético: [OTA inicial = 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$], pH 3,5 e 4,5 nas temperaturas de 20 e 35 $^{\circ}\text{C}$.

Parâmetros de controle	Condições de Ensaio			
	T= 20 $^{\circ}\text{C}$		T= 35 $^{\circ}\text{C}$	
	pH		pH	
	3,5	4,5	3,5	4,5
Concentração inicial de OTA ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0,25	0,25	0,22	0,24
OTA hidrolisada ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) em 114 horas	70,6	84,0	65,1	69,2
Veloc. média hidrólise OTA ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0,5	0,6	0,6	0,6
Percentual de degradação de OTA (%)	28,1	28,3	29,3	28,4
Formação de OT α ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) em 114 horas	38,85	40,68	40,57	42,83
Veloc. inicial formação OT α ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0,30	0,52	0,35	0,57
Conversão de OTA hidrolisada em OT α (%)	86,7	76,3	98,1	97,5

A hidrólise da OTA sob a temperatura de 20 $^{\circ}\text{C}$ (Figura 5.20a) comportou-se de maneira similar, para ambos os ensaios. As velocidades médias de hidrólise não refletem alterações significativas em relação ao pH. Na formação de OT α (Figura 5.20c) as velocidades iniciais foram: 0,30 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para o pH 3,5 e de 0,52 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, não demonstrando dependência do fator pH, com uma média na velocidade de formação de 0,41 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. A conversão em OT α demonstrou ser favorecida em pH mais ácido.

Para a temperatura de 35 $^{\circ}\text{C}$ (Figura 5.20b) a hidrólise da OTA apresentou também uma eficiência muito similar em ambos os ensaios. As velocidades médias de hidrólise se comportaram de forma independente do pH nessa condição de temperatura, ou seja, a mesma para os dois valores de pH.

Para a T = 35 $^{\circ}\text{C}$ (Figura 5.20d), o comportamento foi similar, as velocidades iniciais de formação de OT α apresentaram uma média de

velocidade inicial de formação de $0,46 \text{ ng.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A conversão em $\text{OT}\alpha$ demonstrou ser favorecida em pH mais ácido. No entanto, a conversão em $\text{OT}\alpha$ não demonstrou dependência com o valor de pH, mas revela que a temperatura se refletiu em um fator importante na conversão de OTA em $\text{OT}\alpha$.

Avaliando os dados contidos Tabela 5.18, é possível perceber que a hidrólise da OTA e a conversão em $\text{OT}\alpha$ em meio sintético de uva, com uma concentração inicial de $0,2 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou melhor performance nas seguintes condições: $T = 35^{\circ}\text{C}$ e pH 3,5, porém, cabe ressaltar que, as diferenças percentuais são pequenas.

BEJAOUI *et al.* (2004) registram que nenhum estudo prévio sobre a remoção de OTA por meio biológico em produtos de uvas, havia sido encontrado até o momento de seus experimentos. A remoção de OTA em meio YPG (levedura peptona glucose – pH 5,0) e em meio sintético de uva (ambos com $[\text{OTA inicial}] = 2,0 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ – pH 3,8) foi testada utilizando 6 cepas de *S. cerevisiae* de uso enológico. A melhor performance de remoção ocorreu para todas as cepas em YPG (máximo de remoção = 45%) quando comparadas ao meio de uva sintético (máximo de remoção = 35%), porém, ressaltam que nenhum produto de degradação foi observado, sugerindo que a remoção se deu por adsorção. Eles ainda relatam que o aumento na adsorção da OTA pode ser explicado pela ionização do grupamento amino da molécula de OTA, que é favorecida no meio ácido usado. Mas, se esse raciocínio fosse seguido no seu sentido restrito, a remoção de OTA deveria ter sido maior no meio de uva sintético (pH 3,8) do que em YPG (pH 5,0), sugerindo que a composição do meio deve ser um fator importante a ser considerado na inibição da hidrólise.

BEJAOUI *et al.* (2006b) investigaram a capacidade de 40 estirpes de *Aspergillus* da seção *Nigri* em degradar OTA em CYB (caldo CZAPECK extrato de levedura) e em suco de uva sintético, contendo concentrações iniciais de $\text{OTA} = 2,0 \text{ mg.L}^{-1}$. A capacidade de degradação de OTA das distintas estirpes foi diferente para o mesmo isolado, dependendo do meio. A degradação foi maior no meio de uva sintético do que em CYB. Mas esse melhor desempenho pode estar atribuído ao melhor crescimento fúngico no meio de uva sintético. Os autores salientam que nenhum dado tem sido mostrado na literatura relacionado a presença da enzima *carboxipeptidase* (hábil em hidrolisar OTA em $\text{OT}\alpha$) em representantes do gênero *Aspergillus*.

ABRUNHOSA *et al.* (2006) reportam a habilidade de 14 *proteases* comerciais em hidrolisar OTA em $\text{OT}\alpha$, a partir de uma

concentração inicial de OTA de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em sistema tampão. A atividade das enzimas foi avaliada num intervalo de tempo de 25 horas com incubação a 37°C . A enzima Prolive PAC[®], utilizada na concentração de 10 mg, foi uma dessas enzimas e demonstrou uma fraca atividade hidrolítica em pH 3,0; apresentando um percentual de hidrólise de 3%. Os valores percentuais obtidos em nosso estudo, para a mesma enzima, durante o período de 24 horas a 35°C em pH 3,5 e 4,5 encontram-se na Tabela 5.19:

Tabela 5.19 – Percentual de hidrólise da OTA em meio de uva sintético ao final de 24 horas, com concentrações iniciais de 2,0 e $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, pH 3,5 e $T = 35^{\circ}\text{C}$.

	T = 35°C e 24 horas de incubação [OTA inicial = $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$]	
Remoção de OTA em pH 3,5 (%)	0,56	3,29
Remoção de OTA em pH 4,5 (%)	0,85	14,47

PÉTERI *et al.* (2007) investigaram a degradação de OTA por *P. rhodozyma* e concluíram que conversão em $\text{OT}\alpha$ é possivelmente mediada por uma enzima do grupo das carboxipeptidases. A temperatura ótima da enzima foi superior a 30°C . Essa condição também foi observada no presente experimento, quando avalia-se os diferentes valores de pH (3,5 e 4,5) e concentrações de OTA ($2,0$ e $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sob a temperatura de 35°C , onde a média das conversões da OTA hidrolisada em $\text{OT}\alpha$, foram maiores (97,8%) quando comparada a temperatura de 20°C (83,0%).

As concentrações de $\text{OT}\alpha$ formadas oscilaram entre 38,64 e $46,17 \text{ ng.mL}^{-1}$ para a concentração de OTA inicial de $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 5.15) e entre 38,85 e $42,83 \text{ ng.mL}^{-1}$ para a concentração inicial de OTA = $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 5.18). A atividade específica média foi de $0,30 \mu\text{g}$ de $\text{OT}\alpha$ por μg da enzima Prolive PAC[®] por hora. Essa observação leva a conclusão de que a quantidade de $\text{OT}\alpha$ formada foi discretamente favorecida na maior temperatura (35°C), independente do pH e das concentrações iniciais de OTA. No entanto, a atividade específica da enzima foi muito baixa e as concentrações de $\text{OT}\alpha$ ao final de 114 horas de ensaio foram similares para ambas as concentrações iniciais do substrato. Esse fato leva a constatação de que a enzima não possui como atividade principal a hidrólise da OTA e, sim que apresenta uma ação colateral, conforme anteriormente observado por

ABRUNHOSA *et al.* (2006). A hipótese de que o meio de uva possa apresentar algum componente que venha a colaborar para a redução da hidrólise da OTA também é sugerida.

5.5 Perfil da Ota na microvinificação de uvas tintas naturalmente contaminadas

A OTA é uma micotoxina produzida por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* e, desde a primeira indicação da sua presença em vinhos efetuada por ZIMMERLI & DICK (1996), tem sido a maior questão de segurança nos vinhos. A União Europeia através da norma (CE) n^o 123/2005 estabelece limites de OTA para vinhos em 2,0 µg.L⁻¹. O processamento pode ser um importante fator na redução dos riscos potenciais de alimentos contaminados por micotoxinas. A segurança do vinho em relação ao risco da OTA só pode ser garantida através do monitoramento ao longo do seu processamento. Portanto, a evolução dos níveis de OTA durante o processamento de uvas tintas foi avaliada através de dois ensaios de microvinificação com uvas (Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e Syrah) provenientes da safra de 2006: o primeiro com cerca de 1/3 de podridão e o segundo a partir de uvas visualmente sãs.

5.5.1 Ensaios de Recuperação da OTA

A recuperação da OTA foi avaliada para cada etapa de vinificação para os dois ensaios. É importante ressaltar que para análise do mosto fresco (MF), o método utilizado foi desenvolvido por SERRA *et al.* (2004) e, para as demais etapas seguiu-se a metodologia de referência para vinhos EN14133 descrita no *European Comunitiee Standard* (2003). Os limites foram para detecção de 0,04µg.Kg⁻¹ e quantificação de 0,05µg.Kg⁻¹ (menor valor utilizado na curva de calibração), os valores atenderam o exigido para a referida norma.

