

51075

UFV 36007

**LUÍS ROBERTO BATISTA**

**IDENTIFICAÇÃO, POTENCIAL TOXIGÊNICO E PRODUÇÃO DE  
MICOTOXINAS DE FUNGOS ASSOCIADOS A GRÃOS DE CAFÉ  
(*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Dra Sára Maria Chalfoun de Souza  
Co-orientador: MSc Guilherme Prado

LAVRAS  
MINAS GERAIS-BRASIL

2000

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

**Batista, Luís Roberto**

Identificação, potencial toxigênico e da produção de micotoxinas de fungos associados a grãos de café verde (*Coffea arabica* L. / Luís Roberto Batista. --  
Lavras : UFLA, 2001.

188 p. : il.

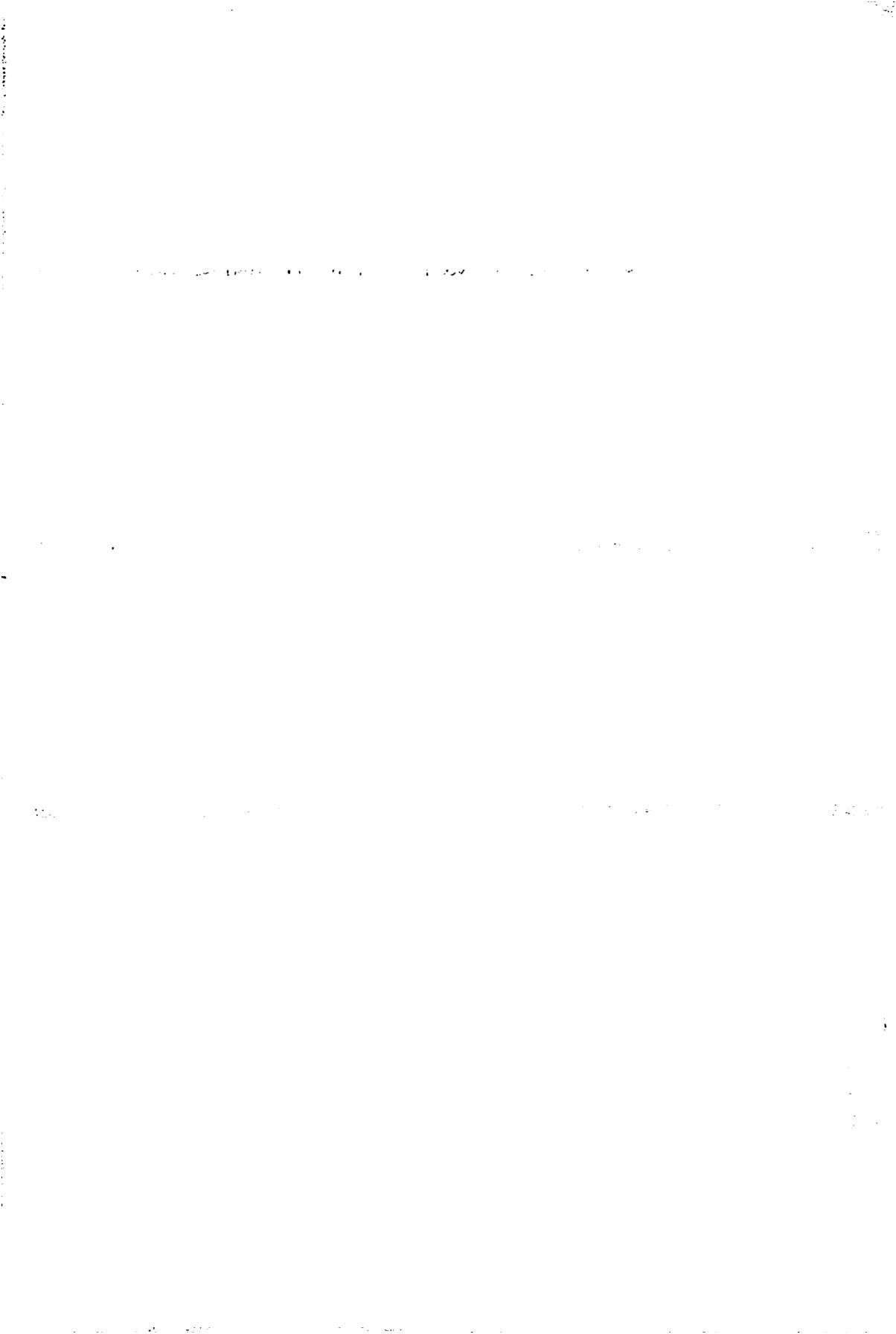
**Orientadora: Sara Maria Chalfoun.**

**Dissertação (Mestrado) – UFLA.**

**Bibliografia.**

I. Café. 2. Ocratoxina A. 3. *Aspergillus*. 4. *Penicillium*. 5. Potencial toxigênico.  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163  
-633.73943



**LUÍS ROBERTO BATISTA**

**IDENTIFICAÇÃO, POTENCIAL TOXIGÊNICO E PRODUÇÃO DE  
MICOTOXINAS DE FUNGOS ASSOCIADOS A GRÃOS DE CAFÉ  
(*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 19 de novembro de 2000

Dra Myrna Sabino

Instituto Adolf Lutz

Prof. Dr Mário Sobral de Abreu

UFLA

  
Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza  
EPAMIG/Lavras-MG  
(Orientadora)

LAVRAS

MINAS GERAIS-BRASIL

2243  
2833  
2811  
2810  
281

**AOS MEUS PAIS: OVÍDIO E EUNÍCE**  
**AOS MEUS IRMÃOS (POR ORDEM DE CHEGADA):**  
**CRISTINA**  
**ANA LÚCIA**  
**SILVANA**  
**EDSON**  
**ROSIANE**  
**NÚBIA**  
**JUNIOR**  
**À MINHA FAMÍLIA**  
**A TODOS OS MEUS AMIGOS**  
**A MINHA NAMORADA**

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a DEUS pela saúde, pela oportunidade, pela força e por ter posicionado em meu caminho as amigadas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, Ovídio e Eunice, pelo apoio, pela confiança e sacrifício que fizeram e estão fazendo para que eu consiga alcançar mais esta etapa.

Aos meus irmãos, Cristina, Ana, Silvana, Edson, Roseani, Núbia e Júnior, pelo incentivo, apoio familiar e financeiro. Muito obrigado.

À Dra Sara Maria Chalfoun de Souza pela incansável orientação, pelos esclarecimentos, pela confiança, pela amizade, pelos incentivos e por ser um exemplo de profissional.

Ao Guilherme Prado pela co-orientação, pelo interesse e pela atenção dedicada a este trabalho.

À Profa Eliana Pinheiro de Carvalho pelo apoio, incentivo e confiança, desde a minha chegada em Lavras.

A Cris pela imensa ajuda, carinho e por tornar os meus dias mais felizes, beijos..

Um “Muito obrigado especial” aos funcionários, professores e pesquisadores da UFLA e da EPAMIG, que tiveram uma participação direta na realização deste trabalho, entre eles:

Prof Luís Carlos e Mércia, do Laboratório de Fisiologia Pós-Colheita de Produtos e Vegetais do DCA, por permitir o uso de equipamentos e reagentes do laboratório.

Prof. Luiz Ronaldo e Sandra, pelo N<sub>2</sub>.

Ao Silvio, por ter cedido as amostras de grãos de café, ao Samuel pela análises químicas e físico-químicas dos grãos, e ao motoristas Valter e Janir.

A Vicentina e Aldair pela preparação dos materiais no laboratório da EPAMIG (apoio essencial);

Ao Marcelo Cláudio pela amizade e pela árdua tarefa de comprar os materiais e aquisição das diárias para as viagens.

Ao Renil pela amizade e pelo auxílio na identificação dos fungos.

As pesquisadoras e bolsistas da Fundação Ezequiel Dias, recebam também o agradecimento especial.

A Jovita, Vanessa e Dida pelo auxílio na identificação dos fungos, pelas fotos e pelo *A. parasiticus*.

A Thais, Fabiana, Rita, Luciana e Ana pela amizade e pela realização das análises de ocratoxina A em grãos de café .

Aos amigos que acreditaram em mim, e que estão sempre me apoiando.

A Mari, à mãe da Mari (Débora) por ter me iniciado na Microbiologia, à Tia Kelly, ao Rafael, a Margarita.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos pela oportunidade de realizar o curso.

À EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) e à Fundação Ezequiel Dias-BH por ter a cedido infraestrutura e reagentes para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café) por ter financiado o projeto.

À CAPES pelo apoio financeiro cedido através da Bolsa de Estudo durante o curso.

Espero poder retribuir a todos a felicidade e a sensação de dever cumprido que sinto neste momento e da qual jamais me esquecerei.

Obrigado a todos.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Produção de café no mundo, no Brasil e no Estado de Minas Gerais .....	03
2.2 Microrganismos associados aos grãos de café .....	05
2.3 Ocorrência de micotoxinas em grãos.....	10
2.4 Micotoxinas em grãos e produtos de café.....	12
2.5 Pesquisas sobre ocratoxina A em grãos e produtos do café no Brasil.....	20
2.6 Fungos toxigênicos.....	21
2.6.1 Fungos produtores de Ocratoxinas.....	22
↳ 2.6.1.1 Ocratoxinas.....	25
↳ 2.6.1.2 Ocratoxicoses.....	26
↳ 2.6.1.3 Propriedades físicas e químicas das Ocratoxinas.....	28
2.6.2 Fungos produtores de Aflatoxinas.....	31
2.6.2.1 Aflatoxinas.....	33
2.6.2.2 Aflatoxicoses.....	33
2.6.2.3 Propriedades físicas e químicas das Aflatoxinas.....	34
2.6.3 Fungos produtores de Esterigmatocistina.....	35
2.6.3.1 Esterigmatocistina.....	36
2.6.3.2 Toxicologia da Esterigmatocistina.....	36

2.6.3.3 Propriedades físicas e químicas da Esterigmatocistina.....	36
2.7 Identificação de fungos toxigênicos.....	37
2.8 Fatores que influenciam o crescimento e a produção de micotoxinas pelos fungos toxigênicos.....	43
2.8.1 Substrato.....	43
2.8.2 Temperatura e disponibilidade de água.....	47
2.8.3 Danos provocados por equipamentos e insetos.....	50
2.8.4 Interação entre microrganismos.....	51
2.9 Legislação e micotoxinas.....	55
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
→ CAPÍTULO 2: Identificação de espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> associadas a grãos de café beneficiado.....	72
RESUMO.....	72
ABSTRACT.....	74
1 INTRODUÇÃO.....	76
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.1 Amostras.....	78
2.2 Isolamento e identificação dos fungos.....	78
↳ 2.2.1 Identificação de fungos filamentosos de gênero <i>Aspergillus</i> .....	80
↳ 2.2.1.1 Identificação das espécies de fungos filamentosos do gênero <i>Aspergillus</i> .....	81
↳ 2.2.2 Identificação de fungos filamentosos de gênero <i>Penicillium</i> .....	82
↳ 2.2.2.1 Identificação das espécies de fungos filamentosos do gênero <i>Penicillium</i> .....	82
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
3.1 Descrição das espécies de fungos identificados.....	90
4 CONCLUSÕES.....	122
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124

CAPÍTULO 3: Determinação do potencial toxigênicos dos fungos dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> isolados de grãos de café beneficiado	128
RESUMO.....	128
ABSTRACT.....	130
1 INTRODUÇÃO.....	131
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	133
2.1 Isolados fúngicos utilizados para a avaliação do potencial toxigênicos.....	133
2.2 Determinação do potencial toxigênico dos fungos em meios de cultura.....	133
2.3 Determinação do potencial toxigênico dos fungos por Plug Ágar.....	134
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	136
3.1 Potencial Ocratoxigênico dos isolados da Seção <i>Nigri</i> .....	136
3.2 Potencial Ocratoxigênico dos isolados da Seção <i>Circundati</i> .....	137
3.3 Potencial Aflatoxigênico dos isolados da Seção <i>Flavi</i> .....	141
3.4 Potencial Ocratoxigênico dos isolados do gênero <i>Penicillium</i> .....	144
4 CONCLUSÕES.....	148
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	150
CAPÍTULO 4 Ocratoxina A em Grãos de Café Beneficiado, Ocorrência e sua Relação com a Presença de Fungos Toxigênicos e com o Padrão da Bebida.....	154
RESUMO.....	154
ABSTRACT.....	155
1 INTRODUÇÃO.....	156
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	158
2.1 Material .....	158
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	161

3.1 Porcentagem de recuperação da metodologia.....	161
3.2 Distribuição de ocratoxina A em amostras naturalmente contaminadas.....	164
3.3 Distribuição de ocratoxina A em grãos de café classificados em diferentes qualidades.....	165
3.4 Distribuição de ocratoxina A e presença dos fungos potencialmente ocratoxigênicos.....	166
3.5 Riscos de intoxicação ao consumidor com relação as amostras analisadas.....	169
4 CONCLUSÕES.....	171
4.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	173
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	174
ANEXOS.....	1176

## RESUMO

BATISTA, L. R. **Identificação, determinação do potencial toxigênico e da produção de micotoxinas por fungos associados a grãos de café verde (coffea arabica l).** Lavras: 2000. 188p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos)

O presente estudo teve como objetos identificar a população fúngica de *Aspergillus* e *Penicillium* associados a grãos de café beneficiados antes e após a desinfecção com NaClO a 1%, avaliar o potencial toxigênico destes isolados identificados quanto a produção de aflatoxinas e ocratoxina A e avaliar também a incidência de ocratoxina A nas mesmas amostras de grãos de café. Em 45 amostras foi analisada a presença da microbiota; destas, em 40 amostras foi avaliada a incidência de ocratoxina A. Das amostras que foram analisadas quanto à microbiota, 95,55% apresentaram contaminação com fungos do gênero *Aspergillus*, 42,22% com fungos do gênero *Penicillium*. Análises realizadas após a desinfecção com NaClO a 1% mostraram que 46,66% apresentaram contaminação com fungos do gênero *Aspergillus*, 24,44% com fungos do gênero *Penicillium*. Cerca de 188 isolados foram identificados até espécie, sendo encontradas 10 espécies da Seção *Circundati*, 3 espécies da Seção *Flavi*, 3 espécies da Seção *Nigri*, 4 espécies da Seção *Versicolores* e 2 espécies de teleomorfos da Seção *Aspergillus*. Do gênero *Penicillium*, foram identificadas 8 espécies. Dos isolados da Seção *Circundati*, 74,67% foram produtores de ocratoxina A. Dos isolados identificados como *Aspergillus flavus* var *flavus* e *Aspergillus flavus* var *columnaris*, 33,33% foram produtores de aflatoxina B1 e B2. Os isolados da Seção *Nigri* e as espécies de *Penicillium* não foram produtoras de ocratoxina A. Das amostras analisadas quanto à incidência de ocratoxina A, 12,5% estavam contaminadas com níveis que variaram de 0,47 a 4,82 ng/g, com uma média dos valores positivos de 2,45ng.

---

Comitê Orientador: Dr<sup>a</sup> Sara Maria Chalfoun – EPAMIG (Orientadora)

MSc Guilherme Prado – FUNED – (Co-orientador)

## ABSTRACT

**BATISTA, L. R. Identificatin, toxigenic potential and of the mycotoxins production of fungi associated with green coffee beans (*Coffea arabica* L). Lavras: 2000. 188p. Dissertation-Master in Food Science)**

The present study was designed to identify the fungal population of *Aspergillus* and *Penicillium* associated with green coffee beans before and after the disinfection with 1% NaClO, to evaluate the toxigenic potential of these isolated identified as to the production of aflatoxins and ochratoxin A and evaluate also the incidence of ochratoxin A in the same coffee beans samples. In 45 samples were analyzed the presence of the microbiota; out of these, in 40 samples was evaluated the incidence of ochratoxin A. Out of the which were analyzed as to the microbiota, 95,55% presented contamination with fungi of the genus *Aspergillus*, 42,22% with fungi of the genus *Penicillium*. Analyses accomplished after the disinfection with NaClO at 1% showed that 46,66% presented contamination with fungi of the genus *Aspergillus*, 24,44% with fungi of the genus *Penicillium*. About 188 isolated were identified to species, being found 10 species of the Section *Circundati*, 3 species of the Section *Flavi*, 3 species of the Section *Nigri*, 4 species of the Section *Versicolores* and 2 species of teleomorphos of the Section *Aspergillus*. From the genus *Penicillium* were identified 8 species. From the isolated of the Section *Circundati* 74,67% were producers of ochratoxin A. Out of the isolates identified as *Asperillus flavus* var *flavus* and *Aspergillus flavus* var *columnaris* 33,33% were producers of B1 and B2 aflatoxin. The isolated of the Section *Nigri* and the species of *Penicillium* were not producers of ochratoxin A. From the analyzed samples concerning the incidence of ochratoxin A, 12,5% were contaminated with levels ranging from 0,47 to 4,82 ng/g with a mean of the positive values of 2,45ng/g

---

Guindance Committee: Ds Sara Maria Chalfoun – EPAMIG (Adviser)

Ms Guilherme Prado – FUNED – (Co-adviser)

# CAPITULO 1

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O café é uma das bebidas de maior tradição no Brasil, não apenas pela sua importância histórica na economia partir de 1830, quando passou a ser o maior produtor mundial, mas por ser uma bebida agradável e de grande consumo diário. O “cafezinho” é, hoje, indispensável por grande parte da população mundial, independente da classe social e do ambiente de trabalho, com uma constante exigência de um produto de qualidade por parte dos consumidores. A qualidade do café sensorialmente observada na xícara é dependente de muito fatores, como o variedade das mudas, ambiente da lavoura, cuidados de manejo pré e pós-colheita, presença de microrganismos e outros. Os microrganismos desenvolvem um papel importantíssimo na qualidade dos frutos, grãos e, conseqüentemente, na bebida do café. As bactérias, fungos e leveduras são os principais gêneros de microrganismos presentes desde os frutos do café na lavoura até os grãos armazenados. Todavia, os fungos são os mais citados por reduzirem a qualidade do café. Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os mais comuns componentes da microbiota fúngica associada ao café. Nos últimos anos, a presença destes fungos tem alertado para a sua capacidade de produzir metabólitos secundários de baixo peso molecular, que mesmo em pequenas concentrações, são extremamente tóxicos ao homem e aos animais, os quais são chamados de micotoxinas. Porém, nem todas as espécies de fungos pertencentes a estes gêneros são produtoras de micotoxinas. Daí a importância de identificar as espécies produtoras de micotoxinas e avaliar os riscos do produto final que será consumido. O café é citado por alguns estudiosos por ser um produto que não favorece a produção de micotoxinas por

alguns fungos produtores devido a sua composição química. Componentes como ácido tânico e cafeína já foram notificados por inibirem tanto o crescimento como a produção de micotoxinas, atuando como agentes protetores naturais do café. As pesquisas prosseguem; porém, poucos países já possuem legislações limitando o nível máximo de micotoxinas em alimentos. A micotoxina mais estudada em grãos e produtos derivados do café é a ocratoxina A. Em alguns países, a concentração máxima permitida para grão de café verde é de 4 µg/Kg. A ocratoxina A é produzida por várias espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium verrucosum*. Entre as espécies em destaque na produção de ocratoxina A, estão as pertencentes ao Grupo *Ochraceus* (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus petrakii* e outros), Grupo *Niger* (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus foetidus* e *Aspergillus niger* var *niger*) e o *Penicillium verrucosum*. Outras micotoxinas, como aflatoxina B1 e esterigmatocistina, têm sido estudadas em café, porém com menor frequência. O Brasil, por ser o maior exportador mundial de café, e o Estado de Minas Gerais, por contribuir com mais de 50% destas exportações, vêm realizando estudos visando deixar o meio científico e a população cientes da qualidade do café que está sendo consumido.

Este estudo visou : Identificar as espécies dos fungos *Aspergillus* e *Penicillium* associadas a grãos de café beneficiado.

Avaliar o potencial toxigênico da população fúngica identificada através da utilização de diferentes métodos.

Avaliar o teor de ocratoxina A em grãos de café beneficiado da espécie *Coffea arabica*;

Comparar os teores de ocratoxina A com a qualidade de bebida das amostras de café.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Produção de Café Mundial, no Brasil e no Estado de Minas Gerais**

A globalização vem alterando todos os setores da economia mundial, com um maior tendência nos setores industriais nos países desenvolvidos e os setores agropecuários nos países em desenvolvimento, o que leva os países a uma grande corrida em busca de mercado, de produtos de qualidade e, conseqüentemente, bons retornos financeiros.

O Brasil vem, nos últimos anos, batendo sucessivos recordes de produção de grãos; entretanto, o mercado internacional, impulsionado pela globalização, vem exigindo produtos de excelente qualidade.

Desde o século dezessete, mais precisamente em 1830, o Brasil é o maior produtor de café do mundo. O produto já chegou a representar 80% das exportações mundiais, e sua participação média nos últimos cinco anos foi de apenas 22,2 %. As principais armas para o cafeicultura num mercado globalizado são a competitividade e a organização, com um enfoque especial para a qualidade, produtividade, menores custos, preços adequados e preservação do meio ambiente. (Floriani, 1999)

Atualmente, o Brasil contribui com uma fatia de 25,8 % do café produzido no mundo, seguido pela Colômbia com 11,7 %, Indonésia com 6,7 %, Vietnã com 5,6 %, México com 5,3 % e Costa do Marfim, Etiópia, Uganda, Guatemala e Índia, todos com 4%, aproximadamente. Os demais países produtores ficam com 25% do restante da produção mundial, sendo este porcentual representado por milhões de sacas de 60Kg durante um período de 1994/95 a 1999/00. Os principais países produtores também são os maiores exportadores de café, uma vantagem expressiva do Brasil que representa cerca

de 22,2%, seguido da Colômbia com 13,9%, Indonésia com 6,4% e Vietnã com 6,3% (Floriani, 1999).

Com interesse geral neste mercado estão os países consumidores importadores deste produto, sendo que a maioria, com exceção do Brasil, é de países desenvolvidos.

O maior consumidor de café é os Estados Unidos da América com 18,4% da média anual, seguido pelo Brasil com 10,9 %; Alemanha com 10,0%; Japão com 6,0 %; França com 5,0% e Itália com 4,3%. Estes países consomem, juntos, aproximadamente 54,5 % do café produzido no mundo. Já os maiores importadores de café são os Estados Unidos da América, com 18,8%, Alemanha com 13,5%, Japão com 6,0 %, França com 6,6 %, Itália com 5,7 %, Espanha com 3,4% e Reino Unido com 3,1%. O consumo “per capita” de café é liderado pela Alemanha, com 7,31 kg/habitante/ano, seguida por França, Espanha, Itália e Brasil, onde o consumo está em torno de 4,54 Kg/habitante/ano (Floriani, 1999).

Um total de 510 municípios do Estado de Minas Gerais contribuem para um parque cafeeiro que já superou 2,5 bilhões de pés plantados e 1 milhão de hectares. O estado de Minas Gerais contribui com 50% da produção nacional com quatro regiões produtoras: Cerrados de Minas, Vales de Minas, Montanhas de Minas e o Sul de Minas. Juntas estas regiões produzirão em torno de 14 milhões de sacas durante a safra de 1999/2000, movimentando cerca de 600 mil empregos temporários e 1,6 milhões de empregos diretos e indiretos no estado (Floriani, 1999).

Uma estimativa realizada pela Embrapa, para a safra 1999/2000, indicou que Minas Gerais teria uma participação de 51,40% da produção de café, sendo que as regiões Sul/Oeste teriam uma participação de 29,50 % deste montante, a região do Triângulo Mineiro/Alto do Paranaíba participariam com 11,1%, a Zona da Mata com 10,5% e a região de menor produção no estado, o Jequitinhonha, com 0,40%. Estes dados mostram a supremacia da região

Sul/Oeste do estado de Minas Gerais em relação à produção de café (Beczkowski, 2000).

Todavia, a quantidade não reflete qualidade, motivo pelo qual, nos últimos anos, vêm aumentando os projetos visando uma melhoria na qualidade do café produzido no estado de Minas Gerais. Estudos visando a melhoria da qualidade são de fundamental importância para o consumidor que irá consumir um produto de melhor qualidade, e para o produtor que terá o preço de seu produto elevado. O café é um dos poucos produtos que têm seu preço ajustado de acordo com a sua qualidade.

Na última semana de julho e primeira semana de agosto do corrente ano, na Bolsa de Mercadoria & Futuros, a saca de café tipo 6 Duro foi negociada a R\$140,00, já a saca de café bebida Rio tipo 6 ficou entre R\$130,00 e R\$134,00 (Beczkowski, 2000).

A qualidade do café depende das características do grão quanto à cor, aspecto, número de defeitos, aroma, gosto da bebida e outros. A qualidade do café se deteriora durante a colheita e o processamento. O café não terá boa qualidade quando, ocorrem alterações nas cores dos grãos beneficiados estocados que passam de verde a branco, amarelo ou marrom, representando queda na atividade da polifenoloxidade e outras transformações (Amorim et al. 1977).

## **2.2 Microrganismos associados aos grãos de café**

Como nas demais culturas, os frutos e grãos de café estão sujeitos a sofrerem contaminação por microrganismos em diferentes fases de desenvolvimento e de colheita e preparo. Esses microrganismos encontram-se presentes nos ambientes das lavouras, de colheita, preparo e armazenamento do café. A sua atuação detrimental à qualidade e segurança do produto final dependerá das condições ambientais e de manejo da cultura e do produto final.

Em estudo realizado por Krug (1940b), fez-se uma relação entre a porcentagem de microrganismos e a qualidade do café, concluindo que quanto maior a porcentagem de microrganismos isolados do interior das sementes, pior era a qualidade do café, e que esta relação foi gradativa.

A qualidade inferior do café produzido em certas regiões do estado de Minas Gerais é justificada, em parte, pela ocorrência de condições ambientais mais favoráveis à incidência de deteriorações microbianas que ocorrem tanto na fase pré como na pós-colheita (Carvalho, Chagas e Chalfoun, 1997).

Os maiores tipos de danos provocados pelo crescimento de fungos em grãos estocados são: 1- decréscimo na germinabilidade, 2 – perda da coloração, 3 – aquecimento dos grãos, 4 - várias alterações bioquímicas, 5 – perda de peso e 6 – produção de micotoxinas, que são prejudiciais a saúde do homem e de outros animais. O conhecimento destes fungos e o entendimento de como, onde e porque eles crescem é desejável por aqueles que possuem quantidades de sementes e grãos em estoque, pois um dos requisitos para uma boa estocagem é a prevenção do crescimento destes fungos. A contaminação ou a invasão dos grãos por todas as classes de fungos é provavelmente maior em regiões ou estações úmidas, e menor em regiões ou estações secas, e é provavelmente maior em cereais que nascem expostos ao ar do que naqueles que crescem protegidos por vagem (Christensen e Kaufmann, 1969).

Os primeiros estudos sobre fungos envolvidos na qualidade do café foram realizados por Krug (1940a), indicando claramente que uma ou mais espécies de fungos foram as responsáveis pelo mau gosto do café, particularmente os provenientes de varrição. De acordo com o autor, foram dois os fatores importantes para o desenvolvimento de microorganismos: o calor e a umidade.

Segundo Wosiacki (1977), a microflora presente em cafés do Brasil é constituída de espécies dos gêneros *Colletotrichum*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*.

Chalfoun e Carvalho (1989) realizaram um dos primeiros trabalhos avaliando a ocorrência da microflora associada aos frutos de café de diferentes locais do estado de Minas Gerais; do tipo de colheita e das diferentes etapas da produção. Neste estudo, foi possível observar, nos frutos cereja, uma predominância dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, que apesar de presentes, ainda não haviam infectado os frutos sadios. A contaminação era apenas superficial; entretanto, a intensificação do ataque destes fungos ocorreu na fase de secagem e beneficiamento, mostrando, assim, que o beneficiamento do café não foi eficaz na eliminação nem na redução da contaminação por estes gêneros de fungos.

Meirelles (1990), realizando um trabalho quase semelhante ao mencionado acima, observou, além da predominância dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, a presença elevada de fungos do gênero *Cladosporium* nos frutos e grãos de café. Fazendo uma correlação entre a qualidade da bebida e os gênero de fungo, a autora observou que ocorreu um predominância dos gêneros *Aspergillus* (em especial as espécies *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus niger*) e *Fusarium* em cafés de qualidade inferior e de *Cladosporium* em cafés de melhor qualidade. O gênero *Penicillium* ocorreu com a mesma frequência nos diferentes tipos de bebida.

Trabalhos com esta ênfase alertaram para a necessidade de estudar a relação que cada espécie de fungo desempenha na qualidade do café.

Alves (1996) relaciona o *Aspergillus flavus* ao *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* como os fungos associados ao café de pior qualidade e reforça os resultados obtidos anteriormente relacionando o gênero *Cladosporium* com bebidas de boa qualidade.

Freitas (2000), estudando amostras de café beneficiado de 170 propriedades produtoras em 17 municípios do Sul de Minas Gerais, isolou o *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus niger* da parte externa dos grãos em 100% e 95%, respectivamente, das amostras analisadas. Outras espécies, como *Aspergillus tamari* (65,5%), *Aspergillus flavus* (58,9%) e *Aspergillus glaucus* (57,7%), foram os fungos que apresentaram elevada contaminação das amostras. Os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* foram isoladas de 40,5 % e 25,6%, respectivamente das amostras.

A grande preocupação em estudar os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium*, devido às alterações que estes fungos promovem na qualidade do café, não deixou de lado o estudo de outros gêneros que são freqüentemente citados. *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Mucor* e outros também fazem parte da microbiota fúngica natural do café. Amostras de café do Cerrado Mineiro foram analisadas por Taniwaki, Banhe e Iamanaka (1999) quanto à presença de fungos que ocorrem em café. Este estudo avaliou a incidência de fungos desde a árvore até o armazenamento. As espécies mais encontradas foram *Alternaria alternata*, *Fusarium incarnatum*, *Cladosporium oxysporum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Khuskia oryzae*, *Phoma sorghina*, *Mucor racemosus* e leveduras. Das espécies analisadas, o *Mucor racemosus* foi a espécie mais comum no café bóia, provavelmente pela alta umidade.

Nos últimos anos tem aumentado o interesse em estudar a microflora fúngica potencialmente toxigênica em grãos de café para avaliar as ameaças concretas que possam comprometer a segurança do produto, já que as micotoxinas estão sendo adotadas como um índice de contaminação.

Os principais gêneros de fungos toxigênicos têm se mostrado contaminantes naturais do café, acompanhando-o desde a lavoura até a estocagem.

Silva et al. (2000), analisando os estádios de maturação dos frutos do café em municípios localizados no Sul de Minas Gerais, observaram a presença de *Penicillium crustosum* e *Fusarium stilboides* em todas as fases da secagem; já o *Aspergillus niger* foi encontrado a partir do fruto “passa”. Outras espécies de fungos também foram isoladas; entre elas *Penicillium citrinum*, *P. restrictum*, *P. implicatum* e *Fusarium semitectum*. Todas estas espécies já foram citadas na literatura como produtoras de micotoxinas

Os grãos de café robusta estocados em silos por 8 meses em condições industriais, na Tailândia, foram analisados quanto à presença de microorganismos e ocratoxina A. Os principais fungos encontrados foram *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. restrictus*, *Penicillium* sp. e *Wallemia sebi*. Não foram encontradas evidências quanto à presença de espécies de fungos que podem ser potencialmente produtores de aflatoxina e ocratoxina A (Bucheli et al., 1998).

Nakajima et al. (1997) encontraram os membros de Grupo *niger* como população fúngica predominante em grãos de café, sendo que 6,6 % dos isolados deste grupo foram produtores de ocratoxina A em meio de cultura, alertando, assim, para a possibilidade de membros do Grupo *Aspergillus niger* serem, em parte, responsáveis pela presença de ocratoxina em grãos de café e chamando atenção especial ao *Aspergillus foetidus*, que faz parte do Grupo *Aspergillus niger* e que anteriormente já foi mencionado pelo autores como produtor de ocratoxina A.

O *A. ochraceus* e *Penicillium* spp são os fungos que causam mais danos em grãos de café, afetando a coloração dos grãos e a qualidade da bebida, em alguns casos após o segundo mês de estocagem (López Garay, Bautista Romero e Moreno González, 1987; Bucheli et al., 1998), enquanto o *A. tamarii* não tem provocado nenhuma alteração significativa na qualidade do café, segundo López Garay, Bautista Romero e Moreno González (1987).

Mislivec, Bruce e Gibson (1983) analisaram a flora fúngica toxigênica de 944 amostras de grão de café de 31 países. Foram avaliadas antes e depois de uma desinfecção com hipoclorito a 5%. Dessas amostras, 99,1%, antes de serem desinfetadas superficialmente, estavam contaminadas com fungos toxigênicos, e 47,9% apresentaram contaminação após a desinfecção. Das 251 amostras brasileiras analisadas, 99,9% apresentaram contaminação antes da desinfecção e 32,0% após o tratamento com NaOCl 5%. As espécies mais encontradas no café brasileiro antes do tratamento foram: *Aspergillus ochraceus* 80,8%, *Aspergillus niger* 64,7%, *Aspergillus glaucus* 29,7%, *Penicillium* ssp 9,1% e *Aspergillus flavus* 2,3%.

Sendo assim, o grande objetivo de muitos estudiosos foi fazer um levantamento das micotoxinas presentes em grãos de café verde, a partir do momento em que foi possível identificar fungos toxigênicos associados ao café, em especial as espécies pertencente ao gêneros *Penicillium* e, principalmente, *Aspergillus*.

### 2.3 Ocorrência de micotoxinas em grãos

Tuberculose { As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos de baixo peso molecular (Saeger, 1999) e as micotoxicoses são intoxicações provocadas em animais e no homem, causadas por micotoxinas produzidas por fungos quando estes crescem em rações e alimentos ou em grãos de outros ingredientes do qual a ração e o alimento foram produzidos e consumidos por humanos e animais (Mirocha, Christensen e Nelson, 1968). Talvez, o caso documentado mais antigo de micotoxicose humana seja o ergotismo. O ergotismo é causado pelo consumo de grãos contaminados por *Claviceps purpurea*, *C. paspali* e *C. fusiformis*. Este patógeno invade o gineceu das plantas hospedeiras como cevada, arroz e milho. Este composto produz, em humanos, várias micotoxicoses caracterizadas por

desordens no sistema nervoso (convulsões, alucinações), contrações dos vasos sanguíneos (gangrena) e desordem gastrointestinal (Pohland, 1993).

