



Renata de Castro Nunes Santos

BIODIVERSIDADE DE *ASPERGILLUS* E *PENICILLIUM* EM SOLO E UVAS CHENIN BLANC E MOSCATO ITÁLIA CULTIVADAS EM MORRO DO CHAPÉU – BA/CHAPADA DIAMANTINA UTILIZADA NA PRODUÇÃO DE VINHOS FINOS E ESPUMANTES.

Lavras-Minas Gerais

2019

Renata de Castro Nunes Santos

**BIODIVERSIDADE DE *ASPERGILLUS* E *PENICILLIUM* EM SOLO
E UVAS CHENIN BLANC E MOSCATO ITÁLIA CULTIVADAS EM
MORRO DO CHAPÉU – BA/CHAPADA DIAMANTINA UTILIZADA
NA PRODUÇÃO DE VINHOS FINOS E ESPUMANTES.**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de bacharel.

Professor Doutor Luís Roberto Batista

Orientador

Lavras – Minas Gerais

2019

Renata de Castro Nunes Santos

BIODIVERSIDADE *ASPERGILLUS* E *PENICILLIUM* EM SOLO E UVAS CHENIN BLANC E MOSCATO ITÁLIA CULTIVADAS EM MORRO DO CHAPÉU – BA/CHAPADA DIAMANTINA UTILIZADA NA PRODUÇÃO DE VINHO ESPUMANTES.

BIODIVERSITY *ASPERGILLUS* AND *PENICILLIUM* IN SOIL AND GRAPES CHENIN BLANC AND MOSCATO ITALY CULTIVATED IN MORRO DO CHAPÉU - BA / CHAPADA DIAMANTINA USED IN THE PRODUCTION OF SPARKLING WINE.

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia de Alimentos, para a obtenção do título de bacharel.

Aprovada em: 17/05/2019

Professor Luís Roberto Batista

Professor Diego Alvarenga Botrel

Doutoranda Suzana Reis Evangelista

Lavras – Minas Gerais

2019

RESUMO

A elaboração de vinhos finos no Brasil é muito recente e pouco disseminada. Desde 2010 a cidade de Morro do Chapéu-BA vem investindo no plantio de uvas para produção de vinho. A região apresenta características climáticas que se aproximam de clima temperado e amplitude térmica durante praticamente o ano todo. O objetivo deste projeto foi isolar, identificar e posteriormente avaliar a produção de micotoxinas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solo e uva da região. Amostras de solo e de duas variedades de uvas foram avaliadas, sendo as uvas Chenin Blanc e Moscato Itália as selecionadas para análise no presente trabalho. Para a avaliação dos fungos presentes no solo foi realizado diluição seriada e para as uvas, plaqueamento direto. Os meios de cultura utilizados foram: DG18 – Ágar Dicloran Glicerol, DRBC - Dicloran Rosa Bengal Cloranfenicol. Após período de incubação, foram purificados em MA - Malte Ágar. Para a identificação foram reativados em CYA - Czapek Yest Agar e MEA - Extract Malt. Para os fungos provenientes do solo, o potencial ocratoxigênico e produção de citrinina foram avaliados através de cultivo ÁGAR-COCO (Creme de leite de coco, ágar e Água destilada) por 10 dias a 25°C. A verificação quanto à produção de toxinas foi realizada em luz ultravioleta com λ 366nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Para os fungos isolados das uvas, o método utilizado foi o de Cromatografia de Camada Delgada. No estudo, os fungos de maior incidência encontrados, foram do gênero *Aspergillus* da Seção *Nigri* e quanto à presença do gênero *Penicillium*, esse se mostrou em menor porcentagem, representando 27% dos fungos identificados. Quanto ao potencial toxigênico, apenas no Solo foram encontrados fungos produtores de micotoxina, sendo 3 isolados do gênero *Penicillium citrinum* produtores da micotoxina citrinina, e 2 presenças de OTA em *Aspergillus* das espécies *Niger* e *Ochraceus*, respectivamente. Nos fungos isolados das uvas não foi identificado a presença de micotoxinas. Este foi o primeiro trabalho realizado na região para a análise de biodiversidade de *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo encontrados fungos das espécies: *A. niger*, *A. japonicus*, *A. awamori*, *A. ostianus*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. foetidus*, *A. aculeatos*, *A. fumigatos*, *A. tamarii*, *A. tubingences*, *A. parasiticus*, *A. oryzae*, *A. carneus*, *A. carbonarius*, *P. paxillii*, *P. citrinum*, *P. variable*, *P. glabrum*, *P. coryophylum*, *P. sclerotiorum*, *P. breviocompactum*, *P. decumbensu*. Com os resultados obtidos, pôde-se concluir que

a produção de vinhos a partir das uvas colhidas na região, são de boa qualidade, portanto, não se deve descartar a possibilidade de novos estudos para uma melhor caracterização do local.

Palavras chave: Solo, Uvas, *Aspergillus*, *Penicillium*, OTA, Citrinina, Morro do Chapéu-BA.

ABSTRACT

The elaboration of fine wines in Brazil is very recent and little disseminated. Since 2010 the city of Morro do Chapéu-BA has been investing in planting grapes for wine production. The region presents climatic characteristics that approximate temperature and thermal amplitude during practically all the year. The objective of this project was to isolate, identify and further evaluate mycotoxin production by fungi of the genus *Aspergillus* and *Penicillium* in soil and grape of the region. Soil samples and two varieties of grapes were evaluated, with the Chenin Blanc and Moscato Italy grapes being selected for analysis in the present work. For the evaluation of the fungi present in the soil was carried out serial dilution and for the grapes, direct plating. The culture media used were: DG18 - Dichloran Glycerol Agar, DRBC - Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol. After incubation period, they were purified on MA-Agar Malt. For the identification were reactivated in CYA-Czapec Yest Agar and MEA-Extract Malt. For the fungi from the soil, the ochratoxigenic potential and citrinin production were evaluated by cultivating AGAR-COCO (coconut milk cream, agar and distilled water) for 10 days at 25 ° C. The verification of toxin production was performed in ultraviolet light with λ 366nm in the CAMAG Chromatograph (UF-BETRACHTER). For the isolated fungi of the grapes, the method used was the Thin Layer Chromatography. In the study, the most prevalent fungi were found in the *Aspergillus* genus of the Nigri Section and the presence of the genus *Penicillium* showed a smaller percentage, representing 27% of the fungi identified. As far as toxigenic potential was concerned, only Mycotoxin-producing fungi were found in Soil, three isolates of the genus *Penicillium citrinum*, producing mycotoxin citrinin, and two OTA occurrences in *Aspergillus*, *Niger* and *Ochraceus*, respectively. In the isolated fungi of the grapes the presence of mycotoxins was not identified. This was the first work carried out in the region to analyze the biodiversity of *Aspergillus* and *Penicillium*, being found fungi of the species: *A. niger*, *A. japonicus*, *A. awamori*, *A. ostianus*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. A. fumigatus*, *A. tubingences*, *A. parasiticus*, *A. oryzae*, *A. carneus*, *A. carbonarius*,

P. paxilii, *P. citrinum*, *P. variable*, *P. glabrum*, *P. coryophylum*, *P. sclerotiorum*, *P. breviocompactum*, *P. decumbensu*. With the results obtained, it was possible to conclude that the production of wines from the grapes harvested in the region are of good quality, therefore, the possibility of further studies should not be ruled out for a better characterization of the site.

Key words: Soil, Grapes, *Aspergillus*, *Penicillium*, OTA, Citrinina, Morro do Chapéu-BA.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVO GERAL	10
2.1	Objetivos específicos.....	10
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
3.1	Consumo de vinho no Brasil.....	10
3.2	Vinho Brasileiro	11
3.2.1	Vitivinicultura em Morro do Chapéu	14
3.3	Fungos produtores de micotoxinas na Cadeia Produtiva do Vinho	16
3.3.2	Ocratoxina.....	18
3.3.2	Citrinina.....	20
4	Material e Métodos.....	21
4.1	Amostragem	21
4.2.1	Isolamento e identificação de fungos do solo	22
4.2.2	Isolamento e identificação de fungos das uvas Chenin Blanc e Moscato Itália	23
4.3	Potencial toxigênicos dos fungos filamentosos no solo.....	24
4.4	Potencial toxigênicos dos fungos filamentosos nas Uvas: Moscato Itália e Chenin Blanc	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
5.1	Biodiversidade de Fungos no Solo.....	25
5.2	Avaliação do Potencial Toxigênico dos Fungos Identificados	30
5.2.1	Solo.....	30
5.2.2	Uvas.....	31
6	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1 INTRODUÇÃO

A elaboração de vinhos finos no Brasil é muito recente e pouco disseminada. O país apresenta grande diversidade de climas e solos que possibilitam a implantação de vinhedos em condições muito variadas, como ocorre na Campanha Gaúcha, regiões de altitude de Santa Catarina, no sul de Minas Gerais e, mais recentemente, na Chapada Diamantina, em Morro do Chapéu-BA. Esta região está localizada em altitude de aproximadamente 1.100 m, cujas características climáticas são influenciadas pelo Clima Oceânico, sua temperatura média compensada equivale a 19,7 °C e a precipitação média anual geralmente é reduzida, em torno de 800 mm.