Os resultados obtidos em nosso experimento estão dentro do esperado para metodologias com concentrações similares. GAMBUTI *et al.* (2005) obtiveram uma recuperação de 77,75% em vinhos para uma concentração de 2,0 µg.L⁻¹. RATOLA *et al.* (2005) apresentaram recuperações de 82,4% para mostos e 92,1% para vinhos.

A Tabela 5.20 apresenta as taxas de recuperação de OTA e os desvios padrão obtidos para cada etapa de vinificação analisada:

Tabela 5.20 – Recuperação da OTA para as concentrações iniciais de 2,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ensaio 1) e de 0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ensaio 2), nas principais etapas de vinificação, os valores são expressos em percentagem.

Etapa da Vinificação	1/3 de uvas com podridão	uvas visivelmente sãs
	Recuperação (%) [OTA = 2,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$]* (Ensaio 1)	Recuperação (%) [OTA = 0,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$]* (Ensaio 2)
MF – Mosto Fresco	87,4 ± 19,3	89,6 ± 6,5
PF - Pós-fermentação alcoólica	90,0 ± 7,6	90,8 ± 7,4
PT1 - Pós-trasfega 1 (pré-malolática)	91,4 ± 16,6	93,7 ± 17,0
PT2 -Pós-trasfega 2 (pós-malolática)	91,9 ± 10,4	95,6 ± 14,5
PT3 -Pós-trasfega 3 (pós-estabilização)	93,1 ± 10,3	91,5 ± 11,4

*A adição de OTA para os ensaios de recuperação foi definida a partir de uma análise prévia da OTA nessas uvas.

5.5.2 Evolução dos níveis de OTA durante a vinificação

O perfil da OTA foi avaliado durante o processamento do vinho por meio da amostragem dos seguintes pontos: mosto fresco, pós-fermentação alcoólica, 1^a trasfega (descuba), 2^a trasfega (pós-fermentação malolática) e 3^a trasfega (pós-estabilização em frio, T= 4^oC). A Tabela 5.21 descreve o comportamento da OTA nas duas vinificações: a primeira com 1/3 de uvas com podridão e a segunda a partir de uvas visualmente sãs.

Tabela 5.21 – Níveis de OTA detectados nas etapas da vinificação de uvas sãs e de uvas com 1/3 de podridão visível

Etapa da Vinificação	1/3 de uvas com podridão	uvas visivelmente sãs
	OTA ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$) ± SD*	OTA ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$) ± SD
MF - Mosto Fresco	2,28 ± 0,25	0,27 ± 0,06
PF - Pós-fermentação alcoólica	0,98 ± 0,14	0,12 ± 0,03
PT1 - Pós-trasfega 1 (pré-malolática)	0,56 ± 0,09	0,06 ± 0,01
PT2 -Pós-trasfega 2 (pós-malolática)	0,41 ± 0,02	ND
PT3 -Pós-trasfega 3 (pós-estabilização)	0,37 ± 0,03	ND

*SD = desvio padrão

5.5.2.1. Detecção de OTA no mosto

A OTA esteve presente nos mostos dos 2 ensaios de vinificação, nas concentrações iniciais de $2,28 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ (ensaio 1) e $0,27 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ (ensaio 2). A detecção de OTA nas uvas sãs (ensaio 2) refere concordância com MENDONÇA *et al.* (2003) de que um produto pode estar contaminado com micotoxinas, sem apresentar sinais visíveis de contaminação fúngica. Pois, o fungo pode invadir os tecidos vegetais sem formar estruturas reprodutoras, ou micélio visível a olho nú. SERRA (2005) demonstra também que, a contaminação da uva pela OTA ocorre inicialmente ainda no baga ervilha e no pintor, onde os níveis detectados foram superiores aos detectados na vindima.

O mosto proveniente das uvas com 1/3 de podridão apresentou uma concentração 84,4 vezes superior em relação ao ensaio efetuado com uvas visualmente sãs, refletindo a importância da condição sanitária das uvas. Os fungos responsáveis pela produção da OTA podem invadir muito facilmente uvas danificadas, podendo produzir a toxina (GRAZIOLI, *et al.* 2006; SERRA, 2005).

GAMBUTI *et al.* (2006), reportam o aumento de aproximadamente quatro vezes nos níveis de OTA em vinhos tintos excessivamente esmagados ($0,115 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) em comparação ao vinho normalmente obtido ($0,029 \mu\text{g.Kg}^{-1}$). Portanto, a busca por maior extração de compostos que concorrem para a qualidade sensorial, pode resultar no aumento da concentração da toxina.

5.5.2.2 OTA na fermentação alcoólica

A remoção da OTA em função da fermentação alcoólica tem sido reportada por vários autores, como um efeito da adsorção da micotoxina à fase sólida e não como consequência da atividade metabólica das leveduras (GRAZIOLI *et al.* 2006, CECHINI *et al.* 2006, GARCIA *et al.* 2005 e SILVA *et al.* 2003).

As amostras referentes a pós-fermentação alcoólica foram coletadas após a descuba, ou seja, separação fase sólida/líquida. Os níveis de OTA detectados foram 0,98 e $0,012 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, para os ensaios 1 e 2, respectivamente (Tabela 5.21). A remoção da OTA em relação aos mostos frescos foi de 57,0% (ensaio 1) e 55,6% (ensaio 2). Os valores observados foram concordantes com o descrito por CECHINI *et al.* (2006) que observaram uma redução entre 53,2% e 70,13% dependendo da levedura utilizada, onde as espécies do gênero *Saccharomyces*

tiveram os melhores desempenhos. Quando esses autores utilizaram a *S. cerevisiae* a redução foi de 65,9%. O considerado pelos autores foi a capacidade de adsorção da OTA na massa de leveduras e não a capacidade de degradação por essas leveduras. GRAZIOLI *et al.* (2006) observaram uma redução de 30% da concentração de OTA após a fermentação alcoólica e clarificação, em vinificações das uvas Primitivo e Neroamaro. A Figura 5.22 apresenta os percentuais proporcionais de remoção entre as operações analisadas.

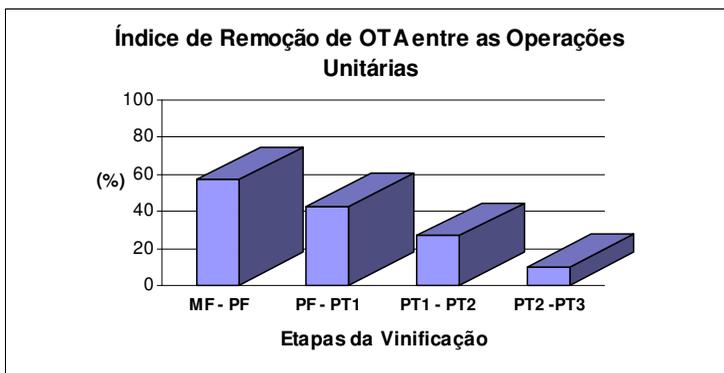


Figura 5.21 – Percentuais de remoção de OTA entre as etapas de vinificação referentes às uvas que continham 1/3 de podridão (ensaio 1).

A tomada de amostras (PT1) foi efetuada 6 horas após a descuba (para decantação) e, as concentrações remanescentes de OTA foram $0,56 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ (ensaio 1) e $0,006 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ (ensaio 2). O índice de remoção entre a fermentação alcoólica e a clarificação foi de 42,9% (Figura 5.21) para o ensaio 1 e de 50,0% para o ensaio 2. No entanto, se avaliarmos em relação à concentração inicial de OTA os percentuais de remoção foram de 75,4% (ensaio 1) e de 77,8% (ensaio 2).

5.5.2.3 OTA e a fermentação malolática

Após a fermentação malolática a concentração remanescente de OTA no ensaio 1 foi de $0,41 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, com um índice de remoção de 26,8% (Figura 5.21), entre a pós-descuba e pós-fermentação malolática. Para o ensaio 2, não foi possível efetuar essa avaliação tendo em vista que OTA esteve a baixo do limite de detecção. GRAZIOLI *et al.* (2006), observaram um índice de redução de 57,0% após a fermentação

malolática. Os mesmos autores atestam o efeito positivo das bactérias ácido-láticas na redução da OTA. Porém, SILVA *et al.* (2003) mostram que essa redução depende da cepa bacteriana e que a eficiência é inversamente proporcional à concentração de OTA no vinho.

5.5.2.4 Comportamento da OTA na estabilização a frio

Após a estabilização a frio em 4°C, onde os vinhos permaneceram durante 30 dias, a concentração de OTA foi investigada para ambos ensaios. A OTA ainda estava presente no vinho proveniente do ensaio 1, enquanto, novamente a OTA não foi detectada no ensaio 2. O índice de remoção de OTA relativo entre a fermentação malolática e a estabilização foi de 7,3%, significativamente menor.

5.5.2.5 Concentração final da OTA no vinho

A Figura 5.22 descreve a evolução da OTA durante todo o processo de vinificação, da uva que continha 1/3 de podridão visível, através das etapas de controle: MF, PF, PT1, PT2 e PT3.