Muitos alimentos são susceptíveis ao crescimento de fungos quando estão estocados em condições não apropriadas (Moss, 1996a). Em condições de pouca umidade os fungos xerofílicos das espécies *Penicillium* e *Aspergillus* são altamente dominantes. Mais de 130 espécies de *Aspergillus* têm sido relatadas por contaminarem alimentos e rações, muitas delas toxigênicas, podendo produzir vários tipos de micotoxinas (Smith e Ross, 1991).

→ Algumas espécies de fungos comumente associados com a deterioração pós-colheita podem também ser capazes de proliferar e produzir metabólitos secundários em cereais antes da colheita (Moss, 1996a).

Na intenção de avaliar as conseqüências para a saúde humana do consumo de um contaminante particular em alimentos e rações, quatro são as informações absolutamente essenciais: a frequência da incidência do contaminante; a concentração normalmente encontrada; estatísticas do consumo do produto e os efeitos toxicológicos em várias concentrações (Pohland, 1993).

Estima-se que 25% dos alimentos consumidos mundialmente estão contaminados com micotoxinas (Philip, 1995).

É geralmente suposto que as micotoxinas sejam um problema sério em países subdesenvolvidos nos quais as condições climáticas, a agricultura e as práticas de estocagem são consideradas favoráveis ao crescimento de fungos e produção de toxinas (Sabino e Rodrigue-Amaya, 1993).

Muitas destas micotoxinas têm ocasionalmente sido identificadas em produtos agrícolas e rações de animais; porém, só um número limitado pode ser genuinamente tratado como seriamente prejudicial à saúde animal. Neste contexto, as aflatoxinas, esterigmatocistina, ácido  $\alpha$ -ciclopiazônico e a ocratoxina A, em rações animais, têm sido bem relatadas (Smith e Ross, 1991). Algumas destas micotoxinas podem afetar a atividade neurológica, embora suas

primeiras e significantes funções tóxicas biológicas indicam sobre outros aspectos de fisiologia animal.

A citrinina e a patulina foram primeiramente estudadas por serem consideradas uma promessa como antibióticos; mais tarde foram descobertos seus efeitos tóxicos em uso clínico. Isto ocorreu várias décadas depois que a citrinina foi implicada em nefropatia suína na Dinamarca e a patulina foi considerada responsável pela morte de gados na França (Moss, 1992).

#### **2.4 Micotoxinas em grãos e produtos do café**

Diferentes fungos filamentosos são relatados por crescerem em grãos de café verde sujeitos a certas condições e causarem, em geral, perda de qualidade, produzindo odor e sabor desagradável, bem como, em alguns casos, poderem produzir micotoxinas. A toxina mais comumente presente em café, porém em baixa quantidade, é a ocratoxina A. A aflatoxina e esterigmatocistina são menos frequentemente mencionadas (Naidu, 1996).

A micotoxinas são conhecidas por contaminarem produtos agrícolas em uma distribuição extremamente heterogênea. Especificamente para grãos de café cru quase não há dados publicados sobre o padrão de homogeneidade de ocratoxina A, nem procedimentos de amostragem estatisticamente válidos (Stegen et al., 1997).

A infestação de fungos em grãos de café pode ser o resultado de condições inadequadas de estocagem, conduzindo à perda de qualidade (Bucheli et al., 1998).

Levi, Hugh e Mohr (1974) realizaram o primeiro trabalho avaliando a presença de ocratoxina A em grãos de café verde. Das 68 amostras avaliadas, 3 apresentaram contaminações que variaram de 20 µg/Kg a 80 µg/Kg; das 10 amostras enviadas diretamente do Brasil para as análises, nenhuma apresentou contaminação acima do limite de detecção do método.

Cantáfora et al (1983) analisaram 40 amostras de grãos de café cru utilizando CLAE, destas amostras 9 apresentaram contaminação que variou de 0,5 a 23,0 µg/Kg. Das amostras brasileiras, 10 de grãos de café e 7 de café torrado descafeinado, nenhuma apresentou contaminação com a toxina. Na avaliação do destino da ocratoxina A após a torração, 90% da toxina foram destruídas. Os autores concluíram que os níveis detectados e a porcentagem de destruição da toxina após a torração suportam a hipótese de que o risco do consumo de ocratoxina pelo café é muito pequeno.

Das 22 amostras de grãos de café analisadas por Tsubouchi et al. (1984), 4 apresentaram contaminação com ocratoxina A, com níveis que variaram de 9.9 a 46µg/Kg. Os autores concluíram que os grãos de café são susceptíveis à contaminação com *Aspergillus ochraceus* e, subseqüentemente, à contaminação com ocratoxina A.

Micco et al. (1989) avaliaram a presença de ocratoxina A em 29 amostras de grãos de café. Destas amostras, 17 (58%) apresentaram contaminação com ocratoxina. Das 14 amostras brasileiras analisadas 10 apresentaram contaminação que variou de 0,2 a 5,5 µg/Kg. Na avaliação do destino da ocratoxina durante a torração dos grãos de café nas amostras artificialmente contaminadas, a destruição da ocratoxina A variou de 47 a 87%; já nas amostras naturalmente contaminadas, a destruição foi ainda maior, ficando entre 90 a 100%. A migração da ocratoxina A para a bebida também foi avaliada em amostras de café torrado artificialmente, contaminado com 6,0µg/Kg, não sendo detectada a a toxina na bebida.

Nakajima et al. (1997) pesquisaram a presença de ocratoxina A em grãos de café utilizando CLAE juntamente com uma coluna de imunoafinidade para a purificação da toxina. Das 47 amostras analisadas, 30% estavam contaminadas com ocratoxina A. As amostras oriundas do Yemem, Tanzânia e Indonésia apresentaram níveis que variaram de 0,1 a 17,4 µg/Kg. Devido a estudo

realizado anteriormente por Tsubouchi et al. (1987) no qual a ocratoxina não foi destruída após a torração, os autores afirmam que a presença de micotoxinas em grãos de café tem o potencial de afetar a saúde humana.

Em estudo realizado por Bucheli et al. (1998) com café robusta estocado em silos, a ocratoxina A foi detectada em todas as amostras de café analisadas, com níveis médios de 4,9 µg/kg em silos aerados, 4,5µg/kg em silos com ar condicionado, 2,8 µg/kg em silos não aerados, e 1,9 µg/kg em sacos de armazéns. As diferenças observadas nos níveis de contaminação de ocratoxina A entre silos e sacos estocados parecem estar diretamente ligadas à quantidade de defeitos. De fato, a quantidade de defeitos em 8 meses de estoque era constantemente menor em sacos (12%) do que em silos (18%). O autor conclui que possivelmente a fonte e processamento pós-colheita podem afetar a quantidade de defeito em grãos de café. Os dados dos níveis de contaminação da ocratoxina A e a avaliação microbiológica durante as condições diferentes de armazenamento industrial testadas indicam fortemente a idéia de que a contaminação de ocratoxina A não é o resultado do armazenamento, mas provavelmente se uniu às condições apresentadas durante o processamento do café (colheita e secando dos frutos do café).

Trucksess et al. (1999) fizeram a determinação e inspeção de ocratoxina A em trigo, cevada e café. Das 19 amostras de grãos de café verde inspecionadas, 9 apresentaram contaminação de 0,1 a 4,6 ng/g. Das 13 amostras de café torrado, 9 estavam contaminadas com a toxina em níveis que variaram de 0,1 a 1,2 ng/g; nenhuma das amostras analisada apresentaram contaminação acima de 5 ng/g.

Para avaliar a presença de ocratoxina em produtos de café, Tsubouchi et al. (1987) mostraram que a torração do café a 200 °C por 10 a 20 minutos tem um pequeno efeito sobre o nível de ocratoxina A. A destruição da ocratoxina

ficou entre 0 e 12% das amostras naturalmente contaminadas; além disso, toda a toxina presente no café torrado pode ser incluída na bebida.

Sessenta e oito amostras de café torrado foram analisadas por Tsubouchi et al. (1988) no Japão, as amostras oriundas da Etiópia, Brasil, Guatemala, Colômbia, Costa Rica, Indonésia, Jamaica, México, Estados Unidos e outros países. Das 9 amostras brasileiras analisadas, nenhuma apresentou contaminação, o mesmo não acontecendo com as amostras da República Árabe do Iêmen, que apresentaram 3 amostras contaminadas com ocratoxina A em 10 analisadas sendo que, os níveis de contaminação foram 17,0, 6,9 e 6,5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ .

Studer-Rohr et al. (1994) mostram uma opinião contraditória que existe entre os pesquisadores a respeito do destino da ocratoxina A durante a torração do café. Em quatro de cinco estudos, eles observaram uma variação de destruição da micotoxina entre 50-100%, enquanto, em um outro trabalho, a destruição ficou em torno de 10%. Em seu trabalho, das 25 amostras analisadas, 13 estavam contaminadas com ocratoxina A, com concentrações variando de 1,2 e 56  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Os autores observaram uma pequena redução de ocratoxina durante a torração do café.

Pittet et al. (1996) analisaram 101 amostras de café solúvel de vários países e de diferentes indústrias, demonstrando níveis de contaminação variando de 0,2 a 6,5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de ocratoxina A em 75% das amostras. Em 41 amostras, os níveis de contaminação ficaram na faixa entre 0,2 e 1,0  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Em 18 amostras, os níveis de contaminação ficaram acima de 2  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , e em 9 amostras, os níveis ultrapassaram 3  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Em 15 amostras de café solúvel adulterado, todas estavam contaminadas em níveis de 1,2 a 15,9  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , com uma média de 5,9  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Com base nos dados toxicológicos determinados pela JECFA, os resultados desta pesquisa indicam que o café solúvel não é a maior fonte de ocratoxina A na dieta.

Stegen et al. (1997) avaliaram 484 amostras de café torrado, sendo 445 normal e 39 descafeinado. Foram avaliadas também 149 amostras de café instantâneo, sendo 119 amostras normais, 20 descafeinadas e 10 de uma mistura de instantâneos. A contaminação das 445 amostras de café torrado normal ficou entre não-detectado e 8,2 ng/g, com uma média de 0,8 ng/g; nas 39 amostras de café torrado descafeinado, a variação ficou entre não-detectado e 2,8 ng/g, com uma média de 0,7 ng/g. Nas 119 amostras de café instantâneo normal, a faixa de contaminação ficou entre não-detectado e 27,2ng/g, com uma média de 1,4 ng/g; as 20 amostras de café instantâneo descafeinado apresentaram contaminação entre não-detectado e 5,5 ng/g, com uma média de 1.1 ng/g; já nas 10 amostras de misturas café instantâneo, a faixa de contaminação ficou entre não-detectado e 1,0 ng/g, com uma média de 0,5 ng/g. Os autores afirmam que de acordo com a toxicidade da ocratoxina A reavaliada pelo JECFA e a ingestão semanal tolerável de 100ng/Kg peso corpóreo/semana, para uma pessoa de 60 Kg o consumo de 24 gramas de café torrado normal por dia contribui com 19 ng/dia, que é só  $\approx 2\%$  do nível da ingestão semanal tolerável.

Patel et al. (1997) avaliaram a presença de ocratoxina A em café torrado e café solúvel disponível no mercado do Reino Unido. Das 80 amostras de café solúvel analisadas, 64 apresentaram contaminação em níveis que variaram de 0,1 a 8,0  $\mu\text{g/Kg}$ . Nas 20 amostras de café torrado, 17 estavam contaminadas com a toxina em níveis que variaram de 0,2 a 2,1  $\mu\text{g/Kg}$ . O resultado desta pesquisa mostra que a contaminação com ocratoxina A dos grãos de café não é completamente destruída pelo processo de torração e pela produção de café solúvel; entretanto, os resultados indicam, também, que os produtos do café não são a maior fonte de ocratoxina A na dieta dos consumidores do Reino Unido.

Blanc et al. (1998) avaliaram a presença de ocratoxina em um lote de 50 sacos de grãos de café Robusta naturalmente contaminados e o destino da toxina após a torração. A faixa de contaminação ficou entre 4,0 e 22,1  $\mu\text{g/Kg}$  com uma

média de 6,7 µg/Kg. A quantidade de ocratoxina A foi drasticamente reduzida durante a fabricação de café solúvel. Uma pequena quantidade de ocratoxina é reduzida durante a limpeza do café, mas a maior parte foi eliminada durante a torração. Apenas 16% da toxina originalmente presente no café foi detectada após a fabricação do café solúvel. Em dados não publicados, os autores afirmam que 80% da ocratoxina presente no café torrado podem ser transferidos para a xícara. Eles concluem, ainda, que a torração dos grãos de café e o café solúvel são as menores fontes de ocratoxina A na dieta, igualmente quando preparados com grãos de café altamente contaminado.

Studer-Rohr et al. (1995) afirmaram que o consumo regular de café pode contribuir para a exposição da ocratoxina A aos seres humanos. A conclusão deste trabalho foi contraditória à de vários estudos que demonstraram que o café torrado não é a principal fonte de ocratoxina A na dieta, e que os níveis encontrados estão muito abaixo dos limites de segurança (Pittet et al., 1996; Patel et al., 1997 e Stegen et al. 1997).

Como medida de controle para evitar a contaminação de ocratoxina A, serão necessárias medidas visando, entre outros fatores, limitar a contaminação na lavoura. Para determinar como a contaminação de ocratoxina A surge durante as fases de produção e armazenamento de grãos verdes, as medidas efetivas estão em procedimentos do tipo APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), para os quais são necessárias informações fundamentais, o que inclui um conhecimento melhor das espécies não toxigênicas e das condições ambientais que favorecem ou inibem a produção de ocratoxina A (Walker, 1997)

A aflatoxina começou a ser estudada em grãos de café beneficiados em 1968, quando Levi e Borker adaptaram uma metodologia para aflatoxina, que anteriormente era utilizada para cafeína. Das 58 amostras analisadas provenientes da Angola, Brasil, Colômbia, Uganda e outros países, nenhuma apresentou contaminação com aflatoxina.

Scott (1968) avaliou um método que utilizava uma coluna de sílica para a purificação da aflatoxina. Neste método, com limites de detecção entre 2-3 µg/Kg para as aflatoxinas B1 e G1, não foi detectada nenhuma amostra contaminada com a toxina. Vale ressaltar também que entre as amostras analisadas, algumas estavam visualmente infectadas por fungos, aparentemente uma amostra de péssima qualidade.

A aflatoxina não foi detectada em nenhuma das 22 amostras de grãos de café analisadas por Tsubouchi et al. (1984)

Abdel-Hafez e El-Maghraby (1992) analisaram amostras de cacau, chá e café torrado quanto à presença da flora fúngica e aflatoxina, os maiores níveis de aflatoxina foram encontrado no chá, no cacau e no café torrado (72µg/Kg, 30µg/Kg e 1,44g/Kg, respectivamente). Dentre os fungos isolados, fizeram parte da relação o *A. flavus* e *A. parasiticus*. Com estes dados, os autores concluíram que o café torrado é um substrato muito pobre para produção de aflatoxina em comparação com o cacau e o chá.

Mico et al. (1992), ao analisarem 41 amostras de grãos de café verde observaram que em nenhuma delas foi detectada a presença de aflatoxina B1, o que demonstrou uma boa qualidade das amostras analisadas. De acordo com os autores, a cafeína provavelmente estaria atuando como um agente protetor contra a formação de aflatoxina B1. A avaliação do destino da aflatoxina durante a torração do café, em amostras artificialmente contaminadas, mostrou que 90 a 100% da toxina são eliminadas durante os dois processo de torração (torração clara e torração escura).

Nakajima et al. (1997) estudaram a presença de aflatoxina B1 e ocratoxina A em grãos de café utilizando, em conjunto, a cromatografia de imunoafinidade e o CLAE, que atualmente são os processo mais seguros e precisos utilizados para as análises de micotoxinas. Com este método, foi possível obter um limite de detecção para aflatoxina de 2,0 ng/Kg e de 0,1µg/Kg

para a ocratoxina. Das 47 amostras analisadas, 32% estavam contaminadas com aflatoxina em níveis que variaram de 2.0 a 32.9 ng/Kg, sendo que as amostras contaminadas foram provenientes de países da África e da Ásia. Das 10 amostras brasileiras analisadas, em nenhuma delas foi detectada a presença das toxinas analisadas.

De acordo com Steigmeier e Schlatter (1992), a esterigmatocistina, juntamente com a aflatoxina B1, ocorrem esporadicamente em grãos de café verde e não oferecem um risco considerável para os consumidores.

Os baixos níveis de esterigmatocistina encontrados em grãos de café podem ser devidos à forte ação inibitória que a cafeína exerce sobre a produção da toxina. Segundo Buchanan, Harry e Gealt (1983) uma concentração de 2mg/ml de cafeína foi suficiente para inibir totalmente a produção da toxina pelo *Aspergillus versicolor*, a concentração de 1,0mg/ml atrasou e diminuiu a produção da toxina e a concentração de 0,5mg/ml de cafeína teve um pequeno efeito na síntese da esterigmatocistina. O forte potencial inibitório da cafeína sobre a produção de esterigmatocistina pelo *Aspergillus versicolor* foi observado também por Betancourt & Frank (1983).

Palo, Gabucci e Valussi (1979) analisaram a presença de aflatoxina e esterigmatocistina em 502 amostra de grãos de café verde de diferentes partes do mundo. Apenas em uma amostra alterada de grãos de café verde, que estava estocada em um armazém, foram detectados 12mg/kg de esterigmatocistina. Purchase e Pretorius (1973) detectaram esterigmatocistina em uma das duas amostras de grãos de café verde que já haviam sido consideradas impróprias para o consumo humano.

As condições climáticas das áreas produtoras de café indicam a necessidade de um controle contínuo da incidência de micotoxinas. A maioria dos estudos realizados visando este problema, tem dado uma atenção especial às amostras de café comercial, mas nenhuma informação está disponível sobre o

nível de contaminação em grandes lotes de grãos de café, obtido por um plano de amostragem baseado estatisticamente (Micco et al., 1992)

## 2.5 Pesquisas sobre ocratoxina A em grãos e produtos do café no Brasil

Os estudos sobre ocratoxina A no Brasil vêm aumentando nos últimos três anos; porém, ainda há poucos dados disponíveis para um levantamento da ocorrência desta toxina no país.

Ainda que limitados, os resultados parecem bastante favoráveis, com poucas amostras contaminadas e teores baixos de ocratoxina A. Dados colhidos pela UNICAMP mostram uma contaminação média de 2,4 µg/Kg em 142 amostras de grãos de café (Soares, 1999).

Furlani, Oliveira e Soares (1999) avaliaram a incidência de ocratoxina A em grãos de café verde destinados ao consumo interno, proveniente de várias regiões produtoras do país. Das 69 amostras de *Coffea arabica* analisadas, 10 apresentaram contaminação com ocratoxina A em níveis que variaram de 1,7 a 12,7 ng/g. Em 10 amostras de *Coffea canephora*, duas amostras estavam contaminadas com níveis que variaram de 5,5 a 114,2 ng/g. Para os autores, a influência da diferença entre o valor comercial das duas espécies e a conseqüente diferença no trato agrícola que recebem não pode ser descartada na avaliação dos resultados.

Leoni, Oliveira e Soares (1999) avaliaram a presença de ocratoxina A em 14 amostras de café solúvel normal e 2 amostras de café solúvel descafeinado, todas adquiridas em pontos de comércio a varejo na cidade de Campinas-SP. Das amostras analisadas todas, apresentaram contaminação que variou de 0,53 a 5,12 ng/g, com uma contaminação média de 2,17 ng/g. Segundo os autores, o valor médio de contaminação representa 8% da Ingestão diária provisória estabelecida pelo Codex Alimentarius para a ocratoxina, levando em

consideração o consumo de 5 xícaras de café por um consumidor adulto de 70Kg.

Prado et al. (no prelo) examinaram amostras de café torrado e moído e café solúvel em Belo Horizonte-MG. Das 47 amostras de café torrado e moído analisadas, 41 estavam contaminadas, em uma faixa de contaminação que variou de 0,99 a 5,87 ng/g e uma média de 1,75ng/g. Das 10 amostras de café solúvel, 8 apresentaram contaminação variando de 0,31 a 1,78 ng/g, com uma média de 0,73 ng/g. De acordo com os autores, os produtos de café não são a maior fonte de ocratoxina A na dieta do consumidor brasileiro, chegando a contribuir com cerca de 0,68% (café solúvel) e 4,9% (café torrado e moído) do nível estimado pelo JECFA.

Apesar de poucos dados sobre a presença de ocratoxina A no café consumido no Brasil, os resultados concordam no aspecto mais importante. A concentração da toxina encontrada nos produtos do café é muito baixa, oferecendo um risco muito pequeno de intoxicação para os consumidores.

Os principais responsáveis pela presença, mesmo em baixos níveis, de ocratoxina A em produtos do café são os fungos potencialmente ocratoxigênicos, entre os quais se destacam as espécies do gênero *Aspergillus* pertencentes as Seções *Circundati* e *Nigri* e o *Penicillium verrucosum*.

## 2.6 Fungos toxigênicos

→ Os fungos filamentosos estão envolvidos na utilização eficiente de substratos para o seu crescimento sobre superfícies sólidas, penetrando dentro destas matrizes. Os fungos são capazes de secretar enzimas para degradar macromoléculas complexas, e o produto desta degradação é, então, utilizado para o crescimento e metabolismo. Eles são capazes de absorver nutrientes de baixo peso molecular e muitos também produzem e secretam metabólitos

secundários, que são componentes de baixo peso molecular, mas não obviamente associados com o processo de crescimento (Moss, 1996a).

Os principais fungos toxigênicos pertencem a 6 gêneros (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Alternaria* e *Rhizoctonia*). Entre eles, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os mais importantes e os mais freqüentemente encontrados (Lin, 1980).

### 2.6.1 Fungos produtores de ocratoxinas

Os principais fungos produtores de ocratoxina A são pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo que os mais citados na literatura são o *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*.

A ocratoxina A é produzida pelo *Penicillium verrucosum* em climas temperados e por um número de espécies de *Aspergillus* nas partes quentes e tropicais do planeta. A espécie mais conhecida por produzir a ocratoxina A é o *A. ochraceus* mas outras, incluindo *A. sulphureus*, *A. aliaceus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum* e *A. melleus*, têm sido citadas ( Smith e Ross, 1991, Moss, 1996b, Walker, 1997). O *Petromyces aliaceus* isolado de canela é também, um bom produtor de ocratoxina A em condições de laboratório.

Têm sido mencionado como produtores de ocratoxina A dois membros do Grupo *niger*, *A. citricus* e *A. fonsecaeus*, mas a importância destes fungos em alimentos é desconhecida (Moss, 1996b).

A ocratoxina A foi identificada pela primeira vez em 1965, por van der Merwe et al., como sendo um metabólito tóxico do *Aspergillus ochraceus*. Esta descoberta foi realizada através da indução da micotoxicose em animais de laboratório, isto é, não ocorrendo naturalmente, diferente de uma micotoxicose natural, como ocorreu com a descoberta da aflatoxina.

Dados na literatura mostram que a minoria dos isolados de *A. ochraceus* são produtores de ocratoxina A. De 27 isolados de *A. ochraceus* analisados 33%

foram produtores de ocratoxina A, sendo dois destes isolados de grãos de café provenientes de Uganda-África. Neste mesmo experimento, sete isolados de *A. ochraceus* de grãos de café do Zaire não produziram a toxina (Varga et al., 1996). Dos 17 isolados de *A. ochraceus*, 29,4% foram ocratoxigênicos no estudo realizado por Ciegler (1972). No estudo de Abarca et al. (1997), 16,6% dos 12 isolados de *A. ochraceus* foram produtores de ocratoxina A

Outras espécies pertencentes à Seção *Circundati* (grupo *A. ochraceus*) já foram relacionadas por produzirem ocratoxina A, como o *A. sclerotiorum* (1 de quatro isolados analisados), *A. aliaceus* (dois isolados analisados), *A. melleus* (três dos cinco isolados) e *A. sulphureus* (o único isolado analisado foi produtor de ocratoxina A) (Ciegler, 1972).

Um dos três isolados de *A. sclerotiorum*, dois dos cinco de *A. aliaceus*, e um dos dois isolados *A. melleus* produziram ocratoxina A em meio líquido YES. Os isolados de *A. albertensis*, *A. auricomus* e dois isolados *A. wentii* também foram ocratoxigênicos e não haviam sido descritos na literatura como produtoras de ocratoxina A até o trabalho de avaliação do potencial toxigênico desenvolvido por Varga et al. (1996).

Dois dos dezenove isolados analisados de *A. niger* var *niger* foram produtores de ocratoxina A em meio líquido e em culturas de cereais. Os fungos foram isolados de ração de frango e de grãos de soja. Este foi o primeiro trabalho que relata a produção de ocratoxina A por *A. niger* var *niger* (Abarca et al., 1994). O resultado desta pesquisa indica que a produção de ocratoxina A por *A. niger*, que é um fungo muito comum, passa a ser um risco inesperado para a saúde humana e dos animais caso esta linhagem seja utilizada como "starters", por exemplo, na indústria de alimentos. A preparação de enzimas pela tecnologia de alimentos pode apresentar um risco similar se atentarmos para resíduos potencialmente tóxicos (Varga et al., 1996).

A incidência de espécies ocratoxigênicas de *Aspergillus* é muito baixa, o que mostra um estudo orientado por Abarca et al. (1997). Apenas 5 dos 176 isolados produziram ocratoxina A, com destaque especial aos isolados de *A. fumigatus* e *A. versicolor*. Este também foi o primeiro trabalho em que estas espécies são mencionadas por produzirem a ocratoxina A. Os autores alertam que a porcentagem de *A. fumigatus* e *A. versicolor* produtores de ocratoxina A é quase similar à porcentagem de *A. ochraceus* ocratoxigênicos.

Com relação ao gênero *Penicillium*, Samson et al. (1995) citam, como produtores de ocratoxina A, os fungos classificados como *Eupenicillium* (anamorficos *Penicillium* subgenero *Penicillium*) - *P. verrucosum*, *Petromyces* (anamorfo *Aspergillus* subgenero *Circumdati*) - *Petromyces aliaceus* e o *A. ochraceus*.

Scott et al. (1972) demonstram a produção de ocratoxina A por 27 isolados de *P. viridicatum* das 32 analisadas em meio YES, concluindo, assim, que o *P. viridicatum* mostra ser uma importante fonte natural de ocratoxina A e citrinina. Este trabalho foi o primeiro a divulgar o *P. palitans* como produtor de ocratoxina A (um dos dois isolados analisados).

Ciegler et al. (1973) classificaram os isolados de *P. viridicatum* em três grupos de acordo com suas características bioquímicas, sendo que um dos sinais distintivos desta subdivisão é a produção de ocratoxina A e a citrinina por *P. viridicatum* grupo II e grupo III que podem ser separados do *P. viridicatum* grupo I que irão produzir outras nefrotoxinas como xantomegnina e viomeleina. Tudo com base nesta divisão, outros trabalhos citam o *P. viridicatum* como produtor de ocratoxina A. Frisvad (1983) relata a produção de ocratoxina A por *Penicillium viridicatum* GII e GIII em meio YES e PRYES, produzindo uma coloração violeta-marrom, o que confirmava a produção de ocratoxina A e a eficiência do meio de cultura na identificação de isolados ocratoxigênicos.

Filtborg e Frisvad (1980), utilizando a técnica de Plug Agar, citam a linhagem de *P. viridicatum* NRRL 5571 como produtora de citrinina e ocratoxina A e a linhagem *P. viridicatum* NRRL 3712 como produtora de ocratoxina A.

Um estudo realizado por Pitt (1987) fez uma reclassificação da nomenclatura feita por Ciegler et al. (1973) para as espécies de *P. viridicatum* do grupo II e do grupo III, mostrando, através da produção micotoxinas, da taxinomia (cor e diâmetro da colônia em MEA e CYA) e de características fisiológicas, que as diferenças entre estas espécies são insignificantes, o que indica que estes dois grupos fazem parte de uma única espécie, *P. verrucosum*. O resultado deste estudo deixa claro que o *P. viridicatum* não produz a ocratoxina A nem a citrinina, micotoxinas produzidas<sup>mas</sup> apenas pelo *P. verrucosum*, mas produz a xantomegnina, viomeleina ou brevianamida A.

Recentemente, a ocratoxina A foi considerada por ser produzida por várias espécies de *Penicillium*, tais como *P. palitans*, *P. commune*, *P. variable*, *P. purpurescens*, *P. cyclopium*, e *P. chrysogenum* (Moss, 1996b)

### 2.6.1.1 Ocratoxinas

Xiao et al. (1996) citando Kuiper-Goodman e Scott, relatam a ocratoxina A como uma toxina hepatóxica, nefratóxica, teratogênica e carcinogênica, produzida por várias espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*.

Quimicamente, a ocratoxina A é conhecida como {( R ) -N-[(5-cloro-3,4-diidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1-H-2-benzopirano-7-il)carbonil]-L-phenillalanina}, é uma micotoxina que vem tendo sua atenção aumentada mundialmente pelo risco à saúde humana e animal. A ocratoxina A é um contaminante de várias plantas e de produtos animais, mas é em maior frequência encontrada em grãos de cereais estocados (Abarca, 1994).

→ molécula na formação embriológica.

Esta micotoxina é um metabólito fúngico que induz alterações patológicas em animais (Moore e Truelove, 1970). O grande interesse em seres humanos está implícito em um papel irreversível e fatal referente a doenças do fígado, como a Nefropatia Edêmica dos Balkans e os potentes efeitos carcinogênicos (Marquardt e Frohlich, 1992).

A produção de ocratoxina por algumas espécies de fungos é influenciada por muito fatores, tais como: atividade de água, temperatura, tipo de substrato, presença da microflora competitiva, linhagem do fungo e a integridade da semente (Marquardt e Frohlich, 1992).

A toxicidade da ocratoxina A varia consideravelmente com sua estrutura (Chu, Noh e Chang, 1972), sendo esta sua toxicidade igual ou da mesma ordem da aflatoxina B1 (van der Merwe et al., 1965)

### 2.6.1.2 Ocratoxicoses

Um dos primeiro trabalhos que relatam algum efeito direta da ocratoxina A em células orgânicas (mitocôndria de ratos) foi realizado por Moore e Truelove (1970). Neste experimento, foi possível observar que a ocratoxina A, em pequenas concentrações, inibe algum ponto da seqüência principal da formação da adenosina difosfato (ADP), provocando uma disfunção na respiração celular.

A ocratoxina A é hepatóxica, nefrotóxica, carcinogênica e imunossupressiva para animais, e possivelmente, para humanos (Smith e Ross, 1991; Xiao, 1996).

A toxicidade da ocratoxina A pode ter três grandes efeitos: a) inibição na síntese de proteínas, b) inibição na síntese de ATP e c) peroxidação lipídica. A inibição na síntese de proteínas é o resultado de uma inibição competitiva pela fenilalanina tRNA sintetase. O aumento da peroxidação lipídica em animais tratados com ocratoxina A tem sido observado, sugerindo que radicais livres ou

espécies ativas de oxigênio podem estar envolvidos em ocratoxicoses. A ocratoxina foi relatada por ser uma inibidora competitiva da succinato desidrogenase e citocromo *c* oxidase em respiração celular, resultando em uma alteração nas funções da mitocôndria. De qualquer modo, não tem sido comprovado o modo de ação da ocratoxina A e se esta toxicidade é o resultado de uma ação direta da ocratoxina A ou uma bioativação no animal (Xiao, 1995).

Micotoxinas, tal como a ocratoxina A, apresentam um problema em potencial para a saúde de aves domésticas, causando perdas econômicas, resultado da perda de peso e da diminuição da produção de ovos (Bailey et al., 1989).

Bailey et al. (1989), após revisarem vários autores, relatam que o consumo por animais de ração contaminada com ocratoxina A, pode causar má absorção de nutrientes, imunossupressão, edema renal e, subsequentemente, acumulação de ácido úrico.

A ocratoxina A, ao ser adicionada na alimentação de frangos, causou uma redução na concentração de hemoglobina e também diminuição da atividade da fosfatase alcalina do soro, resultando uma diminuição na absorção de cálcio, potássio e fósforo inorgânico (Bailey et al., 1989).

A ocratoxina A reduz o peso corpóreo de frangos com três semanas de alimentação com rações contaminadas, isto pode ser devido à redução no metabolismo das proteínas, tendo em vista que a ocratoxina A compete com a fenilalanina pela ligação no sítio ativo da enzima Sintetase RNAPhe-transferase, diminuindo, assim, a síntese de proteínas (Gibson et al., 1989).

A ocratoxina A é citada por diminuir a resistência do intestino grosso de aves. Esta conclusão é baseada na descoberta de que a ocratoxina A, em rações de frango, provocou rompimento no intestino grosso durante o experimento. Esta diminuição na resistência do intestino grosso foi associada com o decréscimo do conteúdo do colágeno, que é a principal proteína do tecido

conectivo e o maior componente das membranas inferiores das células epiteliais e endoteliais (Warren e Hamilton, 1980).

A ocratoxina A, em concentrações acima de  $8\mu\text{g/g}$ , produz a anemia mais comum, a do tipo anemia Microcítica Hipocrônica (que é a Anemia Deficiente de Ferro), em frangos. O mecanismo pelo qual a ocratoxina A induz a anemia deficiente de ferro não foi ainda esclarecido, mas suspeita-se existir uma inibição na absorção de ferro pelo trato gastrointestinal. A produção de anemia pela ocratoxina A representa, desde já, mais um ponto em que as micotoxinas podem ser prejudiciais à saúde (Huff et al., 1979).

A ocratoxina A especialmente não é um mutagênico, mas é fracamente genotóxico para células dos mamíferos (Marquardt e Frohlich, 1992).