O plantio de uvas no município de Morro do Chapéu iniciou-se em 2010 após a área ser identificada como promissora para o cultivo de variedades para elaboração de vinhos finos. O projeto inicial de plantio de uvas na região tinha como objetivo atender a pequenos e médios produtores como alternativa de renda. Hoje, já é considerado como potencial enológico e possui muitos produtores e empresários interessados.

Segundo o pesquisador da Embrapa e responsável pela parte de qualidade das uvas e elaboração dos vinhos, Giuliano Elias Pereira, na reportagem do site Diário da Chapada, o Brasil está em busca dos grandes *terroirs*, onde serão, certamente, elaborados grandes vinhos. Ainda de acordo com Pereira, a vitivinicultura de vinhos finos no Brasil é muito recente e são inúmeras as regiões que ainda não foram exploradas, e que poderão, devido às características de clima, solo e ao homem (na escolha do clone da variedade ideal, do porta-enxerto, da irrigação, da nutrição adequada, do manejo ideal, das particularidades da elaboração dos vinhos), se tornarem referência para o Brasil e ao mundo. (Diário da Chapada, 2012). O diferencial da região do Morro do Chapéu-BA, é que ela recebe duas vezes mais chuva que Petrolina e Juazeiro, onde se encontram outras vinícolas do Nordeste.

A deterioração de uvas tem sido relacionada à ocorrência de fungos filamentosos, tais como *Aspergillus* e *Penicillium*, causando alterações físicas, químicas e sensoriais do produto, acarretando em uma redução na qualidade do alimento fornecido ao consumidor. Esses fungos também podem produzir toxinas, o que representam risco à saúde do consumidor (FLEET, 2001).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos em diferentes etapas do manejo pré e pós-colheita. Entre as micotoxinas conhecidas atualmente, destaca-se a Ocratoxina A, pela sua característica carcinogênica, nefrotóxica e teratogênica em animais. A OTA é considerada, ainda, um composto possivelmente carcinogênico para os seres humanos, estando classificada no grupo 2B (IARC, 1993).

A presença de micotoxinas em qualquer alimento ou bebida acima do limite estabelecido pela legislação é indesejável, tanto do ponto de vista da saúde quanto econômico, pois a contaminação desses produtos implica em perdas de exportações uma vez que, países importadores têm limites regulatórios definidos. Tendo como exemplo a ocorrência de Ocratoxina, em 2011 o Brasil adotou o mesmo limite da Comissão Europeia sendo o máximo tolerável para essa micotoxina em vinho e suco de uva a concentração de 2,0 µg/L. (Resolução – RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011).

O crescimento de fungos micotoxigênicos e a produção de micotoxinas nos produtos agrícolas dependem de uma complexa relação entre fungo, substrato e meio ambiente. No entanto, a disponibilidade de água e de temperaturas adequadas são essenciais para que os fungos colonizem esses produtos e possam produzir micotoxinas. Outros fatores como, por exemplo, a presença de danos físicos devido à ação de insetos ou de máquinas agrícolas, a composição atmosférica do local ou a presença de agentes conservantes podem, também, influenciar o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas (Pitt et al., 2000).

Assim o presente trabalho teve como objetivo avaliar a biodiversidade de fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, bem como o seu potencial micotoxigênico em isolados de solo e uvas cultivadas na região do Morro do Chapéu-BA.

2 OBJETIVO GERAL

Analisar a biodiversidade de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, bem como o seu potencial micotoxigênico em fungos isolados de solo e uvas da Região de Morro do Chapéu/BA.

2.1 Objetivos específicos

- a) Isolar os fungos das espécies *Aspergillus* e *Penicillium* encontrados tanto no solo quanto em uvas;
- b) Identificar os fungos isolados;
- c) Avaliar os fungos identificados quanto a produção de micotoxinas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

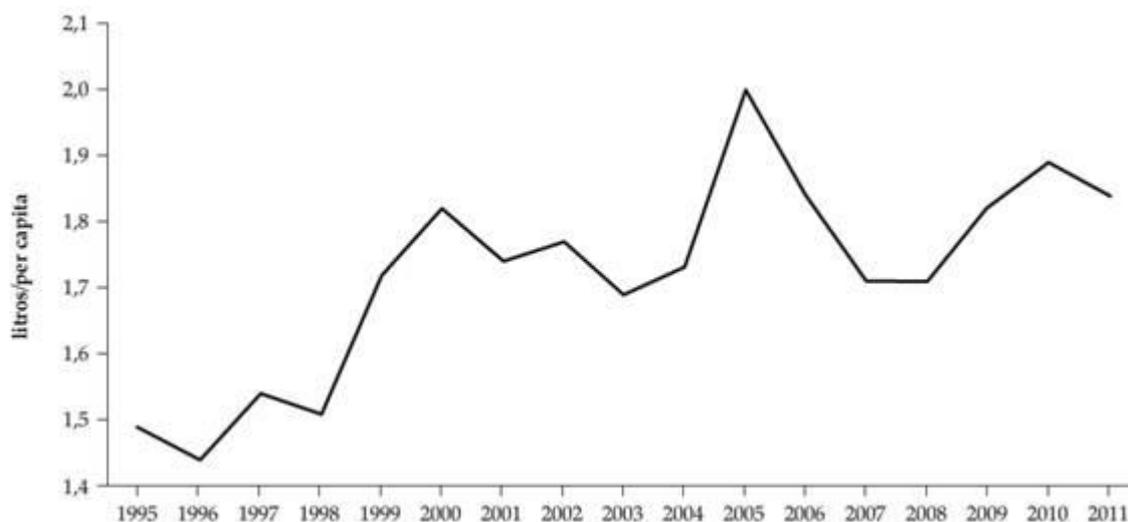
3.1 Consumo de vinho no Brasil

O consumo de vinho no Brasil vem apresentando crescimento acentuado nas duas últimas décadas, porém, pode se afirmar que os brasileiros consomem mais vinhos provenientes de outros países. Dados coletados pela Secretaria de Comércio Internacional (Secex) do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio (MDIC), para o período compreendido entre 1995 e 2014, apresentam que a importação brasileira de vinhos estrangeiros apresentou taxa de crescimento de 11,2% ao ano. (Almeida et al,2015)

O processo de compras de vinhos pelos brasileiros, é influenciado e dependente das características socioeconômicas dos consumidores. Vale ressaltar que, em países latinos como o Brasil, existem certas limitações quanto ao consumo de vinhos finos, pois existem influências culturais que interferem na compra e também pelo fato de a restrição de renda impactar na escolha do tipo de vinho. (SATO e ANGELO,2007, p.3). Nos dados obtidos por Sato e Angelo (2007, p.3), “no Brasil o consumo per capita é de cerca de 2 litros por ano”.

A quantidade de vinho consumido no Brasil per capita por ano, é considerada baixa, quando comparada a outros países, segundo Almeida (2015, p. 6). Uma vez que em países da Europa, o consumo é maior que 35 litros, como exemplos, França (46 litros), Portugal (44 litros) e Itália (38 litros). Quando comparado também a outros países da América do Sul, o consumo brasileiro é considerado baixo. O consumo de vinho da Argentina, do Uruguai, Chile e Paraguai chega a ser 11 vezes maior que o do brasileiro em 2011. (Almeida et al,2015)

Apesar de ser baixo em comparação com outros países, o consumo de vinho no Brasil tem apresentado crescimento consistente ao longo dos últimos anos, como pode ser visto na Figura 1. De acordo com dados da OIV, o consumo brasileiro se elevou de 1,49 litro per capita, em 1995, para 1,84 litro per capita em 2011. Isso representa taxa de crescimento de 1,3% ao ano ao longo do período. (Almeida et al,2015)



Fonte: International Organization of Vine and Wine (OIV), 2015.

Figura 1. Evolução do consumo per capita de vinho no Brasil - 1995 a 2011 - em litros por ano

3.2 Vinho Brasileiro

A história do plantio de uvas para a produção de vinhos no Brasil, já possui mais de 500 anos. O primeiro contato dos brasileiros com a bebida, se deu com a chegada dos colonizadores Portugueses, que se instalaram na Região de São Paulo, no qual fizeram os primeiros testes com as plantações. Posteriormente, as culturas de vinho foram levadas para cultivo no Estado do Rio Grande do Sul. Nessa época, houve

grande instabilidades e desistências, devido a não aderência de algumas espécies às regiões, e até mesmo surtos de doenças fúngicas. Então, o plantio de uvas, permaneceu como cultura doméstica até o final do século XIX, tornando-se uma atividade comercial no início do século seguinte, por iniciativa dos imigrantes italianos estabelecidos no sul do país (PROTAS et al., 2005).