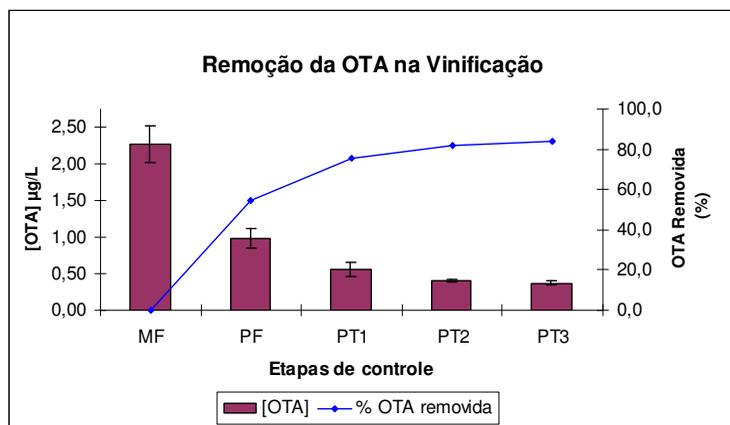


Figura 5.22 – Evolução da OTA durante o processo de vinificação em tinto, a partir de uvas naturalmente contaminadas (ensaio 1).

Ao final do processo a eficiência de remoção da OTA foi de 83,8% para uma concentração inicial de 2,28 µg.Kg⁻¹, permanecendo o

vinho com uma concentração residual de OTA de $0,37 \mu\text{g.Kg}^{-1}$. Já, para a vinificação efetuada com uvas visivelmente sãs, a não detecção de OTA foi observada a partir do término da fermentação malolática, indicando uma remoção superior a 81,5%. RATOLA *et al.* (2005), em um experimento efetuada em vinho do Porto, referenciam uma remoção de 92,0%. GRAZIOLI *et al.* (2006) relatam uma média de remoção de 87,0% ao final do processo em vinificações de uvas Primitivo e Negroamaro efetuada por 3 anos consecutivos.

A concentração de OTA detectada no mosto proveniente de uvas com 1/3 de podridão foi 9,9 vezes superior à concentração observada no mosto de uvas sãs. Evidenciando a importância da qualidade sanitária das uvas na prevenção à OTA nos vinhos. A detecção da OTA no mosto de uvas sãs demonstrou que a OTA pode estar presente em uvas que não apresentam sinais visíveis de contaminação fúngica.

O processo de vinificação colabora de maneira expressiva para a redução da OTA no vinho. Pois, nos dois ensaios a concentração remanescente de OTA no vinho foi inferior a 20,0%, possibilitando a adequação ao valor máximo recomendado de $2,0 \mu\text{g.L}^{-1}$, quando elaborados a partir de uvas contaminadas com OTA em baixas concentrações.

A fermentação alcoólica foi a operação mais representativa na redução dos níveis de OTA durante a vinificação, onde a remoção foi em torno de 50,0%. Isso permite definir, sob o ponto de vista da análise de risco, que a realização do controle da OTA é crucial em 2 pontos: no mosto fresco e após a fermentação alcoólica, pois a concentração da OTA continua decrescendo até o final da vinificação.

Portanto, há que se destacar também, a importância da investigação da OTA no bagaço resultante do processamento. Pois o mesmo é empregado como matéria-prima na elaboração da “graspa” e também, na fabricação de alimentos para nutrição humana e animal.

Os níveis de OTA obtidos ao final da vinificação, sugerem que os vinhos elaborados com uvas tintas de vinífera, produzidas nas regiões do Planalto e Meio-Oeste Catarinenses apresentam baixo risco de exposição à OTA. No entanto, novos estudos devem ser realizados para confirmar essa observação.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho buscou estabelecer um referencial sob a visão do controle micotoxicológico, com relação à qualidade das uvas produzidas e processadas, provenientes de duas importantes regiões vitivinícolas de Santa Catarina (Meio Oeste e Planalto de Santa Catarina obtidas durante as vindimas de 2005/2006). As principais considerações encontram-se descritas a seguir:

Foram recuperadas das uvas e identificadas 1492 estirpes de fungos filamentosos, classificados em 14 gêneros. Os gêneros isolados com maior frequência em ordem decrescente: *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Aureobasidium* e *Rhizopus*. A incidência fúngica na micobiota diferiu entre as regiões: Para a região do Meio Oeste a predominância foi: *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Botrytis* e *Aureobasidium*. Enquanto, no Planalto os gêneros de maior incidência foram: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*.

Embora a distribuição entre os gêneros fúngicos na micobiota das uvas tenha sido diferente, a frequência das espécies de *Penicillium* entre as regiões do Meio Oeste e Planalto Catarinenses, nas safras 2005/2006, não apresentou diferenças significativas. No que diz respeito às espécies ocratoxigênicas, nenhum exemplar de *P. verrucosum* foi isolado.

As ocorrências das espécies de *Aspergillus* divergiram entre as regiões do Planalto e Meio Oeste; 71,1% das estirpes de *Aspergillus* isoladas foram detectadas na região do Meio Oeste. Em ambas regiões as estirpes pertencentes ao agregado *A. niger* foram predominantes. Todas as estirpes de *Aspergillus* negros isoladas de ambas regiões (agregado *A. niger*, *A. japonicus* e *A. carbonarius*) foram recuperadas e testadas quanto a capacidade produtora de OTA em cultura pura. Todos os exemplares de *A. japonicus* testados foram OTA (-), 15,9% das estirpes de agregado *A. niger* foram OTA (+) e dos exemplares de *A. carbonarius* recuperados, apenas um foi hábil para produzir OTA.

A OTA foi detectada em 40,6% do total de amostras de uvas testadas, no Planalto 45,4% das uvas foram OTA (+) enquanto para o Meio Oeste foram 38,1%. No entanto, o Meio Oeste apresentou níveis médios de 0,124 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$, enquanto o Planalto revelou valores de 0,076 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. Para as duas safras estudadas, constatou-se uma variação nos níveis OTA de 74,1 e 86,7% no Planalto e Meio Oeste, respectivamente, indicando que os fatores mais notáveis em relação à concentração de OTA nas uvas não são somente as práticas agrícolas, mas, o ano e

origem geográfica exercem grande influência.

A patulina não foi detectada em nenhuma das amostras das uvas analisadas. Um número reduzido de estirpes de *P. expansum* foram encontradas, representando 0,73% do total de isolados, essa baixa incidência na detecção pode ser um dos fatores relacionados à não detecção de patulina nas uvas.

A concentração média de ácido D-glucônico nas uvas foi 0,361 g.Kg⁻¹ para o ano de 2005 e 0,615 g.Kg⁻¹ em 2006, com um aumento de 41,3% nos níveis de ácido D-glucônico nas uvas da safra de 2006, onde a podridão amarga esteve presente. Todas as amostras que apresentaram níveis superiores a 1,0 g.Kg⁻¹ foram da variedade Cabernet Sauvignon, três delas estavam afetadas pela podridão amarga de forma bastante evidente. Mesmo assim, a concentração média obtida para o ano de 2006 foi inferior a 1,0 g.Kg⁻¹ indicando um bom grau de sanidade das uvas.

O ácido D-glucônico indicou uma fraca relação com os níveis de OTA observados nas uvas, sugerindo ineficiência na predição do rastreio a OTA. Já, em relação à *Botrytis*, o coeficiente de determinação foi de 0,903 para a safra de 2005 e de 0,820 para 2006 (ano em que a podridão amarga foi observada), sendo assim, o ácido D-glucônico comportou-se como um bom indicador para a contaminação por *Botrytis*, muitas vezes, não observada no exame visual.

A formação de OT α mediada pela enzima em meio de uva sintético, confirmou atividade na hidrólise de OTA. A formação de OT α foi discretamente favorecida na maior temperatura (35⁰C), independente do pH e das concentrações iniciais de OTA. No entanto, a atividade específica da enzima foi muito baixa e as concentrações de OT α ao final de 114 horas de ensaio foram similares para ambas concentrações iniciais do substrato. Esse fato leva a constatação de que a hidrólise da OTA representa uma ação residual da enzima Prolyvepac[®]. A hipótese de que o meio de uva possa apresentar algum componente que venha a colaborar para a redução da hidrólise da OTA também é sugerida.

Em relação à evolução da OTA durante a microvinificação, a fermentação alcoólica foi a operação mais representativa na redução dos níveis de OTA. Isso permite definir sob o ponto de vista de análise de risco, que a realização do controle apresenta 2 pontos críticos: mosto fresco e após a fermentação alcoólica, pois o nível de OTA continuou decrescendo até o final da vinificação. Para os dois ensaios a remoção da OTA no vinho foi superior a 80%, possibilitando a adequação ao estabelecido pela União Europeia e recomendado pela Organização

Internacional do Vinho (OIV). Os níveis de OTA obtidos ao final da vinificação, sugerem que os vinhos elaborados com uvas tintas de *viníferas* produzidas nas regiões do Planalto e Meio-Oeste Catarinenses apresentam baixo risco de exposição à OTA.