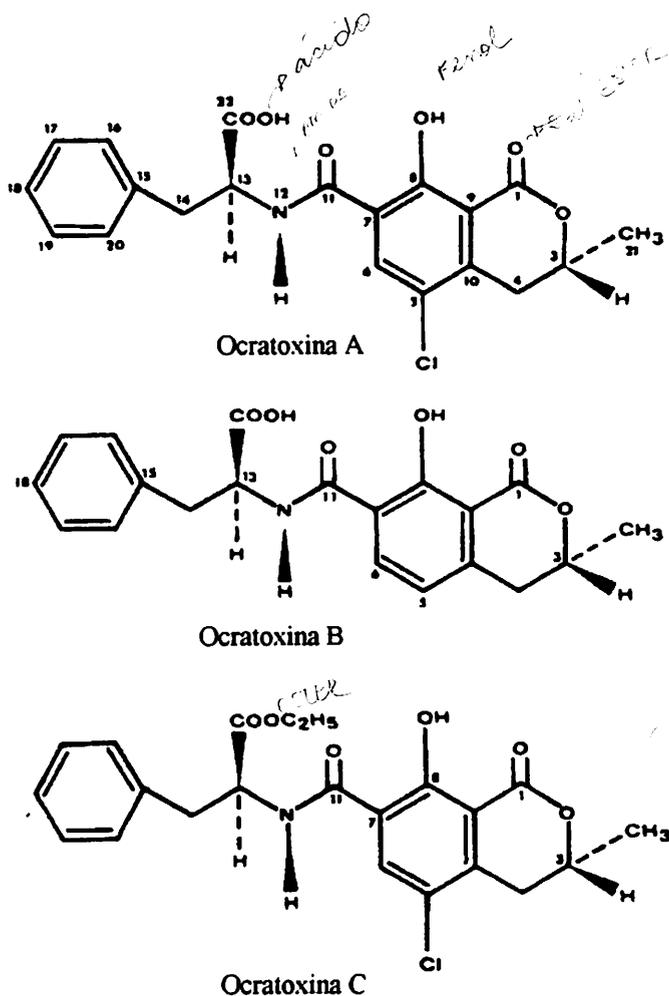
A presença de ocratoxina A em produtos de carne é mais frequentemente associada com a transmissão entre os músculos, rins e sangue, em animais alimentados com rações contaminados Moss (1996b).

### **2.6.1.3 Propriedades físicas e químicas das ocratoxinas**

Quimicamente, a ocratoxina A (figura 1) é formada pela ligação amida entre os compostos 7-carboxil-5-cloro-8-hidroxi 3,4 diidr-3-R-metilisocumarina (ocratoxina  $\alpha$ ) e o grupo L- $\beta$ -fenilalanina (Marquardt e Frohlich, 1992).

A ocratoxina A possui dois grupos ionizáveis, o grupo carboxil da fenilalanina e o 8 hidroxi, ambos podem existir na forma ionizada ou não, em condições fisiológicas (Marquardt e Frohlich, 1992).

A constante de dissociação (pKa) do grupo hidroxi é influenciada pela estrutura da ocratoxina A, os valores do pKa são 7,05 e 7,10 para ocratoxina A e ocratoxina C (figura 1), 8,00 para a ocratoxina B e 11,00 para a ocratoxina  $\alpha$  (Marquardt e Frohlich, 1992).



**FIGURA 1** Estrutura química da ocratoxina A e de seus dois análogos mais importantes, a ocratoxina B e a ocratoxina C (Cole e Cox, 1981).

A toxicidade das formas análogas da ocratoxina A possui uma grande diferença. Os valores de  $LD_{50}$  para frangos jovens são os seguintes: ocratoxina A, 150  $\mu\text{g}$  (3 a 4 mg/Kg); ocratoxina C, 216  $\mu\text{g}$ ; ocratoxina B (figura 1), 1,900 $\mu\text{g}$ ; e a ocratoxina  $\alpha$  não é tóxica a 1,000 $\mu\text{g}$ . Esta toxicidade é afetada pela constante de dissociação do grupo hidroxilfenólico. As formas ocratoxina A e ocratoxina C, que possuem valor de toxicidade molar próximos, têm o mesmo

valor de pKa. A ocratoxina B é aproximadamente 10 vezes menos tóxica que a ocratoxina A, e também tem um pKa que é 10 vezes menor que o da ocratoxina A (Chu, Noh e Chang 1972).

O grupo hidroxil deve existir na forma dissociada em intoxicações com a ocratoxina A. A importância do grupo hidroxil fenólico na ocratoxina A é demonstrado pelo fato de que a ocratoxina C não foi tóxica para os animais testados, uma vez que a ocratoxina C difere da ocratoxina A por uma modificação química no grupo hidroxil (Chu Noh e Chang, 1972).

Os grupo 8-hidroxil, carboxil, cloro e lactona da ocratoxina A têm efeitos substanciais na toxicidade para *Bacillus brevis* e ratos. A atividade biológica da ocratoxina A pode, em parte, ser associada com o grupo lactona do anel isocumarina, neste ponto, este grupo pode não ter um afinidade direta entre a toxicidade das ocratoxinas e a quelação com o ferro; entretanto, a dissociação do grupo fenólico e a presença da cadeia do lado da fenilalanina pode indiretamente aumentar a toxicidade da ocratoxina A. Dados na literatura sugerem que a parte fenilalanina da ocratoxina A funciona como guia para a toxina para metabolismos enzimáticos da fenilalanina, enquanto a porção isocumarina da molécula é responsável pelos efeitos tóxicos.

O átomo de cloro localizado no anel fenólico parece ter um papel indireto na toxicidade das ocratoxinas, exercendo um efeito direto na dissociação do grupo hidroxil fenólico na ocratoxina A e ocratoxina C, dando, assim, o efeito tóxico à molécula. A toxicidade de compostos fenólicos em sistemas biológicos foi relatada por Hansch (1965) segundo o qual tanto a dissociação do grupo hidroxil fenólico quanto a interação hidrofóbica foram importantes na ligação entre compostos orgânicos e a Albumina de soro bovino (BSA) ou proteínas mitocondriais, bem como exercendo uma importância na atividade biológica.

A hipótese de Chu, Noh e Chang (1972) é de que o efeito tóxico da ocratoxina A resulta da interação do grupo fenólico da toxina com proteínas e enzimas *in vivo*.

Os ânions fenólicos tendem a reagir com espécies deficientes de elétrons; assim, se não houver, por parte da proteína ou enzima, um impedimento estérico, o ânion hidroxil pode reagir com um próton de um ponto específico de uma enzima (Hansch, 1965).

Uma vez formada nos alimentos, é difícil a remoção da ocratoxina A pela maioria das formas de processamentos dos alimentos (Moss, 1996b).

A destruição da ocratoxina A após a secagem do trigo, que foi aquecido a 100°C por 20 min, foi, em média, de 2% (Boudra, Bars e Bars, 1995). Estes autores, analisando a estabilidade térmica da ocratoxina A em milho, observaram uma redução de 50 % na concentração de ocratoxina A quando utilizaram as combinações 700, 200, 12 e 6 minutos a 100, 150, 200 e 250°C, respectivamente, e a adição de 50% de água aumentava a decomposição nas temperaturas 100 e 150°C. Porém, o resultado não era mantido em temperaturas mais elevadas. Os autores concluíram que a completa destruição térmica da ocratoxina A durante o processo de aquecimento de 100 a 250°C não foi observada, por ter sido encontrada ocratoxina A após o processamento térmico, sendo necessário um melhor método de descontaminação.

### 2.6.2 Fungos produtores de aflatoxinas

As aflatoxinas são um grupo de compostos dos quais a Aflatoxina B1 é a mais importante, produzida por três espécies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (Moss, 1996a).

Os fungos *A. flavus* e *A. parasiticus* parecem ser onipresentes em solos em que são cultivados grãos. Tem sido considerado que o solo pode ser a principal fonte de inóculo responsável pela infecção do grão. Ambos são hábeis

em produzir aflatoxinas sobre todos os alimentos e rações que suportam o crescimento destes fungos. Em muitos países em desenvolvimento, equipamentos de secagem insuficientes, junto com as condições de umidade atmosférica, resultam em níveis inaceitáveis concentração de aflatoxinas (Smith e Ross, 1991).

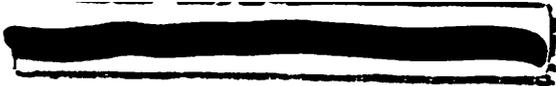
Enquanto a natural formação das aflatoxinas é maior em áreas tropicais e similares, a formação pode ocorrer em zonas temperadas e climas frios, particularmente onde há armazenamento de alimentos nas fazendas (Smith e Ross, 1991).

As aflatoxinas foram primeiramente isoladas do fungo *A. flavus*; porém, com o avanço das pesquisas a respeito desta micotoxina, várias outras espécies de *Aspergillus* têm sido relatadas por produzirem a aflatoxina. Lin (1980), após revisar vários autores relata que nem todas as linhagens de *A. flavus* produzem aflatoxina, e a maioria das linhagens de *A. parasiticus* produz, sendo que a maior parte das linhagens de *A. flavus* produz a aflatoxina B1 e B2 e raramente produz a aflatoxina G1 e G2. Já as linhagens de *A. parasiticus* são potencialmente mais produtoras de aflatoxinas do que o *A. flavus*, além disso, elas são capazes de produzir quatro tipos de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

O *A. parasiticus*, de acordo com alguns autores, pode ser uma variedade (mutante) ou uma outra linhagem particular do *A. flavus* devido às suas semelhanças (Moreau, 1979).

Moreau (1979), revisando vários autores, verificou que os isolados com conídios enrugados e fialides bisseriadas geralmente são colocados nas espécies de *A. flavus*, enquanto aqueles com conidióforo lisos e fialides unisseriadas são classificados como *A. parasiticus*.

Atualmente já é possível encontrar, na literatura, uma grande quantidade de fungos produtores de aflatoxina, mas, de acordo com Lin (1980), estes estudos necessitam de confirmação.



Moreau (1979), revisando vários autores, citam *A. tamaris* Kita, *A. niger*, *A. ostianus*, *A. ruber*, *A. versicolor* (Vuil), *A. wentii* e alguns do gênero *Penicillium* como *P. citrinum*, *P. variable* e *P. frequentans*.

Hesseltine et al (1966), estudando a formação de aflatoxinas por *A. flavus*, verificaram que há grande diferença nas capacidades das linhagens para produzir aflatoxinas, mesmo por linhagens já conhecidas como produtoras. Essas diferenças ocorrem em função do meio de cultivo ou substrato empregado.

{ Moreau (1979), citando Schroeder e Anshworth, relata que a produção de aflatoxina é o resultado da interação do genótipo de uma linhagem e o ambiente em que ela está crescendo. }

### 2.6.2.1 Aflatoxinas

| Aflatoxinas são metabólitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos produzidos por várias estirpes de *Aspergillus*, em diversos produtos. Quimicamente, pertence à classe dos compostos denominados furanocumarina, possuindo um núcleo cumarina associado ao furano e à lactona. A aflatoxina é tóxica para a maioria dos animais, com valor de  $LD_{50} = 0,5 \text{ mg/kg}$ . A forma de lesão mais comum é o excessivo crescimento de células do fígado. Esta é a forma de câncer iniciada pela aflatoxina, reconhecida como o carcinogênico mais potente, e seus principais receptores são as proteínas e os ácidos nucleicos. A aflatoxina é facilmente absorvida pelo trato intestinal. Uma grande variedade de métodos tem sido desenvolvida para a análise de aflatoxina desde a sua descoberta, na década de 1960 (Araujo, 1995). |

### 2.6.2.2 Aflatoxicoses

As aflatoxinas provocam hepatotoxicoses agudas e são conhecidas por ser carcinogênicas em alguns espécies de animais, tais como ratos e cobaias. Estes compostos são severamente tóxicos para os seres humanos, e são provavelmente

[REDACTED]

responsáveis por necrose no fígado, seguida por uma exposição crônica, e pode estar envolvida na epidemiologia de câncer no fígado de humanos em algumas partes do mundo, talvez em sinergismo com o vírus da hepatite B (Moss, 1996a).

Uma vez ingerida na dieta, a aflatoxina B<sub>1</sub> pode ser convertida em um epóxido, um bom candidato a ser carcinogênico e conhecido por reagir com um resíduo da guanina no DNA. O epóxido pode ser futuramente transformado de um epóxido hidratado para uma forma de composto diidratado, que possivelmente poderá ser um a toxina aguda e conhecida por reagir com proteína Moss (1996a)

### **2.6.2.3 Propriedades físicas e químicas das aflatoxinas**

O emprego do calor na forma como é utilizado no processamento de alimentos não inativa completamente a aflatoxina, cerca de 70% da aflatoxina B<sub>1</sub> e 45% da aflatoxina B<sub>2</sub> são inativadas durante a torração do amendoim. O emprego de agentes químicos inativadores pode ser eficiente. A circulação de amônia sobre grãos de milho durante a armazenagem tem sido uma forma eficaz na ativação de aflatoxina, porém tem o inconveniente de alterar a coloração dos grãos (Araujo, 1995).

Segundo Micco (1992), 93% da aflatoxina B<sub>1</sub> presente no café são reduzidas durante uma torração leve e 99% são eliminadas durante uma torração escura. As aflatoxinas são estáveis ao calor. Segundo Asao et al. (1965), a aflatoxina B<sub>1</sub> sofre decomposição a 268-269°C, enquanto a aflatoxina B<sub>2</sub> irá se decompor a 286-289°C. As aflatoxinas são bastantes solúveis em solventes orgânicos moderadamente polares, como clorofórmio, metanol, acetona e dimetilsulfóxido, são moderadamente solúveis em éter de petróleo, instáveis quando expostas à luz e à radiação ultravioleta e estáveis por muitos anos em

soluções de clorofórmio ou benzeno, quando mantidas a frio, com proteção da luz (Araujo, 1995).

De acordo com Magoon, Gupta e Venkatasubramanian (1970), a presença dos grupos lactonas deixa as aflatoxinas susceptíveis à ação de bases, além disso, elas são destruídas por agentes oxidantes fortes.

As aflatoxinas do grupo B possuem um anel ciclopentanona e apresentam um coloração azul-violeta quando irradiadas com luz ultravioleta, enquanto as do grupo G apresentam um grupo lactona insaturado e coloração esverdeada com luz ultravioleta. Ambas as colorações são facilmente diferenciadas quando observadas em Cromatografia de Camada Delgada (CCD) em sílica G 60, sem indicador de fluorescência. Estas siglas B e G advêm do inglês (blue-azul e green-verde) e os indicadores 1 e 2 indicam a posição quando são observadas em CCD.

### 2.6.3 Fungos produtores de Esterigmatocistina

O *Aspergillus versicolor* é o maior produtor de esterigmatocistina, um precursor da aflatoxina (Pitt e Hocking, 1997).

Observa-se que produção de esterigmatocistina e seus derivados tem sido relatada por 15 espécies de fungos: *A. versicolor*, *A. amstelodami*, *A. aurantio-brunneus*, *A. chevalieri*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. parasiticus*, *A. quadrilineatus*, *A. regulosus*, *A. ruber*, *A. sydowi*, *A. ustus* } espécies de *Drechslera*, *Bipolaris sorokiniana* e *Penicillium luteum*. } A esterigmatocistina tem sido encontrada como um contaminante natural, embora em pouca quantidade em milho, cevada, arroz, grãos de café verde, farinha de milho e pães (Davis, 1981).

De acordo com Samson et al (1995), somente o *A. versicolor* e espécies de *Emericella* são produtoras de esterigmatocistina, sendo da Seção *Versicolares* o *A. versicolor* e *A. sydowi*, as espécies mais comum em alimentos. As espécies

de *Chaetomium* tem produzido a esterigmatocistina somente em laboratório e não produzem naturalmente.

### 2.6.3.1 Esterigmatocistina

{ A esterigmatocistina, junto com as aflatoxinas e ocratoxinas, são as principais micotoxinas produzidas pelos fungos do gênero *Aspergillus*, que são conhecidas por ocorrerem naturalmente em níveis significativos, importantes como um risco para a saúde humana de dos animais (Davis, 1981) }

### 2.6.3.2 Toxicologia da Esterigmatocistina

{ Davis (1981) ao citar Ueno e Ueno, descreve a esterigmatocitina como uma micotoxina que apresenta efeitos tóxicos semelhantes ao da aflatoxina B1; sendo assim, este composto é visto como uma potente toxina carcinogênica, mutagênica e teratogênica, porém apresenta uma toxicidade menor do que a da aflatoxina B1. }

A toxicidade da esterigmatocistina varia com o modo de aplicação, de animal para animal, e outros fatores. Em geral, é mais potente quando injetada do que administrada via oral, sugerindo que é absorvida com dificuldade. Em seus sintomas crônicos, são incluídos tumores pulmonares em cobaias, lesões renais e alterações proeminentes no fígado e nos rins, necrose miocárdial no coração e outras (Davis, 1981).

### 2.6.3.3 Propriedades físicas e químicas da Esterigmatocistina

A esterigmatocistina contém o mesmo sistema de anel bifurano que é encontrado na aversina, um pigmento produzido pelo *A. vesicolor*, e na aflatoxina produzida pelo *A. flavus* (Moreau, 1979).

{ A esterigmatocistina é um metabólito que quimicamente é descrito como um sistema insaturado 7,8-diidrofurano(2,3-b) furano ---. Com ponto de fusão

variando de 247-248<sup>o</sup>C, esta toxina é um cristal amarelo pálido, insolúvel em água, e difunde-se na maioria dos solventes orgânicos em presença de calor mas é prontamente solúvel em clorofórmio (Moreau, 1979, Miller e Trenholm, 1994).

{ A esterigmatocistina possui um fluorescência muito fraca e pode ser observada como uma mancha vermelho-tijolo sobre placa de cromatografia delgada irradiada com luz ultravioleta (Miller e Trenholm, 1994). }

## 2.7 Identificação de fungos toxigênico

O gênero *Aspergillus* foi primeiramente descrito por Micheli, por volta de 1729; porém, é geralmente aceito que Link, em 1890, foi quem melhor definiu claramente o gênero (Smith e Ross, 1991). Em 1965 Raper e Fennell descreveram 132 espécies, divididas em 18 grupos, e este sistema é mundialmente usado para propor um diagnóstico em micologia.

→ Uma identificação exata de muitos *Aspergillus* é problemática, em particular com as espécies produtoras de micotoxinas. Isto ocorre por serem adotados fatores altamente subjetivos na identificação, como cor e aparência física das culturas em crescimento. A identificação das espécies de *Aspergillus* anamórficos, além de envolver a cor e forma da colônia, depende extensivamente de observações microscópicas, das características morfológicas dos conidióforos, juntamente com as medidas detalhadas das partes individuais dos fungos (Raper e Fennell, 1965).

Nos últimos 20 anos, os micologistas vêm desenvolvendo vários meio de cultura para a enumeração e isolamento de grupos de fungos específicos, com destaque para os potencialmente toxigênicos, diminuindo o tempo necessário para isolar e identificar fungos de diferentes gêneros.

2) { São vários os métodos utilizados para a detecção de fungos toxigênicos; em geral, estes métodos são baseados na produção de toxina em extrato sólido

ou líquido, extração da toxina com solventes orgânicos, seguida por algum processo de purificação, quando finalmente a toxina é concentrada e detectada por CCD - Cromatografia de Camada Delgada (Filtenborg e Frisvad 1980).

A classificação de fungos do grupo *Penicillium* terverticilado tem sofrido modificações durante a história do gênero (Frisvad e Filtenborg, 1983).

Embora muitos autores tenham indicado que os metabólitos secundários podem ser usados como um fator relevante na taxinomia destes microrganismos, a relação entre o perfil de metabólitos secundários e a taxa de *Penicillium* terverticilado produtores destes metabólitos é escassa, especialmente para as espécies mais importantes. *Penicillium* terverticilado pode ser efetivamente definido pelo perfil dos metabólitos secundários específicos (Frisvad e Filtenborg, 1983).

Muitas espécies e subgrupos produzem uma ou duas micotoxinas em comum, mas a produção de três ou mais micotoxinas biosinteticamente diferentes não foi observada em *Penicillium* terverticilado (Frisvad e Filtenborg, 1983).

Os isolados das seguintes espécies produzem somente dois distintos metabólitos após a confirmação em CCD: *P. camembertii*, *P. mali*, *P. aurantiogriseum* (grupo I), *P. echinulatum*, e *P. viridicatum* (grupos II e III). Estes isolados podem ser, sem equívoco, identificados por seus metabólitos por serem suficientemente específicos (Frisvad e Filtenborg, 1983).

A viomeleina foi consistentemente produzida em quantidade menor do que a xantomegnina, em todos os isolados de *P. aurantiogriseum* grupo I, estas foram produzidas em quantidades relativamente próximas por todos os isolados de *P. viridicatum* grupo I (Frisvad e Filtenborg, 1983).

A produção ocratoxina A e a citrinina por *P. viridicatum* (grupo II) é consistentemente indicado pela coloração violeta marrom no reverso, a xantomegnina e viomeleina produzida por *P. viridicatum* (grupo I) e *P.*

*aurantiogriseum* são consistentemente indicados pela frente e reverso amarelo (Frisvad, 1983).

Os meios CYA e YES foram ótimos para a produção da maioria dos metabólitos secundários observados, o CYA foi ótimo para a produção de ácido ciclopiazônico, roquefortina, xantomegina, viomeleina e outras, enquanto o meio YES favoreceu a produção de citrinina, ocratoxina A, patulina e outras, além de micotoxinas intracelulares, como ácido micofenólico, brevianamida A, viridicatumtoxina e chaetoglobosina (Frisvad e Filtenborg, 1983).

O perfil de metabólitos secundários pode ser usado como primeiro critério na taxonomia ou confirmação da identificação baseada sobre a morfologia e fisiologia (Frisvad e Filtenborg, 1983).

Para as espécies de *Aspergillus*, Bothast e Fennell (1974) desenvolveram o meio (*Aspergillus* Differential Medium) ADM para identificação e enumeração de *A. flavus* e espécies relacionadas. Os isolados de *A. flavus* foram identificados por uma coloração amarelo-laranja brilhante persistente, sendo que o íon férrico foi essencial para a produção da pigmentação. A possibilidade de desenvolver esta pigmentação foi única para o *A. flavus*, ou membros do grupo *Aspergillus flavus*, e pode ser usado para distinguir estas espécies de fungos de outros *Aspergillus* que são mais comuns em alimentos e grãos estocados e de outros gêneros.

Hara et al. (1974) formularam um meio Czapek's modificado (Czapek's agar contendo fosfato de amônio como fonte de nitrogênio - APA) para a detecção de aflatoxina em meio de cultura utilizando luz ultravioleta. A fluorescência azulada serviu como um forte indicativo da presença de aflatoxina, porém foram necessárias a extração e a confirmação por cromatografia. Hara, revisando vários autores, cita que o *A. flavus* é capaz de produzir vários outros compostos azuis fluorescentes como: asperopterina A ou B, flavacol, e o ácido deoxihidroxispergílico. No experimento de Hara et al. (1974) todos os

isolados de *A. flavus* e *A. parasiticus* produtores de aflatoxina, e um de *A. oryzae* aflatoxina-negativo, produziram o halo azulado, porém a aflatoxina não foi confirmada em CCD após examinar o isolado de *A. oryzae*.

Hamsa e Ayres (1977) formularam o meio BSAD (Botron Streptomycin *Aspergillus* Diferencial) que consistiu da combinação do meio ADM descrito por Bothast e Fennell's, em 1976, e o meio Broton Rosa de Bengala Estreptomicina desenvolvido por Bell e Craford, que adicionaram ao ADM o dicloran e a estreptomicina para impedir o antagonismo entre fungos e/ou bactérias que podem influenciar o resultado. Neste meio, *Aspergillus flavus* também foi identificado pela produção de pigmentos amarelo-laranja, sendo que o período de incubação foi de 5 dias a 28° C, sugerido pelos autores. A formação da pigmentação amarelo-laranja foi o resultado da reação entre o ácido kójico e o citrato de ferro. O ácido kójico é um dos metabólitos produzido por vários fungos do gênero *Aspergillus*. Porém, Gourama e Bullerman (1995) mencionaram que o ácido kójico é produzido pelo *Aspergillus flavus* e espécies relativamente próximas. Em 1981, Assante et al. relataram que a formação da pigmentação é devida á formação de um complexo contendo 3 moléculas de ácido aspergílico ou ácido neoaspergílico e o íon férrico, que pode coordenar com o ácido hidroxâmico da molécula orgânica. O ácido neoaspergílico, previamente isolado do *Aspergillus sclerotiorum*, é um isômero do ácido aspergílico. Assim, o íon ferro pode ter uma influência favorável sobre a produção desta classe de metabólitos possivelmente via formação de complexo.

Dos isolados analisados por Pitt, Hocking e Glenn (1983), apenas *Aspergillus oryzae* produziu uma pigmentação semelhante à do *Aspergillus flavus* e do *A. parasiticus*. Estes mesmos autores fizeram uma nova alteração no meio ADM que o deixou ainda mais específica a identificação de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que passou a ser denominado *Aspergillus flavus-parasiticus* ágar (AFPA). De acordo com os autores, as modificações no

ADM provocaram as seguintes vantagens: I) maior solubilidade do citrato de ferro amoniacal e a pigmentação mais pronunciada, proporcionada pela substituição da triptona pelo extrato de levedura. Para Bothast e Fennell (1974), o íon ferro e a fonte de nitrogênio foram essenciais para a produção da pigmentação amarelo-laranja; II) incremento da taxa de crescimento do *Aspergillus flavus* e a inibição dos competidores, uma vez que os antibióticos do ADM foram substituídos pelo dicloran e o clorafenicol, com a vantagem de que, destes, dois antibióticos podem ser adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem e III) os antibióticos acrescentados foram eficazes na inibição de bactérias e fungos que crescem rapidamente como, por exemplo, *Rhizopus* e *Mucor*.

Poucos fungos têm sido relatados por produzirem resultados falso/positivo no meio AFPA. O *A. oryzae* é um fungo que faz parte do grupo *A. flavus* e pode produzir o reverso amarelo-laranja, porém; esta espécie é comum em produtos fermentados provenientes da Ásia, como o molho de soja. O *A. oryzae* é raramente isolado de outra fonte. O *A. ochraceus* produz coloração semelhante, mas seu crescimento é restrito a 30°C. O *A. niger* também produz a pigmentação amarelo-laranja, porém seus conídios são pretos, diferentes dos de *A. flavus* e *A. parasiticus*, que são amarelo vivo (Pitt, Hocking e Glenn, 1983).

O uso do AFPA diminui o tempo necessário para a identificação de espécies de *A. flavus*. Uma outra vantagem é o isolamento e identificação do potencial aflatoxigênico dos fungos. Em muitos laboratórios, este é um método fácil e mais econômico para examinar materiais contaminados (Gourama e Bullerman, 1995).

No final da década de 60, Arseculeratne et al. (1969) recomendam o meio com coco para a produção de aflatoxina em grande escala. Um dos fatores que se pode levar em conta, o alto rendimento de aflatoxina obtido no meio de coco, pode ser o baixo grau de degradação da aflatoxina. Isto é possível porque a

aflatoxina é excretada em um meio contendo uma baixa quantidade de ácidos graxos insaturados; a presença de uma rica concentração de ácidos graxos insaturados no meio de cultura pode aumentar extensivamente a degradação da aflatoxina (Arseculeratne et al.,1969). Um outro fator importante na produção de aflatoxina é a temperatura de incubação, 24°C, que foi considerada uma ótima temperatura para a produção de aflatoxina B1.

Os fungos aflatoxigênicos podem ser identificados com sucesso no meio Cocconut Agar Medium (CAM), desenvolvido por Lin e Dianese (1976). Este método é baseado sobre a detecção da aflatoxina pela produção de uma fluorescência azul-violeta e uma pigmentação específica sobre o meio CAM. A detecção de aflatoxina em meio de cultura por luz ultravioleta foi primeiramente desenvolvida por Hara et al (1974) utilizando uma solução de Czapeck's modificada, testando várias fontes de nitrogênio, sais inorgânicos, pH, tempo de incubação e temperatura, chegando em um meio denominado APA. A fluorescência azul neste meio ao redor da colônia foi um forte indicio da produção de aflatoxina; de qualquer modo, foi necessária a extração com clorofórmio e identificação em CCD.

O meio CAM oferece as vantagens de isolar os fungos *Aspergillus spp* produtores de aflatoxina. A detecção da produção de aflatoxina pela presença da fluorescência, associada com uma pigmentação amarelo-laranja, é rápida e específica, além de ser um meio barato e fácil de preparar (Lin e Dianese, 1976). Porém, várias substâncias produzidas por *A. flavus* e *A. oryzae* diferentes da aflatoxina podem apresentar fluorescência semelhante como a asperopterina A e B, flavacos e o ácido deoxil-hidroxil aspergílico, mostrando que este método necessita de um passo complementar, a confirmação.

## 2.8 Fatores que influenciam o crescimento e a produção de micotoxinas pelos fungos toxigênicos

Os principais fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos em grãos estocados são: a umidade do grão estocado (incluindo a atividade de água), a temperatura, o tempo de estocagem do grão, o grau de contaminação do grão antes de ser estocado, a quantidade de material estranho junto com os grãos e a atividade de insetos e ácaros (Christensen e Kaufmann, 1969).

### 2.8.1 Substrato

Os fungos micotoxigênicos são capazes de crescer sobre uma grande quantidade de substratos. De qualquer modo, nem todos estes substratos são igualmente bons para a produção de micotoxinas. Alguns substratos fornecem pouco ou nenhum nutriente para a produção de micotoxinas e, ao mesmo tempo, favorecem o alto crescimento dos fungos (Bullerman, Schroeder e Park, 1984).

Luchese e Harrigan (1993), citando Bu'Lock, relatam que a produção de metabólitos secundários não é dependente apenas da espécie, mas é influenciada pelo ambiente e qualidade dos nutrientes.

Madhyastha et al (1990) avaliaram o efeito de diferentes cereais sobre o crescimento e a produção de micotoxinas por *A. alutaceus* (*A. ochraceus*) e *P. verrucosum*. O resultado deste trabalho demonstra claramente que o crescimento do fungo e a produção de ocratoxina A, ocratoxina B e citrinina, pelos fungos testados, é altamente influenciada pelo tipo de substrato. O amendoim e a soja foram o melhor substrato para a produção ocratoxina A e ocratoxina B por isolados de *A. alutaceus* (*A. ochraceus*), já os isolados de *P. verrucosum* produziram uma quantidade elevada de ocratoxina A e citrinina em trigo e milho. Em sementes oleaginosas como o amendoim e a soja, não foram um bom substrato para o *P. verrucosum* que, nestas sementes, não produziram a citrinina, mas apenas a ocratoxina A. O *A. alutaceus* (*A. ochraceus*) produziu a ocratoxina

B nas sementes oleaginosas, mas não sobre o milho e o trigo. Assim, o tipo de substrato irá influenciar a natureza e a quantidade de metabólitos tóxicos produzidos.

A soja mostrou ser um melhor substrato para a produção de aflatoxina pelo *A. flavus* em comparação com o arroz, num período 10 dias de incubação (Park e Bullerman, 1983).

Park e Bullerman (1983), estudando o efeito do substrato e temperatura sobre a produção de aflatoxina por isolados de *A. flavus* e *A. parasiticus*, mostraram que alimentos com altas concentrações de proteínas e baixas concentrações de carboidratos não favorecem a produção de aflatoxinas pelo *A. parasiticus*, apesar do crescimento e da esporulação do fungo. De qualquer modo, pequena quantidade de carboidratos pode ser utilizada pelo *A. flavus* para produzir uma quantidade substancial de aflatoxina. Assim, a quantidade de carboidratos presente no alimento e a espécie do fungo são fatores importantes na produção de aflatoxina.

A produção de aflatoxina é altamente afetada pelo tipo e concentração da fonte de carbono disponível (Davis e Diener, 1968), sendo que a produção de concentrações elevadas necessita de altas concentrações de açúcares (Luchese e Harrigan, 1993).

A habilidade de produzir a aflatoxina com diferentes fontes de carbono, pelo *A. parasiticus*, foi avaliada por Buchanan e Stahl (1984). Dos açúcares examinados, a glicose, ribose, frutose, sacarose e maltose favorecem a produção de altas concentrações de aflatoxina, enquanto baixas concentrações foram observadas com ramosa, arabinose, galactose e celobiose.

Embora alguns substratos possam ser menos favoráveis à produção de aflatoxina, eles não podem controlar completamente ou prevenir a formação de micotoxinas, exceto em certas situações específicas. O controle efetivo da formação de aflatoxina provavelmente requer uma interação com outros fatores,

tais como temperatura, umidade e/ou crescimento competitivo (Luchese e Harrigan, 1993).

O café é um outro substrato constantemente estudado, e para muitos pesquisadores, este produto não aparenta ser um bom substrato para a produção de micotoxinas pelos fungos toxigênicos.

A cafeína é uma substância presente no café que possui propriedade antimicotoxigênica, inibindo tanto a produção de micotoxinas como patulina, esterigmatocistina, citrinina, aflatoxinas e as ocratoxinas como o crescimento do fungo, agindo, assim, como um composto fungistático, entretanto, esta inibição é altamente específica, dependendo principalmente dos fatores genéticos dos fungo envolvidos.

Buchanan e Fletcher (1978) testaram o efeito da cafeína em meios líquidos sobre o crescimento do *A. parasiticus* e a produção de aflatoxina B1. Fazendo um monitoramento, visual foi observada uma redução na esporulação do fungo testado. E a cafeína inibiu a formação da aflatoxina B1. Assim, os autores levantaram a hipótese de que a propriedade anti-aflatoxigênicas do café poderia ser atribuída à presença da cafeína. Eles levantaram a hipótese, também, de que a remoção da cafeína poderia aumentar os riscos de contaminação com aflatoxinas.

Nartowicz, Buchanan e Segal (1979) notaram que os fungos potencialmente toxigênicos, associados aos grãos de café armazenados, podem oferecer informações de que o café é um substrato que não oferece condições que favorecem a produção de micotoxina. Neste trabalho, eles confirmam a hipótese de Buchanan e Fletcher (1978) de que a cafeína tem um importante papel na prevenção da formação da aflatoxina em café. Além disso, os resultados mostram claramente que a descafeinação aumenta o potencial aflatoxigênico do café e indicam que cuidados extra devem ser tomados para assegurar a ausência de aflatoxina em café descafeinado.

Buchanan, Tice e Marino (1981), estudando o efeito da cafeína e da teobromina sobre a produção de ocratoxina em seis espécies de fungo toxigênicos, demonstraram que a cafeína tem pouco efeitos sobre o crescimento inicial do *A. ochraceus*, mas aumentando a concentração, o fungo passa a fase estacionária de crescimento. A cafeína mostrou um efeito maior sobre a produção de micotoxinas do que no crescimento do fungo, considerando, assim, que a cafeína pode ser um agente ativo, inibindo a formação de micotoxinas policetídicas, e que o café descafeinado pode ser mais susceptível à contaminação com ocratoxina.

Buchanan, Molly e Gealt (1983) avaliaram, em meios de cultura, o efeito da cafeína sobre três micotoxinas: esterigmatocistina, citrinina e patulina, produzidas pelo *A. versicolor*, *P. citrinum* e *P. urticae*, respectivamente. Este estudo demonstrou que a cafeína pode influenciar no crescimento dos fungos e na produção de micotoxinas policetídicas pelos membros das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Os autores sugerem que a cafeína presente em comidões, como cacau e café, pode ser um agente fungistático que ocorre naturalmente. O mecanismo pelo qual a cafeína inibe a síntese de policetideos ainda é desconhecido.