Os imigrantes italianos, principalmente, foram em grande parte os responsáveis pelo ressurgimento da cultura do vinho na Região Sul do país. Com a chegada de cerca de 90.000 italianos, dentre os anos de 1875 e 1914, os mesmos, aplicaram seus conhecimentos em produção de vinho e se adaptaram à região e as variedades de uvas nativas que, resultaram em um vinho de excelente qualidade. A produção foi certa e logo transformou os pequenos negócios familiares em vinícolas de grande porte, cujos os produtos eram transportados ao longo de todo o território brasileiro (Vinitude, Clube dos Vinhos, 2016).

Desde a década de 1980, vinícolas brasileiras, localizadas no Sul do Brasil, têm investido em tecnologias para a produção de variedades de uvas europeias, bem como em processos de vinificação modernos, a fim de melhorar a qualidade do vinho nacional. Esses investimentos resultaram em muitos prêmios em provas nacionais e internacionais de vinhos (SATO e ANGELO, 2007).

Segundo João Veloso (2012), “Outra região que está crescendo e se firmando como produtora de vinhos é o Vale do São Francisco, situado nos estados de Pernambuco e Bahia. Como em todas as regiões, a viticultura é fundamental desempenhando aqui um fator primordial, pois devido às características climáticas, esta região é a única do mundo a produzir vinhos de qualidade oriundos de duas colheitas por ano.”

Devido à diversidade ambiental é possível observar diferentes características bioclimáticas entre as regiões vitivinícolas do Brasil, sendo possível encontrar videiras com um, dois ou três ciclos anuais (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006).

O cultivo de uvas para a produção de sucos e elaboração de vinhos podem ser distribuídas em três zonas de acordo com suas características: viticultura temperada, que se encontra nos Estados do Sul e do Sudeste; viticultura tropical, nos quais são representados pelos Estados de Pernambuco e Bahia, especificamente a região do

Vale do São Francisco; e por fim, a viticultura subtropical brasileira, no Norte do Estado do Paraná, onde predomina o cultivo de uvas finas de mesa. (IBRAVIN, 2010).

Segundo dados do ano de 2015, em pesquisas realizadas pela Embrapa, o maior produtor de uvas do Brasil é o Estado do Rio Grande do Sul, com produção maior que 800 mil toneladas por ano. O segundo e o terceiro estado, são Pernambuco e São Paulo, respectivamente. Este presente trabalho, refere-se à produção de uvas e vinhos da Região da Bahia, que como se pode ver na tabela a seguir, possui uma produção crescente.

Produção de Uvas no Brasil em Toneladas			
Estado/Ano	2013	2014	2015
Rio Grande do Sul	808.267	812.537	876.286
Pernambuco	228.727	236.767	237.367
São Paulo	172.868	146.790	142.063
Paraná	79.052	80.910	80.000
Santa Catarina	53.153	66.106	69.189
Bahia	52.808	77.504	77.401
Minas Gerais	12.734	11.557	12.615
Goiás	4.581	3.330	3.492
Ceará	664	573	940
Brasil	1412854	1436074	1499353

Tabela 1 – Produção de Uvas no Brasil, Embrapa, 2016

Com experiência de mais de um século no cultivo de uvas, o Brasil é considerado um grande campo de experiências para a plantação e produção de vinhos. Com o passar dos anos, novas potenciais regiões produtoras são encontradas, novas variedades são introduzidas nos vinhedos e modernas técnicas são adotadas. Diversas uvas já demonstraram excelente habitualidade em território brasileiro. As variedades mais encontradas no país são: Ancellotta, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Syrah, Tannat, Tempranillo, Touriga Nacional (Vinhos do Brasil).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, da International Organization of Vine and Wine (OIV), divulgada pela Ibravin, Instituto Brasileiro do Vinho, o Brasil figurou em 2012 entre os 20 países mais importantes do mundo na produção de vinho.

País	Quantidades			
	2009	2010	2011	2012
1. França	46.269	44.320	50.757	41.422
2. Itália	47.314	48.525	42.772	40.060
3. Espanha	36.093	35.535	33.397	30.392
4. EUA	21.965	20.887	19.187	20.510
5. China	12.800	13.000	13.200	14.880
6. Austrália	11.784	11.420	11.180	12.660
7. Chile	10.093	8.844	10.464	12.554
8. Argentina	12.135	16.250	15.473	11.778
9. África do Sul	9.986	9.327	9.324	10.037
10. Alemanha	9.228	6.906	9.123	9.012
11. Portugal	5.868	7.133	5.610	6.141
12. Romênia	6.703	3.287	4.058	3.311
13. Grécia	3.366	2.950	2.750	3.150
14. Brasil	2.720	2.459	3.394	2.917

Tabela 2 – Quantidade de vinho produzida (em milhões de hectolitros) pelos países ao redor do Mundo.

Fonte: International Organization of Vine and Wine (OIV), 2015.

3.2.1 Vitivinicultura em Morro do Chapéu/Bahia

O município de Morro do Chapéu, localiza-se na região oriental da Chapada Diamantina, conhecida por sua vasta biodiversidade e belezas naturais, além de posição geográfica privilegiada, cerca de mais de 1.200 metros acima do nível do mar. Considerada uma das cidades mais frias do estado da Bahia, possui clima com uma temperatura média anual de 20°C, chegando a 8º C graus em períodos de inverno (abril a agosto).



Figura 2 – Localização de Morro do Chapéu na Bahia

Fonte: Wikipédia, 2018

Morro do Chapéu, apresenta um clima Clima Oceânico, tipo Cwb, criado por sua elevada altitude e sua posição no agreste baiano que leva a cidade a receber, ainda uma influência marítima, das massas nebulares vindas do oceano atlântico e das massas polares oceânicas advindas do Brasil meridional. Apesar de ter uma quantidade de chuvas inferior a diversas cidades com este tipo de clima, Morro do Chapéu, chove anualmente 157,6mm a menos que o Clima Oceânico de Característica Continental da nublada e úmida Varsóvia, na Polônia. (Wikipédia, 2018)

No ano 2010, iniciou-se o plantio de uvas na cidade de Morro do chapéu/BA, tendo como ideia um projeto vindo de uma cooperação entre produtores da região, prefeitura, governo estadual e a União das Cooperativas da Região de Champanhe, na França, para o investimento e testes iniciais. No município em 2013, já tinham sido colhidas algumas safras de uvas na área experimental, que compreendia cerca de 1,5 hectares. Após as colheitas e testes realizados com as primeiras produções de vinhos, obtiveram-se resultados técnico-enológico satisfatórios, no que se refere à qualidade obtida da bebida, atestada, inclusive, pela Embrapa/Cpatsa (PE). Confirmando que as características climáticas da região, altitude (1.200 metros acima do mar) e a alta incidência de chuva, podem produzir uvas e vinhos de ótima qualidade. Vale ressaltar que a região recebe duas vezes mais chuva que Petrolina e Juazeiro, principal polo vinícola do Nordeste. (Jornal da Chapada, 2018)

O vinhedo foi estabelecido em um solo arenoso profundo, conduzido em espaldeira ascendente, com podas em duplo cordão esporonado e irrigado por gotejamento. As videiras foram podadas no início do ano de 2013 e colhidas em agosto e setembro do mesmo ano, cujas colheitas foram submetidas à elaboração de vinhos brancos e tintos tranquilos (Vasconcelos et al, 2014).

Foram plantadas muitas variedades de videiras no município, dentre elas: pinot noir, cabernet sauvignon, petit verdot, tannat, malbec, merlot, syrah, sauvignon blanc, chardonnay e muscat petit grain. Os testes iniciais, tiveram como objetivo identificar o comportamento das variedades e a sua adaptação às condições de solo e clima da Chapada Diamantina. O local tem capacidade para produzir 16 toneladas de uvas, mas, hoje em dia, produz oito (Secom Bahia, 2013).

A variedade Moscato Itália, originalmente encontrada nos países Itália e Alemanha, tem como características principais, a coloração branca e um elevado teor de açúcar. Muito utilizada para a produção dos vinhos de mesa e espumantes, suas bebidas são reconhecidas pelo seu sabor ácido misturado ao seu alto dulçor e de coloração palha claro.

Provinda da França e muito cultivada e disseminada na África do Sul, a variedade Chenin Blanc, possui coloração branca e uma alta adaptabilidade em diferentes climas e países. Possui uma acidez característica e é bastante utilizada para a produção de vinhos com notas de frescor, tais como vinhos varietais (em que somente se usa uma variedade de uvas) ou blends.