Em relação à sanidade das uvas, o presente estudo demonstrou baixo risco em relação à presença de micotoxinas e sua relação com a microbiota, bem como, com os níveis de ácido D-glucônico. Portanto, tem-se mais um indicador que reforça a tradição da região do Meio Oeste e a vocação da nova região do Planalto para a produção de uvas de excelente qualidade e conseqüentemente de bons vinhos no Estado de Santa Catarina.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. Applied and Environmental Microbiology, 60:2650-2652.
- ABRAMSON, D. (1998). Factors in mycotoxin formation. In K. K. Sinha & D. Bhatnagar (Eds.), Mycotoxins in agriculture and food safety:255-277. New York: Marcel Dekker.
- ABRUNHOSA, L.; SANTOS, L. and VENÂNCIO A. (2006). Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. Food Biotechnology, 20:231-242.
- ABRUNHOSA, L.; SERRA, R. and VENÂNCIO A. (2002). Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50:7493-7496.
- ABRUNHOSA, L. (2001). Isolamento de fungos filamentosos e produção de micotoxinas em uvas. Dissertação de Mestrado. (Engenharia Biológica), Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- ABRUNHOSA, L; PATERSON, R. R., KOZAKIEWICZ, Z., LIMA, N.; VENÂNCIO, A. (2001). Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. Letters in Applied Microbiology, 32: 240-242.
- ACCENSI, F., ABARCA, M. L., CANO, J., FIGUERA, L.; CABAÑES, F. J. (2001). Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. Antonie Van Leeuwenhoek 79:365-370.
- ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W. and BLACWELL, M. (1996). Introductory mycology. Ed. John Wiley & Sons, New York, 865p.
- AMORIN, L. & KUNIYUKI, H. (2005). Doenças da videira. Em KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO A. e CAMARGO, L.E.A. (eds). Manual de Fitopatologia, Vol 2, 4ª ed., (p.639-651). Ed. Agronomica CERES, São Paulo.
- ATROSHI, F.; BIESE, I.; SALONIEMI, H.; ALI-VEHMAS, T.; SAARI, S.; RIZZO, A.; VEIJALAINEN, P. (2000). Significance of

apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3:281-291.

BATA, Á & LASZTITY, R (1999). Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 10:223-228.

BATTILANI, P.; GIORNI, P.; BERTUZZI, T.; FOMENTI, S. and PIETRI, A. (2006). Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S53-60.

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

BATTILANI, P.; GIORNI, P. and PIETRI, A. (2003b). Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*, 109:715-722.

BATTILANI, P. & PIETRI, A. (2002). Ochratoxin A in Grapes and Wine. *European Journal of Plant Pathology*, 108:639-643.

BATTILANI, P.; GIORNI, P. and PIETRI, A. (2001). Role of cultural factors on the content of ochratoxin A in grape. *European Journal of Plant Pathology*, 83:231.

BAÚ, M.; BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; MINGUEZ, S.; CABAÑES, F. J. (2005). Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 98:125-130.

BELLÍ, N.; BAU, M.; MARÍN, S.; ABARCA, M.L.; RAMOS, A.J.; BRAGULAT, M.R. (2006). Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S-1:40-45.

BEJAOUI, H.; MATHIEU, F.; Taillandier, P.; Lebrihi, A. (2006a). Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. *International Journal of Food Microbiology*, 111: S46-S52.

BEJAOU, H.; MATHIEU, F.; TAILANDIER, P. and LEBRIHI, A. (2006b). Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* seção *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *Microbiology Letter*, 255:203-208.

BEJAOU, H.; MATHIEU, F.; TAILANDIER, P. and LEBRIHI, A. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 97:1038-1044.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L. and STREYER L. (2004). *Bioquímica*, 5ª ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1059p.

BEUCHAT, L.R. (1987). *Food and Beverage Mycology*, 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York, 661p.

BILGRAMI, K.S. & CHOUDHARY, A.K. (1998). Mycotoxin in preharvest contamination of agricultural crops. In: SINHA, K.K. & BHATNAGAR, D. (eds), *Mycotoxin agriculture and food safety*, (p. 1-43). Marcel Decker, New York.

BRAGA, H.J. & GHELLRE, R. (1999). Proposta de diferenciação climática para o Estado de Santa Catarina. Em: XI Congresso Brasileiro de Agrometeorologia (p.20-31), SBA, Florianópolis.

BRAGULAT, M.R., ABARCA, M.L. and CABAÑES, F.J. (2001). Na easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*. 71:139-144.

BRASIL, (1990). Decreto n° 99.066, de 08 de março de 1990. Regulamenta a lei n° 7.678, de 08 de Novembro de 1988, que dispões sobre à produção, circulação e comercialização do vinho e derivados do vinho e da uva.

BRAUCE, A.R; BURKE J.; TANNER, A.; HAMMACK S, WOODWARD, B.B. and POST, S. (1996). Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography. *Journal AOAC International Journal AOAC*,79 (2):451- 455.

BRAUSE, A.R.,TRUCKSESS, M.W.; THOMAS, F.S.; PAGE, W.

(1996). Determination of patulin in apple juice by liquid chromatography: collaborative study. *Journal of AOAC International* 79:451–455.

BRDE (2005). BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. Vitivinicultura em Santa Catarina: situação atual e perspectivas. Florianópolis, SC, 83p.

BRUININK, A.; RASONYI, T. and SIDLER, C. (1998). Differences in neurotoxic effects of ochratoxin A, ochracin and ochratoxin- α *in vitro*. *Natural Toxins*, 6 (5):173-177.

BULIT, J., DUBOS, B., (1988). *Botrytis* bunch rot and blight. In: Pearson, R.C., Goheen, A.C. (Eds.), *Compendium of Grape Diseases*, (p.13–15) APS Press, The American Phytopathological Society.

BURGESS, L. W., LIDDELL, C. M., and SUMMERELL, B. A. (1988). Laboratory manual for *Fusarium* research. (2nd ed.): *Fusarium* Research Laboratory. Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology. The University of Sydney.

BURROUGHES, L.F. (1977). Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation. *Journal AOAC*, 60 (1):100-103.

BUZZINI, P., GOBBETTI, M.; ROSSI, J.; RIBALDI, M. (1993) Utilization of grape-must and concentrated rectified grape-must to produce gluconic acid by *Aspergillus niger*, in batch fermentation. *Biotechnology Letters* 15:151–156.

CALDAS, G.M.M., OLIVEIRA, R.C., TESSMANN, D.J. e MACHINSKI, JR. M. (2008). Ocorrência de patulina em uva fina (*Vitis vinífera* L. cv Rubi) com sinais de podridão ácida. *Ciência Rural*, 38 (1):14-18.

CALLAGHAN, J.O.; CADDICK, M.X. & DOBSON, A.D. (2003). A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*, *Microbiology*, 149:3485–3491.

CARIDIS, K.A.; CHRISTAKOPOULUS, P. and MACRIS, B.J. (1991). Simultaneous production of glucose oxidase and catalase by *Alternaria alternate*. *Applied Microbiology*, 34:794-797.

CAST (2003). *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*. Council for Agricultural Science and Technology Ames, Iowa, 217p.

CASTEGNARO, M.; BARSCH, H. and Chernozemsky, I. (1987). Endemic nephropathy and urinary tract tumors in the Balkans. *Cancer Research*, 47:3606–3609.

CASTELLÁ, G., LARSEN, T. O., CABAÑES, F. J., SCHMIDT, H., ALBORESI, A., NIESSEN, L., FÄRBER P.; GEISEN R. (2002). Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Systematics and Applied Microbiology* 25:74-83.

CE (2005). Comissão Européia. Regulamento N. 123/2005 da Comissão de 26 de Janeiro de 2005, que altera o Regulamento (CE) n. 466/2001 no que diz respeito à ocratoxina A. *Jornal Oficial da União Europeia*, 25:3-5.

CECCHINI, F.; MORASSUT, M.; MORUNO, E.G.; DI STEFANO, R. (2006). Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology*, 23: 411–417.

CHU, F.S. (1974). A comparative study of the interaction of ochratoxins with bovine serum albumin. *Biochemical Pharmacology*, 23:1105-1113

CHU, F.S.; NOH, I. & CHANG, C.C. (1972). Structural requirements for ochratoxin intoxication. *Life sciences* – 1, 11:503-508.

CHULZE, S.N.; MAGNOLI, C.E. and DALCERO A.M. (2006). Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America – Review. *International Journal of Food Microbiology*, 111:S5-S9.

COELHO, A.R.; HOFFMANN, F.L. e HIROOKA, E.Y. (2003). Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. *Semina: Ciências Agrárias*, 24: 337-358.

CREPPY, E. E.; BAUDRIMONT, I. and ANNE, M. (1998). How aspartame prevents the toxicity of ochratoxin A. *Journal of Toxicological Sciences*, 23-S.2:165-172.

CUADRADO, M.U.; PEREZ-JUAN, M.P.; CASTRO, M.D.L. and GOMEZ-NIETO, M.A. (2005). A fully automated method for in real time determination of laccase activity in wines. *Analytica Chimica Acta*, 553: 99–104.

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

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

DEWEY, F. M. & MEYER, U. (2004). Rapid, quantitative Tube immunoassays for on-site detection of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Penicillium* antigens in grape juice. *Analytica Chimica Acta*, 513:11-19.

DELAGE, N.; dHARLINGUE, A.; COLONNA CECCALDI, B.; BOMPEIX, G. (2003). Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine. *Food Control*, 14 225–227.