O modo de ação pelo qual a cafeína inibe a síntese de micotoxinas tem sido estudado por Buchanan, Hoover e Jones (1983). Estes pesquisadores chegaram à conclusão de que o efeito inibitório da cafeína sobre o *Aspergillus parasiticus*, reduzindo o crescimento do fungo e a produção de aflatoxina, não envolve a inibição do ciclo da fosfodiesterase AMP ou a quelação de íons metálicos. A especificidade da cafeína parece ser a de inibir a frutose-1,6-difosfatase pelo carbono catabólico, resultando em um decréscimo na atividade glicolítica e alterando a carga de energia do microrganismo. A síntese de aflatoxina tem sido relatada por ser altamente dependente do catabolismo ativo

de certos carboidratos; reduzindo a atividade glicolítica, será esperada uma forte redução na síntese de policetídeos.

Hasan (1996), estudando as propriedades antitoxigênicas do chá e do café, concluiu que além da cafeína, o ácido tânico apresenta propriedades anti-aflatoxigênicas. A síntese de aflatoxina e o crescimento do *Aspergillus parasiticus* foram afetados pela presença dos taninos e da cafeína presentes no chá e no café; o mecanismo pelo qual os dois compostos provocam tal inibição pode ser devido à redução na atividade glicolítica.

Porém, nem todas as linhagens de fungos são sensíveis à cafeína. Tsubouchi et al (1985) isolaram, de grãos de café, uma linhagem de *Aspergillus ochraceus* resistente à cafeína. Este experimento mostrou que embora os níveis de ocratoxinas em grãos de café verde sejam baixos, a presença de *Aspergillus ochraceus*, que é uma espécie de fungo comum em grãos de café verde, em alguns isolados, tem o potencial de crescer sobre grãos de café úmidos e produzir a ocratoxina. A atividade de inibição da cafeína é altamente específica, o isolado ocratoxigênico deste estudo teve a capacidade de crescer bem em meio de cultura com extrato de café, degradou a cafeína e produziu a ocratoxina em meio contendo a cafeína.

### **2.8.2 Temperatura e Disponibilidade de água:**

Os fatores mais importantes que influenciam o crescimento dos fungos sobre um substrato intrinsecamente susceptível são a atividade de água e a temperatura, a micotoxina pode ser formada como um resultado deste crescimento (Moss, 1996a). A temperatura tem um papel dominante no crescimento do micélio, bem como na formação e germinação dos esporos (Moreau, 1979).

A temperatura ótima para o crescimento e produção de micotoxinas para os fungos do gênero *Penicillium* varia de 25<sup>o</sup> a 30<sup>o</sup>C, enquanto, para os do

gênero *Aspergillus*, é de 30<sup>o</sup> a 40<sup>o</sup>C, sendo que a temperatura máxima de crescimento de *Penicillium* varia de 28<sup>o</sup> a 35<sup>o</sup>C, e para a maioria dos *Aspergillus*, de 37<sup>o</sup> a 45<sup>o</sup>C. (Samson et al 1995)

É essencial notar que, embora muitas vezes semelhantes, as temperaturas de crescimento e de esporulação podem ser diferentes. Assim, ao observar um temperatura ótima para a esporulação, esta pode ou não ser menor que a temperatura de crescimento. Além de desempenhar um importante papel no crescimento e morfologia dos fungos, a temperatura também influencia na quantidade e natureza dos metabólitos que eles produzem. E não necessariamente a temperatura ótima de crescimento é igual à temperatura para a produção de todos os metabólitos (Moreau, 1979).

A maioria do fungos que contaminam em grãos estocados cresce muito bem em temperaturas de 30 a 32 °C aproximadamente, e o crescimento destes fungos diminui à medida que decresce a temperatura. Algumas espécies do grupo *Aspergillus glaucus* crescem lentamente em temperaturas de 35 a 40 °C, e algumas espécies de *Penicillium*, que requerem alta umidade, podem crescer em temperaturas próximas do congelamento (Christensen e Kaufmann, 1969)

Tão necessária quanto a temperatura é a disponibilidade de água para o microorganismo, que pode ser expressa como umidade relativa ou atividade de água, que também possui um papel muito importante para o crescimento do fungos, principalmente quando estes estão prestes a se instalarem em grãos estocados.

A umidade relativa é o mesmo que a atividade de água, exceto que a umidade relativa é expressa em porcentagem e a atividade de água em números decimais (Smith e Kozakiewicz, 1994).

A atividade de água ( $a_w$ ) é a água disponível para o crescimento dos fungos e outros microrganismos em um substrato; diminuindo a atividade de água do produto, irá diminuir também a disponibilidade de água para o fungo.

Todos os fungos, independente da espécie, possuem uma máxima, ótima e mínima atividade de água para o seu crescimento, sendo que estas variam de espécie para espécie (Miller e Trenholm 1994).

As espécies de *Aspergillus* diferem em sua necessidade de  $a_w$ ; portanto a presença de uma espécie em particular, em um determinado alimento, é igualmente indicada como um prévia das condições de estocagem. As espécies de *Eurotium* que são melhor conhecidas como membros do grupo do *A. glaucus* são os mais xerofílicos, capazes de crescer em baixa  $a_w$ , normalmente a 0.71. *A. versicolor*, *A. flavus* necessitam de uma  $a_w$  0,78, *A. ochraceus* requer 0,75 de  $a_w$ ; enquanto o *A. fumigatus* requer 0.85 de  $a_w$  (Smith e Kozakiewicz, 1994).

Os efeitos da  $a_w$  e temperatura sobre a produção de micotoxinas são diferentes das mencionadas para a germinação dos esporos e crescimento dos fungos. Além disso, o efeito desses dois fatores pode ser diferente para a produção de duas toxinas pela mesma espécie e também da mesma toxina por espécies diferentes (Smith e Kozakiewicz, 1994).

Hill et al citados por Moss (1996a), analisando dados publicados de vários isolados de *A. flavus* e *A. parasiticus*, compararam a temperatura e a atividade de água e montaram um diagrama que demonstra claramente que as condições da produção de aflatoxina são uma subsérie do crescimento e que as ótimas condições de crescimento (36<sup>o</sup> C em  $a_w$  0.95) não são as mesmas para a produção de aflatoxina (33<sup>o</sup> C em  $a_w$  0.99), reconhecendo que linhagens individuais são caracterizadas por valores distintos deste parâmetros.

As duas maiores espécies de fungos produtoras de ocratoxina A diferem nas condições de temperatura e atividade de água  $a_w$  ótimas para o crescimento e a produção de micotoxinas. Assim, a  $a_w$  mínima para o crescimento de *Penicillium verrucosum* é 0.81 e para *A. ochraceus*, 0.76, mas o mínimo para a produção de ocratoxina A é 0.85 para ambas as espécies e a  $a_w$  ótima é acima de 0.97. Em  $a_w$  ótima, a temperatura para a produção de ocratoxina A varia de 4-

31°C (24°C é a temperatura ótima) para *P. verrucosum* e 12-37°C (25°C temperatura ótima) para o *A. ochraceus* (Moss, 1996b)

### **2.8.3 Danos provocados por equipamentos e insetos**

Miller e Ternholm (1994), ao citar Le Bars, relatam que os danos mecânicos provocados durante a colheita, provocados pelos equipamentos e as lesões causadas por insetos, podem facilitar a penetração dos fungos no interior dos grãos

Já os insetos e os ácaros afetam o desenvolvimento dos fungos geralmente de dois modos, aumentando a umidade dos grãos e carregando os esporos dos fungos para o interior do grão e para outros grãos não contaminados. Alguns insetos e ácaros transformam os seus alimentos em gás carbônico e água, aumentando, assim, a umidade dos grãos, tornando-os ativos para a contaminação. Os ácaros, quando se desenvolvem em grãos mofados, podem transportar os esporos destes fungos tanto no lado externo de seus corpos como no trato digestivos e nas fezes. Assim, eles podem penetrar em grãos saudáveis, inoculando os esporos no interior do grão. Provavelmente, quando ocorre uma contaminação destes ácaros em grãos, é de se esperar que não ocorram apenas os danos provocados pelos ácaros, mas também pelos fungos que os acompanham (Christensen e Kaufmann, 1969)

Entretanto a relação entre insetos e fungos é imprevisível. Embora algumas espécies de insetos sejam capazes de espalhar os esporos dos fungos, outros são capazes de reduzir o crescimento de outras espécies de fungos (Miller e Ternholm, 1994).

O inverso também é verdadeiro, uma vez que alguns fungos podem impedir a contaminação dos insetos onde eles estão instalados. A ocratoxina A é uma micotoxina conhecida por demonstrar uma certa toxicidade sobre os insetos.

Esta toxina pode tanto ser excretada no substrato como acumulada no esclerotium dos isolados.

Wicklow et al. (1996) relatam que o escleródios das espécies de *Aspergillus* pode ser importante para a sobrevivência dos fungos e é uma fonte de produtos com propriedades inseticidas. Os escleródios produzidos pelo *A. carbonarius* funcionam como um efetivo defensivo químico contra insetos fungívoros, devido à presença da ocratoxina A. Insetos como *Carpophilus hemipterus* e *Helicoverpa zea* (broca do milho) mostraram ser sensíveis à ocratoxina A, apresentando sintomas como perda na taxa de alimentação, perda de peso, sendo que até a mortalidade dos insetos foi diagnosticada.

#### 2.8.4 Interação entre microrganismos

A colonização dos grãos estocados é um processo complexo, envolvendo mais do que o antagonismo dos fungos. Como os metabólitos não se difundem entre os grãos, a taxa de crescimento pode tornar-se mais importante do que em culturas sintética. Também os fatores nutricionais, temperaturas ou atividade de água também podem fazer parte. O contato entre as hifas de diferentes espécies de fungos certamente ocorre em grãos estocados em menor proporção do que em meios de cultura. As interações são prováveis para fazer o papel na determinação de qual espécie será dominante no ecossistema dos grãos estocados abaixo de um conjunto de fatores ambientais (Magan e Lacey, 1984).

A atividade de água e a temperatura irão influenciar na microbiota dominante, o *Aspergillus ochraceus* foi dominante sobre o *Aspergillus flavus* em milho com  $a_w$  0,95 a 18 °C, mas a 30 °C, o *Aspergillus flavus* foi dominante. O *Eurotium amstelodami* foi dominante sobre o *Aspergillus ochraceus* em ambas as temperaturas, a 18 e a 30°C, com uma atividade de água de 0,95. Com o aumento da atividade de água (0,995 – água livre), o *Aspergillus ochraceus* foi dominante sobre *Aspergillus candidus* e *Eurotium amstelodami* a 18 °C, e a

30°C contra *Alternaria alternata*. O crescimento do *Aspergillus ochraceus* foi significativamente reduzido pela presença de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Eurotium amstelidami*, a 30 °C, com uma  $a_w$  de 0,95, o *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* inibiram o crescimento do *Aspergillus ochraceus* com  $a_w$  de 0,995 (Lee e Magan, 2000).

É esperado que a competição entre os microrganismos afete profundamente a produção de metabólitos secundários, visto que estes microrganismos em culturas compete por todos os fatores ambientais essenciais, incluindo o espaço e os nutrientes. A presença de microrganismos competidores pode resultar na inibição ou estimulando a produção de micotoxinas (Petersson et al, 1998).

Petersson et al (1998) relatam que os fungos toxigênicos durante o controle biológico não têm mostrado um aumento na produção das micotoxinas. Porém, não se pode descartar a possibilidade do antagonismo destes microrganismos resultarem numa maior produção de metabólitos secundários e, conseqüentemente, das micotoxinas; esta situação dependerá das espécies envolvidas e das condições ambientais.

O *Aspergillus ochraceus* teve os níveis de produção ocratoxina significativamente reduzidos na presença de *Aspergillus niger* e *Eurotium amstelodami* a 30°C em ambas as  $a_w$ ; de 0,95 e 0,995; a presença do *Aspergillus flavus* reduziu a produção de ocratoxina A com  $a_w$  0,95. Já o *Aspergillus candidus* influenciou a redução de ocratoxina A em ambas as  $a_w$  (0,95 e 0,995) a 18°C (Lee e Magan, 2000).

O estudo desenvolvido por Lee e Magan (2000) mostra que alguns fungos inibem significativamente o crescimento e a produção de ocratoxina A por *Aspergillus ochraceus* em temperaturas e  $a_w$  ótimas.

Paster, Pushinsky e Menasherov (1992) encontraram fortes indicativos de que o *A. niger* é capaz de inibir o crescimento do *A. flavus* e *A. ochraceus*, bem

como a produção de aflatoxina. Este estudo mostrou que a inibição provocada pela presença do *A. niger* foi atribuída à produção de metabólitos, e não somente à redução do pH no meio de cultura. A presença do *A. niger* e de *Trichoderma viride* também impediram a produção da aflatoxina por *A. flavus* em grãos esterilizados (Wicklów et al, 1980).

Wicklów et al (1980) propõem que o sucesso da invasão do *A. flavus* na pré-colheita de cereais e, posteriormente, a produção de aflatoxina, pode ser dependente da seqüência em que o fungo se instala no grão em relação a um outro colonizador e das propriedades biológicas deste outro colonizador. Assim, *Trichoderma viride* cresce rapidamente e é um forte antagonista do *A. flavus*, e é esperado que ele restrinja ou previna a colonização do *A. flavus* no grão. Os autores reconhecem que a especialidade ecológica dos fungos na pré e pós-colheita pode afetar a susceptibilidade dos fungos nos grãos e a contaminação com micotoxinas.

Devido à competição entre a microbiota natural e produtos inoculados com micotoxinas, ambos, crescimento do fungo e produção de micotoxinas, são reduzidos. A redução do crescimento, causada pela presença de espécies específicas de bactérias e leveduras, podem também influenciar na produção de micotoxinas, certas substâncias produzidas por estes microrganismos podem reduzir a produção de toxinas pelos fungos toxigênicos (Pettersson et al, 1998).

Um dos processos que têm sido estudados com atenção é a detoxificação microbiana das micotoxinas produzidas em cereais. Alguns microrganismos possuem habilidade de degradar as micotoxinas, transformando-as em substâncias menos tóxicas.

As espécies de *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* conseguem degradar a ocratoxina A em meios de cultura YES. O *Aspergillus niger* foi encontrado por ser efetivo na eliminação de ocratoxina A e também na decomposição da ocratoxina  $\alpha$  em meios líquidos e meios sólidos.

Esta observação é promissora porque pode permitir uma eliminação biológica desta micotoxina de substratos sólidos, tais como grãos de café e cereais (Varga, Rigó e Téren, 2000).

Uma das alternativas que explicam este processo de detoxificação biológica é que espécies de fungos podem provir de enzimas como a carboxilpeptidase, produzidas por *Aspergillus niger*, que são capazes de decompor a ocratoxina A e ocratoxina  $\alpha$  (Varga, Rigó e Téren, 2000).

O *Acinetobacter calcoaceticus* possui a capacidade de degradar a ocratoxina A em ocratoxina  $\alpha$  em meio EMSM (ethanol-minimal salts medium), com uma redução significativa da concentração da toxina no período de tempo entre 24 e 48h; entretanto, o *Acinetobacter calcoaceticus* não cresce em meio com o mínimo de sal sem etanol. Isto indica que o *Acinetobacter calcoaceticus* é incapaz de usar a ocratoxina A como única fonte de carbono (Hwang e Draughon, 1994).

A *Pichia anomala* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram a propriedade de inibir tanto a produção de ocratoxina A como o crescimento de dois isolados de *Penicillium verrucosum* no teste *in vitro*. Já no substrato natural utilizado (trigo), apenas em um dos isolados foi observada a redução no crescimento e na produção da toxina (Petersson et al, 1998).

O métodos de controle biológico de fungos não podem ser considerados seguros a menos que a interação microbiana em níveis necessários para que ocorra o antagonismo seja entendida. Além disso, é necessário um total conhecimento do microrganismo escolhido como agente controlador. Este microrganismo não pode produzir resíduos tóxicos, não pode alterar a qualidade do substrato e sua presença não pode colocar em risco a saúde do homem e de outros animais.

Outros fatores têm sido relatados por serem de vital importância para o crescimento do fungo e, conseqüentemente, a produção de micotoxina, tais

como o tempo em que o produto será estocado; o tempo de crescimento do fungo e de produção de micotoxinas, que difere para cada espécie de fungo, dependendo do substrato e das condições de estocagem; a concentração da relação  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ . Na maioria dos casos, a produção de micotoxinas e o crescimento do fungo sofrerão uma redução quando menor for a concentração de  $\text{O}_2$  e/ou maior for a concentração de  $\text{CO}_2$ . Outros fatores de grande importância são grau de contaminação por esporos dos fungos, uso de fungicidas, materiais estranhos aos produtos armazenados, como fragmentos de plantas e de insetos, ciscos e torrões de terra e, por final, a localização geográfica.

## **2.9 Legislação e Micotoxinas**

As legislações para os alimentos servem para proteger a saúde dos consumidores, os interesses econômicos dos produtores e os comercializantes destes produtos (Egmond, 1998).

Sendo a micotoxina um contaminante natural de muitos produtos, e os processos que sofrem os alimentos não são capazes de eliminar completamente as micotoxinas, cabe aos órgãos oficiais de saúde pública chegar a um compromisso de decisão reguladora em face da informação limitada sobre o efeito tóxico, ou outros efeitos negativos das micotoxinas (Sabino, 1999).

Egmond (1998) menciona que são muitos os fatos que podem interferir no limites de tolerância das micotoxinas, tanto os de natureza científica como os não científicos, entre eles:

- ⇒ disponibilidade de dados toxicológicos;
- ⇒ disponibilidade de dados sobre a presença de micotoxinas em vários produtos básicos;
- ⇒ conhecimento da distribuição das concentrações de micotoxinas nos lotes;
- ⇒ disponibilidade de métodos analíticos;

⇒ legislação em outros países com os quais existem contatos comerciais;

⇒ e a necessidade de um abastecimento de alimentos suficiente

Para Egmond (1998), é difícil estabelecer um limite para micotoxinas visando sua toxicidade. O Comitê Misto de Especialistas em Aditivos Alimentares (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JECFA) tem avaliado os riscos das micotoxinas como semelhantes aos aditivos alimentares. Em princípio, baseia-se na determinação de um nível sem efeito observado em estudo toxicológicos de longa duração e na multiplicação de um fator de segurança (geralmente 100). Esta visão de avaliação de riscos não é aplicada a micotoxinas carcinogênicas como as aflatoxinas. Levando em conta que não se pode estabelecer um limite mínimo sem efeitos para compostos genotóxicos como as aflatoxinas, qualquer dose, por menor que seja, terá um efeito proporcionalmente pequeno. Um outro fator é a avaliação da exposição de animais e do homem aos alimentos básicos contaminados, a avaliação dos riscos à saúde e o produto da toxicidade e da exposição ao consumo do produto.

Com relação à ocratoxina A, o JECFA usou o menor efeito observado no porco para calcular um ISPT - Ingestão Semanal Provisória Tolerável - (Provisional Tolerable Weekly Intake - PTWI) para homem, aplicando um fator de segurança de 500, chegando a um ISPT de 112 ng/kg. Assim, para um adulto de 60 kg, o ISPT seria 6000ng/semana (Walker, 1997). Pelos cálculos do JECFA, o nível de ingestão diária ocratoxina A é de 14ng/Kg de peso corpóreo. Grupos de pesquisadores trabalhando separadamente têm sugerido valores diferenciados de doses de Ingestão Diária Tolerada Provisória – IDTP. Para um grupo de pesquisadores canadenses, o valor de IDTP para a ocratoxina A deve ficar entre 1,2 - 5,7 ng/Kg p.c., para um nível de risco de  $10^{-5}$ . Já um grupo de toxicologistas nórdicos propôs um valor de 5 ng/Kg p.c. (Sabino, 1999).

Podem ocorrer, também, implicações no comércio internacional sobre o limite máximo de micotoxinas nos produtos, podendo ser mais de interesse político do que de saúde pública. De acordo com Sabino (1999), os países que não são produtores de produtos susceptíveis à contaminação com micotoxinas têm limites de tolerância menores do que os produtores, principalmente quando alimentos importados são considerados como luxo. Este fato torna mais simples, para as autoridades, decretar uma medida administrativa do que resolver o problema da presença de um contaminante natural inevitável, ficando a critério dos países exportadores e importadores estabelecer os limites de tolerância.

Porém, limites muito baixos podem acarretar perdas econômicas para os países exportadores e ausência de produto para os países importadores. Por outro lado, pode ocorrer de um país exportador selecionar os melhores produtos para a exportação, deixando os de pior qualidade e, conseqüentemente, os produtos contaminados, para o consumo interno, aumentando o risco de contaminação da população local (Sabino, 1999).

Países como a Argentina, México, Bulgária e outros têm aplicado limites de tolerância igual a zero (aflatoxina) para alimentos infantis, o que, do ponto de vista da saúde da população, seria o ideal; porém um limite zero pode ser impraticável por duas razões discutidas por Sabino (1999). A primeira é que as micotoxinas são contaminantes naturais e que não podem ser completamente excluídas da cadeia alimentar. E em segundo, é que atualmente não existe uma metodologia analítica disponível para detectar zero de micotoxina.

No Brasil, para alimentos destinados a consumo humano, existe, uma Resolução (34/76) no Ministério da Saúde, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, publicada no Diário Oficial em janeiro de 1977, fixando um limite máximo de 30 µg/Kg de aflatoxinas B1 e G1. Já a Portaria número 183 do Ministério da Agricultura, publicada no Diário Oficial da União

em março de 1996, fixou um limite máximo das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em 20µg/Kg.

No Mercosul, uma legislação comum a todos os integrantes destina um limite de 20ppb de aflatoxinas totais (B1, B2, G1 e G2) para milho, farelo de milho, amendoim e produtos e para os grãos em geral. Atualmente, não foram fixados limites de ocratoxinas, zearalenona e tricotecenos em nenhum produto pelos países que compõem o Mercosul.

Na União Européia, para todos os membros, a legislação estimula um valor de 5ppb de aflatoxinas totais para cereais, amendoim, nozes e produtos processados para consumo humano direto.

Poucos países possuem limites para ocratoxina A e aflatoxinas específicas para grãos e produtos de café. Na Grécia, o limite de ocratoxina A em café cru é de 20 ppb. A maioria dos países europeus estão propondo, para consumo humano, um limite entre 4 e 5ppb tanto de aflatoxina como para ocratoxina A em cereais e grãos de uma maneira geral, sem especificação do produto (Soares, 1999).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G.; CABANES, F.J. New Ochratoxigenic Species in the Genus *Aspergillus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.2, p.1580-1582, Feb. 1997.
- ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G.; CABANES, F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*.. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.7, p.2650-2652, July 1994.
- ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G.; CABANES, F.J. New Ochratoxigenic Species in the Genus *Aspergillus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.2, p.1580-1582, Feb. 1997.
- ABDEL-HAFEZ, A.I.I.; EL-MAGHRABY, O.M.O. Fungal flora and aflatoxin associated with cocoa, roasted coffee and tea powders in Egypt. **Criptogamie, Mycology**, v.3. n.1, p.31-45, 1992.
- ALVES, E. **População fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e as fases pré e pós colheita relação com a bebida e local de cultivo**. Lavras: UFLA, 1996. 48p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).
- AMORIM, H.V.; CRUZ, A.R.; ANGELO, A.J.ST.; DIAS, R.M.; MELO, M.; TEIXEIRA, A.A.; GUTIERREZ, L.E.; ORY, R.L. Biochemical, physical and organoleptical changes during raw coffee quality deterioration. **ASIC, 8<sup>o</sup> Colloque**, Abidjan, 1977. p. 183-186.
- ARAUJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa – MG: UFV, 1995. 335p.
- ARSECUCULERATNE, S.N.; SILVA, L.M. de.; WIJESUNDERA, S.; BANDUNATHA, C.H.S.R. Coconut as a Medium for the Experimental Production of Aflatoxin, **Applied Microbiology**, Washington, v.18, n.1, p. 88-94, 1969.
- ASAO, T.; BUCHI, G.; ABDEL-KADER, M.M.; CHANG, S.B.; WICK, E.L.; WOGAN, G.N. The Structures of Aflatoxins B and G1 **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.87, n.4, p.882-886, Feb. 1965.

- ASSANTE, G.; CAMARDA, L.; LOCCI, R.; MERLINI, L.; NASINI, G., Isolation and structure of red pigments from *Aspergillus flavus* and related species, grown on a differential medium. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.29, n.4, p.785-787, July/Aug. 1981.
- BAILEY, C. A.; GIBSON, R. M. Ochratoxin A and dietary protein. 2. Effects on hematology and various clinical chemistry measurements. **Poultry Science**, Champaign, v.68, n.12, p.1664-1671, Dec. 1989.
- BECZKOWKI, S. Mercado de Café. **Síntese Agropecuária – BM&F**, n. 48, 03.08.2000.
- BETANCOURT, L.E.; FRANK, H. K. Conditions for microbial spoilage of green coffee. II. Formation of mycotoxin. **Deutsche Lebensmittel Rundschau**, v.79, n.12, p.404-407, 1983.
- BLANC, M.; PITTET, A.; MUÑOZ-BOX, R.; VIANI, R. Behavior of Ochratoxin A during Green Coffee Roasting and soluble Coffee Manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, n.3, p.673-675, Mar. 1998.
- BOTHAST, R.J.; FENNEL, D.I. A Medium for Rapid Identification and numeration of *Aspergillus flavus* and Related Organisms, **Mycologia**, New York, v.66, p.365-369, 1974.
- BOUDRA, H.; LE BARS P.; LE BARS. J. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washinton, v. 61, n.3, p.1156-1158, Mar. 1995.
- BUCHANAN, R.L.; FLETCHER, M. Methylxanthine inhibition of Aflatoxin production. **Journal of Food Science**, Chicago, v.43, n.3, p.654-655, May/June 1978.
- BUCHANAN, R.L.; HARRY, M.; GEALT, M.A. Caffeine inhibition of Sterigmatocystin, Citrin, and Patulin Production . **Journal of Food Science**, Chicago, v.48, n.4, p.1226-1228, July/Aug. 1983.
- BUCHANAN, R.L.; HOOVER, D.G.; JONES, S.B. Caffeine inhibition of aflatoxin production.. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.46, n.5, p.1193-1200, May 1983.

- BUCHANAN, R.L.; STAHL, H. G. Ability of various carbon sources to induce and support aflatoxin synthesis by *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Food Safety**, Connecticut, v.6, n.4, p.271-279, 1984.
- BUCHANAN, R.L.; TICE, G.; MARINO, D. Caffeine inhibition of ochratoxin A production. **Journal of Food Science**, Chicago, v.47, p.319-321, 1981.
- BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G.; VIANI, R. Industrial storage of green robusta under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, n.11, p.4507-4511, Nov. 1998.
- BULLERMAN, L.B.; SCHROEDER, L.L.; PARK, K.Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.47, n.8, p.637-646, Aug. 1984.
- CANTÁFORA, A.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BENELLI, L.; Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography. **La Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione**, Roma, n.12, p.103-108, 1983.
- CARVALHO, V.D. de; CHAGAS, S.J. de R.; CHALFOUN, S.M. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p.5-20, 1997.
- CHALFOUN, S.M.; CARVALHO, V.D. Microflora associada a frutos e grãos de café de diferentes locais, tipos de colheita e diferentes etapas de preparo. Ano 1: 1987. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEIEIRA 15., 1989, Maringá. **Resumo ...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1989. p.17-21.
- CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. **Grain storage – The role of fungi in quality loss**. Minneapolis: University of Minnesota Press, 1969. 153p.
- CHU, F.S.; NOH, I.; CHANG, C. C. Structural Requirements for ochratoxin intoxication. **Life Science**, Osaka, v.11, pt. 1, p. 503-508, 1972.
- CIEGLER, A. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.18, n.5, p.631-636, May 1972.
- CIEGLER, A.; FENNEL, D.I.; SANSING, G.A.; DETROY, R.W.; BENNETT, G.A. Micotoxin producing strains of *Penicillium viridicatum*:

- classification into subgroups. **Applied Microbiology**, Washington, v.26, n.2, p.119-124, Feb. 1973.
- COLE, R.J.; COX, R.H. Ochratoxins. In: **Handbook of toxic fungal metabolites**. Academic Press, 1981. p.128-151.
- DAVIS, N.D. Sterigmatocystin and other Mycotoxins Produced by *Aspergillus* Species. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 44, n.9, p.711-714, Sept. 1981
- DAVIS, N.D.; DIENER, U. L. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* from various carbon source. **Applied Microbiology**, Washington, v.16, p.158-159, 1968
- EGMOND, H.P. Regulamentación mundial de las micotoxinas. In: **CONFERENCIA INTERNACIONAL FAO/OMS/PMS SOBRE MICOTOXINAS**, 3., 1998, Túnez, Túnez. **Anais... Túnez**, 1998. p.1-8
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C. A simple screening - method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v.13, p.128-130, 1980
- FLORIANI, C.G. Café - a certificação é o caminho. **Agro Técnico, Caderno Técnico - IMA**, n. 1, p.18, 1999.
- FREITAS, R.F. **Fungos Associados a Grãos de café (Coffea arabica L.) beneficiado em Diversos Municípios da Região Sul de Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2000. 72p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- FRISVAD, J.C. A selective and indicative medium for group of *Penicillium viridicatum* producing different mycotoxins in cereals, **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.54, n.3, p.409-416, June 1983
- FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.46, n.6, p.1301-1310, June 1983.
- FURLANI, R.P.Z.; OLIVEIRA, P.L.C.; SOARES, L.M.V. Ochratoxina A em cafés verdes brasileiros: diferenças com relação a espécie. In: **SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA**

- CAFEIRA, 3., 2000, Londrina. **Programas e resumos...** Londrina: IAPAR/IRD, 1999. p.19.
- GIBSON, R.M.; BAILEY, C.A; KUBENA, L.F.; HUFF, W.E.; HARVEY, R.B. Ochratoxin A and dietary protein. 1. Effects on body weight, feed conversion, relative organ weight, and mortality in three-week-old broilers. **Poultry Science**, Chanpaign, v.68, n.12, p.1658-1663, Dec. 1989.
- GOURAMA, H.; BULLERMAN, L.B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in food and feeds: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.58, n.12, p.1395-1404, Dec. 1995.
- HAMSA, T.A.P.; AYRES, J.C. A differential medium for the Isolation of *Aspergillus flavus* from cottonseed. **Journal of Food Science**, Chicago, v.42, n.2, p.449-453, Mar./Apr. 1977.
- HANSCH, C.; KIEHS, K.; LAWRENCE, G.L. The role of substituents in the Hydrophobic bonding of phenols by serum and mitochondrial proteins. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.87, n.24, p.5770-5073, Dec. 1965.
- HARA, S.; FENNELL, D.I.; HESSELTINE, C.W. Aflatoxin-production strains of *Aspergillus flavus* detected by fluorescence of agar medium under ultraviolet light. **Applied Microbiology**, Washington, v.27, n.6, p.1118-1123, June 1974.
- HASAN, H.A.H. Anti-toxicogenic properties of coffee and tea. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON FUNGI**, 1., 1996, Cairo. **Proceedings...** Cairo: Hopes & Chal.engs., 1996. v.1, p.75-78.
- HESSELTINE, C.W.; SHOTWELL, O.L.; ELLIS, J.J.; STUBBLEFIELD, R.D. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Bacteriological Review**, Baltimore, v.30, p.795-805, 1966.
- HUFF, W.E.; CHANG, C.F.; WARREN, M.F.; HAMILTON, P. B. Ochratoxin A induced iron deficiency anemia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, n.3, p.601-604, Mar. 1979.
- HWANG, C.; DRAUGHON, F.A. Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, n.5, p.410-414, May 1994.

- KRUG, H.P. Cafés duros. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v.25, n.159, p.636-638, maio 1940a.
- KRUG, H.P. Cafés duros III. Relação entre a percentagem de microrganismos e qualidade do café. **Revista do Instituto do Café**, São Paulo, v.27, n.163, p. 1827-1831, set. 1940b.
- LEE, H.B.; MANGAN, N. Impact of enviromental and interspecific interaction between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.61, p.11-16, 2000.
- LEONI, L.A.B.; OLIVEIRA, P.L.C.; SOARES, L.M.V. Incidencia de ocratoxina A em café solúvel comercializado no município de Campinas-SP. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS : Educação, Pesquisa e Desenvolvimento, 3., 1999, Campinas. **Anais... Campinas: UNICAMP**, 1999. p.58.
- LEVI, C.P.; TRENK, H.L.; MOHR, H.K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the Association Official Analytical Chemists**, Washinton, v.57, n.4, p.866-870, 1974.
- LI, S.; MARQUARDT, R.R.; ABRAMSON, D. Immunochemical detection of molds: a review, **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.63. n.2, p. 281-291, Feb. 2000.
- LIN, M.T. Biologia do fungos toxigênicos. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS: Problemas e Soluções, 1980, **Anais... 1980. p.11-22**
- LIN, M.T.; DIANESE, J.C. A coconut-Agar Medium Rapid Detection of Aflatoxin Production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v.66, n.12, p.1466-1469, Dec. 1976.
- LÓPEZ GARAY, C; BATUTISTA ROMERO, E.; MORENO GONZÁLEZ, E. Microflora of the stored coffee and its influence on quality. **ASIC**, 12<sup>a</sup> Colloque, Montreux, 1987. p.758-770.
- LUCHESE, R.H.; HARRIGAN, W. F. Biosynthesis of aflatoxin – the role of nutritional factors. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.74, n.1, p.5-15, Jan. 1993.

- [REDACTED]
- MADHYASTHA, S.M.; MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A. PLATFORD, G.; ABRAMSON, D. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.38, n.7, p.1506-1510, July 1990.
- MAGAN, N.; LACEY, J. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. **Transaction British Mycological Society**, Cambridge, v.82, n.1, p.83-93, Jan. 1984.
- MAGOON, K.K.; GUPTA, S.K.; VENKITASUBRAMANIAN, T.A. The chemistry of aflatoxins. **Journal Sciences Ind Researches**, v. 41, p. 8, 1970.
- MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. **Journal of Animal Science**, Campaign, v.70, n.12, p.3968-3988, Dec. 1992.
- MEIRELES, A.M.A. Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais. Lavras: UFLA, 1990. 71p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- MICCO, M.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C. A study of the contamination by ochratoxin A of green e roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, Hants, v.6, n.3, p.333-339, 1989.
- MICCO, M.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C.; DESIDERIO, C.; MASCI, V. The effect of roasting on the fate aflatoxin B1 in artificial.y contaminated green coffe beans. **Mycotoxin Research**, Mainz, v.8, p.93-97, 1992.
- MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. **Mycotoxins in grain - compounds other than Aflatoxin**. St. Paul, Minessota: Eagan Press, 1994.
- MIROCHA, C.J.; CHRISTENSEN, C.M.; NELSON, G.H. Toxic metabolites produced by fungi implicated in mycotoxicoses. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.10, p.469-482, 1968.
- MISLIVEC, P.B.; BRUCE, V.R.; GIBSON, R. Incidence of Toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**. Des Moines, v. 46, n.11, p.969-973, Nov. 1983.