3.3 Fungos produtores de micotoxinas na Cadeia Produtiva do Vinho

De acordo com Murphy et al (2006, apud Maziero; Berzot 2010), alguns gêneros de fungos filamentosos podem produzir micotoxinas, dentre as quais, destacam-se a aflatoxina, ocratoxina, zearalenona, patulina, fumonisina e desoxinivalenol. As micotoxinas são metabólitos secundários, de baixo peso molecular, produzidos por fungos; apresentam efeito tóxico para o homem e outros seres vivos, plantas e microrganismos (Bennett & Klich, 2003).

Segundo Hussein & Brassel (2001) conforme citado por Maziero & Berzot (2010), “diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, como também, uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de toxina. Os efeitos tóxicos das micotoxinas podem ser potencializados pelo sinergismo que pode haver entre elas ou com doenças, principalmente imunossupressoras”.

Para os fungos se desenvolverem e produzirem micotoxinas é preciso que haja condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, composição química do alimento e por fim, potencial redox (Pereira et al., 2002). A presença do fungo no alimento não resulta em produção de micotoxina obrigatoriamente, assim como, a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo (Diniz, 2002). Pode acontecer que o alimento passe por um tratamento térmico no qual o fungo seja eliminado e a micotoxina continue presente no produto.

A ingestão de alimentos contaminados por micotoxinas, podem causar micotoxicoses em animais e pessoas. O grau da micotoxicose é dependente do indivíduo e do tipo de micotoxinas, aspectos como idade e estado nutricional da pessoa, também são considerados.

As condições climáticas de um país determinam, em grande parte, as classes de fungos que irão crescer e os tipos de micotoxinas que podem produzir. No Brasil, existem condições propícias para o crescimento de todo tipo de fungos produtores de micotoxinas.

As micotoxinas são produzidas principalmente por cinco gêneros de fungos: Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Claviceps e Alternaria. As principais micotoxinas encontradas em alimentos são: aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1), ácido fusárico, fumonisinas (B1 e B2), fumonisinas, ocratoxinas (A, B e C), patulina, citrinina, zearalenona e tricotecenos. Aflatoxinas são encontradas em frutas secas e cereais em condições de umidade e temperatura elevadas e constituem um risco a saúde humana, devido aos seus efeitos tóxicos imediatos, imunossupressores, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. As espécies mais importantes de Aspergillus produtoras de aflatoxinas são A. flavus, que só produz AFB, e A. parasiticus, que produz AFB e AFG (Peraica et al., 2000).

De acordo com Gil-Serna et al (2017): “As boas práticas agrícolas e de colheita são o segredo para minimizar a ocorrência de OTA em uvas e vinho (FAO, 2001). Mesmo que as condições ambientais estejam favorecendo o crescimento de fungos, a aplicação de um manejo adequado do vinhedo pode reduzir significativamente a

concentração final de OTA nas uvas (Covarelli, 2012).” As medidas para reduzir a incidência de *Aspergillus* spp. em bagas maduras incluem a minimização de danos às uvas durante a colheita e a remoção de bagas descoloridas, seleção de variedades de uvas resistentes a danos causados pelas chuvas, ou a aplicação de métodos de controle para reduzir pragas e outras doenças fúngicas.

Apesar da Ocratoxina A ser a mais comumente encontrada em uvas e vinhos, têm crescido o número de estudos associados ao aparecimento de contaminações por alguns dos derivados da OTA. Um trabalho que exemplifica essa ocorrência, foi um realizado em países Mediterrâneos, nos quais mostra a detecção de OTA simultaneamente com OTB e OTC em praticamente todas as amostras de vinho, em altos níveis de concentração.(Gil-Serna, 2017).

3.3.2 Ocratoxina

A Ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário encontrado em alguns alimentos e em solo, essa micotoxina é produzida por espécies de fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* (MATEO et al., 2007; EC, 2006; IMPERATO et al., 2011; BRERA et al., 2011). As espécies ocratoxigênicas são comumente encontradas em regiões de clima temperado e tropical, sendo detectadas em solo e em matérias orgânicas, como falado anteriormente, causando contaminações às uvas durante o período de crescimento das bagas por exemplo. Por se apresentar uma molécula bastante consolidada e estável, essa ocratoxina pode permanecer presente nos alimentos mesmo após estes serem processados (MURILLO-ARBIZU et al., 2010).

A OTA é um composto de cor branca e cristalina, com nome químico (R) N[(5-cloro-3,4-di-hidro-8-hidroxi-3-metil-1oxo-1H-2-benzopirran-7-il)carbonil]-L-fenilalanina. Sua fórmula empírica é C₂₀H₁₈O₆NCl (Figura 3) e possui peso molecular de 403,82g/mol. (ANLI; ALKIS,2010).

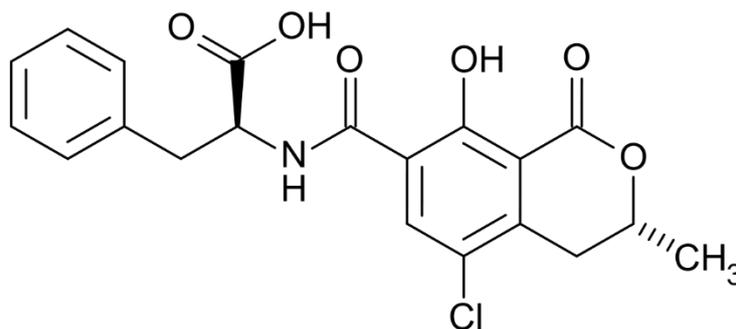


Figura 3: Estrutura da Ocratoxina A

Fonte: (ANLI; ALKIS, 2010).

Para identificar a presença dessa micotoxina nos fungos, um dos mecanismos utilizados é a Cromatografia em Camada Delgada. A Cromatografia em Camada Delgada (CCD), é um método considerado simples, com um técnica de fácil comparação de padrões e manchas dentro do espectro UV, além da vantagem de ser de baixo custo. (VALENTA, 1998; CIGIC e PROSEN, 2009; WELKE et al., 2010; HOELTZ et al., 2010). Os dispositivos de carga acoplada (DCA), ao serem ajustadas à CCD, proporcionam um instrumento preciso para quantificação de micotoxinas, na medida em que, por meio de sensores, captam a imagem de uma área em frações de segundo ou em tempo real (LANCASTER et al., 2006; WELKE et al., 2010).

Em suas pesquisas, Da Rocha et al (2012), afirma que *Aspergillus section Nigri* são a fonte de OTA em produtos como uvas, frutas secas e uma fonte menor em café. Battilani et al. (2003) em seu trabalho com uvas das regiões do norte e sul da Itália, identificaram 477 isolados de *Aspergillus sp.*, 97% do total de isolados (464) foram identificados como *Aspergillus section Nigri*. Dentro deste gênero, 86 foram identificados como *Aspergillus carbonarius* que apresentaram 60% do total de isolados produtores de OTA, e o restante, 378 isolados foram considerados apenas como grupo do *Aspergillus niger*. Apenas 4% foram produtores de OTA.

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

Em sua revisão, Gil-Serna et al. (2017), afirma que a incidência de Ocratoxina A em uvas para produção de vinhos é realmente extensa, portanto o conteúdo dessa micotoxina raramente excede os limites impostos pela União Europeia (usualmente 2 mg/L). Em 2002, uma avaliação sobre a ingestão de OTA pela população de países da União Europeia concluiu que o vinho contribui com 13% da média de ingestão total, tornando-o a segunda fonte mais relevante. Os cereais foram considerados os contribuintes mais importantes (50%) (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002).

3.3.2 Citrinina

A citrinina é um subproduto metabólico de origem cumarínica que provém do crescimento de várias espécies de fungos, dentre eles, os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. As micotoxinas são produzidas durante o desenvolvimento fúngico em grãos, alimentos processados e produtos alimentícios, oriundos ou não do processamento e da manipulação em citricultura (C.A. Carvalho; B.C.T.M. Fernandes; R.B. Freire, 2005).

A citrinina (CIT) possui fórmula molecular $C_{13}H_{14}O_5$, massa molecular de 250,25 g/mol e ponto de fusão de 172 °C.¹⁴ Esta micotoxina é comumente encontrada como contaminante em milho, arroz, trigo e outros cereais, em frutas senescentes e derivados lácteos; este composto também é estável durante o processamento e preparo de alimentos (HACKBART et. al, 2012). A citrinina é sólida e tem coloração amarelada quando é cristalizada em etanol absoluto. É pouco solúvel em água, é solúvel em etanol aquecido, benzeno, clorofórmio, acetato de etila e pouco solúvel em éter de petróleo e etanol (BETINA, 1984).