DGHCP (2002). Directorate-General Health and Consumer Protection. Reports on tasks for scientific cooperation - Assessment of dietary intake of Patulin by the population of EU Member States, 138p.

EPAGRI/CIRAM. Zoneamento Agroecológico e socioeconômico de Santa Catarina.pdf, 1010 p. Versão eletrônica, disponibilizado em <http://ciram.epagri.rct-sc.br:8080/cms/zoneamento/zae.jsp>. Acessado em 03/07/2005.

EUROPEAN STANDARD (2003). Foodstuffs – Determination of ochratoxin A in wine and beer - HPLC method with immunoaffinity column clean-up, prEN14133:2003 E, European Comunittee for Standardization, Brussels.

FAO (2004). Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition Paper 81, ISBN: 9251051623, Rome, 180p.

FERNÁNDEZ-TREVEJO E. O., VERDÉS J. A. A. and ESPINOSA R. S. (2001). Validación de un método para la determinación de patulina en jugos y purés de frutas por HPLC. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 15, 1:20-25.

FISCHER, U. & BERGER, T. (2007). Alemania: Medición objetiva de la sanidad de las uvas. *In focus*, 31-1:18-21.

FISCHER, I.H.; KIMATI, H. & REZENDE, J.A.M. (2005). Doenças da acerola. Em KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO A. E CAMARGO, L.E.A. (eds). *Manual de Fitopatologia*, Vol 2, 4ª ed., (p.467-474). Ed. Agronomica CERES, São Paulo.

FOULER, S.G.; TRIVEDI, A.B. and KITABATAKE, N. (1994). Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide. *Journal AOAC International*, 77(3):631-637.

FREGONI, M. (1985). *Viticultura generale; compendi didattici e scientifici*. Ed. Reda, Roma, 728p.

FRISVAD, J. C. & THRANE, U. (1996). Mycotoxin production by food-borne fungi. In R. A. Samson, E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad, & O. Filtenborg (Eds.). *Introduction to food-borne fungi*, 5ª ed., (p.251-260). Centraalbureau voor Schimmelcultures: Baarn, The Netherlands.

FRISVAD, J. C. & FILTENBORG, O. (1989). Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia* 81, 837-861.

FROST, M.G. & MOSS, D.A. (1987). Production of enzymes by fermentations. In *Biotechnology*, 7a. (p. 421-457), Eds. Rehm, H.J. & Reed, G.

GAMS, W., CHRISTENSEN, M., ONIONS, A. H. S., PITT, J. I., & SAMSON, R. A. (1985). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: SAMSON, R.A. & PITT, J.I. (Eds.), *Advances in Aspergillus and Penicillium Systematics*, (p.55-62). Plenum Press, New York.

GAMBUTI, A.; STROLLO, D; GENOVESE, A.; UGLIANO, M.; RITIENI, A.; MOIO, L. Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*,

56 (2): 155-162.

GARCIA MORUNO, E.; SANLORENZO, C.; BOCCACCINO, B.; DI STEFANO, R. (2005). Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56: 73-76.

GARRIDO, L.R. & SONEGO, O.R. (2003). Doenças Fúngicas e Medidas de Controle. Em, Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado. Embrapa Uva e Vinho. Sistema de Produção, 4. ISSN 1678-8761- Versão Eletrônica.

GAUCHER, G.M. 1975. m-Hydroxybenzyl alcohol dehydrogenase. *Methods Enzymology*, 43:540–548.

GILBERT, J., & POHLAND, A. E. (2003). Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems (vol. 139). Ames: Council for Agricultural Science and Technology, 199 p.

GIOVANNINI, E. (1999). Produção de uvas para vinho, suco e mesa. Ed. Renascença, Porto Alegre, RS.

GOMES, M.C.S.R. (2006). Influência da microflora das uvas na qualidade dos vinhos. 100^o Curso Intensivo de Vinificação. 04/09-Anadia, Portugal.

GÓMEZ, C.; BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.R.; MINGUEZ, S. and CABAÑES, F.J. (2006). Ochratoxin A-producing fungi from grapes intended for liqueur wine production. *Food microbiology*, 23:541-545.

GORDON, S. H., SCHUDY, R. B., WHEELER, B. C., WICKLOW, D. T., & GREENE, R. V. (1997). Identification of Fourier transform infrared photoacoustic spectral features for detection of *Aspergillus flavus* infection in corn. *International Journal of Food Microbiology*, 35:179-186.

GRAZIOLI, B.; FUMI, M.D. and SILVA, A. (2006). The role of processing on ochratoxin A content in Italian must and wine; A study on naturally contaminated grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 111:S93-S96.

GRIFFIN, D.H. (1994). Fungal physiology, 2^a ed. Ed. Willey-Liss, New York, 458p.

GROSSO, F.; SAÍD, S.; MABROUK, I.; FREMY, J.M.; CASTEGNARO, M.; JEMMALI, M.; DRAGACCI, S. (2003). New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunísia. Food and Chemical Toxicology, 41 (8):1133-1140.

GUERRA, C.C. & BARANBÉ, D. (2005). Vinho, (p.423-469). Em VENTURINI FILHO, W.G. (coord), Tecnologia de Bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPC, legislação e mercado, 1^a ed., Ed. Edgard Blücher, São Paulo, SP.

HARVEY, J.M.; SMITH JR., W.L and KAUFMAN, J. (1972). Market diseases of stone fruits: cherries, peaches, nectarines, apricots and plums. USDA handbook, p. 414:464.

HARWIG, J.; BLANCHFIELD, B.J. and SCOTT, P.M. (1978). Patulin production by *Penicillium roqueforti* Thom from grape. Canadian Institute Food Science Technology Journal, 11(3): 149–151.

HARWIG, J.; SCOTT, P.M.; KENNEDY, B.P.C. and CHEN, Y.K. (1973). Disappearance of patulin from apple juice fermented by *Saccharomyces* spp. Canadian Institute Food Science Technology Journal, 6:45-46.

HAYES, A.W.; PHILLIPS, T.D.; WILLIAMS, W.L.; CIEGLER A. (1979). Acute toxicity of patulin in mice and rats. Toxicology 13:91–100.

HOCKING, A. ; VARELIS, P. and PITT, J.I. (2004). Incidence of ochratoxin A in Australian wine (p. 99-108). In: EMMETT, B. (Ed.), Fungal contaminants and their impact on wine quality. Final report to grape and wine Research and development corporation. Urrbae: Cooperative research center for viticulture.

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

HOPKINS J. (1993). The toxicological hazards of patulin. *Br Ind Biol Res Assoc Bull*, 32:3-4.

HORIE, Y. (1995). Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakkai Kaiho* 36: 73-76.

HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KAPPELI, O. DUTLER, H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal by differents adsorbents. *Toxicology Letter*, 122:179-188.

HWANG, C.A. & DRAUGHON, F.A. (1994). Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal Food Protectiton* 57:410-414.

IARC (1993). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. (Vol. 56) Lyon: International Agency for Research on Cancer.

IBGE (2007). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – Setembro 2007. Acessado em 30/10/07, disponibilizado em <http://www.sidra.ibge.gov.br>

IHA, M.H., & SABINO, M. (2007). Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks. *Food Control*, 19 (4): 417-422.

JELINEK, C.F.; PHOLAND, A.E. and WOOD, E.E. (1989). Worldwide occurrence of mycotoxins on foods and feeds – an update. *Journal of AOAC*, 72, 2:223-230.

KARLOVSKY, P. (1999). Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins*, 7:1-23.

KHURDIYA, D.S. (1995). Non-thermal methods for preservation of fruits and vegetables: A critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*-32, n.6:441-452.

KLICH, M.A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species, 1nd. Centraalbureau voor schimmecultures, The Netherlands, 111p.

KLICH, M.A. & PITT, J.I. (1988). A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), Division of Food Processing, North Ryde.

KOS, G.; LOGHNINGER, H. and KRŠKA, R. (2002). Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT/IR/ATR) as a tool for the detection of *Fusarium* fungi on maize. *Vibrational Spectroscopy*, 29:115-119.

KOSHINSKY, H.A. & KHACHATOURIANS, G.G. (1994) Mycotoxicoses: the effect of mycotoxin combinations (p.463–520). In: HUI, Y.H.; GORHAM, J. R., MURELL, K.D. and CLIVER, D.O. (Eds.), *Foodborne Disease Handbook*, vol.2, Marcel Dekker Inc.

KUIPPER-GOODMAN, T. & SCOTT, P.M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A, *Biomedical Environment Science*, 2:179–248.

KUROZAWA, C. & PAVAN, M.A. (2005). Doenças das rosáceas do tomateiro. Em KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO A. e CAMARGO, L.E.A. (eds). *Manual de Fitopatologia*, Vol 2, 4ª ed., (p.607-626). Ed. Agronomica CERES, São Paulo.

LARSEN, T. O., SVENDSEN, A., and SMEDSGAARD, J. (2001). Biochemical Characterization of Ochratoxin A-Producing Strains of the Genus *Penicillium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:3630-3635.

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

LEA, T.; STEIN, K. & STORMER, F.C. (1989). Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression, *Mycopathologia*, 107:153–159.