- MOORE, J.H.; TRUELOVE, B. Ochratoxin A: inhibition of mitochondrial respiration, *Science*, London, v.168, n. 3935, p..... , May 1970.
- MOREAU, C. *Moulds, toxins e food*. London: John Wiley & Sons, 1979.
- MOSS, M.O. Mode of formation of Ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, Hants, v.13, p.5-9, 1996a. Supplement.
- MOSS, M.O. Mycotoxins. *Mycological Research*, Cambridge, v.100, n.5, p.513-523, 1996b.
- MOSS, M.O. Secondary metabolism and food intoxication – moulds. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, v.73, p.80S-88S, 1992.
- NAIDU, R. Mycotoxins in coffee. *Indian coffee*, Bangalore, v.60, n.8, p.9-11, Ago. 1996.
- NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M.; UENO, Y. Survey of Aflatoxin B 1 and Ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and Agricultural Immunology*, Oxon, n.9, p.77-83, 1997.
- NARTOWICZ, V.B.; BUCHANAN, R.L.; SEGAL., S. Aflatoxin production in regular and decaffeinated coffee beans. *Journal of Food Science*, Chicago, v.44, n.02, p.446-448, Mar./Apr. 1979.
- PALO, D.; GABUCCI, G.; VALUSSI, S. Presence of aflatoxins, sterigmatocystin and ochratoxin in green coffee beans. In: **INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE**, 8., 1979, Local. p.539-543.
- PARK, K.; BULLERMAN, L.B. Effects of substrate and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.46, n.3, p.178-184, Mar. 1983.
- PASTER, N.; PUSHINSKY, A.; MENASHEROY, M.; CHET, I. Innibitory Efeict of *Aspergillus niger* on the Growth of *Aspergillu ochraceus* and *Aspergillus flavus*, and on Aflatoxin Formation. *Journal Science Food Agricultural*, London, v.58, n.4, p.589 591, Apr. 1992.

- PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G.M.; GLEADLE, A.E. Survey ochratoxin A in UK retail coffees. **Food Additives and Contaminants**, Hants, v.14, n.3, p.217-222, 1997.
- PETERSSON, S.; HANSEN, M.W.; AXBERG, K.; HULT, K.; SCHNÜNER, J. Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, n.8, p.1003-1008, Aug. 1998.
- PHILIP, R.B. Mycotoxins and other toxins from unicellular organisms. **Environmental Razard and human health**. 1995. p.209-222.
- PITT, J.I. *Penicillium viridicatum*. *Penicillium verrucosum* and production Ochratoxin A **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 2, p. 266-269, feb, 1987.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 2.ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D.; GLENN, D.R. Na improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.54, n.1, p.109-114, Feb. 1983.
- PITTET, A.; TORNARE, D.; HUGGETT, A.; VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using na immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.11, p.3564-3569, 1996.
- POHLAND, A.E. Mycotoxins in review. **Food Additives and Contaminants**, Hants, v.10, n.1, p.17-18, 1993.
- PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; VELOSO, T.; BARROSO, R. E. S. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moido e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no prelo
- PURCHASE, I.F.H.; PRETORIUS, M.E. Sterigmatocystin in coffee beans. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v.56, n.1, p.225-226, 1973.

- RAPER, K.B.; FENNELL, D. I. **The Genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1965.
- SABINO, M. Normais e níveis de tolerância de micotoxinas no Brasil, no Mercosul e no mundo. In: ROLIN, R.E.; VALENTIN, M.L. (eds). **Simpósio sobre micotoxinas em grãos**. Campinas: Fundação Cargil, 1999. 208p.
- SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Mycotoxin Research in Brazil, **Ciência e Cultura**, Campinas, v.45, n.6, p.359-371, jun. 1993.
- SAEGER, S.; PETEGHEM, C.V. Flow-Through Membrane-Based Enzyme Immunoassay for Rapid Detection of ochratoxin A in Wheat. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62, n.1, p.65-69, Jan. 1999.
- SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD., J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4.ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 1995. p.322
- SCOTT, P.B. Note on Analysis of Aflatoxins in Green Coffee. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v.51, n.3, p.609, 1968.
- SCOTT, P.M.; WALBEEK, W.V.; KENNEDY, B.; ANYETI, D. Mycotoxins (Ochratoxin A, Citrinin, and Sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.20, n.6, p.1103-1109, Nov.Dec. 1972.
- SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F.; DIAS, E.S.; WHEALS, A.E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil, **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.60, p.251-260, 2000.
- SMITH, D.; KOZAKIEWISZ, Z. Physiology of *Aspergillus*. In: SMITH, J.E. **Biotechnology handbooks – 7. *Aspergillus***. New York: Plenum Publishing Corporation, 1994. p.23-40.
- SMITH, J.E.; ROSS, K. The Toxigenic *Aspergilli*. In: SMITH, J.E.; HENDERSON, R.S. (eds). **Mycotoxin and animal foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.101-118.

- SOARES, L. S. Ocratoxinas e aflatoxinas em café brasileiro. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. Anais... Londrina: IAPAR/IRD, 1999. p.447-452.
- STEGEN, G.V.D.; JÖRISSEN, U.; PITTET, A.; SACCON, M.; STEINER, W.; VINCENZI, M.; WINKLER, M.; ZAPP, J.; SCHLATTER, CHR. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additives and Contaminants**, Hants, v.14, n.3, p.211-216, 1997.
- STEIGMEIER, M.E.; SCHLATTER, C. Mycotoxin in coffee. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 14., 1991, San Francisco. Paris: Association Scientifique Internationale du café, 1992. p. 57-63
- STUDER-ROHOR, I.; DIETRICH, D. R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food Chemistry and Toxicology**, Oxford, v.33, n.5, p.341-355, 1995.
- STUDER-ROHR, I.; DIETRICH, D.R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. Ochratoxin A and Coffee. **Mitteilungen aus der Gebiete Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, Bern, v.85, p.719-727, 1994
- TANIWAKI, M.H.; BANHE, A.A.; IAMANAKA, B. T. Incidência de Fungos em café. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 2000, Londrina. **Programas e resumos...** Londrina: IAPAR/IRD, 2000. p.85.
- TRUCKSESS, M.W.; GILER, J.; YOUNG, K.; WHITE, K. D.; PAGE, S.W. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee-1997. SCOTT, P.B. Note on Analysis of Aflatoxins in Green Coffee. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v.82, n.1, p. 85-89, 1999.
- TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. Caffeine degradation e increased ochratoxin A production by toxigenic strains of *Aspergillus ochraceus* isolated from green coffee beans. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.90, p.181-186, 1985.
- TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Washington, v.36, n.3, p.340-342, Msr./Apr. 1988.

- TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. A Survey occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in imported green coffee beans. **Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology**, Tokyo, n.19, p.16-21, 1984.
- TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y.; UDAGAWA, S. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.97, p.111-115, 1987.
- van der MERVE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURE, L.; SCOTT, B.; THERON, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, London, v.205, p 1112-1113, 1965.
- VARGA, J.; KEVEL, E.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62. n.12, p.4461-4464, Dec. 1996.
- VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J., Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.59, p.1-7, 2000.
- WALKER, R. Quality and safety of coffee. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 17., 1997, Nairobi, Kenya. .... Nairobi: ASIC, 1997.
- WARREN, M.F.; HAMILTON, P.B. Intestinal fragility during ochratoxicosis and aflatoxicosis in broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.40, n.3, p.641-645, Mar. 1980.
- WICKLOW, D.T.; DOWD, P.F.; ALFATAFTA, A.A.; GLOER, J.B. Ochratoxin A: na antiinsectan metabolite from the sclerotia of *Aspergillus carbonarius* NRRL 369. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.42, p.1100-1103, 1996.
- WICKLOW, D.T.; HESSELTINE, C.W.; SHOTWELL, O.L.; ADAMS, G.L. Interference Competition and aflatoxin levels in corn. **Phytopathology**, St Paul, v.70, n.8, p.761-764, 1980.

**WOSIACKI, G. Enzimas pectinolíticas de *Fusarium oxysporum* Schlecht EX. Fr. Isolado de frutos de café. Campinas: UNICAMP, 1977. 73p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos).**

**XIAO, H.; MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A.; LING Y.Z. Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.43, n.2, p.524-530, 1995.**

**XIAO, H.; MADHYASTHA, S.; MARQUARDT, R.R.; LI, S.; VODELA, J. K. FROHLICH, A.A.; KEMPPAINEN, B.W. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*, San Diego, v. 137, p. 182-192, 1996.**

## CAPÍTULO 2

### IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Aspergillus* E *Penicillium* ASSOCIADOS A GRÃOS DE CAFÉ VERDE

#### RESUMO

**BATISTA, L. R. Identificação de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* associados a grãos de café beneficiado. Lavras: 2000. (Dissertação-Mestrado em Ciência dos Alimentos).**

A presença de algumas espécies de fungos filamentosos em grãos de café é indesejável, pois muitas espécies contribuem para a perda de qualidade do produto, apesar de não serem apenas os fungos os únicos fatores responsáveis pelo decréscimo dessa qualidade na bebida. A ocorrência de algumas espécies de fungos tem servido de alerta para o risco de contaminação com micotoxinas, embora dentro da mesma espécie nem todos os isolados sejam produtores. O presente estudo teve como objeto identificar a população fúngica de *Aspergillus* e *Penicillium* associados a grãos de café beneficiados antes e após a desinfecção com NaClO a 1%. Foram analisadas 45 amostras, oriundas de 10 municípios da região sul do Estado de Minas Gerais. Das amostras analisadas antes da desinfecção com NaClO 1%, 95,55% apresentaram contaminação com fungos do gênero *Aspergillus*, 42,22% com fungos do gênero *Penicillium*. Do gênero *Aspergillus*, houve uma maior ocorrência de fungos pertencentes à Seção *Nigri*, presentes em 88,37% das amostras contaminadas com *Aspergillus*, seguida pelas espécies da Seção *Aspergillus* em 72,09% das amostras. A Seção *Circundati* esteve presente em 65,12% das amostras, a Seção *Flavi* em 44,19% e a Seção *Versicolores* em 6,98% das amostras. Análises realizadas após a desinfecção mostraram que 46,66% apresentaram contaminação com fungos do gênero

*Aspergillus*, 24,44% com fungos do gênero *Penicillium*. Também após a desinfecção houve um predomínio das espécies pertencentes a Seção *Nigri*, presentes em 25% das amostras contaminadas com *Aspergillus*, seguida pela espécies da Seção *Aspergillus* em 20,93% das amostras, a Seção *Circundati* esteve presente em 16,27% das amostras e a seção *Flavi* em 6,98%. Dentro do gênero *Aspergillus*, as espécies identificadas foram espécies da Seção *Circundati* (*Aspergillus auricomus*, *Aspergillus elegans*, *Aspergillus insulicola*, *Aspergillus lanosus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus ostiamus*, *Aspergillus petrakii*, *Aspergillus sclerotiorum* e *Aspergillus sulphureus*), da Seção *Flavi* (*Aspergillus flavus* var. *flavus*, *Aspergillus flavus* var. *columnaris*, e *Aspergillus tamarii*), da Seção *Nigri* (*Aspergillus niger* var. *niger*, *Aspergillus niger* var. *awamori* e *Aspergillus foetidus*), da Seção *Versicolores* (*Aspergillus granulatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus sydowii* e *Aspergillus caespitosus*), da Seção *Aspergillus*, os teleomorfos (*Eurotium amstelodami* e *Eurotium chevalieri*). Do gênero *Penicillium*, foram identificados 08 espécies (*Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium brevecompactum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium glabrum* e *Penicillium solitum*). A maioria dos isolados identificados fazem parte da contaminação externa do grão, que irão se desenvolver a partir do momento em que as condições ambientais estejam favoráveis. Todas estas espécies identificadas são possíveis produtoras de uma ou mais micotoxinas. Sendo assim, a prevenção é a melhor forma de evitar a sua contaminação e, conseqüentemente, reduzir o risco de síntese de micotoxinas.

---

Comitê Orientados: Dr<sup>a</sup> Sara Maria Chalfoun – EPAMIG (Orientadora)  
Ms Guilherme Prado – FUNED – (Co-orientador)

## ABSTRACT

**BATISTA, L. R. Identificação of species of *Aspergillus* and *Penicillium* associated with green coffee beans. Lavras: 2000. (Dissertation-Master's degree in Food Science).**

The presence of some species of filamentous fungi in coffee beans is undesirable, for many species contribute to the loss of quality of the product, despite not being the fungi the only factors responsible for the decrease of that quality in the beverage. The occurrence of some species of fungi has served as an alert to the risk of contamination with mycotoxins, although within the same species not all the isolates are producers. The present study was intended to identify the fungal population of *Aspergillus* and *Penicillium* associated with green coffee beans before and after the disinfection with 1% NaClO. 45 samples coming from towns of the south region of the State of Minas Gerais were analyzed. From the samples evaluated before the disinfection with 1% NaClO, 95,55% presented contamination with fungi of the genus *Aspergillus*, 42,22% by fungi of the genus *Penicillium*. Out of the genus *Aspergillus* there was an increased occurrence of fungi belonging to the Section *Nigri* presents in 88,37% of the samples contaminated by *Aspergillus*, followed by the species of the Section *Aspergillus* in 72,09% of the samples, the Section *Circundati* was present in 65,12% of the samples, the Section *Flavi* in 44,19% and the Section *Versicolores* in 6,98% of the samples. Analyses performed after disinfection showed that 46,66% presented contamination with fungi of the genus *Aspergillus*, 24,44% with fungi of the genus *Penicillium*. Also, after disinfection there was a predominance of the species belonging to the Section *Nigri* presents in 25% of the samples contaminated with *Aspergillus*, followed by the Section *Aspergillus* species in 20,93% of the samples, the Section *Circundati* was

present in 16,27% of the samples, the Section *Flavi* in 6,98%. Within the genus *Aspergillus*, the species identified species were, species of the Section *Circundati* (*Aspergillus auricomus*, *Aspergillus elegans*, *Aspergillus insulicola*, *Aspergillus lanosus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus petrakii*, *Aspergillus sclerotiorum* and *Aspergillus sulphureus*), of the Section *Flavi* (*Aspergillus flavus* var. *flavus*, *Aspergillus flavus* var. *colmnaris*, and *Aspergillus tamaritii*), of the Section *Nigri* was identified (*Aspergillus niger* var. *niger*, *Aspergillus niger* var. *awamori* and *Aspergillus foetidus*), of the Section *Versicolores* (*Aspergillus granulatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus sydowii* and *Aspergillus caespitosus*), of the Section *Aspergillus* the teleomorphos (*Eurotium amstelodami* and *Eurotium chevalieri*) of the genus *Penicillium* were identified 08 species (*Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium brevecompactum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium glabrum* and *Penicillium solitum*). Most of the isolates identified makes part of the external contamination of the beans, which will develop from the moment in which the environmental conditions be favorable. All these species identified are possible producers of one or more mycotoxins. So, prevention is the best way of preventing their contamination and consequently reducing the risk of mycotoxins synthesis.

---

Guidance Committee: Ds Sara Maria Chalfoun – EPAMIG (Adviser )

Ms Guilherme Prado – FUNED – (Co-Adviser)

## 1 INTRODUÇÃO

A presença dos fungos nos frutos e grãos de café pode alterar a qualidade do produto, tendo em vista que os fungos possuem um potencial enzimático muito amplo. Estas enzimas, em contato com um substrato, transformam as matérias orgânicas em nutrientes para o fungo, alterando composição química do café. Além disso, algumas espécies de fungos podem produzir micotoxinas. Contudo, algumas espécies podem atuar como protetoras contra a invasão de outros fungos e muitas são as espécie que não produzem micotoxinas. Sendo assim, é essencial identificar as espécies de fungos que estão associadas ao café, avaliar qual o papel desta espécies na qualidade final do produto e se estas podem apresentar um risco para a segurança do produto.

O processo de identificação tradicional das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* é baseado primeiramente na identificação das características da colônia e das características micromorfológicas. Entretanto, o grande número de espécies incluídas em um gênero e o amplo número de variedades dentro de uma mesma espécie dificultam a identificação até mesmo por um micologista experiente.

{ Nos métodos considerados como tradicionais, os fungos são inoculados em três ou mais meios de culturas padronizados, por um período de 7-14 dias, com temperaturas controladas (5°C, 25°C e 37°C). A identificação é realizada analisando as características macroscópicas e microscópicas, que são, posteriormente, seguidas em uma Chave de Identificação até chegar a uma espécie que apresentou todas as características direcionadas pela Chave. }

Uma identificação acurada de muitos *Aspergillus* até o momento continua por ser problemática. Em particular, isto se deve à forma de identificação, como a adoção de critérios altamente subjetivos como cor e

aparência física do crescimento das culturas como fator determinante na identificação (Smith e Ross, 1991).

Contudo, os métodos tradicionais têm sido reforçados com a utilização de meios de culturas seletivos e indicativos, como o AFPA (*Aspergillus flavus/parasiticus* Agar) para *A. flavus* e *A. parasiticus*, que é capaz de diferenciar estas duas espécies das demais, e o meio YES (Yeast Extract Sucrose), que além de auxiliar na identificação de espécies de fungos do gênero *Penicillium* (terverticilado), é capaz de indicar a produção de prováveis micotoxinas. Ambos os meios têm como critério de diferenciação das espécies, a produção de uma coloração característica de uma espécie, como resultado de uma reação química entre os componentes do meio e os metabólitos produzidos pelo fungo.

{ Frisvad e Filtenborg (1983) têm sugerido, em conjunto com o método tradicional de identificação, a utilização de métodos mais objetivos, como a identificação dos metabólitos secundários, que são específicos para muitas espécies, e a confirmação destes por Cromatografia de Camada Delgada-(CCD) ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-(CLAE). }

{ Um método simples, exato e consistente é desejado para auxiliar a identificação das espécies, especialmente dos *Aspergillus* e *Penicillium*. O método mais direto e talvez o mais seguro é pela identidade do fungo sobre as bases de seus ácidos nucleicos (DNA). Entretanto, este método possui a desvantagem de que o DNA de muitos fungos considerados padrão não estão disponíveis e o método não poderá ser aplicado para uma grande quantidade de fungos de uma amostra (Li, Marquardt e Abramson, 2000). }

Este estudo teve como objetivo isolar e identificar as espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* associados aos grãos de café verde armazenados através da associação dos métodos atualmente disponíveis.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras

As amostras constituídas de grãos de café beneficiado, espécie *Coffea arabica*, provenientes dos municípios do Sul de Minas Gerais: Alfenas, Campos Gerais, Boa Esperança, Carmo do Rio Claro, Cabo Verde, Três Pontas, Ouro Fino, Guaxupé, Poços de Caldas e Lavras, foram coletadas através da EPAMIG/CTSM Lavras- MG e fizeram parte do projeto do BIOEX/CNPq, que teve, como um dos objetivos, traçar a regionalização da qualidade do café no Estado de Minas Gerais. De cada cidade foram selecionadas, aleatoriamente, cinco amostras de diferentes classificações quanto ao tipo de bebida. A classificação da qualidade da bebida foi determinada pela atividade da polifenoloxidase e variou de estritamente mole a rio.

As amostras utilizadas neste estudo fazem parte da colheita 1998/1999. Os resultados da qualidade da bebida foram obtidos com os pesquisadores envolvidos no projeto e foram realizados no laboratório da EPAMIG/CTSM, em Lavras-MG.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com três repetições.

### 2.2 Isolamento e identificação dos fungos

Para o isolamento dos fungos dos grãos de café beneficiado, foi utilizada a técnica de plaqueamento direto. O plaqueamento direto é a mais efetiva técnica para um exame micológico dos grãos (Samson et al. 1995).

De cada amostra de grãos de café, foram coletados 30 grãos ao acaso, sendo que 15 grãos foram plaqueados sem desinfecção com hipoclorito a 1%, permitindo identificar a população fúngica presente no exterior do grão. Esta

contaminação representa um risco em potencial no caso de alterações no ambiente do armazenamento que possam favorecer a germinação dos esporos ali localizados. Nos 15 grãos restantes, foi realizada uma desinfecção com hipoclorito a 1% visando a identificação dos fungos presentes no interior dos grãos.

Durante o processo de desinfecção, inicialmente foi feita uma lavagem dos grãos com álcool 70% para fazer uma primeira desinfecção superficial e diminuir a tensão superficial do grão, permitindo o melhor contato entre a solução de hipoclorito e os grãos. Num segundo momento, os grãos de café foram imersos na solução de hipoclorito de sódio a 1% durante dois minutos, sendo utilizada uma solução de hipoclorito de sódio para cada amostra analisada. Como último passo da desinfecção após o tempo de contato com o hipoclorito, os grãos foram lavados por três vezes com água destilada e esterilizada com a finalidade de retirar o resíduo de hipoclorito de sódio.

Os grãos após a desinfecção e os que não sofreram a desinfecção foram transferidos asépticamente para as placas de Petri de vidro com 9 cm de diâmetro, contendo 3 papéis de filtro, esterilizadas em estufa por 2h a 160°C e umedecidos com 2 ml de água destilada e esterilizada. Em cada placa foram colocados cinco grãos de cada tratamento e incubados a 25°C por 7 dias.

O isolamento dos fungos foi realizado com o auxílio de palitos de madeira esterilizados em autoclave (20 min a 121°C), transferindo-os com um leve toque na cabeça conidial dos fungos, que cresceram na superfície do grão; os esporos foram transferidos para uma placa de Petri contendo Malte Agar (MA), os quais foram repicados sucessivamente até a obtenção de culturas puras.

A partir das culturas puras as espécies da Seção *Circundati* foram identificadas de acordo com Christensen (1981), as espécies da Seção *Flavi* de acordo com Christensen (1982), as espécies da Seção *Nigri* foram identificadas

de acordo com Klich e Pitt (1988a), as espécies do gênero *Penicillium* foram identificadas de acordo com Pitt (1988) e as espécies da Seção *Versicolores* de acordo com Klich (1993) sendo estas identificações amparadas por Raper e Fennell (1965), Sansom et al. (1995) e Pitt e Hocking (1997). Todos os meios de cultura utilizados na identificação dos fungos e na determinação do potencial toxigênico estão descritos em anexo.

### **2.2.1 Identificação de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus***

A identificação taxonômica dos isolados de *Aspergillus* foi baseada em Raper e Fennell (1965), Christensen (1981) e (1982), Klich e Pitt (1988b), Klich (1993), Sansom et al. (1995) e Pitt e Hocking (1997). Os isolados foram plaqueados com palitos de madeira esterilizados em três pontos equidistantes na placa de Petri, contendo os meios padronizados e temperaturas descritos na tabela 1, com um período de 7-10 dias de incubação.

Com isolamento feito em meio MA, as colônias dos fungos apresentam características morfológicas que possibilitam fazer um direcionamento dos meios de cultura que devem ser utilizados de acordo com o provável Subgênero/Seção. Para os isolados que permaneceram em dúvida, foi preparada uma lâmina, corada e observada ao microscópio. Assim, a tabela 2 mostra o procedimento feito para a incubação dos fungos do gênero *Aspergillus*.

**TABELA 1.** Procedimento de incubação dos fungos do gênero *Aspergillus*

Meio de cultura/Temperaturas em °C	Subgênero/Seção
CYA e MEA, 25°C, AFPA 30°C e CYA 37°C	<i>Circundati / Flavi</i>
CYA e MEA, 25°C e CYA 37°C	<i>Circundati / Nigri</i>
CYA e MEA, 25°C e CYA 37°C	<i>Circundati / Circundati</i>
CYA, MEA e CYA20S 25°C e CYA 37°C	<i>Circundati / Versicolores</i>
CYA, MEA e CYA20S 25°C e CYA 37°C	<i>Aspergillus / Aspergillus</i>

#### 2.2.1.1 Identificação das espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*

Para a identificação das espécies dos fungos do gênero *Aspergillus*, foram observadas as características classificadas como macroscópicas e microscópicas por Klich e Pitt (1988b) após o período de incubação. Características macroscópicas - coloração (massa conidial) e diâmetro das colônias, presença ou ausência e coloração dos escleródios e a coloração no reverso das colônias, em todos os meios de cultura.

Para a avaliação das características microscópicas foram retirados micélios dos fungos, juntamente com uma pequena porção do meio de cultura. Esta porção foi lavada com gotas de álcool 50% para eliminar o excesso de esporos. As sobras do álcool à volta do micélio foram retiradas com papel higiênico fino e macio e uma gota do corante azul de metila foi adicionada sobre o micélio. Posteriormente, uma laminula foi colocada por cima e pressionada sobre o micélio, o excesso de corante foi retirado com papel higiênico e a lâmina levada ao microscópio, no qual foram observadas as seguintes características: o arranjo entre métulas e fiálides ligadas à vesícula (esterigma bisseriada: presença de métulas ligadas à vesícula e as fiálides ligadas à métula ou esterigma monosseriada: fiálides inseridas direto na vesícula), comprimento do

conidióforo, forma e tamanho dos conídios, vesículas, métulas e fiálides, textura dos conídios e do conidióforo, presença ou ausência de células Hülle

Os isolados da Seção *Flavi* foram inoculados em AFPA, um meio seletivo e indicativo das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*. Estas espécies produzem uma coloração laranja-amarelada no reverso da colônia. A intensidade desta coloração foi medida subjetivamente e recebeu um valor de 0 a 3. A intensidade de maior valor recebeu nota 3, e os que não apresentaram esta coloração, nota 0, após 72 horas de incubação.

### 2.2.2 Identificação de fungos filamentosos do gênero *Penicillium*

A identificação taxonômica dos isolados de *Penicillium* foi baseada em Pitt (1988), Sansom et al. (1995) e Pitt e Hocking (1997). Os isolados foram plaqueados com palitos de madeira esterilizados em três pontos equidistantes na placa de Petri contendo meios padronizados. Os meios de cultura utilizados, as temperaturas e o período de incubação estão descritos na tabela 2. Este procedimento foi utilizado para todos os isolado.

**TABELA 2.** Procedimento de incubação dos fungos do gênero *Penicillium*

Meios de cultura	Temperatura	Tempo de incubação
CYA e MEA	25°C	7 dias
YES	25°C	7 dias
CYA	37°C	7 dias

#### 2.2.2.1 Identificação das espécies de fungos filamentosos do gênero *Penicillium*

O procedimento para a identificação das espécies de *Penicillium* foi semelhante ao procedimento utilizado para as espécies de *Aspergillus*. Em todos

os meios foram observadas as características macroscópicas, como: coloração e diâmetro das colônias, coloração do reverso das colônias e a produção de exudato.

A verificação das características microscópicas procedeu da mesma forma utilizada na identificação das espécies de *Aspergillus*: retirada do micélio, lavagem com álcool 50%, coloração da lâmina e, por último, a colocação da laminula. As características microscópicas observadas neste gênero foram: o número de ramificações que indicariam se o fungo é monossériado, bisssériado, <sup>tervertissilado, triverticila</sup> tervertissilado, textura da estipe, textura, forma e tamanho dos conídios e das métulas e fiálides. Todas estas características macroscópicas ou microscópicas levam em consideração as recomendações feitas por Pitt (1988), Sansom et al. (1995) e Pitt e Hocking (1997), para a identificação de espécies de fungos do gênero *Penicillium*.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 45 amostras analisadas, 45 (100%) apresentaram contaminação com fungos filamentosos. Estes resultados, por terem um valor qualitativo e não quantitativo levam em consideração a quantidade de amostras contaminadas e não a porcentagem de grãos contaminados.

Os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* foram notificados por contaminarem os grãos de café antes e após a desinfecção. A tabela 3.1 mostra a porcentagem de contaminação antes e após a desinfecção com hipoclorito dos principais gêneros encontrados nas amostras e a localidade.

Os resultados mostram que 95,55% das amostras sem desinfecção estavam contaminadas com alguma espécie de *Aspergillus*, enquanto 46,66% das amostras após a desinfecção apresentaram contaminação com fungos deste gênero. O segundo gênero com maior índice de contaminação das amostras foi *Penicillium*, para o qual 42,22% das amostras apresentaram alguma espécie de *Penicillium* antes da descontaminação, após a descontaminação, 24,44 % das amostras estavam contaminadas com *Penicillium*. Com relação ao gênero *Fusarium*, 28,89 % das amostras apresentaram contaminação antes e após a desinfecção com hipoclorito 1%. O gênero *Cladosporium* esteve presente em 28,89% das amostras antes da desinfecção e 6,67% das amostras após a desinfecção com hipoclorito. Estes resultados refletem os resultados obtidos por Mislivec, Bruce e Gibson (1983) e Abdel-Hafez e El-Maghraby (1992), segundo os quais a população fúngica de *Aspergillus* em grãos de café foi substancialmente superior à população de *Penicillium*, sendo que as espécies dos gêneros *Fusarium* e *Cladosporium* foram detectadas esporadicamente.

Há uma forte tendência de que a população fúngica dominante seja composta de fungos do gênero *Aspergillus* e algumas espécies do gênero

*Penicillium*. Isto ocorre pelo fato de algumas espécies destes dois gênero conseguirem se adaptar a grãos com pouca umidade (Hoseney, 1994).

Para Pitt e Hocking (1997), o *Aspergillus* e *Eurotium* são os componentes dominantes na microflora de produtos estocados em condições tropicais, mais do que o *Penicillium*.

Outros gêneros de fungos também foram notificados, *Mucor* sp, *Colletotrichum* sp e *Rhizopus* sp, porém em quantidade muito baixa. Estes que não tiveram um estudo mais aprofundado, pois não apresentaram tanta importância para o objetivo deste estudo.

**TABELA 3** Percentagem de contaminação dos principais gêneros isolados de café beneficiado armazenados

Local	N. amostras	Tratamento	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Fusarium</i>
Guaxupé	4	Sem Desinfec.	100%	25%	25%	25%
		Com Desinfec.	50%	25%	---	25%
Cabo Verde	5	Sem Desinfec.	80%	40%	20%	60%
		Com Desinfec.	40%	40%	20%	20%
Campos Gerais	5	Sem Desinfec.	100%	60%	60%	40%
		Com Desinfec.	60%	20%	--	20%
Carmo do Rio Claro	5	Sem Desinfec.	100%	20%	---	80%
		Com Desinfec.	60%	---	---	40%
São Sebastião do Paraíso	4	Sem Desinfec.	100%	75%	50%	---
		Com Desinfec.	25%	25%	---	50%
Ouro Fino	5	Sem Desinfec.	80%	---	---	---
		Com Desinfec.	80%	20%	---	60%
Lavras	1	Sem Desinfec.	100%	---	---	---
		Com Desinfec.	100%	---	---	---
Alfenas	1	Sem Desinfec.	100%	100%	100%	---
		Com Desinfec.	100%	100%	100%	---
Poços de Caldas	5	Sem Desinfec.	100%	80%	40%	20%
		Com Desinfec.	60%	---	---	---
Três Pontas	5	Sem Desinfec.	100%	40%	---	40%
		Com Desinfec.	---	---	20%	20%
Boa Esperança	5	Sem Desinfec.	100%	40%	20%	---
		Com Desinfec.	20%	80%	---	40%

Das 45 amostras em que foi notificada a presença de fungos do gênero *Aspergillus*, houve um predomínio da seção *Nigri*, presente em 88,37%(38) das amostras antes da desinfecção com hipoclorito e 25%(11) após a desinfecção, seguida pelos fungos da Seção *Aspergillus* com 72,09% (31) antes da desinfecção e 20,93% (9) após a desinfecção. As espécies da Seção *Circundati* foram detectadas em 65,12%(28) antes da desinfecção e 16,27 (7) após a desinfecção. As espécies da Seção *Flavi* com 44,19%(19) antes da desinfecção e 6,98% (3) após a desinfecção com hipoclorito a Seção *Versicolores* esteve presente em 6,98%(3) das amostras antes da desinfecção e não foi notificada após a desinfecção.

Dos fungos notificados, 188 foram isolados, purificados e identificados até espécie. Das espécies identificadas, 75 pertenciam à Seção *Circundati*, 46 à Seção *Flavi*, 28 à Seção *Nigri*, 09 à Seção *Versicolares*, 05 à Seção *Aspergillus* e 25 espécies do gênero *Penicillium*.

A identificação das espécies da Seção *Circundati* é justificada pelo fato da maioria das espécies pertencentes a esta Seção, como *A. ochraceus*, *A. sulphureus*, *sclerotiorum*, *A. auricomus*, *A. melleus*, *petrakii* e *A. ostianus*, serem consideradas como produtoras de ocratoxina A (Moss, 1998; Varga, 1996; Ciegler, 1972; Hesseltine et al., 1972). Do mesmo modo, os isolados da Seção *Flavi* foram identificados para avaliar quais espécies desta Seção poderiam apresentar um risco para a presença de aflatoxina em café. A identificação das espécies da Seção *Nigri* foi realizada para avaliar a presença de espécies citadas como produtoras de ocratoxina A, como o *Aspergillus niger* var *niger* e *Aspergillus foetidus*(Abarca et al., 1994; Nakajima et al., 1997). As espécies da Seção *Versicolares* foram identificadas para estimar a possível presença de espécies produtoras de esterigmatocistina, como *Aspergillus sydowii* e *Aspergillus versicolor* e, por fim, as espécies do Subgênero *Penicillium* para

identificar espécies produtoras de ocratoxina A, citrinina, xantomegnina e viomeleina.

**TABELA 4** Porcentagem de contaminação das principais Seções do Subgênero *Aspergillus* associadas a grãos de café beneficiado, procedentes de diferentes municípios da Região Sul do Estado de Minas Gerais.