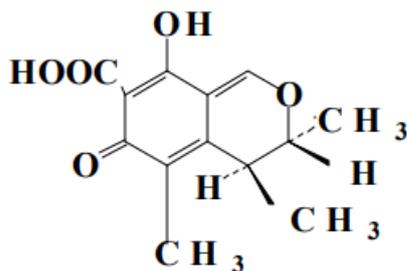


Figura 4 – Estrutura química da Citrinina

Fonte: Ribeiro et al. (1997)

A citrinina, que pode ser produzida por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Monascus* foi descoberta em 1931, sendo estudada, a princípio, com o propósito de ser empregada como antibiótico. Porém, tal propósito foi frustrado após a demonstração de sua atividade nefrotóxica em 1955 (HETHERINGTON e RAISTRICK, 1931; DAMODARAN et al., 1973; BETINA, 1984). Essa descoberta gerou crescente preocupação da população científica, uma vez que os fungos produtores dessa micotoxina são contaminantes naturais de frutas e grãos, com potencial toxicidade para consumidores de tais produtos.

P. citrinum é considerado o principal e mais eficiente produtor de citrinina, mas fungos toxigênicos, como *P. expansum*, *P. viridicatum*, *P. roqueforti*, *P. verrucosum*, *P. steckii*, *P. corylophilum*, *Aspergillus carneus*, *A. terreus*, *A. candidus*, *A. niveus*, *Monascus ruber* e *M. purpureus*, podem também produzi essa micotoxina em determinadas quantidades (BETINA, 1984).

4 Material e Métodos

4.1 Amostragem

Para avaliar a ocorrência de fungos filamentosos em solo, foram coletados porções em três pontos equidistantes ao longo de uma diagonal traçada na área de cultivo da vinícola localizada em Morro do Chapéu-BA, totalizando 300g de solo, ou seja, 100g de cada ponto. Também foram feitas análises nas uvas Moscato Itália e Chenin Blanc cultivadas na vinícola. Foram retiradas 100 unidades de uvas

provenientes de diferentes bagas para análise (essa quantidade foi utilizada para as duas variedades).

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Micologia e Micotoxinas de Alimentos – LAMIT - Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras-MG.

4.2.1 Isolamento e identificação de fungos do solo

O isolamento de fungos filamentosos provindos do solo da área da Vinícola de Morro do Chapéu/BA foi realizado pela técnica de Diluição seriada, no qual 10g de cada ponto coletado foram homogeneizados com 90mL de água peptonada 0,1%. Utilizou-se as diluições 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000 para o plaqueamento em meio de cultura Dichloran Glicerol Medium Base (DG18) composto por 1,0 mL de Dicloran; 5,0g/L de Peptona Bacteriológica; 1,0 g/L de KH_2PO_4 ; 0,5g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 220 g/L de Glicerol; 15,0g/L de Ágar; 1 mg/L de cloranfenicol. e cultura DRBC - Dicloran Rosa Bengal DRBC composto por 10,0 g/L de Glicose; 5,0/L de Peptona Bacteriológica; 1,0 g/L de KH_2PO_4 ; 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mL de solução 5% de Rosa de Bengala; 1,0 mL de Dicloran; 15,0 g/L de Ágar; 1 mg/L de cloranfenicol.

As placas de meios de cultura DRBC e DG18 foram então incubadas em BOD à 25 °C por 5 a 7 dias para a posterior avaliação e isolamento dos fungos filamentosos. Após o período de incubação foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/g).

Para a purificação das culturas de fungos filamentosos, foram realizadas repicagens sucessivas em meio MA - Malte Ágar. A partir de uma prévia caracterização morfológica das colônias crescidas de modo a se obter a diferenciação dos morfotipos presentes, as culturas puras as espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foram incubados em meio CYA - Czapek Yest Agar composto por 1,0 g de K_2HPO_4 , 10ml de Czapek Concentrate (NaNO_3 - 30.0 g, KCl - 5.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 5.0g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.1g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.1g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0.05g, Água destilada- 1.0L), 5,0g de Extrato de levedura, 30g de Sacarose, 15 g de Agar e 1.0 L de água deslitolada, a 25°C e 37°C e MEA - Extract Malt Agar, composto por 30,0g de extrato de malte, 5,0g de peptona bacteriológica e 15,0g de ágar, a 25°C durante 7 dias. Após o período de incubação, com o crescimento adequado dos fungos, foram avaliados as características macroscópicas e lâminas foram preparadas para

observação das características microscópicas. A identificação foi realizada através de manuais de identificação descritos por Klich (2002) e Pitt (2000).

4.2.2 Isolamento e identificação de fungos das uvas Chenin Blanc e Moscato Itália

Para o isolamento dos fungos provenientes das uvas, foi utilizada a técnica de plaqueamento direto em meio de cultura DRBC - Dicloran Rosa Bengal DRBC composto por 10,0 g/L de Glicose; 5,0/L de Peptona Bacteriológica; 1,0 g/L de KH_2PO_4 ; 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mL de solução 5% de Rosa de Bengala; 1,0 mL de Dicloran; 15,0 g/L de Ágar; 1 mg/L de cloranfenicol. De cada ponto da videira foram selecionadas 100 bagas de uvas (sadias e injuriadas), que foram submetidas à desinfecção superficial com hipoclorito de sódio a 1%. Após a desinfecção as uvas foram plaqueadas diretamente sob o meio DRBC e incubadas a 25°C por 7 dias.

Para a purificação das culturas de fungos filamentosos, os fungos foram coletados das bagas de uvas contaminadas e foram realizadas repicagens sucessivas em meio MA - Malte Ágar. A partir de uma prévia caracterização morfológica das colônias crescidas de modo a se obter a diferenciação dos morfotipos presentes, as culturas puras as espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foram incubados em meio CYA - Czapek Yest Agar composto por 1,0 g de K_2HPO_4 , 10ml de Czapek Concentrate (NaNO_3 - 30.0 g, KCl - 5.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 5.0g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.1g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.1g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0.05g, Distilled water - 1.0L), 5,0g de Extrato de levedura, 30g de Sacarose, 15 g de Agar e 1.0 L de água deslitolada, a 25°C e 37°C e MEA - Extract Malt Agar, composto por 30,0g de extrato de malte, 5,0g de pepitona bacteriológica e 15,0g de ágar, a 25°C durante 7 dias para observação das características macroscópicas. Após o período de incubação com o crescimento adequado dos fungos. Foram avaliadas as características macroscópicas e lâminas foram preparadas para observação das características microscópicas. A identificação foi realizada através de manuais de identificação descritos por Klich (2002) e Pitt (2000).

4.3 Potencial toxigênicos dos fungos filamentosos no solo

O potencial ocratoxigênico e produção de citrinina e aflatoxina foram avaliados pelo método de Ágar Creme de Coco, onde os isolados do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* foram inoculados em meio de cultivo ÁGAR-COCO (Creme de leite de coco: 400g; Ágar: 12g; Água destilada: 400mL) por 10 dias a 25°C, no escuro segundo metodologia descrita por Mohamed et al. (2013). A confirmação quanto à produção de citrinina, ocratoxina e aflatoxina foi realizada em luz ultravioleta com λ 366nm em Cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de citrinina apresentaram fluorescência verde amarelo intenso ao redor da colônia. Já os isolados produtores de ocratoxina e aflatoxina tiveram coloração azulada diante da luz UV.

4.4 Potencial toxigênicos dos fungos filamentosos nas Uvas: Moscato Itália e Chenin Blanc

Para determinação do potencial de produção de OTA, AFLA e Citrinina, os isolados fúngicos testados foram inoculados em meio YES (Yeast Extract Sucrose Agar) e CYA (Czapek Yeast Agar) a 25°C por 7 dias, do qual foi realizada a técnica de plug agar para avaliação em cromatografia de camada delgada, conforme Filtenborg & Frisvad (1980). Foram utilizados os padrões de cada micotoxina nas Placas de Cromatografia de Camada Delgada (Merk-Sílica Gel 60, 20x20) e como Fase móvel TEF-Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (50:40:10). Após a eluição, as placas foram secas em capela de fluxo de ar. A confirmação quanto a produção de micotoxinas foi feita em luz ultravioleta com comprimento de onda entre 264nm e 366nm em um cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados como produtores de ocratoxina A e aflatoxina B1, B2, G1 e G2, apresentaram um RF (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão da ocratoxina A e da aflatoxina B1, B2, G1 e G2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Biodiversidade de Fungos no Solo e Uvas

Todos os pontos de solo analisados se apresentaram infectadas por fungos filamentosos.



Figura 5 – Contaminação de fungos Uvas Chenin Blanc

Dos 96 isolados identificados do solo, 71 pertencem ao gênero *Aspergillus* e 25 ao gênero *Penicillium* (Tabela 3). Foram identificadas as espécies: *A. flavus* (4), *A. niger* (26), *A. niger* Agregado (5), *A. tubingensis* (2), *A. japonicus* (5), *A. awamori* (7), *A. carneus* (1), *Aspergillus sp.* (2), *A. ostianus*(5), *A. oryzae* (1), *A. tamaritii* (2), *A. fumigatus*(1), *A. ochraceus* (3), *A. aculeatus* (4), *A. foetidus* (2), *A. carbonarius* (1), *P. corylophilum* (2), *Penicillium sp* (4), *P. glabrum* (1), *P. citrunum* (9), *P. paxilli* (4), *P. variable* (4) e *P. hetheringtonii* (1). Na amostra avaliada, o gênero *Aspergillus* foi o de maior incidência com média de 73,96% de ocorrência.