LEITE, R.M.V.B.C. (2005). Doenças do girassol. Em: KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO A. e

- CAMARGO, L.E.A. (eds). Manual de Fitopatologia, Vol 2, 4ª ed., (p. 385-399). Ed. Agronomica CERES, São Paulo.
- LI, S.; MARQUARDT, R.R; FROHLICH, A.A.; VITTI, T.G.; CROW, G. (1997). Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicology Applied Pharmacology*, 145 (1):82-90.
- LIU, J.Z.; YANG, L.P. & JI, L.N. (1999). Synthesis of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus niger* in resting cell culture system. *Letters Applied Microbiology*, 29:337-341.
- LOPES, M. C. (2002). Micobiota da filosfera. In I. M. Santos, A. Venâncio, & N. Lima (Eds.), *Ecologia dos fungos* (p.31-45). Braga: Micoteca da Universidade do Minho.
- LOPES, P. A. (2001) Probabilidades & Estatística – conceitos, modelos e aplicação em excel[®]. Reichmann e Affonso editores, Rio de Janeiro, 174p.
- LUGAUSKAS, A.; RAUDONIENE, V. & VEISTYTË, L. (2005). Toxin producing micromycetes on imported products of plant origin. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 12:109-118.
- LUND, F. & FRISVAD, J. C. (1994). Chemotaxonomy of *Penicillium aurantiogriseum* and related species. *Mycological Research*, 98:481-492.
- LÜTHI, H. & VETSCH, U. (1992). Mikroskopische beurteilung von weinen und fruchtsäften in der praxis. Heller Chemie – und Werwaltungsgesellschaft mbH. 169p.
- MAGAN, N. & EVANS, P. (2000). Volatiles in grain as an indicator of fungal spoilage, odour descriptors for classifying spoiled grain and the potential for early detection using electronic nose technology: A review. *Journal of Stored Product Protection*, 36: 319-340.
- MAGNOLI, C., ASTORECA, A., PONSONE, L., COMBINA, M., PALACIO, G., ROSA, C. A.; DALCERO, A. M. (2004). Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Letters in Applied Microbiology*, 39:326-331.

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

MAHFOUD, R.; MARESCA, M.; GARMY, N.; FANTINI, J. (2002). The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicology Applied Pharmacology*, 18:1209–1218.

MAJERUS, P. & KAPP, K. (2002). Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU member states, March 2002. Report on Tasks for Scientific Cooperation, Directorate-General Health and Consumer Protection. (disponível em http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/index_en.html).

MARTINS, M.C; BETTI, J.A.; LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE JR., R.P & AMORIN L. (2005). Doenças das rosáceas de caroço. Em KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO A. e CAMARGO, L.E.A. (eds). *Manual de Fitopatologia*, Vol 2, 4ª ed., (p. 545-557). Ed. Agronomica CERES, São Paulo.

MASSOLA JR, N.S; MARTINS, M.C; GIORIA, R. & JESUS JR, W.C. (2005). Doenças do alho e cebola. Em KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO A. e CAMARGO, L.E.A. (eds). *Manual de Fitopatologia*, Vol 2, 4ª ed., (p. 53-63). Ed. Agronomica CERES, São Paulo.

McCLOSKEY, L. P. (1974). Gluconic acid in California wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25- 4:198-201.

McKENZIE, K.S; SARR, A.B.; MAYURA, K.; BAILEY, R.H.; MILLER, D.R.; ROGERS, T.D.; NORRED, W.P. (1997). Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chemistry and Toxicology*, 35:807-820.

MELKI BEN FREDJ, S.; CHEBIL, S.; LEBRHI, A; LASRAM, A.; GORBEL, A.; MLIKI, A. (2007). Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyards. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 3:245-250.

MELLO, L.M.R. (2006). Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2006. Artigo Técnico, disponibilizado em 04/04/07 na página <http://www.cnpuv.embrapa.br>

MENDONÇA, C.; ABRUNHOSA, L.; SERRA, R. e VENÂNCIO, A. (2003). Contaminação fúngica das uvas e ocratoxina A em vinhos . Em: CERDEIRA, A.; VENÂNCIO, A.; ALVES, A.; BARROS, P. e SIMÕES, T. (eds). Impacto da Contaminação Fúngica sobre a Competitividade de Vinhos – Ocratoxina A. (9-27pp.). Ed. Micoteca da Universidade do Minho, Braga, Portugal.

MENEGUZZO, J. ; RIZZON, L.A.; MIELE, A. e AYUB, M.A. (2006). Efeito de *Botrytis cinerea* na composição do vinho Gewürztraminer. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 26-3, Julho/Setembro. Campinas.

MÍNGUEZ, S. (2003). Biodinâmica de implantación de micobiótica y efectividad de fungicidas en el control de las espécies ocratoxigénicas en el viñedo. Resultados de la reducción del contenido en ocratoxina en el vino. Em: CERDEIRA, A.; VENÂNCIO, A.; ALVES, A.; BARROS, P. e SIMÕES, T. (eds). Impacto da Contaminação Fúngica sobre a Competitividade de Vinhos – Ocratoxina A. (p.71-79). Ed. Micoteca da Universidade do Minho, Braga, Portugal.

MIRAGLIA, E. & BRERA, C. (2002). Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. Report on Tasks for Scientific Cooperation, Directorate-General Health and Consumer Protection.

MITCHEL D.; PARRA ALDRED, R. D. and MAGAN, N. (2004). Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel, Journal Applied Microbiology,97:439–445.

MOAKE, M. M., PADILLA-ZAKOUR, O. I. and WOROBO, R. W. (2005). Comprehensive Review of Patulin Control (p.1-21) – In: Methods in Foods Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Vol.1- Institute of Food Technologists.

MORALES, H.; MARÍN, S.; CENTELLES, X.; RAMOS, A.J. and SANCHIS, V. (2007). Cold and ambient deck storage prior to processing as a critical control point for patulin accumulation.

International Journal of Food Microbiology, 116: 260–265.

MOSS, M.O. & LONG, M.T. (2002). Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Food additives and contaminants, 19 (4):387-399.

NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A., and MARASAS, W. F. (1983). *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. University Park: Pennsylvania State University Press.

NIESSEN, L., SCHMIDT, H., and VOGEL, R. F. (2004). The use of tri5 gene sequences for PCR detection and taxonomy of trichothecene-producing species in the *Fusarium* section *Sporotrichiella*. International Journal of Food Microbiology, 95:305-319.

NIELSEN, K.F. & SMEDS GAARD, J. (2003). Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. Journal of Chromatography A, 1002:111–136.

NOVAKOSKI, D. & FREITAS, A. (2003). Vinho: castas regiões produtoras e serviço. Ed. Senec Nacional, Rio de Janeiro, RJ.

NUNES, E.O. (2001). Influência do pH e concentração inicial de glicose na produção de biomassa do fungo *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. Dissertação de Mestrado (Engenharia Química) UFSC, Florianópolis, S.C.

OLSSON, J., BORJESSON, T., LUNDSTEDT, T.; SCHNURER, J. (2002). Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic diagnose. *International Journal of Food Microbiology*, 72:203-214.

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

PAPA, M.F.S. (2005). Doenças da acerola. Em KIMATI, H.; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO A. e CAMARGO, L.E.A. (eds). Manual de Fitopatologia, 4ª ed., Vol 2,(p. 15-18). Ed.

Agronomica CERES, São Paulo.

PARDO, E.; MARÍN, S.; SANCHIS, V. and RAMOS, A.J. (2005). Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. *Food Microbiology* 22:383–389.

PARMASTO, E. & PARMASTO, I. (1992). Size and shape of basidiospores in the Hymenomycetes. *Mycologia Helvética*, 5:47-78.

PATERSON, R. R. M. & BRIDGE, P. D. (1994). *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi*. IMI Technical Handbooks, CAB International, Wallingford.

PÉREZ, L.; VALCÁRCEL, M.J.; GONZÁLEZ, P. and DOMECCQ, B.(1991). Influence of Botrytis infection of the grapes on the biological aging process of Fino Sherry. *American Journal Enology and Viticulture*, 42:58-62.

PÉTERI, Z.; TÉREN, J. and VÁGVÖLGY, J. (2007). Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology*, 24:205-210.

PIEMONTESE, L.; SOLFRIZZO, M. and VISCONTI, A. (2005). Occurrence of patulin in conventional and organic fruit products in Italy and subsequent exposure assessment. *Food Additives & Contaminants*, 22:437-442

PITT J.I. & HOCKING, A.D. (1997). *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, London, 593 p.

PITT, J. I. (1989). Food mycology - an emergengy discipline. *Journal Applied Bacteriology*, Symp. Supl., 1S-9S.

PITT, J. I. (1988). *A laboratory guide to common Penicillium species*. 2nd ed. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), Division of Food Processing, North Ryde.

PITT, J. I. (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology* 53:266–269.

PITT, J. I. (1979). *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. London: Academic Press.

POHLAND, A.E. NESHEIM, S. and FRIEDMAN, L. (1992). Ochratoxin A: a review (IUPACtechnicalrapport), Pure Applied Chemistry, 64:1029–1046.

POHLAND, A.E.; SCHULLER, P.L.; STEYN, P.S. and VAN EGMOND, H.P. (1982). Physicochemical data for some selected mycotoxins. Pure Applied Chemistry, 54:2219–2284.