Local	N. amostras	Tratamento	Seção	Seção	Seção	Seção
Guaxupe	5	Sem Desinfec.	(04) 80%	(01) 100%	(03) 60%	(02) 50%
Cabo Verde	5	Com Desinfec.	---	---	(02) 40%	---
Campos Gerais	5	Sem Desinfec.	(03) 60%	---	(05) 100%	(03) 60%
Campos Gerais	5	Com Desinfec.	---	---	(02) 40%	(01) 20%
Campos Gerais	5	Sem Desinfec.	(03) 60%	(04) 80%	(05) 100%	(03) 60%
Carmo do Rio Claro	4	Sem Desinfec.	(01) 25%	(01) 25%	(04) 100%	---
São Sebastião do Paraíso	5	Sem Desinfec.	(01) 20%	(02) 40%	(04) 80%	(01) 25%
Ouro Fino	1	Sem Desinfec.	(01) 100%	(01) 100%	(01) 100%	---
Lavras	1	Com Desinfec.	(01) 100%	---	(01) 100%	---
Altenas	5	Sem Desinfec.	(1) 20%	(02) 40%	(05) 100%	(01) 100%
Pocos de Caldas	5	Com Desinfec.	(3) 60%	(02) 40%	---	(01) 20%
Três Pontas	5	Sem Desinfec.	(05) 100%	(02) 40%	(02) 40%	(04) 80%
Boa Esperança	5	Sem Desinfec.	(04) 80%	(03) 60%	(04) 80%	(05) 100%
		Com Desinfec.	---	---	(01) 20%	---

A descrição dos fungos identificados reúne as características de todos os isolados da mesma espécie, com exceção das espécies que só tiveram um isolado. As características aqui apresentadas são dos isolados identificados e não das referências utilizadas para a identificação dos fungos. Todas as espécies de isolado foram fotografadas em meio CYA 25°C e encontram-se em anexo, na Seção de fotos.

### 3.1 Descrição das espécies de fungos identificados

Gênero *Aspergillus*

Subgênero *Circundati* Seção *Nigri*

*Aspergillus niger* var Tieghem var *niger*

As colônias sobre CYA foram maiores que 6 cm de diâmetro, de coloração preta e às vezes marrom muito escuras. Apresentaram ótimo crescimento em CYA a 37°C, acima de 6cm de diâmetro. A forma de crescimento variou de radial a compactada e, em alguns casos, com micélio branco, sendo que os isolados que cresceram de forma radial não produziram micélio branco; Reverso em CYA, variando de pouco a densamente compacto e coloração pálida; em MEA, colônias pretas com 6,0 cm de diâmetro e reverso constantemente ralo e incolor.

Cabeça conidial bisseriada, com longas métulas (12 a 14µm) e fiáides curtas (6 a 7µm) e arredondadas, vesículas globosas variando de 37 a 65 µm de diâmetro, conídios pretos de formas variadas de 4 a 5 µm, distintamente rugosos. Conidióforos lisos de 800 a 1230 µm.

*Aspergillus niger* var Tieghem var *awamori* (Nakazawa) Al-Musal.am

As colônias sobre CYA foram maiores que 6,0 cm de diâmetro, de coloração marrom-escura, tendendo a preto, micélio branco presente. Apresentaram ótimo crescimento em CYA a 37°C, acima de 6,0 cm de diâmetro.

A forma de crescimento variou de radial a compactado e, em alguns casos, com micélio branco, sendo que os isolados que cresceram de forma radial não produziram micélio branco; Reverso em CYA, variando de pouco a densamente compacto e coloração pálida; em MEA colônias pretas com 6,0 cm de diâmetro e reverso constantemente ralo e incolor.

Cabeça conidial bisseriada, com longas métulas medindo de 10 a 15µm e fiálides medindo 7 e 8µm, vesículas globosas variando de 40 a 62 µm de diâmetro, conídios globoso pretos, finamente rugosos, de 4 a 5 µm de diâmetro. Conidióforos lisos, geralmente com 750 a 1200 µm de comprimento.

#### *Aspergillus foetidus* Thom & Raper

As colônias sobre CYA foram maiores que 6,0 cm de diâmetro, de coloração marrom muito escuras, bem próximas do preto, com reverso pálido e levemente compacto . apresentaram ótimo crescimento em CYA a 37°C, acima de 6,0 cm de diâmetro, presença de micélio branco com reverso compacto, com o centro da colônia escuro (preto); em MEA, colônias pretas com 6,0 cm de diâmetro e reverso constantemente ralo e incolor.

Cabeça conidial bisseriada, métulas com 10 a 12µm de comprimento e fiálides de 8 a 10µm, vesículas globosas variando de 32 a 63µm de diâmetro, conídios lisos a finamente rugosos, de cor preta e de forma globosa a forma de barril, medindo em média de 3 a 4 µm de diâmetro. Conidióforos lisos a maioria medindo entre 450 a 700 µm.

Para a diferenciação das espécies da Seção *Nigri*, as características microscópicas foram as que mais auxiliaram, com destaque para a textura dos conídios e o comprimento dos conidióforos. O *Aspergillus niger* var *niger* diferenciou das duas outras espécies identificadas pela textura dos conídios, que são distintamente rugosos. Os conídios das espécies de *Aspergillus niger* var *awamori* e *Aspergillus foetidus* possuem uma textura muito parecida, podendo

ser confundidos, apesar dos conídios do *Aspergillus niger* var *awamori* terem uma rugosidade mais aparente do que a do *Aspergillus foetidus*, que aparenta ser mais liso. Outra característica que auxiliou na diferenciação destas duas espécies foi o comprimento do conidióforo, que no *Aspergillus niger* var *awamori* é maior do que no *Aspergillus foetidus*. Contudo, as demais características descritas por Klich e Pitt (1988b) também foram necessárias, entre elas pequenas gotas abundantes, presentes nos isolados de *A. niger* var *awamori* e ausentes nos isolados *A. foetidus*.

Alguns trabalhos mencionam o Grupo *A. Niger* como predominante nas amostras de grãos de café analisadas (Nakajima et al., 1997; Tsubouchi et al., 1984). Sendo assim, estas espécies identificadas que pertencem a esta Seção (Grupo) podem fazer parte da microflora dos ambientes da lavoura de café. O que pode afetar o resultado das espécies identificadas é o manual utilizado na identificação. Ao incluir três metodologias de identificação de *Aspergillus* em uma tabela, Sansom (1994) demonstra que o *A. niger* identificado por Raper e Fennell pode ser identificado como *A. niger* var *niger* utilizando o método de identificação descrito por Al-Musalam, e como *A. niger*, utilizando uma outra técnica descrita por Kusters-Van Someren et al.. Dentro do mesmo grupo, o *A. awamori*, segundo Raper e Fennell, é o *A. niger* var. *awamori*, de acordo com Al-Musalam e *A. niger*, utilizando Kusters- Van Someren et al.. Os fungos da Seção *Nigri* são contaminantes de inúmeros produtos e, em café, eles estão relacionados com a redução na qualidade da bebida por estarem associados a produtos de padrão inferior, o que não ocorre em cafés com bebidas de boa qualidade. Por outro lado, Paster et al. (1992) demonstraram o efeito inibidor do *A. niger* sobre o crescimento de *A. ochraceus* e *A. flavus* e também na formação de aflatoxina em meio sintético. O importante agora é saber qual o papel de cada espécie deste grupo sobre os produtos: benéficos, atuando como um agente

protetor, ou maléficis, reduzindo a qualidade dos produtos e/ou produzindo micotoxinas.

### **Subgênero *Circundati* Seção *Circundati***

#### ***Aspergillus ochraceus* Wilhelm**

As colônias sobre CYA 25°C de 4,8 a maiores que 5,0 cm de diâmetro, apresentando coloração ocre, micelium variando de creme a esverdeado quando presente, colônias com aspecto sucadas, e reverso pálido com tons de verde-amarelado a marrom escuro; presença de escleródios vinho a púrpura em quase todos os isolados, em média após o 12 dias de incubação. Nenhum dos isolado cresceu em CYA a 37°C. Em MEA, colônias ocre mais claras, com diâmetro acima de 5,0 cm. Poucos isolados apresentaram micelium de coloração branca a esverdeada, reverso predominantemente incolor, com alguns em tons de amarelo-esverdeado no centro.

Cabeça conidial bisseriada, com métulas medindo de 10 a 14µm e as fiálides de 8 a 11µm, vesículas globosas variando de 23 a 70µm, conídios finamente rugosos, pequenos e globosos, com 2 a 3,5µm de diâmetro. Conidióforos rugosos de 400 a 1515 µm.

#### ***Aspergillus petrakii* Vörös**

As colônias sobre CYA 25°C maiores que 5,0 cm de diâmetro, apresentando coloração ocre-amarelado, colônias planas e reverso pálido, ausência de escleródios. Em CYA a 37°C, colônias com 1,2cm de diâmetro, de coloração creme e reverso pálido. Em MEA, colônias ocre, com diâmetro acima de 5,0 cm.

Cabeça conidial bisseriada com apenas um terço da vesícula possuindo métulas, medindo 9,0 µm de comprimento e as fiálides entre 10 e 11µm; vesículas globosas variando de 25 a 32µm, conídios lisos, subglobosos a

elipsoidais de comprimento variado (3x3,5 / 3x4 / 3,5x4 / 4x5). Conidióforos lisos de 450 a 575 µm.

***Aspergillus sclerotiorum* Huber**

As colônias sobre CYA 25<sup>o</sup>C de 4,8 a 5,4 cm de diâmetro, apresentando coloração ocre, colônias com aspecto pouco sucado, e reverso pálido, com tons bem fracos de marrom, presença de escleródios amarelados nos primeiros dias de incubação. Em CYA a 37<sup>o</sup>C, crescimento de colônias creme com diâmetro de 0,6 cm, sendo que um isolado não cresceu nesta temperatura. Em MEA, colônias e reverso ocre, com diâmetro acima de 5,0 cm.

Cabeça conidial bisseriada, com métulas medindo de 11 a 13µm e as fiálides de 8 a 9 µm, vesículas globosas variando de 26 a 43µm, conídios finamente rugosos, globosos a subglobosos, variando de 2,5 a 3,0µm. Conidióforos rugosos de 550 a 750 µm de comprimento.

***Aspergillus melleus* Yukawa**

As colônias sobre CYA 25<sup>o</sup>C maiores que 5,0 cm de diâmetro, apresentando coloração ocre, micélium variando de creme a esverdeado quando presente, colônias com aspecto sucadas e reverso pálido com tons de verde-amarelado, presença de escleródios em abundância, de cor amarelo puro, branco quando em formação nos primeiros dias de incubação. Crescimento em CYA a 37<sup>o</sup>C, variando de 0,6 a 0,85 cm de diâmetro. Em MEA, colônias ocre mais claras, com diâmetro acima de 5cm, reverso predominantemente ocre com alguns em tons de verde.

Cabeça conidial bisseriada, com métulas medindo de 08 a 12µm e as fiálides de 5 a 8µm, vesículas globosas e subglobosas variando de 24 a 31µm, conídios lisos, pequenos, globosos a subglobosos, com 3 a 4µm de diâmetro. Conidióforos lisos a finamente rugosos de 360 a 600 µm.

***Aspergillus sulphureus* (Fres.) Wehmer**

As colônias sobre CYA 25<sup>o</sup>C maiores que 5 cm de diâmetro, apresentando coloração ocre amarelado, micelium em tons de creme quando presente, colônias com aspecto sucado e reverso pálido tendendo ao amarelo, presença de escleródios amarelo dourado em grande quantidade, com formação logo no primeiros dias de incubação. Crescimento CYA a 37<sup>o</sup>C variando de 0,55 a 1,0 cm, com uma coloração e reverso pálido próximo do amarelo. Em MEA, colônias ocre amarelada com diâmetro acima de 5cm, reverso predominantemente ocre com alguns em tons de amarelo.

Cabeça conidial bisseriada, com métulas medindo de 06 a 10 $\mu$ m e as fiálides de 07 a 12 $\mu$ m, vesículas globosas variando de 22 a 34 $\mu$ m, conídios pequenos, de forma variada ( globosos, subglobosos e elipsoidal), lisos a finamente rugosos e predominantemente medindo 3 a 4 $\mu$ m de diâmetro. Conidióforos finamente rugosos, de 275 a 830  $\mu$ m de comprimento.

***Aspergillus lanosus* (Kamal & Bhargava)**

As colônias sobre CYA 25<sup>o</sup>C medindo entre 4,4 e 5,0 cm de diâmetro, apresentando coloração amarelo forte para amarelo cádmio, colônias planas, com aspecto pouco aveludado e reverso creme tendendo ao ocre; ausência de escleródios. Crescimento CYA a 37<sup>o</sup>C variando de 2,0 a 2,4 cm, com reverso pálido próximo de marfim. Em MEA, colônias amareladas com diâmetro acima de 5,8 cm, reverso predominantemente amarelo, com alguns em tons de amarelo limão no centro.

Cabeça conidial bisseriada, com métulas medindo de 07 a 09 $\mu$ m e as fiálides de 06 a 08 $\mu$ m, vesículas globosas e pequenas, variando de 27 a 37 $\mu$ m, conídios lisos e globosos, medindo 2,5 a 3,0  $\mu$ m de diâmetro. Conidióforos lisos com 600 a 1005  $\mu$ m de comprimento.

### *Aspergillus elegans* Gasperini

As colônias sobre CYA 25°C medindo 4,0 cm de diâmetro, apresentando coloração ocre, micelium em tons de creme, colônias com aspecto sucado, e reverso pálido tendendo ao amarelo, formação de grandes gotas de exudato; presença de escleródios cremes a amarelo dourado, com formação logo no primeiros dias de incubação. Não cresceu a CYA a 37°C. Em MEA, colônias ocre amareladas com diâmetro de 5,8 a 6,0 cm, reverso em tons de creme para marrom claro.

Cabeça conidial bisseriada, com métulas medindo em torno de 23µm e as fiálides em torno de 08 µm, vesículas globosas variando de 37 a 60µm, conídios nascendo ovóides. Com a maturidade, os conídios são de maioria subglobosos a ovóides, de textura lisa a finamente rugosa e predominantemente medindo 3,5 a 4,0 µm de diâmetro. Conidióforos finamente rugosos a rugosos, lisos próximos da vesícula e, em sua maioria, medindo 1200 a 1600 µm de comprimento.

### *Aspergillus ostianus* Wehmer

As colônias sobre CYA 25°C com diâmetro variando de 5,4 a 4,8 cm, apresentando coloração ocre mais forte no centro da colônia e tons de amarelado nas bordas, pouco micelium branco, desaparecendo com a maturidade da colônia, colônias com aspecto levemente sucado e reverso creme, presença de escleródios amarelo em pequena quantidade. Não cresceu em CYA a 37°C. Em MEA, colônias ocre mais claras, tendendo a amareladas, com diâmetro próximo de 6,0 cm, reverso incolor.

Cabeça conidial bisseriada, com métulas medindo em torno de 13µm e as fiálides em torno de 08µm, vesículas globosas para levemente alongadas, variando de 19 a 33µm, conídios globosos a subglobosos, de textura finamente

rugosa e medindo 2,5 a 3,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Conidióforos finamente rugosos a rugosos com 575 a 840  $\mu\text{m}$  de comprimento.

*Aspergillus insulicola* Montemayor & Santiago

As colônias sobre CYA 25<sup>o</sup>C medindo de 6,0 a 6,2 cm de diâmetro, apresentando uma coloração amarelo ouro e reverso creme, presença de escleródios amarelos, com formação logo no primeiros dias de incubação. Crescimento CYA a 37<sup>o</sup>C variando de 1,8 a 2,0 cm, com uma coloração e reverso em tons de creme. Em MEA, colônias ocre amareladas com diâmetro acima de 5,0 cm de reverso incolor a ocre.

Cabeça conidial bisseriada, vesículas globosas variando de 19 a 31 $\mu\text{m}$ , conídios subglobosos, finamente rugosos medindo entre 3,0 e 3,5 $\mu\text{m}$  de diâmetro. Conidióforos curtos finamente rugosos, sendo que os maiores eram rugosos, com 345 a 410  $\mu\text{m}$  de comprimento.

*Aspergillus auricomus* (Guéguen) Sato

As colônias sobre CYA 25<sup>o</sup>C medindo 4,8 a 5,8 cm de diâmetro, apresentando coloração amarelada, colônias formadas em forma de raias circulares, e reverso creme para uma ocre mais claro, presença de escleródios amarelos em grande quantidade, com formação logo no primeiros dias de incubação. Crescimento CYA a 37<sup>o</sup>C variando de 1,2 a 1,6 cm, com uma coloração creme amarelada, reverso creme pálido. Em MEA, colônias ocre amareladas, com uma forte tendência ao amarelo, com diâmetro acima de 5,0 cm, reverso predominantemente ocre, com alguns em tons de creme.

Cabeça conidial bisseriada, com vesículas subglobosas a um pouco alongadas, variando de 27 a 39 $\mu\text{m}$  de diâmetro, conídios globosos a subglobosos, lisos a delicadamente rugosos, medindo de 3,5 a 4,5 $\mu\text{m}$  de

diâmetro. Conidióforos longos finamente rugosos a muito rugosos nos maiores, medindo entre 1000 e 1200µm de comprimento.

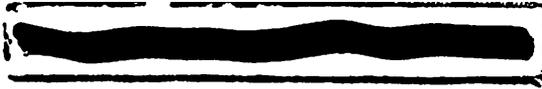
Das Seções analisadas, a Seção *Circundati* apresentou muita dificuldade na diferenciação das espécies, devido à semelhança morfológicas das espécies.

As primeiras características observadas para a diferenciação das espécies foram a produção e cor dos escleródios e o crescimento a 37°C. Os isolados de *A. ochraceus* foram identificados primeiramente pela produção de escleródios vermelho carmim a púrpura. Os escleródios púrpura a rosa, produzidos pelas espécies de *A. ochraceus*, e os conídios pequenos e próximos de lisos são as maiores características para distinguir estas espécies das demais. Apenas dois isolados de *A. ochraceus* não produziram escleródios; porém, as características das colônias e as características microscópicas foram semelhantes às dos isolados que haviam produzido escleródios.

Os isolados de *A. sulphureus* apresentaram um crescimento constante entre 1,0 e 1,8 cm a 37°C e uma elevada produção de escleródios amarelos nos primeiros dias de incubação em CYA a 25°C, para todos os isolados. Estas foram umas das características mais marcantes na distinção desta espécie. Entretanto, para diferenciá-la das espécies que também produziram escleródios amarelos, as características mais marcantes foram a textura dos conidióforos e a forma e textura dos conídios.

A identificação dos *A. sulphureus* foi muito trabalhosa devido à variedade morfológica que apresentavam as colônias, tanto na coloração como no arranjo dos conidióforos; entretanto, em todos os isolados identificados foi constante a produção de muitos escleródios nos primeiro dias de incubação; conidióforos lisos e a cor e o tamanho dos escleródios, além do diâmetro e a textura dos conídios e o crescimento a 37°C.

As espécies de *A. sclerotiorum* também produziram escleródios amarelos, porém estes escleródios possuem uma coloração mais próxima de



creme e alguns são quase brancos quando bem formados. A textura rugosa o comprimento dos conidióforos e a cabeça conidial colunar dividida em duas partes (observada na lupa) favorecem a diferenciação desta espécie em relação a *A. sulphureus*, *A. melleus*, *A. ostianus*.

O *A. melleus* produziu escleródios amarelos, o que o diferencia do *A. ochraceus*, que produz escleródios púrpura a vermelho carmim, e do *A. elegans*, que produz escleródios creme a branco; o crescimento a 37°C diferencia esta espécie do *A. auricomus* e *A. ostianus*. A textura dos conidióforos permite a distinção entre esta espécie e o *A. sulphureus*. O *A. melleus* e *A. sclerotiorum* são duas espécies que aparentaram muita semelhança; a diferenciação destas espécies foi feita observando a cabeça conidial, que dos isolados de *A. sclerotiorum* é colunar e dividida, quando observada na lupa.

O isolado identificado como *A. ostianus* se diferenciou das demais espécies pela textura da colônia, produção de poucos escleródios de cor creme a amarelo pálido, após 10 dias de incubação, e conidióforos curtos e rugosos. Este isolado apresentou muita semelhança com o *A. ochraceus* na textura da colônia, porém a coloração amarronzada no reverso da colônia em CYA a 25°C e a produção de escleródios amarelados auxiliam na separação destas espécies, que foi diferente, também, do *A. sulphureus*, por apresentar conidióforos rugosos, contra os conidióforos lisos a finamente rugosos do *A. sulphureus*. Apesar de conidióforos rugosos, esta espécie se diferencia do *A. sclerotiorum* pelo aspecto da colônia e do *A. melleus* pelo comprimento do conidióforo e coloração dos escleródios.

O *A. Petrakii* diferenciou principalmente pela produção de pequenos conidióforos, pelas diferentes formas de conídios lisos (elipsoidal, ovóide, subgloboso) e ausência de escleródios.

O *A. lanosus* apresentou uma coloração característica, amarelo limão, e o arranjo dos conidióforos bem diferenciado das demais espécies. Ramificações

dos conidióforos, que são raras em *Aspergillus*, foram observadas nesta espécie (Kamal e Bhargava, 1969). Este isolado não produziu escleródios, porém pode ser diferenciado do *A. petrakii* pelos conidióforos lisos e conídios globosos.

Os isolados de *A. elegans* se diferenciou das demais espécies pela produção de escleródios cremes e brancos e os conídios principalmente ovóides, além dos longos conidióforos rugosos. O próprio aspecto da colônia, com pouco micelium em tons de verde e denso, faz a primeira distinção desta espécie.

O *A. auricomus* apresentou conidióforos longos e rugosos e poucos escleródios amarelados, e se diferencia do *A. sulphureus* pela rugosidade dos conídios; a cor dos escleródios permite distinguir esta espécie do *A. ochraceus*, *A. sclerotiorum* e *A. elegans*, e do *A. melleus* pelo crescimento em CYA a 37°C.

O *A. insulicola* diferenciou das demais espécies por apresentar conidióforos curtos e rugosos e escleródios amarelos. Esta espécie se diferencia do *A. sulphureus* pela textura do conidióforo, difere do *A. ochraceus* e do *A. elegans* pela cor dos escleródios, o crescimento em CYA a 37°C separa esta espécie do *A. auricomus* e do *A. ostianus*. O comprimento dos conidióforos distingui esta espécie do *A. melleus* e a cabeça conidial colunar do *A. sclerotiorum* permite a distinção entre o *A. insulicola*. Entretanto, nas literaturas consultadas, nenhuma menciona presença ou ausência de escleródios nesta espécie.

No estudo visando identificar espécies de 75 isolados da Seção *Circundati*, constatou-se a presença de 41 isolados da espécies *Aspergillus ochraceus* (54,67 %), 01 isolado de *Aspergillus petrakii* (1,33 %), 23 isolados de *Aspergillus sulphureus* (30,67 %), 03 isolados de *Aspergillus sclerotiorum* (4,00 %), 02 isolados de *Aspergillus melleus* (2,67 %), 01 isolado de *Aspergillus lanosus* (1,33 %), 02 isolado de *Aspergillus elegans* (2,67 %), 01 isolados de *Aspergillus insulicola* (1,33 %), 01 isolados de *Aspergillus auricomus* (1,33 %) e 01 isolados de *Aspergillus ostianus* (1,33 %), demonstrando a predominância

das espécies de *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus sulphureus* em relação às demais espécies desta Seção.

Os membros do Grupo *A. ochraceus* (Seção *Circundati*) são amplamente distribuídos na natureza e têm sido isolados dos solos de muitas partes do mundo. Estas espécies são comuns na microflora de vegetação em decomposição, mas há poucas evidências de que elas desempenham um papel ativo no processo de decomposição (Raper e Fennell, 1965).

Domsch, Gams e Anderson (1980) descrevem três espécies deste grupo: o *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus melleus* e *Aspergillus sclerotiorum*, que foram isoladas de solos cultivados e também dos solos de florestas de várias partes do mundo, principalmente das áreas tropicais e subtropicais. As espécies de *Aspergillus lanosus* foram primeiramente isoladas do solo de florestas localizadas na Índia (Kamal e Bhargava, 1969),

O *A. ochraceus* é a principal espécie desta Seção isolada de grãos de café (Sansom et al., 1995, Mislivec, Bruce e Gibson, 1983, López Garay, Bautista Romero e Moreno González, 1987; Bucheli et al., 1998 Meirelles, 1990, Alves, 1996, Freitas, 2000). As espécies de *A. elegans* e *A. sclerotiorum* também foram isoladas de grãos de café por Tsubouchi et al. (1984).

#### **Subgênero *Circundati* Seção *Flavi***

#### ***Aspergillus flavus* Link var *flavus***

As colônias sobre CYA 25°C maiores que 5,0 cm de diâmetro, de coloração verde escuro com tons de verde-amarelados nas bordas, micélio branco presente em algumas colônias, reverso compacto, com tonalidades de amarelo-pálido e às vezes acinzentado; presença de escleródios pretos, cobertos com um amontoado de hifa, em poucos isolado. Crescimento CYA a 37°C variando de 4,6 a 5,0 cm, de coloração esverdeada com tons de verde-amarelado nas bordas das colônias, reverso variando de amarelo pálido a cinza claro,

formação de escleródios em poucos isolados. Em MEA, colônias verde-claras a verde amareladas com diâmetro acima de 5,0 cm, ralas, reverso predominantemente incolor; algumas com o centro da colônia mais compacto e com uma coloração marrom amarelada.

Cabeça conidial predominantemente bisseriada, com métulas medindo de 09 a 19  $\mu\text{m}$  e as fiálides de 06 a 10  $\mu\text{m}$ ; nos esterigmas monosseriados, as fiálides mediram entre 10 e 12  $\mu\text{m}$ , vesículas globosas, subglobosas e poucas alongadas, variando de 28 a 73 $\mu\text{m}$ , sendo que as vesículas menores eram alongadas, conídios verdes, globosos a subglobosos, a maioria finamente rugosos e medindo de 3,5 a 6,0 de diâmetro, apenas um isolado teve conídios medindo 6,0  $\mu\text{m}$ . Conidióforos rugosos medindo de 700 a 1695  $\mu\text{m}$  de comprimento, a maioria medindo entre 1000 e 1300 $\mu\text{m}$ .

*Aspergillus flavus* Link var *columnaris* Raper e Fennell

As colônias sobre CYA 25<sup>o</sup>C maiores que 5,0 cm de diâmetro, de coloração verde-escuro, com tons de verde-amarelado nas bordas, micelium branco presente em algumas colônias, reverso compacto, com tonalidades de amarelo-pálido e às vezes acinzentado, presença de escleródios pretos, cobertos com um amontoados de hifa, em poucos isolado. Crescimento CYA a 37<sup>o</sup>C variando de 4,6 a 5,0 cm, de coloração esverdeada, com tons de verde-amarelado nas bordas das colônias, reverso variando de amarelo pálido a cinza claro, formação de escleródios em poucos isolados. Em MEA, colônias verde-claras a verde-amareladas, com diâmetro acima de 5,0 cm, ralas, reverso predominantemente incolor; algumas com o centro da colônia mais compacto e com uma coloração marrom-amarelada.

Cabeça conidial predominantemente bisseriada, com métulas medindo de 09 a 14  $\mu\text{m}$  e as fiálides de 06 a 10  $\mu\text{m}$ , nos esterigmas monosseriados, as fiálides mediram entre 07 e 08  $\mu\text{m}$ , vesículas globosas, subglobosas e poucas

alongadas, variando de 28 a 36  $\mu\text{m}$ , conídios verdes, globosos a subglobosos, a maioria finamente rugosos e medindo de 3,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Conidióforos rugosos, medindo em torno de 1000  $\mu\text{m}$ .

### *Aspergillus tamarii* Kita

As colônias sobre CYA 25°C de 4,8 a maiores que 5,0 cm de diâmetro, apresentando coloração em tons de verde-amarronzado a marrom com 7 dias e tomando marrom escuro após 15 dias de incubação, poucos isolados com micelium branco, reverso acinzentado levemente marrom. Crescimento em CYA a 37°C variando de 4,2 a 5,0 cm, colônias marrom com tons de verde a amarelo, e mais compactas, reverso marrom. Em MEA, colônias de coloração em tons de marrom com diâmetro acima de 5,0 cm, reverso ralo e incolor .

Esterigmata predominantemente bisseriada e poucas unisseriada, com métulas medindo de 08 a 14 $\mu\text{m}$  e as fiálides de 8 a 11 $\mu\text{m}$ , vesículas globosas subglobosas e alongadas, variando de 17 a 39  $\mu\text{m}$ , conídios marrons, distintamente rugosos, globosos e subglobosos com 5,0 a 7,0 $\mu\text{m}$  de diâmetro. Conidióforos espinhosos e longos acima de 810 $\mu\text{m}$ .

A cor marrom das colônias e os conídios distintamente rugosos são as maiores características para distinguir o *A. tamarii* das demais espécies (Klich e Pitt, 1988b).

A identificação das espécies da Seção *Flavi* se deu primeiramente pelo meio AFPA, que é capaz de diferenciar as espécies de *A. flavus* e *A. parasiticus* das demais espécies pertencentes a esta Seção ( ou Grupo). O meio AFPA permite uma identificação precisa das espécies de *A. flavus* e *A. parasiticus* em 42 horas (Pitt, Hocking e Glenn, 1983). Os isolados que apresentavam coloração esverdeada e marrom durante a purificação em meio MA foram inoculados em AFPA e nos demais meios de identificação. Após 72 horas, os fungos que apresentaram um coloração laranja-amarelada tiveram suas identificações

direcionadas para *A. flavus* e *A. parasiticus*. O outro passo para a identificação foram as características microscópicas, como: o diâmetro das vesículas e a proporção entre monoseriadas e bisseriadas, diâmetro e textura dos conídios e o crescimento a 37°C. De acordo com Christensen (1982), o tamanho da vesícula e dos conídios tem sido prático e seguro para uma primeira ordem de separação e uma segunda separação pode ser realizada pelo crescimento a 37°C. As demais características também foram investigadas para confirmar as espécies identificadas, características como tamanho e textura dos conidióforos, e as características consideradas mais subjetivas como, cor e textura das colônias. De acordo com Klich e Pitt (1988a), a cor das colônias de *A. parasiticus* é um verde mais escuro que o tom de verde das colônias de *A. flavus*, entretanto esta diferença não oferece consistência suficiente para ser de valor prático na distinção destas duas espécies.

Todos os isolados identificados como *A. flavus* var *flavus* e o *A. flavus* var *flavus* apresentaram uma coloração laranja-amarelada em AFPA, o que favoreceu a identificação destas espécies. O *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae* e *Aspergillus tamarii* podem produzir uma coloração semelhante, porém esta constatação não é tão comum (Klich e Pitt, 1988a). Entretanto estas espécies podem ser diferenciadas em CYA pela tonalidade de marrom que apresentam com a idade, o que não ocorreu com os isolados identificados como *A. flavus* var *flavus* e o *A. flavus* var *flavus*. A tabela 5 mostra o valor de intensidade de coloração produzida pelos isolados em meio AFPA.

**TABELA 5** Valor recebido pela intensidade da coloração laranja-amarelado produzida em AFPA pelos isolados identificados como *A. flavus* e *A. parasiticus*.

Número de isolados	Nota
09 <i>A. flavus</i> var <i>flavus</i> )	3
06 ( <i>A. flavus</i> var <i>flavus</i> ) e 01 ( <i>A. flavus</i> var <i>columnaris</i> )	2
02 ( <i>A. flavus</i> var <i>flavus</i> )	1

A diferenciação das espécies de *A. flavus* var *flavus* do *Aspergillus flavus* var *columnaris* se deu principalmente pela textura. O *flavus* var *columnaris* apresentou uma textura velutinosa e plana, com micelium branco rasteiro e denso, enquanto, para o *A. flavus* var *flavus*, as colônias tinham conidióforos de tamanhos diferenciados e o micelium branco, quando produzidos, era mais volumoso e espaçado.

Os isolados de *A. tamarii* foram diferenciados primeiramente pela coloração marrom escura em meio MEA e CYA com o tempo. Ao microscópio, a rugosidade e a coloração amarronzada dos conídios desta espécie distingui o *A. tamarii* do *A. flavus* e *A. flavus* var *columnaris*.

As espécies de *A. flavus* var *flavus*, *A. flavus* var *columnaris* e *A. tamarii*, e as demais espécies desta Seção, estão extensamente distribuídas na natureza. São isoladas de solo, particularmente das áreas tropicais e subtropicais, das florestas, de grãos e sementes estocadas e de vários tipos de alimentos. Eles também contribuem para o processo de decomposição em níveis de umidade superiores aos toleráveis por fungos extremamente xerofílicos (Raper e Fennell, 1965).

O *A. tamarii*, *A. flavus* var *flavus* e *A. flavus* var *columnaris* têm sido isolados de frutos e grão de café (Mislivec, Bruce e Gibson, 1983, López Garay,

Bautista Romero e Moreno González ,1987; Bucheli et al., 1998 Meirelles, 1990, Alves, 1996, Freitas, 2000).

A presença destes fungos em grãos de café alertam para uma possível presença de aflatoxinas e ácidos ciclopiazônico no produto, uma vez que estas espécies estão relacionadas como produtoras desta micotoxinas. Este risco será possível desde que ocorra condições nutricionais e ambientais favoráveis.

#### **Subgênero *Circundati* Seção *Versicolares***

##### ***Aspergillus granulosis* Raper & Thom**

As colônias sobre CYA 25°C com diâmetro variando entre 4,9 e 5,0 cm, de coloração verde folha, com as bordas das colônias brancas, reverso da colônia colorido em forma de raias, creme, vermelho, marrom e cinza, com o centro marrom e compacto, exudatos em tons de marrom. Crescimento CYA a 37°C acima de 6,0 cm, de coloração verde oliva e textura sucada, reverso marrom no centro e cinza nas bordas. Crescimento em CYA20S variando de 4,0 a 4,6 cm de diâmetro, coloração verde folha com reverso cinza e tons de verde escuro no centro. Em MEA, colônias verde folha com diâmetro acima de 5,0 cm, reverso predominantemente incolor.

Cabeça conidial predominantemente bisseriada, com métulas medindo de 06 a 07  $\mu\text{m}$  e as fiálides em torno de 06  $\mu\text{m}$ , vesículas subglobosas e pouco alongadas, variando de 13 a 15 $\mu\text{m}$ , conídios verdes, globosos a subglobosos, finamente rugosos e medindo de 4,0 a 4,5 de diâmetro. Conidióforos lisos, de coloração amarronzada, medindo de 100 a 150  $\mu\text{m}$  de comprimento. Células Hülle globosas a subglobosas.

##### ***Aspergillus caespitosus* Raper & Thom**

As colônias sobre CYA 25°C com diâmetro variando entre 4,4 e 5,2 cm, de coloração verde-folha, reverso da colônia variando de vermelho-alaranjado a

marrom-avermelhado e compacto. Crescimento CYA a 37°C acima de 6,0 cm, de coloração verde-oliva, com micélio vermelho tendendo a rosa e textura sucada, reverso marrom-avermelhado. Crescimento em CYA20S variando de 4,6 a 5,0 cm de diâmetro, coloração semelhante ao CYA 25 °C. Em MEA, colônias verde-folha e amarelas no centro, com diâmetro variando de 2,7 a 3,1 e reverso verde-pálido.