SOLO	
Isolados	Número de Isolados
<i>A. niger</i>	26
<i>A. niger</i> Agregado	5
<i>A. flavus</i>	4
<i>A. tubingensis</i>	2
<i>A. japonicus</i>	5
<i>A. awamori</i>	7
<i>A. carneus</i>	1
<i>Aspergillus sp</i>	2
<i>A. ostianus</i>	5
<i>A. oryzae</i>	1
<i>A. tamaritii</i>	2
<i>A. fumigatus</i>	1
<i>A. ochraceus</i>	3
<i>A. aculeatus</i>	4
<i>A. foetidus</i>	2
<i>A. carbonarius</i>	1
<i>P. corylophilum</i>	2
<i>Penicillium sp</i>	4
<i>P. glabrum</i>	1
<i>P. citrunum</i>	9
<i>P. paxilli</i>	4
<i>P. variable</i>	4
<i>P. hetheringtonii</i>	1
Total	96

Tabela 3 – Biodiversidade de Fungos no Solo

Dos 32 isolados identificados das uvas Moscato Itália, foram identificados as seguintes espécies: *A. niger* (10), *A. japonicus* (3), *A. parasiticus* (15), *P. seção citrina* (3) e *P. brevicompactum* (1), representados na Tabela 4. Na amostra avaliada, o

gênero *Aspergillus* foi o de maior incidência com média de 87,5% de incidências nas uvas.

Moscato Itália	
Isolados	Número de isolados
<i>A. niger</i>	10
<i>A. japonicus</i>	3
<i>A. parasiticus</i>	15
<i>Penicillium. Seção Citrina</i>	3
<i>P. brevicompactum</i>	1
Total	32

Tabela 4 – Biodiversidade de Fungos Uva Moscato Itália

Em relação a Uva Chenin Blanc, os 70 isolados foram identificados as seguintes espécies: *A. niger* (31), *A. Japonicus* (13), *P. sclerotiorum* (19), *P. glabrum* (2), *P. brevicompactum* (3), *P. decumbens* (2). Na amostra avaliada o gênero *Aspergillus* foi o de maior incidência com média de 63% de incidências nas uvas.

Chenin Blanc	
Isolados	Número de Isolados
<i>A. niger</i>	31
<i>A. japonicus</i>	13
<i>P. sclerotiorum</i>	19
<i>P. glabrum</i>	2
<i>P. brevicompactum</i>	3
<i>P. decumbens</i>	2
Total	70

Tabela 5 - Biodiversidade de Fungos Uva Chenin Blanc

No presente estudo, através da técnica utilizada, foi observada uma maior diversidade de espécies presentes no solo, sendo 14 espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. As espécies mais comuns no solo e que também ocorreram nas uvas foram: *A. niger*, *A. Japonicus* e *P. citrinum*. Um cenário melhor a respeito de todas as contaminações, pode ser melhor observado na tabela a seguir.

Espécie	Solo			Uvas		Total	Frequência
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Chenin Blanc	Moscato Itália		
Gênero <i>Aspergillus</i>							
<i>Aspergillus sp</i>	1	1	0	0	0	2	1,03092784
<i>A. niger</i>	6	7	13	31	10	67	34,5360825
<i>A. niger agreg.</i>	0	1	3	0	0	4	2,06185567
<i>A. japonicus</i>	1	1	3	13	3	21	10,8247423
<i>A. awamori</i>	2	3	2	0	0	7	3,60824742
<i>A. ostianus</i>	1	2	2	0	0	5	2,57731959
<i>A. foetidus</i>	1	0	1	0	0	2	1,03092784
<i>A. flavus</i>	1	0	3	0	0	4	2,06185567
<i>A. aculeatos</i>	1	2	1	0	0	4	2,06185567
<i>A. fumigatus</i>	0	1	0	0	0	1	0,51546392
<i>A. ochraceus</i>	0	3	0	0	0	3	1,54639175
<i>A. tamaraii</i>	0	1	1	0	0	2	1,03092784
<i>A. tubingences</i>	0	2	0	0	0	2	1,03092784
<i>A. parasiticus</i>	0	0	0	0	15	15	7,73195876
<i>A. oryzae</i>	0	0	1	0	0	1	0,51546392
<i>A. carneus</i>	0	0	1	0	0	1	0,51546392
<i>A. carbonarius</i>	0	0	1	0	0	1	0,51546392
Gênero <i>Penicillium</i>							
<i>P. paxilli</i>	1	3	0	0	0	4	2,06185567
<i>P. citrinum</i>	2	2	5	0	3	12	6,18556701
<i>P. variable</i>	1	2	1	0	0	4	2,06185567
<i>Penicillium sp</i>	1	2	1	0	0	4	2,06185567
<i>P. corylophilum</i>	1	0	1	0	0	2	1,03092784
<i>P. glabrum</i>	0	0	1	0	0	1	0,51546392
<i>P. Sclerotiorum</i>	0	0	0	19	0	19	9,79381443
<i>P. breviocompactum</i>	0	0	0	3	1	4	2,06185567
<i>P. decumbens</i>	0	0	0	2	0	2	1,03092784
Total:						194	100

Tabela 6 – Biodiversidade de *Aspergillus* e *Penicillium* em Solo e Uvas da região de Morro do Chapéu- BA.

Tanto nos isolados do Solo, quanto nos isolados da Uva, o *Aspergillus niger* foi a espécie que mais foi encontrada, com cerca de 34% de ocorrência dentre todos os fungos analisados.

Alguns estudos australianos demonstraram que o solo de vinhedo a uma profundidade de 0 a 5 cm abaixo das videiras é o principal reservatório de *Aspergillus Niger* da Seção Nigri (Clarke et al., 2003).

Tem sido demonstrado que em condições naturais de estresse, tal como infestações de insetos, climas secos, avaria mecânica, deficiências nutricionais e diferenças de temperatura e umidade podem promover a distribuição da população de fungos, incluindo estes presentes em uvas e que também afetam na suscetibilidade da cultivar quanto a presença de micotoxinas (Felšöciová; Mašková; Kačániová, 2018).

Leong et al. (2007) estudaram a incidência de *Aspergillus*, Seção Nigri, associada com solos de vinhedos australianos e ráquis. *A. niger* foi a espécie mais frequentemente isolada, e esteve presente em uma concentração maior do que *A. carbonarius* nos solos.

Em um trabalho realizado recentemente, com análises de uvas, suco de uvas, mosto e vinho provindos de diversas regiões da República Eslovaca; Felšöciová, Mašková, e Kačániová, (2018), também encontraram baixas incidências da presença do gênero *Penicillium* em seus experimentos. Em média, a cada produto analisado, apenas cerca de 2% dos fungos indentificados eram caracterizados como espécies de *Penicillium*.

A incidência de fungos filamentosos e níveis de toxinas em uvas e vinhos variam dependendo do tipo de uvas analisadas, a região onde o vinho é produzido, das praticas de agricultura, condições climáticas, e o processo de produção do vinho. (Alshannaq and Yu, 2017).

A região de Morro do Chapéu é classificada como uma região tropical, possui temperaturas altas e umidade relativa elevada. Estas condições são favoráveis ao crescimento de fungos *Aspergillus*, o que pode explicar a maior incidência deste gênero na região estudada. Segundo Pitt (2009) *Penicillium* são mais comuns em climas temperados, já as espécies do gênero *Aspergillus* são encontradas em regiões tropicais.



Figura 6 – Foto de Isolado *Aspergillus Niger*

O gênero *Penicillium* tem sido comumente conhecido por crescer em uvas e por ser o causador do mofo com coloração esverdeada, que é uma doença secundária de bagas maduras e que resulta na perda de coloração e diminuição do teor de açúcar presente na fruta. Este gênero é dificilmente isolado de videiras com clima tropical em comparação às videiras situadas em condições climáticas mais baixas. (Rousseaux et al., 2014).

5. 2 Avaliação do Potencial Toxigênico dos Fungos Identificados

5.2.1 Solo

Após análise com o Método de Agar Creme Coco, obtiveram-se os seguintes resultados: Quanto a produção de citrinina, do gênero *Penicillium*, apenas a espécie *P. citrinum* comprovou presença da toxina em três dos nove fungos identificados. Já para a espécie *Aspergillus* houveram duas ocorrências de ocratoxina (OTA), nas espécie *A. niger* e *A. ochraceus*.