POMMER, C. V. (2003) Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Ed. Cinco Continentes, Porto Alegre – RS. 777p.

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

RANALDI, G.; MANCINI, E.; FERRUZZA, S.; SAMBUY, Y.; PEROZZI, G. (2007). Effects of red wine on ochratoxin A toxicity in intestinal Caco-2/TC7 cells. Toxicology in vitro, 21-2:204-210.

RATOLA, N.; ABADE, E.; SIMÕES, T.; VENAÂNCIO, A.; ALVES, A. (2005). Evolution of ochratoxin A content from must to wine in Port Wine microvinification. Anal Bioanal Chem, 382:405-411.

RATOLA, N., MARTINS, L., and ALVES, A. (2004). Ochratoxin A in wines-assessing global uncertainty associated with the results. Analytica Chimica Acta, 513:319-324.

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y.J.; LARONDELLE, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. Chemico-Biological Interactions, 59-1:18-46.

ROLAND, J.O. & BEUCHAT, L.R. (1984). Biomass and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in apple juice as affected by sorbate, benzoate, SO₂, and temperature. Journal Food Science, 49:402–406.

ROLL, R.; MATTHIASCHK, G. and KORTE A. (1990). Embryotoxicity and mutagenicity of mycotoxins. J. Envir. Pathol.

Toxicol. Oncol. 10:1-7.

ROMERO, S.M.; COMERIO, R.M.; LARUMBE, G.; RITIENI, A.; VAAMONDE, G.; FERNÁNDEZ PINTO, V. (2005). Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *Journal of Microbiology*, 104:43-49.

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

ROSIER, J. P. (2003). Novas regiões: vinhos de altitude no sul do Brasil. Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia. 10:137-140. Bento Gonçalves, R.S.

ROSIER, J.P. & LOSSO, M. (1997). Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: Vitivinicultura – Boletim técnico, 83. Epagri, Florianópolis, Brasil, 41p.

ROUSSEAU, J. (2004). Ochratoxin A in wines: Current knowledge. *Vinidea.net Wine Internet Technical Journal*, vol.5.

ROTEM, J. (1978). Climatic and weather influences on epidemics. In: HORSFALL, J.G. & DIMOND, A. E. (ed.). *Plant disease*, vol 2: How disease develops in populations (p. 317-337). Academic Press. New York.

SABATER-VILAR, M.; MAAS, R.F.M.; DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; FINK-GREMMELS, J. (2004). Patulin produced by an *Aspergillus clavatus* isolated from feed containing malting residues associated with a lethal neurotoxicosis in cattle. *Mycopathologia*, 158:419-426.

SAGE, L., GARON, D., and SEIGLE-MURANDI, F. (2004). Fungal microflora and ochratoxin A risk in french vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:5764-5768.

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

Chemistry 50:1306-1311.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; KUIJPERS, A.; FRANK, J. M.; FRISVAD, J. C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 50:45-61.

SAMSON, R. A. & PITT, J. I. (2000). Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood Academic Publishers, Singapore

SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. (1996). Introduction to food-borne fungi (5^a ed.). The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 322p.

SAMSON, R. A.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; KING, A. D. (1992). Modern methods in food mycology. Amsterdam: Elsevier.

SAMSON, R. A. & GAMS, W. (1985). Typification of the species of *Aspergillus* and associated teleomorphs. In R.A.Samson & J. I. Pitt (Eds.), *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics* (p. 31-54). New York: Plenum Press.

SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S. and VAN OORSCHOT C.A.N.. (1984). Introduction to food-borne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.

SANTOS, I.M.; VENÂNCIO, A. e LIMA, N. (1998). Fungos contaminantes na indústria alimentar. Ed. Bezerra, Braga, 128p.

SCHATZMAYR, G.; HEIDLER, D.; FUCHS, E. MOHNL, M.; TÄUBEL, M.; LOIBNER, A.P.; BRAUN, R. BINDER, E.M. (2003). Investigation of different yeasts strains for detoxification of ochratoxin A. *Mycotoxicology Research*,19:124-128.

SCOTT, P. M., FULEKI, T., and HARWIG, J. (1977). Patulin content of juice and wine produced from mouldy grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25:434-437.

SCUSSEL, V. M. (1998). Micotoxinas em Alimentos. Ed. Insular, Florianópolis, S.C., 144p.

SERRA, R.M.A. (2005). Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação de com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A. Tese de doutorado (Engenharia Química e Biológica), Universidade do Minho, Braga, Portugal.

SERRA, R.; BRAGA, A. and VENÂNCIO, A. (2005). Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A Research in Microbiology, 156:515–521

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

SERRA, R.; ABRUNHOSA L.; KOZAKIEWICZ Z. and VENÂNCIO, A. (2003) Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes.

SHUNDO, L.; ALMEIDA, P.A.; RUVIERI, V.; NAVAS, S.A.; LAMARDO, L.C.A.; and SABINO, M. (2006). Ochatoxin A in wines and grape juice comercialized in the city of São Paulo, Brazil. Brazilian Journal of microbiology, 37:533-537.

SINGH, O.V.; KAPUR, N. and SINGH, R.P. (2005). Evaluation of agro-food byproducts for gluconic acid production by *Aspergillus niger* ORS-4.410. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21:519–524.

SILVA, A.; GALLI, R., GRAZIOLI, B., FUMI, M.D., (2003). Metodi di riduzione di residui di ocratoxina A nei vini. Industrie delle Bevande, 32 (187):467–472.

SIMÃO, S. (1971). Manual de fruticultura. Ed. Agronômica Ceres, São Paulo, 530p.

SKRINJAR, M.; RASIC, J.I. and STOJICIC, V. (1996). Lowering ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. Folia Microbiology, 41:26-28.

SMITH, J.E.; LACEY, J.; CUERO, R.; RAMAKRISHNA, N. and

GQALENI, N. (1988). Storage product ecology and mycotoxin formation. In: MIRAGLIA, M.; VAN EGMOND, H.; BRERA, C. & GILBERT, J. (eds), *Mycotoxins and phycotoxins – developments in chemistry, toxicology and food safety* (p.289-302), Oxford: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

SOMMER, N.F.; BUCHANAN, J.R. and FORTLAGE, R.J. (1974). Production of patulin by *Penicillium expansum*. *Applied Microbiology*, 28:589-593.

SPEIJERS, G.J.A. & SPEIJERS, M.H.M. (2004). Combined effects of mycotoxins, *Toxicology Letters* 153:91–98.

SHEPHARD, G. S. & LEGGOTT, N.L. (2000). Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. *Journal of Chromatography A*, 882:17–22.

SHUNDO, L.; ALMEIDA, P.A.; RUVIERI, V.; NAVAS, S.A.; LAMARDO, L.C.A.; SABINO, M. (2006). Ochratoxin A in wines and grape juice commercialized in the city of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of microbiology*, 37:533-537.

STANDER, M.A.; BORNSCHEUER, T.; HENKE, E. and STEYN, P.S.(2000). Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 48:5736–5739.

STOEV, S. D.; DJUVINOV, D.; MIRTICHEVA, T.; PAVLOV, D.; MANTLE, P. (2002). Studies on some feed additives giving partial protection against ochratoxin A toxicity in chicks. *Toxicology Letters* 135:33-50.

SUÁREZ, J. & IÑIGO, B. (1990). Microbial alterations in wines. Yeast and molds. In: *Enological Microbiology*, (p.331-347). Mundi Prensa, Madrid.

SVENDSEN, J. A. & FRISVAD, J. C. (1994). A chemotaxonomic study of the terverticillate penicillia based on high performance liquid chromatography of secondary metabolites. *Mycological Research* 98:1317-1328.

SYLOS, C. M. & RODRIGUEZ AMAYA, D. B. (1999). Incidence of

patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 16(2): 71–74.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology* 82: 173-179.

TANIWAKI, M.H. & SILVA, N. (2001). Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Núcleo de Microbiologia/ITAL, 82p.

TÉREN, J., VARGA, J., HAMARI, Z., RINYU, E.; KEVEL, F. (1996). Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 134:171-176.

TONIETTO, J. (2003). Indicações Geográficas para Vinhos Brasileiros. Em, Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado. Embrapa Uva e Vinho. Sistema de Produção, 4. ISSN 1678-8761- Versão Eletrônica.

TONIETTO, J.; GARRIDO, L.R. e SÔNEGO, O.R. (2002). Avaliação ex-ante do impacto de alterações climáticas do complexo energético do Rio das Antas sobre a viticultura regional – Relatório técnico – EMBRAPA – CNPUV, 76p.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R. & CASE, C.L. (2000). *Microbiologia*, 6^a ed., Artmed, Porto Alegre, 827p.

TRUCKSESS, M.W. & TANG, Y. (1999). *Journal of AOAC International*, 82:1109-1113.

UENO, Y.; KAWAMURA, O.; SUGIURA, Y.; HORIGUCHI, K.; NAKAJIMA, M.; YAMAMOTO, K.; SATO, S. (1991). Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi. IARC Scientific Publications 115, 71-75.

URBANO, G. R.; TANIWAKI, M. H.; LEITAO, M. F.; VICENTINI, M. C. (2001). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection* 64: 1226-1230.