Cabeça conidial predominantemente bisseriada, com métulas medindo de 05 a 09 µm e as fiálides de 06 a 08 µm, vesículas subglobosas a um pouco alongadas variando de 09 a 13µm, conídios verdes, globosos a subglobosos e rugosos medindo 3,5 µm de diâmetro. Conidióforos lisos de coloração marrom-pálido, medindo de 115 a 140 µm de comprimento. Células Hülle globosas, presentes em um dos isolados.

*Aspergillus sydowii* (Bain. & Sart.) Thom & Church

As colônias sobre CYA 25°C com diâmetro variando entre 3,0 e 3,1 cm, de coloração verde-azulada com micélio branco, reverso da colônia vermelho amarronzado e pigmentação solúvel amarronzada. Crescimento CYA a 37°C variando de 1,2 a 1,7 cm, de coloração acinzentada com micélio branco. Exudato vermelho-escuro. Crescimento e coloração em CYA20S a CYA 25 °C. Em MEA, colônias azul-verde acinzentadas, com diâmetro variando de 3,0 a 3,1 e reverso pálido.

Cabeça conidial predominantemente bisseriada, com métulas medindo de 06 a 07 µm e as fiálides de 06 a 08 µm, vesículas subglobosas a alongadas, variando de 14 a 17µm, conídios verdes, globosos a subglobosos e rugosos, medindo entre 3,0 e 3,5 µm de diâmetro. Conidióforos lisos incolor, medindo em torno de 300 µm de comprimento. Células Hülle globosas presentes.

*Aspergillus versicolor* (Vuill) Tirab

As colônias sobre CYA 25°C com diâmetro variando entre 3,3 e 3,5 cm, de coloração azulada com micelium branco, reverso da colônia em tons de alaranjado. Não cresceu em CYA a 37°C. Exudato amarelado. Crescimento e coloração em CYA20S a CYA 25 °C. Em MEA, colônias azul-verde acinzentadas, com diâmetro variando de 2,0a 3,6 e reverso pálido.

Cabeça conidial predominantemente bisseriada, com métulas medindo entre 04 e 05 µm e as fiálides de 05 a 07 µm, vesículas subglobosas a alongadas, variando de 12 a 17µm, conídios verdes, globosos a subglobosos e finamente rugosos, medindo entre 2,0 e 3,0 µm de diâmetro. Conidióforos lisos incolores, medindo de 275 a 300 µm de comprimento.

A tabela 6 mostra a quantidade de cada espécie da Seção *Versicolares* identificada neste estudo.

**TABELA 6** Espécies da Seção *Versicolares* identificadas nas amostras de grãos de café verde.

Espécies	Número de Isolados identificados	Tratamento
<i>Aspergillus caespitosus</i>	02	Antes da desinfecção
<i>Aspergillus granulosis</i>	02	Antes da desinfecção
<i>Aspergillus versicolor</i>	02	Antes da desinfecção
<i>Aspergillus sydowii</i>	03	Antes da desinfecção

As espécies da Seção *Versicolares*, *Aspergillus caespitosus* e *Aspergillus granulosis* são duas espécies muito próximas e de difícil distinção. De acordo com Klich (1993), o *Aspergillus caespitosus* e o *Aspergillus granulosis*, através de suas características morfológicas parecem ser a mesma espécie, entretanto o *Aspergillus caespitosus* tem uma coloração verde-amarelada mais acentuada do que o *Aspergillus granulosis*. Neste estudo, foi possível constatar esta

observação e separar estas duas espécies; entretanto, esta distinção foi fortalecida pela diferença de crescimento em MEA, que é a características que separa estas duas espécies na Chave de Identificação.

O *Aspergillus sydowii* se diferencia das outras duas espécies identificadas pela coloração em tons azulados, exudato vermelho e pela presença de métulas em quase toda a vesícula, diferente das outras duas espécies nas quais apenas 1/3 da vesícula é preenchido com métulas. Outra característica que auxiliou a distinção destas espécies foi a coloração dos conidióforos, os do *Aspergillus sydowii* são incolores, enquanto os do *Aspergillus caespitosus* e do *Aspergillus granulatus* são coloridos em tons de marrom-claro.

O *Aspergillus versicolor* se diferenciou da demais espécies deste grupo pela coloração azuladas das colônias, não cresceu a 37°C e os conídios são menores e menos rugosos

As espécies *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus caespitosus* e *Aspergillus granulatus* são fungos típicos de solo, distribuídos mundialmente, sendo detectados desde o solo do deserto até em minas de urânio na Checoslováquia e na rizosfera de plantas e semente (Domsch, Gams e Anderson; 1980). Isolados de *Aspergillus sydowii* e *Aspergillus versicolor* foram detectados em grãos de café por Abdel-Hafez & El-Maghraby (1992) e Mislivec, Bruce e Gibson (1983).

### **Subgênero *Circundati* Seção *Aspergillus***

A identificação dos isolados da Seção *Aspergillus* procedeu de acordo com Pitt e Hocking (1997). Os nomes designados para os isolados seguiram os utilizados pela referência de identificação.

### *Eurotium amstelodami*

As colônias sobre CYA 25<sup>0</sup>C variando de 3,5 a 4,0, com cleistotécios amarelos e com pouca produção de conidióforos, conídios verde-escuro acinzentados, reverso amarelo tendendo ao alaranjado e pigmentos solúveis de coloração amarelada. Não cresceu a 37<sup>0</sup>C. Em MEA, colônias com 2,5 a 3,4 cm de diâmetro, produção de cleistotécio amarelo, com pouca esporulação verde-acinzentada no centro, pigmentos solúvel amarelado, reverso variando de amarelo escuro a alaranjado. Em CYA20S, colônia com diâmetro entre 4,6 e 4,8 cm, cleistotécios amarelo-laranja em abundância, com hifas amarelas sobre os cleistotécios, com pouca esporulação de cor verde-escura acinzentada, reverso amarelo-alaranjado. Em todos os meios de cultura, a coloração das colônias é amarela com pouco tons de alaranjado em função da quantidade de cleistotécios.

Cabeça conidial predominantemente unisseriada, com fiáides medindo de 06 a 10  $\mu$ m, vesículas subglobosas e pouco alongadas variando de 14 a 35 $\mu$ m, conídios verdes, globosos a subglobosos, rugosos e medindo de 4,5 a 6,0 de diâmetro. Conidióforos lisos, medindo em torno de 215  $\mu$ m de comprimento, cleistotécios amarelos, de forma variada entre globosos e subglobosos, com diâmetro variando de 65 a 130  $\mu$ m, ascósporos rugosos, com duas fendas longitudinais medindo 5,0 de comprimento e 3,0 a 3,5 de largura.

### *Eurotium chevalieri*

As colônias sobre CYA 25<sup>0</sup>C variando de 2,0 a 2,1, com cleistotécios amarelos, exudato marrom-avermelhado, poucos conidióforos centralizados, reverso amarelo a alaranjado. Não cresceu a 37<sup>0</sup>C. Em MEA, colônias com 2,3 a 2,7 cm de diâmetro, produção de cleistotécio amarelo, com pouca esporulação verde-acinzentada e pequenas gotas de exudato marrom-avermelhado, reverso amarelo escuro. Em CYA20S, colônia com diâmetro entre 4,5 e 4,8 cm, com cleistotécios amarelos em abundância por toda a colônia, porém cobertos pelos

conidióforos e massa conidial verde-escuro acinzentada, reverso amarelo alaranjado. Nos meios CYA e MEA, a coloração das colônias é amarelada em função da quantidade de cleistotécios.

Cabeça conidial, com fiáides medindo de 07 a 08  $\mu\text{m}$ , vesículas subglobosas e pouco alongadas, variando de 17 a 25 $\mu\text{m}$ , conídios verdes, subglobosos a ovóides, rugosos e medindo de 4,5 a 5,0 de diâmetro. Conidióforos lisos, cleistotécios amarelos, de forma variadas entre globosos e subglobosos, com diâmetro variando de 83 a 125  $\mu\text{m}$ , ascósporos lisos, com duas fendas longitudinais medindo 5,0 de comprimento e 3,0 a 3,5 de largura.

Dos isolados da Seção *Aspergillus*, 5 foram identificados até espécies, sendo dois isolados de *Eurotium chevalieri* e três isolados de *Eurotium amstelodami*. Destes isolados, todos faziam parte da contaminação externa dos grãos. As espécies de *Eurotium amstelodami* e *Eurotium chevalieri* são predominantes em áreas subtropicais e tropicais do planeta, estando presentes em solos, grãos, produtos secos, etc. (Samson et al. 1995).

As espécies de *Eurotium* já foram isoladas de grãos de café. Isto se deve, em parte, ao fato dos grãos de café serem armazenados com pouca umidade e estas espécies serem xerofilicas.

A principal característica utilizada para diferenciar as duas espécies desta Seção, identificadas neste estudo, foi a textura dos ascósporos. De acordo com Pitt e Hocking (1997), a estrutura dos ascósporos é a principal característica para diferenciar as espécies de *Eurotium*.

Os isolados de *Eurotium chevalieri* possuem ascósporos com duas fendas longitudinais e textura lisa, já os isolados de *Eurotium amstelodami* também possuem ascósporos com duas fendas longitudinais, porém são rugosos. A forma dos conídios também auxiliou na diferenciação das duas espécies, os isolados de *Eurotium chevalieri* possuem conídios rugosos predominantemente

ovais, enquanto os isolados de *Eurotium amstelodami* possuem conídios rugosos predominantemente globosos a subglobosos. No aspecto das colônias, a formação de hifas amarelas a alaranjadas sob os cleistotécios, produzidas pelos isolados de *Eurotium amstelodami*, também auxiliou na identificação dos isolados pertencentes a esta espécie. Os isolados de *Eurotium chevalieri* produziram hifas amareladas (e não alaranjadas) sobre os cleistotécios mas em quantidades tão pequenas que não chegaram a alterar a coloração das colônias.

### **Gênero *Penicillium***

Para a identificação das espécies do gênero *Penicillium*, foi utilizado “A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species” de Pitt (1988). Sendo assim, o nome das espécies identificadas e seus sinônimos estão de acordo esta referência, que atualmente é a mais completa disponível para a identificação deste gênero fúngico.

#### **Subgênero *Monoverticillium***

##### ***Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling**

##### **Sinônimo (*Penicillium frequetans* Westling)**

As colônias sobre CYA 25<sup>o</sup>C com diâmetro variando entre 4,2 a 4,4 cm, de coloração verde-acinzentada, com tons de azul nas bordas, levemente sucada, com micélio branco nas bordas das colônias, reverso da colônia acinzentado. Não cresceu em CYA a 37<sup>o</sup>C. Em MEA, colônias verde-acinzentadas com diâmetro variando entre 5,8 e 6,0 cm, colônias planas e reverso predominantemente em tons de verde-pálido. Em meio YES, colônias de coloração bege (pêssego) no centro, amarelo e nas bordas tons de amarelo esverdeado e reverso amarelo brilhante.

Penicilli monoverticillado, estipe vesiculata de parede lisa e as fiálides ampuliformes de 09 a 10 µm, conídios esféricos a subesféricos, lisos a finamente rugosos, com diâmetro variando de 2,5 a 3,0 µm

### **Subgênero *Biverticillium***

#### ***Penicillium citrinum* Thom**

Sinônimo (*Penicillium steckii* Zaleski)

As colônias sobre CYA 25°C com diâmetro variando entre 2,7 e 3,3 cm, de coloração verde-azul acinzentado, levemente sucada, com micelium branco nas bordas das colônias, exudato amarelo pálido e pigmentação solúvel em alguns isolados, reverso da colônia colorido em tons de amarelo, principalmente no centro. Crescimento em CYA a 37°C muito pobre, geralmente próximo de 0,1 a 0,5 cm, formando apenas um ponto de micelium branco, alguns isolados não cresceram. Em MEA, colônias verde-acinzentadas, com diâmetro variando entre 1,9 e 2,4 cm, colônias planas, formando pouca quantidade de micelium nas bordas e reverso predominantemente em tons de verde pálido. Em meio YES, a maioria dos isolados apresentaram uma coloração bege(pêssego) nas bordas e no centro um tom de verde-acinzentado, e crescimento variando de 3,0 a 4,4 cm, colônias sucadas. A coloração do reverso, neste meio, variou de amarelo esverdeado a verde azulado brilhante

Penicilli bivertissilio, estipe de parede lisa com grupos de 3 a 4 métulas variando de 11 a 15 µm de comprimento e as fiálides ampuliformes de 06 a 10 µm, conídios esféricos a subsféricos, lisos a finamente rugosos, com diâmetro variando de 2,0 a 2,5 µm

#### ***Penicillium corylophilum* Dierckx**

As colônias sobre CYA 25°C com diâmetro variando entre 2,6 a 2,7 cm, de coloração verde-acinzentada com tons de azul nas bordas, levemente sucada, com micelium branco nas bordas das colônias, reverso da colônia pálido. Não cresceu em CYA a 37°C. Em MEA, colônias verde-acinzentadas, com tons azulados nas bordas, diâmetro variando entre 3,2 e 3,3 cm, colônias planas e reverso predominantemente em tons de verde-pálido. Em meio YES, colônias de

coloração marfim a creme-amarelado, com tons de azul no centro e reverso incolor.

Penicilli biverticilado, estipe vesiculata de parede lisa, métulas medindo de 13 a 20  $\mu\text{m}$ , ramificações próximas de 22  $\mu\text{m}$  e as fiálides ampuliformes em torno de 08  $\mu\text{m}$ , conídios esféricos a subesféricos, finamente rugosos, com diâmetro variando de 2,5 a 3,0  $\mu\text{m}$  |

### **Subgênero Terverticillium**

***Penicillium aurantiogriseum* Dierckx**

Sinônimo (*Penicillium puberulum* Bainier)

(*Penicillium cyclopium* Westling)

(*Penicillium aurantiovirens* Biourge)

(*Penicillium martensii* Biourge)

(*Penicillium lanoso-coeruleum* Thom)

(*Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* Westling)

As colônias sobre CYA 25°C com diâmetro variando entre 5,2 a 5,4 cm, de coloração azul-acinzentado, com tons de verde no centro, colônias planas, com micélium branco nas bordas das colônias, reverso da colônia pálido. Não cresceu em CYA a 37°C. Em MEA, colônias azul-acinzentadas, com diâmetro em torno de 6,0 cm, colônias planas e reverso predominantemente acinzentado. Em meio YES, colônias de coloração creme amarronzado no centro e, nas bordas tons de verde e reverso creme para marrom-claro.

Penicilli terverticilado, estipe lisas aparentemente manchadas, ramificações em torno de 31  $\mu\text{m}$ , métulas medindo próximo de 17 $\mu\text{m}$ , fiálides ampuliformes de 08 a 10  $\mu\text{m}$ , conídios esféricos a subesféricos, lisos a finamente rugosos com diâmetro variando de 3,0 a 3,5  $\mu\text{m}$

***Penicillium brevecompactum* Dierckx**

Sinônimo (*Penicillium stoloniferum* Thom)

As colônias sobre CYA 25°C com diâmetro variando entre 3,8 a 4,1 cm, de coloração verde-acinzentada, aveludadas, colônias sucadas com pouco micelium branco nas bordas, reverso da colônia pálido. Não cresceu em CYA a 37°C. Em MEA, colônias verde acinzentadas com diâmetro em torno de 2,4 cm, colônias planas e reverso predominantemente acinzentado. Em meio YES, colônias de coloração creme amarronzado no centro e nas bordas tons de verde e reverso creme.

Penicilli terverticilado, estipe lisas aparentemente, ramificações finamente rugosas em torno de 23 µm, métulas medindo 10µm, fiálides ampuliformes, com a maioria medindo 07 µm, conídios esféricos a subesféricos, lisos a finamente rugoso, com diâmetro variando de 3,0 a 3,5 µm

***Penicillium chrysogenum* Thom**

Sinônimo (*Penicillium notatum* Westling)

(*Penicillium meleagrinum* Biourge)

As colônias sobre CYA 25°C com diâmetro variando entre 3,4 e 3,5 cm, de coloração verde-acinzentado com poucos tons de azul, colônias distintamente sucadas, elevada concentração de exudatos por toda a colônia, micelium branco nas bordas, reverso pálido com pigmentação solúvel amarelada. Não cresceu em CYA a 37°C. Em MEA, colônias verde-acinzentadas com diâmetro variando entre 4,8 a 5,0 cm, colônias planas e reverso da cor da colônia, porém mais fosco. Em meio YES colônias, creme-amarronzadas nos centro e verde-amareladas nas bordas, crescimento em torno de 4,6 cm, colônias sucadas com reverso creme.

Penicilli predominantemente terverticilado, estipe de parede lisa, ramificação medindo 14 a 20 µm de comprimento, métulas variando de 10 a 13

µm de comprimento e as fiáldes ampuliformes de 07 a 09 µm, conídios globosos a subglobosos, porém a maioria elipsoidal, finamente rugosos, com diâmetro variando próximo de 4,0 µm

*Penicillium expansum* (Oudem) Seifert & Samson

As colônias sobre CYA 25°C com diâmetro variando entre 3,2 e 4,0 cm, de coloração verde-acinzentada, com tons de azul nas bordas, levemente sucada, com micelium branco nas bordas das colônias, exudato claro nas bordas da colônia, reverso pálido. Não cresceu em CYA a 37°C. Em MEA, colônias verde-acinzentadas com diâmetro variando entre 5,0-5,4 cm, colônias planas e reverso acinzentado. Em meio YES, colônias creme-amarronzadas nos centro e verde-amareladas nas bordas, crescimento variando de 4,2 a 4,6 cm, colônias sucadas com reverso amarelo.

Penicilli predominantemente terverticilado, estipe de parede lisa, ramificação medindo 14 a 31 µm de comprimento, métulas variando de 09 a 10 µm de comprimento e as fiáldes ampuliformes de 07 a 09 µm, conídios elipsoidais, lisos a finamente rugosos, com diâmetro variando de 3,0 a 3,5 µm

*Penicillium solitum* Westling

Sinônimo (*Penicillium verrucosum* var. *melanochlorum* Samson et al)

As colônias sobre CYA 25°C com diâmetro variando entre 1,9 e 2,0 cm, de coloração verde-acinzentado, colônias planas, com pouco micelium branco nas bordas das colônias, reverso da colônia acinzentado. Não cresceu em CYA a 37°C. Em MEA, colônias verde-acinzentadas com diâmetro entre 2,5 e 2,7 cm, colônias planas e reverso verde-pálido. Em meio YES, colônias de coloração creme-amarronzada no centro e, nas bordas, tons de verde e reverso marrom.

Penicilli terverticilado, estipe lisas aparentemente manchadas, ramificações em torno de 26 µm, métulas cilíndricas medindo próximo de

13µm, fiáides ampuliformes de 08 a 10 µm, conídios esféricos a subesféricos, lisos a finamente rugosos, com diâmetro variando de 3,0 a 3,5 µm

De acordo com a descrição acima, foram identificadas 8 espécies do gênero *Penicillium*. A tabela 7 mostra as espécies e a quantidade de cada uma delas nos dois tratamentos utilizados.

**TABELA 7** Espécies de *Penicillium* identificadas nas amostras de grãos de café verde.

Espécies	Número de Isolados identificados	Tratamento
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	05	05 – Antes desinfecção
<i>Penicillium brevecompactum</i>	02	02 – Antes desinfecção
<i>Penicillium citrinum</i>	09	05 – Antes desinfecção 04 – Após desinfecção
<i>Penicillium corylophilum</i>	01	01 – Antes desinfecção
<i>Penicillium chrysogenum</i>	02	02 – Antes desinfecção
<i>Penicillium expansum</i>	03	03 – Antes desinfecção
<i>Penicillium glabrum</i>	02	02 – Antes desinfecção
<i>Penicillium solitum</i>	01	01 – Antes desinfecção

A principal característica utilizada para a distinção destas espécies foi a quantidade de ramificações (monoverticilado, biverticilado e terverticilado).

O *Penicillium glabrum* se diferenciou dos demais por ser a única espécie monoseriada identificada. De acordo com Pitt (1988), esta espécie está mundialmente distribuída em solos como um agente de biodeterioração.

As duas espécies biverticillium, *Penicillium citrinum* e *Penicillium corylophilum*, foram diferenciadas pelo crescimento em MEA, no qual o

*Penicillium corylophilum* cresceu mais do que o *Penicillium citrinum*. Pitt (1988) cita o crescimento em MEA como uma das características para distinguir estas espécies. Em meio YES, todos os isolados de *Penicillium citrinum* apresentaram uma coloração de amarelo-esverdeada a verde-azulada, enquanto o isolado de *Penicillium corylophilum* não produziu nenhuma coloração, ficando o reverso da colônia incolor. Sendo assim, o meio YES ofereceu indicações para a separação entre estas duas espécies. O meio YES já é utilizado para a separação de espécies tervertissiladas através a coloração do reverso da colônia devido à produção de metabólitos secundários.

Dentre as espécies tervertissiladas, o *Penicillium aurantiogriseum* se destaca das demais pelo rápido crescimento e colônias em todos os meios a 25°C, em tons azulados. A coloração azulada é uma das características que auxiliam na distinção desta espécie (Pitt, 1988). O *Penicillium chrysogenum* se diferenciou dos demais pela textura da colônia, pela quantidade de exudatos e pelos conídios elipsoidais. Entretanto, os conídios e a textura da colônia fazem com que esta espécie fique bem parecida com o *Penicillium expansum*. Todavia, a maior taxa de crescimento deste último e a coloração verde escura separam estas duas espécies. O *Penicillium solitum* se diferenciou dos demais pela baixa taxa de crescimento e pela coloração verde-escura. Segundo Pitt (1988), a coloração desta espécie é a principal característica para distinguir o *Penicillium solitum* das espécies mais próximas deste. O *Penicillium brevicompactum* se diferenciou das demais principalmente por apresentar em algumas de suas estruturas microscópicas, uma ramificação a mais que os demais terverticilado; uma outra espécie que pode apresentar uma ramificação a mas é o *Penicillium olsonii*, mais as características morfológicas já são necessárias para distinguir estas duas espécies

Todas as espécies identificadas nestes estudo são classificadas como fungos de solo e são encontrados em todas as parte do planeta, principalmente em climas quentes(Domsch, Gams e Anderson; 1980)

A presença das espécies de *Penicillium aurantiogriseum* (*Penicillium cyclopium*), *Penicillium brevecompactum*, *Penicillium citrinum*, *P. expansum* e *P. glabrum* (*Penicillium frequetans*), encontradas neste estudo, concordam com os resultados obtidos por Mislivec (1981) e Mislivec, Bruce e Gibson (1983), segundo os quais estas são as principais espécies deste gênero encontradas em grãos de café. O *Penicillium aurantiogriseum* é o fungo mais encontrado sobre a Terra, é amplamente distribuído em cereais maduros ou em processo de secagem e em muitas outras classes de alimentos (Pitt e Hocking, 1997). O *Penicillium corylophilum* é comum em grãos de cereais e tem sido amplamente encontrado em outros alimentos, em vegetação em decomposição, no solo e em condições de baixa atividade de água (Pitt e Hocking, 1997 – Pitt, 1988). O *Penicillium solitum* não é um fungo muito comum (Gams, Hoekstra e Aptoot, 1998), mas recentemente tem sido reconhecido como um patógeno sobre maçã (Pitt, 1988). O *Penicillium brevecompactum* é um fungo cosmopolita, especialmente em solos, vegetação em decomposição, cereais e grãos de café verde, mas não é particularmente freqüente (Gams, Hoekstra e Aptoot, 1998; Pitt e Hocking, 1997; Pitt, 1988; Freitas, 2000)

O *Penicillium chrysogenum* foi a espécie de *Penicillium* mais comum encontrada em grãos de café analisadas por Abdel-Hafez & El-Maghraby (1992). No estudo realizado por estes autores, foram identificadas também *Penicillium citrinum* e *Penicillium brevecompactum*

A maioria dos isolados identificados do gênero *Penicillium* faziam parte da superfície do grão. Dos 25 isolados identificados, 04 estavam no interior do grão, todos identificados como *Penicillium citrinum*. O *Penicillium citrinum* é um potente biodegenerador, comumente causando decomposição e perda em

alimentos (Pitt, 1988). Domsch, Gams e Anderson (1980), ao citarem vários autores, relatam que esta espécie de *Penicillium* é intensivo decompositor da pectina e do amido e de parte da celulose. Estas características podem fazer com que este fungo apresente um potencial de penetração considerável, tornando possível a presença desta espécie no interior do grão. A presença das demais espécies na superfície do grão é esperada por serem todos fungos de solo, qualquer deslocamento de ar pode fazer com que os esporos destas espécies fiquem impregnados nos frutos de café, e a partir do momento em que ocorre uma lesão, qualquer no fruto estes esporos podem ficar em contato com o grão. Havendo condições favoráveis, irá ocorrer a germinação destes esporos e, posteriormente, o crescimento micelial. A presença desta espécie em grãos de café após a desinfecção com hipoclorito a 1% também foi observada por Mislivec, Bruce e Gibson (1983).

As espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* ocorrem comumente na atmosfera, no solo em regiões de climas quentes, em compostos orgânicos em decomposição, grãos estocados e outros (Domsch, Gams e Anderson; 1980). Os fungos vivem a maioria do tempo no solo e em um estado dormente (esporos, clamidosporos ou escleródios), somente o estado micelial pode ser considerado com uma atividade metabólica (Gams, Hoekstra e Aptoot, 1998).

A presença de esporos de fungos em grãos de café é inevitável e normal, e não implica que o mesmo esteja contaminado ou em processo de deterioração. O que determina a germinação dos esporos e o desenvolvimento dos fungos são as condições de armazenamento, sendo que os pontos principais para este desenvolvimento são a atividade de água, temperatura e substratos.

As espécies de *Aspergillus* da Seção *Aspergillus*, apesar de fazerem parte da segunda população com maior nível de contaminação das amostras analisadas, não foram identificadas, pois estas espécies não são citadas como produtoras da principais micotoxinas encontradas no café. Contudo, estudo

posteriores irão indicar as espécies encontradas nestas mesmas amostras analisadas. O mesmo ocorre com as espécies de *Cladosporium* e *Fusarium*.

## 4 CONCLUSÕES

Das amostras analisadas antes da desinfecção com hipoclorito 1%, 95,55% apresentaram contaminação com fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium*;

Do gênero *Aspergillus* houve uma maior ocorrência de fungos pertencentes à Seção *Nigri* seguida pelas espécies das Seções *Aspergillus*. *Circundati*, *Flavi* e *Versicolores*;

Após a desinfecção, houve uma redução significativa da população fúngica dos gêneros em igual proporção, com exceção do gênero *Fusarium*, que permaneceu constante;

As espécies identificadas da Seção *Nigri* foram: *Aspergillus niger* var *niger*, *Aspergillus niger* var *awamori* e *Aspergillus foetidus*;

As espécies da Seção *Circundati* identificadas foram: *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus elegans*, *Aspergillus insulicola*, *Aspergillus lanosus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus petrakii*, *Aspergillus sclerotiorum* e *Aspergillus sulphureus*;

As espécies identificadas da Seção *Flavi* foram: *Aspergillus flavus* var. *flavus*, *Aspergillus flavus* var *columnaris*, e *Aspergillus tamarisii*;

As espécies identificadas da Seção *Versicolores* foram: *Aspergillus granulatus*, *Aspergillus sydowii* e *Aspergillus caespitosus*, *Aspergillus versicolor*;

As espécies identificadas da Seção *Aspergillus* foram os teleomorfos *Eurotium amstelodami* e *Eurotium chevalieri*;

Do gênero *Penicillium*, foram identificadas espécies: *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium brevecompactum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium glabrum* e *Penicillium solitum*;

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÀ, G.; CABAÑES, F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.7, p.2650-2652, July 1994.
- ABDEL-HAFEZ, A.I.I.; EL-MAGHRABY, O.M.O. Fungal flora and aflatoxin asociatd with cocoa, roasted coffee and tea powders in Egypt. **Criptogamie, Mycology**, New York, v.3, n.1, p.31-45, 1992.
- ALVES, E. **População fúngica associada ao café (Coffea arabica L.) beneficiado e as fases pré e pós colheita relação com a bebida e local de cultivo**. Lavras: UFLA, 1996. 48p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).
- BUCHELI, P.; MEYER, I.; PITTET, A.; VUATAZ, G.; VIANI, R. Industrial storage of green robusta under tropical conditions and its impact on raw material quality and Ochratoxin A content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, n.11, p.4507-4511, Nov. 1998.
- CHRISTENSEN, M. The *Aspergillus ochraceus* Group: Two new species from western soils and a synoptc key, **Mycologia**, New York, v.74, n.2, p.210-225, Mar./Apr. 1982.
- CHRISTENSEN, M. A Synoptic key and evaluation of Species in the *Aspergillus flavus* group. **Mycologia**, New York, v.73, n.6, p.1056-1084, Nov./Dec. 1981.
- CIEGLER, A. Bioproduction of achratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.18, n.5, p.631-636, May 1972.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T-H. **Compedium of soil fungi**. London: Academic Press, 1980. v.1.
- FREITAS, R. F. **Fungos Associados a Grãos de café (Coffea arabica L.) beneficiado em Diversos Municípios da Região Sul de Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2000. 72p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).

- FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. Classification of terverticillate penicillia based on prolifes of mycotoxins and other secondary metabolites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v46, n.6, p.1301-1310, June 1983.
- GAMS, W.; HOEKSTRA, E. S.; APTROOT, A. **CBS – Course of mycology**. 4 ed. Wageningen: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1998. 165p.
- HESELTIME, C.W.; VANDERGRAFT, E.E.; FENNELL, D.I.; SMITH, M. L.; SHOTWELL, O.L. Aspergilli as ochratoxin Producing. **Mycologia**, New York, v.64, n.3, p.539-550, May/June 1972.
- HOSENEY, R.C. **Principles of cereal science and technology**. 2.ed. Minnesota: American Association of cereal chemists, 1994. 378p
- KAMAL,; BHARGAVA, K.S. Two new species of *Aspergillus* from soil. **Transaction British of Mycological Society**, Cambridge, v.52, n.2, p.36-340, Apr. 1969.
- KLICH, M.A. Morphological Studies of *Aspergillus* Section *Versicolores* and related Species. **Mycologia**, New York, v.85, n.1, p.100-107, Jan./Feb. 1993.
- KLICH, M.A.; PITT, J. I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. **Transaction British of Mycological Society**, Cambridge, v.94, n.1, p.99-108, July 1988a.
- KLICH, M.A.; PITT, J.I. **A Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their Teleomorphs**. North Ryde, 1988b.
- LI, S.; MARQUARDT, R.R.; ABRAMSON, D. Immunochemical detection of molds: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.63. n.2, p.281-291, Feb. 2000.
- LÓPEZ GARAY, C.; BATUTISTA ROMERO, E.; MORENO GONZÁLEZ, E. Microflora of the stored coffee and its influence on quality. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ, 12., 1987, Montreax. **Proceedings...** Montreax: ASIC, 1987. p.758-770.
- MEIRELES, A.M.A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades**

- do estado de Minas Gerais. Lavras: UFLA, 1990. 71p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- MISLIVEC, P. B. Toxic Species of *Penicillium* common in Food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.44, n.9, p.723-726, Sept. 1981.
- MISLIVEC, P.B.; BRUCE, V.R.; GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.46, n.11, p.969-973, Nov. 1983.
- MOSS, M.O. Recent Studies of Mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology Symposium**, Oxford, v.84, p. 62S-76S, 1998. Supplement.
- NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M.; UENO, Y. Survey of Aflatoxin B<sub>1</sub> and Ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, Oxon, n.9, p.77-83, 1997.
- PASTER, N.; PUSHINSKY, A.; MENASHEROY, M.; CHET, I. Inhibitory effect of *Aspergillus niger* on the growth of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus flavus*, and on aflatoxin formation. **Journal Science and Food Agriculture**, London, v.58, n.4, p.589-591, Apr. 1992.
- PITT, J.I. A Laboratory guide to common *Penicillium* species. North Ryde, 1988. p.187.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 2.ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D.; GLENN, D.R. Na improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.54, p.109-114, 1983.
- RAPER, K.B.; FENNELL, D.I. **The Genus Aspergillus**. Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1965.
- SANSOM, R.A. Taxonomy - Current Concepts of *Aspergillus* Systematics, In: SMITH, J.E. (ed.). **Biotechnology Handbook 7 – Aspergillus**. New York: Plenum Publishing Corporation, 1994. p.1-18.

- SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O.  
**Introduction to food-borne fungi.** 4.ed. Wageningen: Centraalbureau Voor  
Schimmelcultures Baarn Delft, 1995. p.322
- SMITH, J.E.; ROSS, K. The Toxigenic *Aspergilli*. In: SMITH, J.E.;  
HENDERSON, R.S. (eds). **Mycotoxin and animal foods.** Boca Raton:  
CRC Press, 1991. p.101-118.
- TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE. A Survey  
occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in imported green coffee  
beans. **Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology.**  
Tokyo, n.19, p.16-21, 1984.
- VARGA, J.; KEVEL, E.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z.  
Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species. **Applied and  
Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.12, p.4461-4464, 1996.

## CAPÍTULO 3

### DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL TOXIGÊNICO DOS FUNGOS DOS GÊNEROS *Aspergillus* E *Penicillium* ISOLADOS DE GRÃOS DE CAFÉ BENEFICIADO

#### RESUMO

BATISTA, L. R. Determinação do potencial toxigênicos dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* isolados de grãos de café beneficiado. Lavras: UFLA, 2000. (Dissertação-Mestrado em Ciência dos Alimentos).

†O potencial toxigênico de um fungo é definido como sendo a habilidade de uma espécie em produzir micotoxinas. Este potencial toxigênico irá depender de fatores intrínsecos, como a espécie do fungo e sua expressão dependerá dos fatores extrínsecos, como temperatura, atividade de água, substrato, etc. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial toxigênico das espécies identificadas, utilizando o meio CAM para as espécies produtoras de aflatoxinas e a técnica de Plug Agar para as espécies produtoras de aflatoxinas e ocratoxina A. Setenta e cinco isolados da Seção *Circundati* de 10 espécies diferentes foram testados quanto à produção de ocratoxina em meio YES. Dos isolados da seção *Circundati* testados, 74,67% foram produtores de ocratoxina A. Quarenta e seis isolados da Seção *Flavi* foram testados quanto à produção de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Das espécies de *Aspergillus flavus* var. *flavus*-17 e *Aspergillus flavus* var. *colmnaris*,-1, 33,33% foram produtores de aflatoxina B1 e B2. Dos 28 isolados de *Aspergillus tamarii*, nenhum foi produtor de aflatoxinas. Os isolados da seção *Nigri* e as espécies de *Penicillium* não foram produtoras de ocratoxina

A, sendo que o potencial toxigênico quanto à presença de outras micotoxinas deverá ser investigado. O meio CAM e a técnica de Plug agar, apresentaram resultados semelhantes para os isolados produtores e não produtores de aflatoxinas.