Apenas algumas espécies produzem OTA, pode-se citar como exemplo, *A. niger*, *A. carbonarius* e *A. japonicus* (Battilani et al., 2003a). *A. ochraceus* (pertencente à seção *Circumdati*), embora capaz de produzir OTA, foi apenas ocasionalmente isolado em uvas. (Serra et al., 2005).

Na Itália, levantamentos de campo estudaram os fungos associados com uvas e sua capacidade de produzir OTA em diferentes áreas de cultivo no norte e sul do país (Battilani et al., 2002) . A análise dessas amostras de uva revelou que a espécie *A. niger Agregado* foi a espécie prevalecente e *A. carbonarius* foi encontrado principalmente no sul da Itália e na Sicília (Lucchetta et al., 2010; Oliveri, 2007). *A. carbonarius* nunca foi dominante em diferentes estágios de crescimento, ou em diferentes áreas geográficas e anos, mas foi confirmado como o fungo chave devido à alta porcentagem de isolados com potencial produção de OTA.

Nos estudos de Michele HOELTZ (2012), com análise da Qualidade de vinhos Brasileiros e Importados, em relação a presença de Ocratoxina A, comprovou a baixa incidência dessa micotoxina em produtos de vinho. O seu trabalho consistiu em analisar 63 amostras de vinhos tintos brasileiros, argentinos, uruguaios e chilenos analisados quanto a presença de OTA, e em nenhuma das amostras ela foi detectada.

Segundo Pietri et al (2001), citado por Michele Hoeltz (2012), “A baixa ocorrência de OTA nos vinhos pode estar relacionada à baixa presença de fungos ocratoxigênicos nas uvas ou às condições climáticas desfavoráveis para o desenvolvimento destes durante o período de amadurecimentos e colheita das bagas”.

5.2.2 Uvas

Após análise com o método de Cromatografia de Camada Delgada. Foi possível notar que os fungos isolados das uvas das espécies Moscato Itália e Chenin Blanc não são produtoras de micotoxinas.

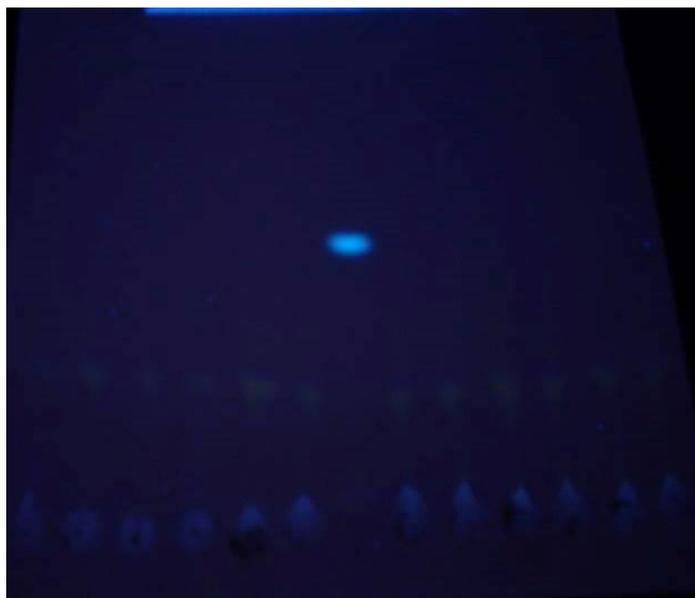


Figura 7 – Imagem Resultado de Cromatografia de Camada Delgada – Isolados
Chenin Blanc



Figura 8 – Imagem Resultado de Cromatografia de Camada Delgada – Isolados
Moscato Itália

A presença somente de fungos que não foram capazes de produzir OTA, AFLA e Citrininina avaliadas, indica uma segurança e qualidade das uvas produzidas na

Região de Morro do Chapéu/BA. Pode-se observar também, que a pouca ocorrência dessas no solo, tem baixa probabilidade de transferência para as uvas cultivadas.

Um trabalho realizado no Brasil por Einloft T. et al (2015), na Região de Rio Grande do Sul, com uvas das variedades Carbernet Sauvignon e Merlot, também avaliou a biodiversidade fúngica das uvas e conseqüentemente a ocorrência de Ocratoxina A nas frutas em estudo. Por possuir condições climáticas diferentes da Região Nordeste do Brasil, o gênero de fungos mais incidente, foi o *Alternaria* sp, com mais de 85% de predominância. Todos os fungos da espécie *Aspergillus* seção *Nigri* foram avaliados quanto a produção de OTA, os resultados encontrados foram muito próximos aos encontrados no presente trabalho, apenas 1 fungo foi identificado como real produtor, porém em níveis muito pequenos de concentração.

A contaminação do vinho por Ocratoxina A se dá, a partir do momento em que as as uvas destinadas ao processamento foram ponto do desenvolvimento de fungos. Assim, a matéria-prima é a responsável pela maior fonte de OTA nos vinhos e sua condição fitossanitária para a qualidade final deles (NUNEZ, 2008). Durante o processo de maturação das uvas, ocorre um elevado aumento no teor de açúcar e amolecimento da película da baga e, até a colheita, as uvas tornam-se mais susceptíveis à infecção por fungos do gênero *Aspergillus* (BATTILANI; MAGAN; LOGRIECO, 2006; LEONG et al., 2006; LEONG et al., 2007). Assim, o retardamento da colheita de uvas pode aumentar o risco de contaminação com OTA (GAMBUTI et al., 2005).

A alta incidência de fungos no solo e nas uvas podem ser melhoradas com a adoção de boas práticas agrícolas, desde as etapas de plantação, até a fase de colheita e armazenamento, tomando cuidado com a manipulação das bagas, para evitar injúrias e aumento da contaminação. Todas essas mudanças podem ser efetivas quanto a diminuição do risco da presença de fungos produtores de toxinas e também de patógenos, de acordo a literatura.

Apesar de não terem sido encontrados números expressivos de espécies produtoras de Ocratoxina A e Citrina no solo e uvas analisadas, é importante o controle e o conhecimento da microbiota existente já que, as uvas produzidas serão utilizadas para a posterior fabricação de vinhos finos e espumantes, além de ser

questão de saúde pública e os índices de concentração dessas substâncias, descritas por legislação.

6 CONCLUSÃO

A detecção de fungos nas amostras de solo e uvas analisadas demonstra a importância de avaliar e identificar os fungos, além de verificar a capacidade destes em produzir micotoxinas nos alimentos. A avaliação desses fungos, se relaciona com a qualidade do produto e ajuda avaliar se é necessário mudanças nas boas práticas e manipulação desses alimentos. O fungo de maior incidência no presente trabalho, foi o *Aspergillus niger*, com detecção total de 34% em todo o estudo. Foram identificados 27 espécies de fungos, sendo elas: *Aspergillus sp.*, *A. niger*, *A. niger agregado*, *A. japonicus*, *A. awamori*, *A. ostianus*, *A. foetidus*, *A. flavus*, *A. aculeatus*, *A. tamarii*, *A. tubingences*, *A. parasiticus*, *oryzae*, *A. carneus*, *A. carbonarius*, *P. paxilli*, *P. citrinum*, *P. variable*, *Penicillium sp.*, *P. corylophilum*, *P. variable*, *P. glabrum*, *P. sclerotiorum*, *P. breviocompactum* e *P. decumbens*.

Este foi o primeiro estudo realizado na região para a análise da biodiversidade dos fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* e avaliação do potencial micotoxigênico com uvas e solo em Morro do Chapéu/BA. Considerando que a produção de vinhos no local é recente, um estudo como este, tem grande validade para a caracterização do vinho local e pode ser um grande retorno de conhecimento para os produtores da região, principalmente em relação ao risco da presença de micotoxina.

Através deste trabalho, pode-se concluir que o vinho produzido a partir das uvas produzidas na Região de Morro do Chapéu/BA é de boa qualidade e segurança, visto que não foram isolados fungos produtores de micotoxinas nas uvas. Porém, para uma verdadeira conclusão, sugere-se uma continuidade no projeto, para avaliar novamente a incidência de fungos e presença de micotoxinas diretamente nas uvas e conseqüentemente a real qualidade do vinho da região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, A. N.; Bragagnolo, C.; Chagas, A. L. S. A Demanda por Vinho no Brasil: elasticidades no consumo das famílias e determinantes da importação. *Rev. Econ. Sociol. Rural* vol.53 no.3 Brasília July/Sept. 2015.

Alshannaq, A., Yu, J. H. 2017. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 14, no. 6, p. 632. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>

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

Bennett, J. W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* v.16, n.3, p. 497–516, 2003.

BETINA, V. Citrinin and related substances. In: V. Betina (Ed). *Mycotoxins, Production, Isolation, Separation and Purification*. Elsevier, Sci. Publ. Co. Inc., New York, p. 3-236. 1984.

CARVALHO, C.A.; FERNANDES B.C.T.M.; FREIRE, R.B. Supressão da resposta imunitária humoral causada pela citrinina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* vol.57 no.2 Belo Horizonte Apr. 2005.