USFDA (2004). Compliance policy guide. Compliance policy guidance for FDA staff. Sec. 510.150. Apple juice, apple juice concentrates, and apple juice products—Adulteration with patulin. U.S. Food and Drug Administration. Disponibilizado em:

http://www.fda.gov/ora/compliance_ref/cpg/cpgfod/cpg510-150.htm.

Acessado em: 02/08/2004.

VALENTA, H. (1998). Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal Chromatography A*, 815:75–92.

VAN DER MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, D. B.; THERON, J. J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205, 1112-1113.

VARGA, J. & KOZAKIEWICZ, Z. (2006). Review: Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science & Technology* 17:72–81.

VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVOLGYI, C. (2005). Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 321–32.

VARGA, J., KEVEI, F., HAMARI, Z., TÓTH, B., TÉREN, J., CROFT, J. H.; KOZAKIEWICZ, Z. (2000). Genotypic and phenotypic variability among black aspergilli. In: Samson, R. A. & Pitt, J. I. (Eds.), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification* (p.397-411). Amsterdam: Harwood Academic Publishers.

VERMA, R. J. & SHALINI, M. (1997). Ochratoxin A-induced cytotoxicity to human red blood cells and its prevention by certain vitamins. *Medical Science Research*, 25:833-834.

VRABCHEVA, T.; USLEBER, E.; RICHARD, D.; MARTLBAUER, E. (2000). Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian Villages with a history of Balkan Endemic Nephropaty. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:2483-2488

WALKER, R. (1999). Mycotoxins of growing interest. Proceedings of the third Joint FAO/UNEP International Conference on Mycotoxins. Tunis, Tunisia.

WESTPHALEN, S. L. & MALUF, J. R. T. (2000) Caracterização das áreas bioclimáticas para o cultivo de *Vitis vinifera* L. : regiões da Serra do Nordeste e Planalto do Estado do Rio Grande do Sul. Brasília: Embrapa. 98 p.

WESTWOOD, M. N. (1982). Fruticultura de zonas templadas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 461p.

WICHMANN, G.; HERBARTH, O. and LEHMANN, I. (2002). The mycotoxins citrinin, gliotoxin and patulin affect interferon- rather than interleukin-4 production in human blood cells. *Environmental Toxicology*, 17- 3:211–218.

WINKLER, A. (1976). J. Viticultura. Ed. Continental, México, 792p.

WHO (1996). . World Health Organization. Ochratoxin A - Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Food Additives series 35: 363-376, Geneva.

XIAO, H.; MADHYASTA, S.; MARQUARDT, R.R.; LI, S.; VODELA, K.; FROHLICH, A.A.; KEMPPAINEN, W. (1996). Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. *Toxicology Applied Pharmacology*, 137:182-192.

ZENARO, M. & MUGNOL, A.S. (2004). Formação de um *cluster* para o vale do vinho. *Evidência*, 03:94-102.

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

ZIMMERLI, B. & DICK, R. (1995). 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 cleanup: methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography*, B-666, 85-99.

ZOECKLEIN, B.W. (2006). Effects of Fruit Rot on Wine Stability. Acessado em 01/08/2007, disponibilizado em www.oardc.ohio-state.edu/grapeweb/OGEN/09252006.

ANEXOS

ANEXO A – Formulação dos meios de cultura

ANEXO B – Ficha técnica – enzima Prolive PAC[®]

ANEXO C – Formulação do meio de uva sintético

Anexo A - Formulação dos meios de cultura

- **Agar Czapeck extrato Levedura – CYA**
30 g de sacarose (Merck)
15 g de agar nº3 (Oxoid L13)
5 g de extrato de levedura (Difco 212750)
1g de K_2HPO_4 (Merck)
10 mL de concentrado de Czapek
Água destilada q.s.p. 1000mL

- **Concentrado de Czapek (com elementos traço)**
30 g de $NaNO_3$ (P.A. Merck)
5 g de KCl (P.A. Merck)
0,1 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (P.A. Merck)
0,1 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (P.A. Merck)
0,05 g de $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ (P.A. Merck)
Água destilada q.s.p. 1000mL

- **Agar Czapeck Dox – CZ**
30 g de sacarose (Merck)
15 g de agar nº3 (Oxoid L13)
1g de K_2HPO_4 (Merck)
10 mL de concentrado de Czapek
Água destilada q.s.p. 1000mL

- **Agar Extrato de Malte (MEA)**
20 g de glicose monohidratada (Merck)
20 g de extrato de malte (Oxoid L39)
20g de ágar (Oxoid L13 - nº3)
1 g de peptona (Oxoid L40)
Água destilada q.s.p. 1000mL

- **Ágar Agua Torneira – TWA c/ papel filtro**
15 g de agar nº3 (Oxoid L13)
Papel filtro
Água da torneira q.s.p. 1000mL

Anexo B - Ficha técnica: enzima Prolyve PAC®



LYVEN

PROLYVE PAC

Fungal acid proteolytic enzyme.

Presentation :

PROLYVE PAC is an acid protease obtained from a selected strain of *Aspergillus Niger*.

PROLYVE PAC contains some side activities like amylases, cellulases and hemicellulases.

Properties :

PROLYVE PAC is active in acid range pH. The optimum pH is at pH 2.5-3.0 (see fig.1).

PROLYVE PAC is stable between pH 2.3 and 6.0 (see fig.2). The optimum temperature is 55°C (see fig.3) and the enzyme is stable below 50°C (see fig.4).

Applications :

PROLYVE PAC is capable of splitting at random the inner peptide bonds of protein to produce peptides.

PROLYVE PAC can be used in very different field of applications : wine making, baking, meat tendering, manufacture of seasonings, gluten modification, digestive aids and feed applications.

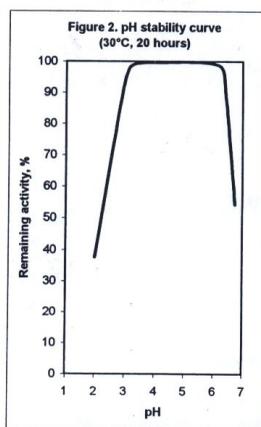
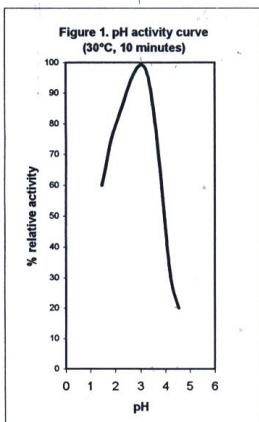
Description :

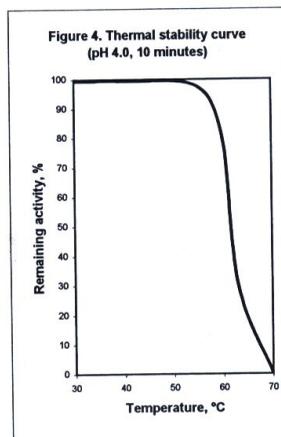
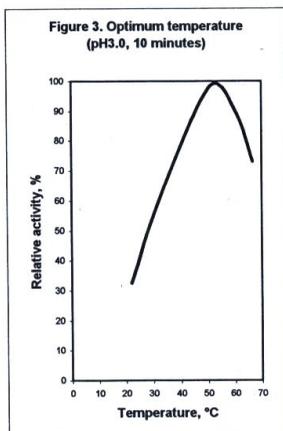
PROLYVE PAC is a slightly brownish powder soluble in water, diluent is lactose.

PROLYVE PAC is standardised at 3000 PAC units per gram following LYVEN assay method (available on request).

The standard packaging is 25 Kg paper sacks with plastic liner. Stored in cool place (less than 20°C) **PROLYVE PAC** is stable for a year.

PROLYVE PAC comply with FAO/WHO JECFA and FCC recommended specification for food grade enzymes.





LYVEN – A partnership with you :

For practical applications and processes LYVEN has sufficient technical “know-how” to be capable of providing special formulations to suit your needs. Do not hesitate to contact us.

LYVEN
Technical and Commercial Service
Zac Normandial
11 Avenue du Pays de Caen
14460 COLOMBELLES - FRANCE
Site Internet : www.lyven.com

Tél : 33 (0) 2 .31.35.05.30
Fax : 33 (0) 2 31.34.54.49

Address Internet : lyven@lyven.com

Anexo C - Formulação do meio de uva sintético

Reagente	Fórmula Química	Massa / g
D(+) Glucose monohidratada	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	76,99
D(-) Frutose	$C_6H_{12}O_6$	30,00
L(-) Ácido tartárico	$C_4H_6O_6$	7,00
L(-) Ácido málico	$C_4H_6O_5$	10,00
Sulfato de amónio	$(NH_4)_2SO_4$	0,67
Fosfato de amónio	$(NH_4)_2HPO_4$	0,67
Fosfato de potássio	KH_2PO_4	1,50
Sulfato de magnésio heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,75
Cloreto de sódio	$NaCl$	0,15
Cloreto de Cálcio	$CaCl_2$	0,15
Cloreto de cobre (II) dihidratado	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,0019
Sulfato ferroso heptahidratado	$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,021
Sulfato de zinco heptahidratado	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,0075
(+) Hidrato de catequina		0,05
Água destilada q.s.p. 1000 mL		