Clarke, K., Emmett, R.W., Kazi, B.A., Nancarrow, N. & Leong, S.,(2003). Susceptibility of dried grape varieties to berry splitting and infection by *Aspergillus carbonarius* *Proceedings of 8th International Congress of Plant Pathology*, vol. 2, p. 140, Christchurch, New Zealand

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission regulation (EC) no 472: amending regulation (EC) no 466 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. *Official Journal of the European Communities*, Brussels, 16 Mar. 2002. p. L75/18-L75-20.

COVARELLI, L.; BECCARI, G.; MARINI, A.; TOSI, L. A review on the occurrence and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A in dehydrated grapes, non-

fortified dessert wines and dried vine fruit in the Mediterranean área. *Food Control* 2012, 26, 347-356.

DAMODARAN, C.; RAMADOSS, C.S. e SHANMUGASUNDARAM, E.R.B. A rapid procedure for the isolation, identification and estimation of citrinin. *Analytical Biochemistry*, v.52, p.482-488, 1973.

DA ROCHA ROSA, C.A., PALACIOS, V., COMBINAS, M., FRAGA, M.E., OLIVEIRA, R., MAGNOLI, C.E. & DALCERO, A.M. Potential ochratoxin A from wines grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants* 19:408–414. 2002.

Diário da Chapada. Agricultura: Experimento de uvas em Morro do Chapéu. Disponível em: <http://diariodachapada.com.br/noticia/452/agricultura-experimento-de-uvas-em-morro-do-chapeu-.html>. Acesso em: 09 de junho de 2018.

Diniz, S.P.S.S. Micotoxinas. Livraria e Editora Rural. 181p. 2002

EINLOFT, T. C.; HOELTZ M.; TEIXEIRA T. R.; OLDONI, V.P.; MANFROI, V.; NOLL, B. I. Survey of mycobiota, black *Aspergillus* and ochratoxin A occurrence on Brazilian wine grapes. Springer-Verlag Berlin Heidelberg and the University of Milan 2016.

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

Food and Agriculture Organization (FAO). Manual on the Application of the HACCP System in Mycotoxin Prevention and Control; FAO Food and Nutrition Paper, Food and Agriculture Organizations: Roma, Italy, 2001; Volume 73, pp. 1-124.

HACKBART, H.C. S.; SOUZA, M. M. S.; SCAGLIONI, P. T. S.; PRIMEL, E. G.; GARDA-BUFON, J.; BADIALE-FURLON, E. Método QuEChERS para determinação de ocratoxina a e citrinina em arroz e farelo de arroz. *Quím. Nova* vol.35 no.9 São Paulo 2012.

HETHERINGTON, A.C.; RAISTRICK, H. Studies in biochemistry of microorganisms XI. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. *Phil. Trans. R. Soc. London*, v.220, p.269-297, 1931.

HOELTZ, M. ; MONEZZI, L. P.; MANFROI, V.; NOLL, I. B. Ocratoxina A: análise da qualidade de vinhos brasileiros e importados. Braz. J. Food Technol., IV SSA, maio 2012, p. 58-63

HOCKING, A. D.; LEONG, S. L.; KAZI, B.A.; EMMETT, R.W; SCOTT, E.S.. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. Int. J. Food Microbiol, 2007, 119, 84-88.

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER). Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: IARC, 1993. 571p.

Jornal da Chapada. Chapada da Diamantina entra para a rota do vinho com produção em Morro do Chapéu. Disponível em: <https://jornaldachapada.com.br/2015/09/08/chapada-diamantina-entra-para-a-rota-do-vinho-com-producao-em-morro-do-chapeu/>. Acesso em: 16 abril. 2018.

KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht: CBS, 2002. 116 p.

KLICH, M.A. & PITT, J.I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. Transactions of the British Mycological Society 91:99–108. 1988.

LANCASTER, M.; GOODALL, D. M.; BERGSTROM, E. T.; McCROSSEN, S.; MYERS, P. Real-time image acquisition for absorbance detection and quantification in thin-layer chromatography. Analytical Chemistry, Washington, v. 78, n. 3, p. 905-11, 2006. <http://dx.doi.org/10.1021/ac051390g>

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

LEONG, S.L; HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; KAZI, B. A.; EMMETT, R. W.; SCOFF, E. S. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. International Journal of Food Microbiology. v.111, n.S1, p.S10-S17, 2006.

MATEO, R.; MEDINA, Á.; MATEO, E. M.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 79-83, 2007.

MORRO DO CHAPÉU. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2018. Disponível em: <[https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Morro do Chap%C3%A9u&oldid=51739824](https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Morro_do_Chap%C3%A9u&oldid=51739824)>. Acesso em: 7 abr. 2018.

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

MURILLO-ARBIZU, M. T.; AMÉZQUETA, S.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; CERAIN, A. L. Occurrence of Ochratoxin A in Southern Spanish Generous Wines under the Denomination of Origin "Jerez-Xérès-Sherry and 'Manzanilla' Sanlúcar de Barrameda". *Toxins*, Switzerland, v. 2, n. 5, p. 1054-1064, 2010.

Murphy, P.A.; Hendrich, S.; Landgren, C.; Bryant, C.M. Food Mycotoxins: An Update. *J. Food Scien.* v.71, n.5, p.51-65, 2006.

PEREIRA, M.L.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. *B. Ceppa.* v.20, n.1, p.141-156, 2002.

PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; PALLARONI, L.; PIVA IV, G. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants*, London, v. 18, v. 7, p. 647-654, 2001. [http:// dx.doi.org/10.1080/02652030119480](http://dx.doi.org/10.1080/02652030119480)

PITT, J. I. A Laboratory Guide to Common Penicillium Species. Australia: Food Science Australia. 2000. 187 p.

PROTAS, J. F. S. da; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. R. A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas. Brasília: EMBRAPA, 2001. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/>>. Acesso em: 24 abril .2015

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. A vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010. Brasília: SEBRAE, 2011.

PITT, J.I; HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage. Spring Science and Business Media: New York, 2009.

Resolução – RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites Máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa, 2011

RIBEIRO, de M. L. M. Desempenho da Vitivinicultura brasileira em 2015. Agroindústria Estudos socioeconômicos e ambientais, Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação. Embrapa. 2016.

RIBEIRO, S.M.; CHAGAS, G.M.; CAMPELO, A.P.; KLUPPEL, M.L. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effects on the homeostasis of reactive oxygen species. *Cell Biochemistry and Function*, v.15, p.203-209, 1997.

Rocha, A.J.D. & Costa, I.V.G. (org.). 1995. Projeto mapas municipais do município de Morro do Chapéu. Salvador, Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais.

Rousseaux, S., Diguta, C. F., Radoï-Matei, F., Alexandre, H., Guilloux-Bénatier, M. 2014. Non-botrytis grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins. *Food Microbiol.*, vol. 38, p. 104-121. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.013>

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Introduction to food-borne fungi. 4. ed. Centraalbureau: Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000.

SATO, G. S. e ANGELO, J. A. *As exportações brasileiras de vinhos e derivados*: início de processo de internacionalização. X SEMEAD - Seminários em Administração FEA-USP, 2007. Disponível em: <Disponível em: <http://www.ead.fea.usp.br/semead/10semead/sistema/resultado/trabalhosPDF/563.pdf> >. Acesso em: 11 abril, 2018.

Secom Bahia. Chapada da Diamantina se destaca na produção de uvas e tomates. Disponível em: <http://www.zeneto.com.br/noticia/7595/chapada-diamantina-se-destaca-na-producao-de-uvas-e-tomates>. Acesso em: 16 abril.2018

VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography A*, New York, v. 815, p. 75-92, 1998

Vasconcelos, M. C. O. et al. Potencial enológico de uvas viníferas cultivadas em região de clima tropical de altitude, na Chapada Diamantina-BA. Em: ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO. 57,2014, Petrolina. Potencial enológico de uvas viníferas cultivadas em região de clima tropical de altitude, na Chapada Diamantina-BA.

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/996727/1/anaisIC2014.59.pdf>

Veloso, João. A história do vinho no Brasil. Disponível em: <http://vinhosbrasucas.blogspot.pe/2012/10/a-historia-do-vinho-no-brasil.html>. Acesso em: 14 abril, 2018.

Vitude, Clube dos Vinhos. A Trajetória do Vinho no Brasil. Disponível em: <https://www.clubedosvinhos.com.br/a-trajetoria-do-vinho-no-brasil/>. Acesso em: 14 abril, 2018.

WILSON, D. M. Aflatoxin analytical methods for groundnuts. In: SEMPLE, R. L.; FRIO, A. S.; HICKS, P. A.; LOZARE, J.V. *Mycotoxin Prevention and Control in Food Grains*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/x5036E0m.htm>. Acesso em: 03 de junho de 2018.