---

Comitê Orientados: Dr<sup>a</sup> Sara Maria Chalfoun – EPAMIG (Orientadora)

MSc Guilherme Prado – FUNED – (Co-orientador)

## ABSTRACT

**BATISTA, L. R. Determination of the potential toxigenic of the fungi of the genus *Aspergillus* and *Penicillium* isolated of green coffee beans. Lavras: UFLA, 2000. (Dissertation of Master's degree in Food Science).**

The potential toxigenic of a fungi is defined as being the ability of a species in producing mycotoxins. This toxigenic potential will depend on intrinsic factors such as the species of the fungus and its expression will depend on extrinsic factors as temperature, water activity, substrat, etc. This study was designed to evaluate the toxigenic potential of thespecies identified. Utilizing the medium CAM for the species producing and technics of Plug Agar for the species producers of aflatoxins and ochratoxin A. Seventy five isolated of Section *Circundati* of 10 different species were tested as to ochratoxin A production in YES medium. Out of the isolated of the Section *Circundati* tested, 74,67% were producers of ochratoxin A. Fortyisix isolates of the Section *Flavi* were tested as the aflatoxins production B1, B2, G1 and G2. Out of the species of *Aspergillus flavus* var. *flavus*-17 and *Aspergillus flavus* var *colmnaris*,-1, 33,33% were producers of aflatoxin B1 and B2. From the 28 isolated of *Aspergillus tamarii*, none was producer of aflatoxins. The isolated of the Section *Nigri* and the species of *Penicillium* were not producers of ochratoxin A, being that the toxigenic potential concerning the presence of other mycotoxins should be investigated. The CAM medium and the technique of Plug agar, presented similar results to the isolates producing and not producing aflatoxins.

---

Guindance Committee: Ds Sara Maria Chalfoun – EPAMIG (Adviser)  
Ms Guilherme Prado – FUNED – (Co-adviser)

## 1 INTRODUÇÃO

O potencial toxigênico de um fungo é definido como sendo a habilidade de uma linhagem em produzir metabólitos tóxicos (Piñeiro, 1996). As micotoxinas são caracterizadas como metabólitos secundários tóxicos, e são produzidas entre o final da fase exponencial e o início da fase estacionária de crescimento dos fungos, portanto não estão relacionadas com o papel biológico dos microrganismos (Bars e Bars, 1999, Bullerman, Schroeder e Park, 1984).

Dentre os fatores ligados à presença de micotoxinas em alimentos, há duas importantes categorias: os fatores intrínsecos, que são dependentes das linhagens ou espécies de fungos, e os fatores extrínsecos, que dependem das condições ambientais ( Bars e Bars, 1999).

As condições que permitem a produção de micotoxinas por uma linhagem potencialmente toxigênica são mais limitadas do que as que permitem o crescimento do fungos. Dentro de uma mesma espécie considerada toxigênica, muitas linhagens não possuem esta propriedade. Já nas espécies potencialmente toxigênicas, a produção das toxinas pode variar em até 1000 vezes (Bars e Bars, 1999).

Para avaliar o potencial toxigênico dos fungos, atualmente são utilizado meios de cultura sólidos ou líquidos que, em sua composição, contêm compostos que estimulam a produção das toxinas pelos fungos. A presença da toxina é detectada através da mudança de coloração do meio, como o YES para *Penicillium terverticilado*. Neste meio as espécies de *Penicillium terverticilado* que apresentarem uma coloração vermelho-amarronzada são produtoras de ocratoxina A ou citrinina, enquanto os terverticilados que apresentarem uma coloração amarelo-alaranjado são produtores de uma ou das três toxinas: xantomegnina, viomeleina ou vioxantina. A micotoxina pode ser detectada

também pela fluorescência emitida quando irradiada com luz ultravioleta. Por exemplo, meio CAM para espécies produtoras de aflatoxinas. Durante o desenvolvimento deste meio, foi observado que produção da fluorescência sempre foi acompanhada por uma pigmentação amarelo-alaranjada. A pigmentação foi observada antes da fluorescência e o grau de pigmentação é proporcional à intensidade da fluorescência (Lin e Dianese, 1976). Ainda utilizando meios sólidos, a micotoxina produzida por um isolado toxigênico pode ser detectada por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) pela técnica de Plug Agar. A sensibilidade da técnica de Plug Agar tem sido testada com o padrão da micotoxina incorporada no agar (aflatoxina B1 e G1, ocratoxina A, patulina, citrinina, e ácido penicílico), a sensibilidade do presente método é capaz de detectar a produção de toxina de todos os fungos testados. As micotoxinas: aflatoxina B1 e B2 a 0,1 ppb, ocratoxina A a 0,2 ppb e citrinina a 2,0 ppb tiveram 100% de recuperação enquanto a patulina e o ácido penicílico tiveram uma recuperação de 67%. O presente método fornece um rápido e simples caminho para a detecção de fungos toxigênicos, bem como a produção de aflatoxina B1 e G1, ocratoxina A, citrinina, patulina e ácido penicílico (Filtenborg e Frisvad 1980).

Utilizando meio líquido, é possível fazer uma extração e purificação da toxina e a quantificação por CCD ou por CLAE.

Este estudo teve com o objetivo avaliar o potencial toxigênico dos isolados identificados como integrantes da Seção *Flavi* quanto à produção de aflatoxina B1, B2, G1 e G2; Avaliar o potencial toxigênicos dos isolados identificados como integrantes da Seção *Circundati* e *Nigri* quanto à produção ocratoxina A e avaliar o potencial toxigênicos dos isolados do gênero *Penicillium* quanto à produção de ocratoxina A.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Isolados fúngicos utilizados para a avaliação do potencial toxigênico

Todos os isolados identificados no capítulo 2, pertencentes aos gênero *Aspergillus* das Seções *Nigri* e *Circundati*, foram testados quanto ao potencial ocratoxigênico, os isolados da Seção *Flavi* foram testados quanto ao potencial aflatoxigênico e os isolados do gênero *Penicillium* foram testados quanto ao seu potencial ocratoxigênicos e aflatoxigênico.

### 2.2 Determinação do potencial toxigênico dos fungos em meios de cultura

O potencial toxigênico dos fungos em meios de cultura foi avaliado utilizando os meios CAM para os fungos do gênero *Aspergillus* produtores de aflatoxina e o meio YES para os fungos do gênero *Penicillium* produtoras de nefrotoxinas, como citrinina, ocratoxina, xantomegnina e viomeleina

Após a inoculação do fungo, feita com palito de madeira esterilizado, no centro da placa, as placas são incubadas à temperatura de 25<sup>o</sup>C e são examinadas pela pigmentação amarelo-alaranjada e fluorescência por uma semana.

Os *Aspergillus* produtores de aflatoxina são identificados pela produção de pigmentos específicos de coloração amarelo-alaranjado e uma fluorescência azulada ao redor das colônias quando irradiadas com luz ultravioleta (Lin e Dianese, 1976)

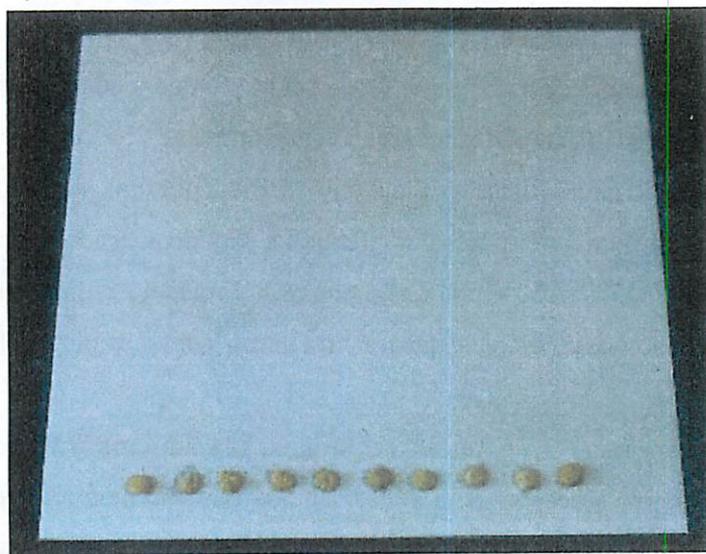
Para examinar a fluorescência, foi utilizado um cromatovisor CAMAG com luz ultravioleta de 366nm; a intensidade da fluorescência foi expressa com o símbolo (+) adotado subjetivamente, sendo que os que apresentaram a fluorescência mais intensa receberam nota (+++++), a menor fluorescência (+) e (-) para os que não apresentaram a fluorescência característica da produção de aflatoxina B1 e B2.

Os isolados que não produziram a pigmentação e fluorescência em cinco dias foram considerados não produtores de aflatoxina.

### 2.3 Determinação do potencial toxigênico dos fungos por Plug Agar

Todos os isolados identificados foram inoculados em meio YES e embebidos por 7 dias a 25-26<sup>o</sup>C. O tempo de incubação para a detecção da produção de micotoxina pela técnica de Plug Agar é de cinco dias a uma temperatura a 25<sup>o</sup> C (Filtenborg e Frisvad 1980).

Com o auxílio de uma ponteira de pipeta automática, foi feito um corte circular de aproximadamente 25 mm do micelium do fungo com agar; este micelium foi colocado sobre uma placa de CCD (Merck – Sílica Gel 60, 20x20) previamente ativada, junto com o micélio dos demais isolados, um ao lado do outro, com 1,5cm de distância, como mostra a figura 1.



**FIGURA 1** Placa de Cromatografia de Camada Delgada com micélio dos isolados antes da eluição

Ao lado do último micelium é feita a aplicação do padrão da micotoxina (aflatoxinas ou ocratoxina A). O micelium é retirado e após 15 minutos é feita a

eluição em uma cuba de vidro contendo como fase móvel TEF - Tolueno, Acetato de Etila e Ácido fórmico 90% (50:40:10)

Este método conta com o fato de que muitas micotoxinas são extracelulares, difundindo-se no substrato. A toxina é transferida para a placa de CCD pelo micélio do fungo colocado diretamente sobre a placa e retirado em seguida (Filtenborg e Frisvad 1980).

Após a eluição, as placas são secas em capela pelo fluxo. A confirmação é feita em luz ultravioleta com  $\lambda$  366nm em cromatovisor CAMAG (UV-BETRACHTER)

O isolado produtor da micotoxina (aflatoxinas ou ocratoxina) apresenta um Rf (fator de retenção) e um spot de fluorescência semelhante ao do padrão da micotoxina testada.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Potencial ocratoxigênico do isolados da Seção *Nigri*

A tabela 1 mostra os resultados do potencial ocratoxigênico da Seção *Nigri*. Dos 28 isolados testados, não foi detectada a presença de ocratoxina A em nenhum dos isolados. Embora dentro da Seção *Nigri* (Grupo *Aspergillus niger*) sejam relatados como potencialmente ocratoxigênicos os fungos *Aspergillus niger var niger* e *Aspergillus foetidus* (Abarca et al., 1994; Nakajima et al., 1997), no presente trabalho verificou-se que em 10 isolados classificados como *Aspergillus niger var niger* (07) e *Aspergillus foetidus* (03), nenhum isolado demonstrou ser potencialmente produtor de ocratoxina A. Os 18 isolados de *Aspergillus niger var awamori* também foram testados quanto ao potencial toxigênico e não foi detectada a presença de ocratoxina por nenhum dos isolados.

**TABELA 1** Teste do potencial toxigênico dos isolados da Seção *Nigri*

Subgênero/espécie	Número de isolados	Teste de produção de ocratoxina A pela Técnica de Plug Agar.
<i>A. niger var awamori</i>	18	ND
<i>A. niger var niger</i>	07	ND
<i>A. foetidus</i>	03	ND

(ND) não detectada

Tal fato pode reverter-se de importância, considerando ser esta Seção predominante nos grãos examinados, concordando com os resultados de Freitas (2000), Meirelles (1990) e Alves (1996).

Durante a revisão bibliográfica para a realização deste trabalho, não foi encontrada nenhuma referência citando o *Aspergillus niger* var *awamori* como produtor de ocratoxina A.

De acordo com Frisvad, citado por Smith e Ross (1991), as espécies de *Aspergillus niger* var *niger* e *Aspergillus niger* var *awamori* podem ser produtoras de malforminas. As malforminas são um grupo de peptídeos cíclicos que tem sido mostrados por serem tóxicos a mamíferos, bem como causando má formação dos tecidos das plantas (Moss, 1977)

### 3.2 Potencial ocratoxigênico do isolados da Seção *Circundati*

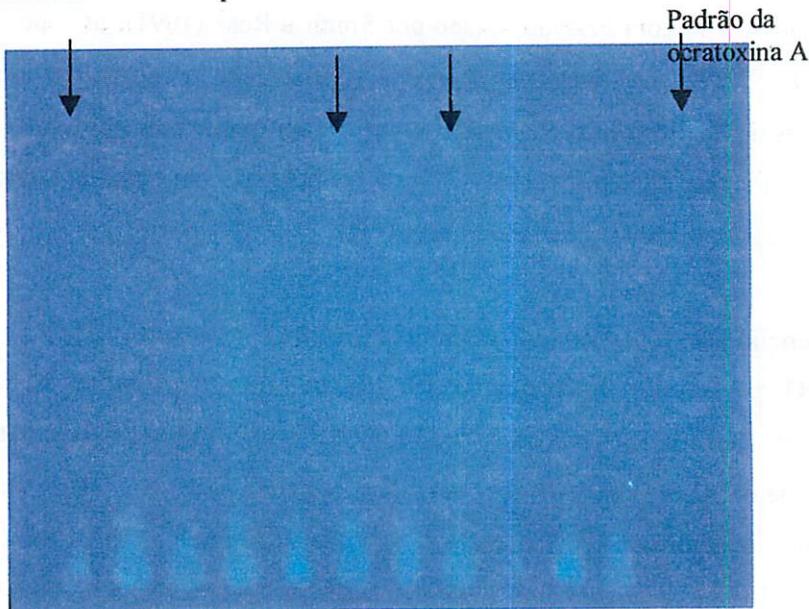
O potencial ocratoxigênico foi testado em 75 isolados da Seção *Circundati*. Dos isolados testados, 56 (74,67 %) foram produtores de ocratoxina A em meio YES, confirmados por Plug Agar, sendo que, dos isolados produtores de ocratoxina A, 27 foram *A. ochraceus*, 22 de *A. sulphureus*, 2 de *A. elegans*, 01 de *A. sclerotiorum*, e 01 dos isolados *A. auricomus*, *A. insulicola*, *petrakii* e *A. ostianus*.

A figura 2 mostra o resultado de uma das placas de cromatografia de camada delgada em que foi detectada a produção de ocratoxina por três isolados (indicados com uma seta) da Seção *Circundati*.

As espécies de *A. ochraceus*, *A. sulphureus*, *sclerotiorum*, *A. auricomus*, *A. melleus*, *A. petrakii* e *A. ostianus* têm sido relatadas por produzirem ocratoxina A, seja em meio de cultura sintético ou semi-sintético (Moss, 1998; Varga, 1996; Ciegler, 1972; Hesseltine et al., 1972.)

Com relação ao *A. insulicola*, no levantamento bibliográfico para a realização deste trabalho, não foi possível encontrar nenhuma literatura que relatasse esta espécie como produtora de ocratoxina A.

Nos isolados identificados como *A. lanosus* e *A. melleus*, não foi detectada a presença de ocratoxina A nas placas de CCD, e estas foram considerados como não produtores.



**FIGURA 2** Isolados ocratoxigênicos detectados por Plug Agar

Neste estudo os dois isolados de *A. elegans* foram os que apresentaram fluorescência mais intensa na placa de CCD. Apesar de não ser uma análise quantitativa, fazendo uma comparação visual, estes isolados apresentaram um potencial ocratoxigênico superior ao das demais espécies desta Seção.

A tabela 2 mostra a quantidade de isolados na parte externa e no interior dos grão, e a porcentagem de isolados ocratoxigênico nas duas situações.

Das espécies pertencentes à Seção *Circundati*, a que demonstrou ter um maior poder de penetração no grão de café beneficiado foi o *A. sulphureus*. Doze dos 23 isolados foram produtores de ocratoxina A, sendo 08 retirados após a desinfecção com hipoclorito, de uma mesma amostra de Poços de Caldas-MG. A

segunda localidade que apresentou o maior índice de contaminação foi Cabo Verde, com 03 isolados de *Aspergillus sulphureus*.

Dos 41 isolados de *A. ochraceus* identificados, 40 faziam parte da contaminação externa dos grãos de café. Destes 40 isolados, 26 foram produtores de ocratoxina A. A presença de *Aspergillus ochraceus* nas amostras foi uniformemente distribuída com concentrações mais elevadas em Boa Esperança (13) e Guaxupé (12); nas demais localidades o número de isolados variou de 1 a 5, estando presente em todas as localidades analisadas.

Os fungos pertencentes à Seção *Circundati* podem ser produtores de muitas outras micotoxinas; alguns isolados chegam a produzir mais de uma simultaneamente.

O *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus sulphureus* e *Aspergillus melleus*, além da ocratoxina A, podem produzir o ácido penicílico (Scott et al., 1972; Gorst-Alman e Steyn, 1979).

Isolados de *Aspergillus ochraceus* podem ser produtores de ácido penicílico, xantomegnina, viomeleina, e vioxantina e podem produzir vários outros compostos do grupo da ocratoxina A, como meleina, 4-hidroximeleina, ocratoxina B e ocratoxina C. (Stack et al., 1983; Samson et al., 1995; Cole e Cox, 1981).

**TABELA 2** Potencial ocratoxigênicos dos isolados identificados da Seção *Circundati*.

Subgênero/espécie	Número de isolados	Isolados produtores de ocratoxina A identificados por Plug Agar.	
		Com desinfecção	Sem desinfecção
<i>A. auricomus</i>	1		1 (+)
<i>A. elegans</i>	2	1 (+)	1 (+)
<i>A. insulicola</i>	1		1 (+)
<i>A. lanosus</i>	1		1 (ND)
<i>A. melleus</i>	2		2 (ND)
<i>A. ochraceus</i>	41	1 (+)	14 (ND), 26(+)
<i>A. ostianus</i>	1		1 (+)
<i>A. petrakii</i>	1		1 (+)
<i>A. sclerotiorum</i>	2		1 (ND), 1 (+)
<i>A. sulphureus</i>	23	12 (+)	1 (ND), 10 (+)

(+) isolado(s) produtor(es) de ocratoxina A, (ND) não detectada

O *Aspergillus melleus* pode ser produtor da ocratoxina A e da meleina (Cole e Cox, 1981).

Smith e Ross (1981) ao citarem Frisvad, J. C., relatam que as espécies da Seção *Circundati*, como *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus sclerotiorum*, *Aspergillus petrakii* e *Aspergillus sulphureus*, podem produzir as ocratoxinas, ácido neoaspergílico, emodina, viomeleina, xantomegnina, vioxantina.

O ácido penicílico é uma micotoxina de pouca importância. As micotoxinas xantomegnina, viomeleina e vioxantina são consideradas compostos nefrotóxicos e hepatóxicos para ratos e porcos (Pitt e Hocking, 1997).

### 3.3 Potencial aflatoxigênico do isolados da Seção *Flavi*

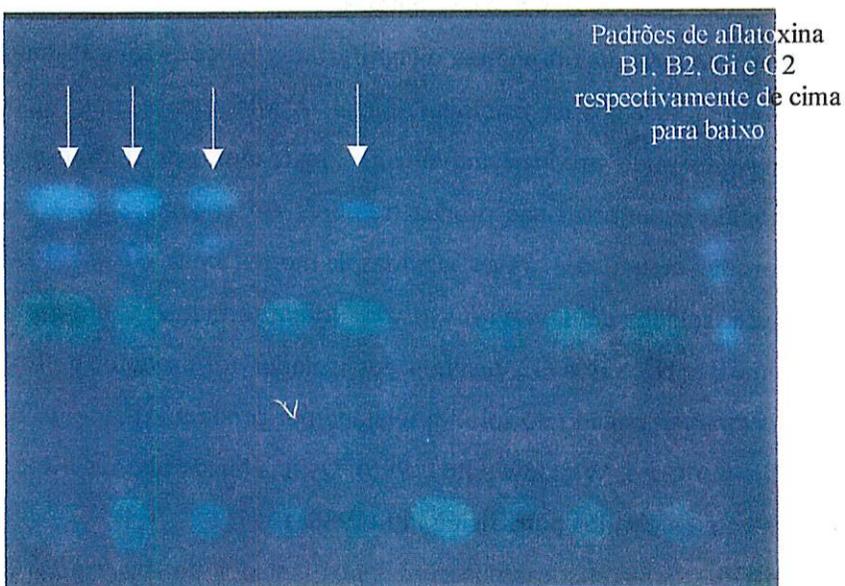
O potencial aflatoxigênico de 17 isolados de *A. flavus* var *flavus* e 01 *A. flavus* var *columnaris* foi testado em meio CAM e em CCD por Plug Agar. Os resultados indicaram que dos 18 isolados testados, 06 (33,33) % foram produtores de aflatoxina B1 e B2.

A tabela 3 mostra os resultados obtido por dois métodos de avaliação do potencial aflatoxigênico, pelo meio de cultura à base e leite de coco e pela técnica de Plug Agar.

**TABELA 3** Resultado do potencial aflatoxigênico dos isolados da Seção *Flavi*

Isolado	Resultado em meio CAM em 5 dias	Resultado em CCD por Plug Agar em 7 dias
<i>A. flavus</i> 87	-	ND
<i>A. flavus</i> 88	-	ND
<i>A. flavus</i> 91	-	ND
<i>A. flavus</i> 95	+	+
<i>A. flavus</i> 99	-	ND
<i>A. flavus</i> 118	-	ND
<i>A. flavus</i> 141	-	ND
<i>A. flavus</i> 147	+++++	+
<i>A. flavus</i> 153	++	+
<i>A. flavus</i> 154	++	+
<i>A. flavus</i> 182	-	ND
<i>A. flavus</i> 260	-	ND
<i>A. flavus</i> 332	-	ND
<i>A. flavus</i> 334	-	ND
<i>A. flavus</i> 354	+++++	+
<i>A. flavus</i> 355	+++++	+
<i>A. flavus</i> var <i>columnaris</i>	-	ND

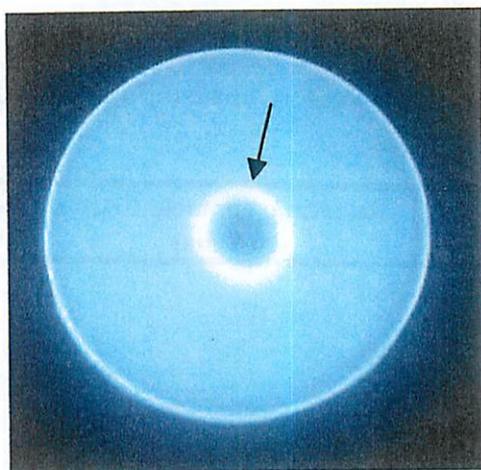
ND = Não Detectada



**FIGURA 4** Aflatoxinas produzidas por isolados de *Aspergillus flavus* var *flavus*

A porcentagem de *A. flavus* produtores de aflatoxinas B1 e B2 está de acordo com Bars e Bars (1999), segundo os quais a porcentagem de isolados não potencialmente aflatoxigênicos varia de 20 a 75%, como ocorre com as demais

Ocorreu uma igualdade nos resultados dos dois métodos utilizados para a avaliação do potencial aflatoxigênico dos isolados testados, sendo que os isolados que apresentaram um fluorescência mais intensa no meio CAM (figura 3) apresentaram um spot mais intenso na placa de CCD, mostrando que a intensidade da fluorescência no meio CAM é proporcional à concentração das aflatoxinas produzidas, apesar do método de Plug Agar utilizado não ser quantitativo, e sim qualitativo.



**FIGURA 3** *Aspergillus flavus* aflatoxigênico em meio CAM, com uma seta indicando a formação e posição da toxina.

A figura 4 mostra o resultado de uma das placas de cromatografia de camada delgada em que foi detectada a produção de aflatoxina B1 e B2 por três isolados (indicados com uma seta) da Seção *Flavi*

As aflatoxinas e o ácido ciclopiazônico podem afetar as atividades neurológicas, embora suas primeiras e significantes funções tóxicas biológicas sejam em outros aspectos da fisiologia animal. A aflatrema é uma micotoxina tremogênica que pode produzir movimentos marcados por tremor no corpo inteiro. O ácido aspergílico não produz tremores em cobaias após a ingestão, mas pode produzir convulsões graves seguidas de morte (Smith e Ross, 1981).

Os 28 isolados de *Aspergillus tamarii* foram testados quanto à produção de aflatoxina B1, B2, G1 e G2, nenhum dos isolados foi produtor da toxina. O *Aspergillus tamarii* isolado do solo foi relatado por produzir aflatoxina B1 e B2 em meio GY por Goto, Wicklow e Ito (1996). Os resultados obtidos neste estudo concordam com os obtidos por Klich e Pitt (1988a).

Uma das características observadas nos isolados de *Aspergillus tamarii* produtores de aflatoxinas foi a produção de escleródios pretos (Goto, Wicklow e Ito, 1996). Dos isolados aqui identificados e testados, nenhum produziu escleródios.

**TABELA 4** Potencial toxigênico dos isolados de *Penicillium* identificadas quanto à produção de ocratoxina A.

Espécies	Número de Isolados Testados	Potencial Toxigênico por Plug Agar
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	05	ND
<i>Penicillium brevecompactum</i>	02	ND
<i>Penicillium citrinum</i>	09	ND
<i>Penicillium corylophilum</i>	01	ND
<i>Penicillium chrysogenum</i>	02	ND
<i>Penicillium expansum</i>	03	ND
<i>Penicillium glabrum</i>	02	ND
<i>Penicillium solitum</i>	01	ND

ND – Não detectada a de Ocratoxina A.

Nenhum dos isolados testados foi produtor de ocratoxina A. Estes resultados concordam Pitt (1987), segundo o qual a única espécie de *Penicillium* produtora de ocratoxina A é o *Penicillium verrucosum*.

As espécies identificadas de *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium aurantiogriseum* (*Penicillium cyclopium*) já foram citados como produtoras de ocratoxina A (Gorst-Alman e Steyn, 1979); entretanto, estes dados não foram confirmados neste estudo.

Todas as espécies de *Penicillium* identificadas neste estudo são produtoras de algum tipo de micotoxinas, algumas menos estudadas, outras descobertas primeiramente como antibióticos, outras sem tanta importância toxigênica e algumas com a toxigenicidade ainda questionada.

A produção de certas micotoxinas pode ser fundamental na identificação de algumas espécies

O *Penicillium citrinum* é o maior produtor de citrinina, uma micotoxina de toxicidade moderada, que em doses prolongadas pode provocar danos aos rins (Pitt e Hocking, 1997), esta espécie pode também produzir aflatoxinas (Moreau, 1979). O efeito da citrinina em humanos não foi documentado, embora danos nos rins parecem estar ligado à ingestão prolongada de alimentos contaminados (ICMSF, 1996b).

A maioria dos isolados de *Penicillium chrysogenum* são produtores de penicilina, meleagrina, roquefortina C e ácido ciclopiazônico (Frisvad e Filtenborg, 1989; Pitt e Hocking, 1997). O ácido ciclopiazônico provoca convulsões em ratos, além de danos nos fígados e nos rins, porém esta toxina não tem sido detectada como um contaminante natural e nem relacionada com doenças em animais; o ácido ciclopiazônico é considerado importante devido a sua extrema toxicidade (Mislivec, 1981)

As principais micotoxinas produzidas por isolados de *Penicillium aurantiogriseum* são o ácido penicílico, verrucosidina, roquefortina C, ácido ciclopiazônico e penitrema A (Frisvad e Filtenborg, 1989; Pitt e Hocking, 1997; Moreau, 1979). A penitrema A é uma toxina neuropática para ratos, aves e porcos (Mislivec, 1981). Algumas variedades desta espécie podem produzir xantomegnina, viomeleina e vioxantina, micotoxinas de potencial nefratóxicos (Frisvad e Filtenborg, 1989).

Durante o processo final de crescimento das colônias, o *Penicillium expansum* pode produzir a roquefortina C, patulina e citrinina (Frisvad e Filtenborg, 1989; Pitt e Hocking, 1997). A patulina é um potente antibiótico que na década de 1940 foi utilizado para fins terapêuticos. Atualmente, apesar dos resultados incertos sobre os seu potencial carcinogênico em humanos, ela pode causar danos nos rins, fígado, pulmão e cérebro de ratos, aves e coelhos (Mislivec, 1981).

Isolados de *Penicillium brevecompactum* podem ser produtores de ácido micofenólicos e breveanamidas (Frisvad e Filtenborg, 1989). O ácido micofenólico é um antibiótico, e não é considerado uma potente micotoxina devido ao seu auto valor de LD<sub>50</sub> para ratos, entretanto, com doses diárias de ácido micofenólicos, alguns ratos chegaram a desenvolver cólica abdominal, diarreia com sangue e perda de peso (Scott, 1981).

O *Penicillium corylophilum* pode ser produtor de citrinina e gliotoxina (Moreau, 1979); entretanto, Pitt e Hocking (1997) relatam que não se tem conhecimento de nenhuma micotoxina produzida por esta espécie.

O *Penicillium solitum* pode ser identificado pela produção de ciclopenina e compactina, entretanto estas micotoxinas não são significantes (Frisvad e Filtenborg, 1989).

A constatação de espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus* associadas a grãos de café beneficiados, e considerando que são espécies comuns no ambiente (Moss, 1977; ICMSF, 1996a), justifica-se a adoção de boas práticas agrícolas e de manejo do produto visando prevenir a sua contaminação, uma vez que a presença de esporos e/ou outros corpos de frutificação dos fungos, em todas as fases de cultivo e preparo do café, é praticamente inevitável. As condições que favorecem o fungo micotoxigênicos a produzir as toxinas são mais restritas do que as condições que favorecem o seu crescimento. Todavia, durante uma prática adequada de cultivo, coleta, secagem e armazenamento, esta situação não ira ocorrer, descartando, assim, os riscos da presença desta micotoxinas.

## 4 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos a partir da determinação do potencial toxigênico das espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, conclui-se:

Dos isolados da seção *Circundati* testados, 74,67% foram produtores de ocratoxina A, representados pelas espécies: *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus elegans*, *Aspergillus insulicola*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus petrakii*, *Aspergillus sclerotiorum* e *Aspergillus sulphureus*:

Dos 41 isolados de *A. ochraceus*, 27 (65,85%) foram produtores de ocratoxina A, apresentando, portanto, um risco potencial, uma vez que fazem parte da microbiota presente associada ao café;

Os isolados de *Aspergillus melleus* e *Aspergillus lanosus* não apresentaram potencial para a produção de ocratoxina A;

Dos isolados de *Aspergillus flavus*, 33,33% foram produtores de aflatoxina B1 e B2.

Os isolados de *Aspergillus tamaris* não apresentaram potencial para a produção de aflatoxinas.

Os isolados de *Aspergillus niger* var *awamori*(18), *Aspergillus niger* var *niger* (07) e *Aspergillus foetidus* (03) não foram produtores de ocratoxina A.

Das espécies de *Penicillium* identificadas e testadas, nenhuma espécie foi produtora de ocratoxina A, sendo que o potencial toxigênico quanto à presença de outras micotoxinas deverá ser investigado.

O meio CAM e a técnica de Plug Agar apresentaram resultados semelhantes para os isolados potencialmente produtores e não produtores de aflatoxinas.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*.. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.7, p.2650-2652, July 1994.
- ALVES, E. **População fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e as fases pré e pós colheita relação com a bebida e local de cultivo**. Lavras: UFLA, 1996. 48p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).
- BARS, L.L.; BARS, P.L. Mycotoxigenic in Grains Application to Mycotoxic Prevention in Coffee. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. Anais... Londrina: IAPAR/IRD, 1999. p.513.
- BULLERMAN, L.B.; SCHROEDER, L.L.; PARK, K.Y. Formation and Control of Mycotoxins in Food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.47, n. 8, p.637-646, Aug. 1984.
- CIEGLER, A. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.18, n.5, p.631-636 May 1972.
- COLE, R.J.; COX, R.H. Ochratoxins. In: **Handbook of toxic fungal metabolites**. Local: Academic Press, 1981. p.128-151.
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C. A simple screening- method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v.13, p.128-130, 1980
- FREITAS, R.F. **Fungos Associados a Grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiado em Diversos Municípios da Região Sul de Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2000. 72p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. Teretricillate Penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. **Mycologia**, New York, v.86, n.6, p.837-861, Nov./Dec. 1989.

- GORST-AL.MAN, C.P. ; STEYN, P.S. Screening methods for the detection of thirteen common mycotoxins. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.175, p. 325-331, 1979.
- GOTO, T.; WICKLOW, D.T.; ITO, Y. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.11, p.4036-4038, Nov. 1996.
- HESSELTINE, C.W.; VANDERGRAFT, E.E.; FENNELL, D.I.; SMITH, M. L.; SHOTWELL, O.L. *Aspergilli* as ochratoxin procedurs. **Mycologia**, v.64, p.539-550, 1972.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. Toxigenic fungi: *Aspergillus*. In: **Microorganisms in Foods, Characteristics of food pathogens**. London: Blakie Academic and Professional, 1996a. p.341-381.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. Toxigenic Fungi: *Penicillium*. In **Microorganisms in foods, characteristics of food pathogens**. London: Blakie Academic and Professional, 1996b. p.397-413.
- KLICH, M.A.; PITT, J.I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. **Transaction British Mycological Society**, Cambridge, v.94. n.1, p.99-108, 1988.
- LIN, M.T.; DIANESE, J.C. A coconut-agar medium rapid detection of Aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v.66, p.1466-1469, 1976.
- MEIRELES, A.M.A. Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais. Lavras: UFLA, 1990. 71p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- MISLIVEC, P. B. Toxic species of *Penicillium* common in food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.44, n.9, p.723-726, Sept. 1981.
- MOREAU, C. *Moulds, toxins e food*. London: John Wiley & Sons 1979.

- MOSS, M.O. *Aspergillus* mycotoxins. In: SMITH, J.E.; PATEMAN, J.A. (eds). **Genetics and physiology of *Aspergillus***. New York: Academic Press, 1977. 494p.
- MOSS, M.O. Recent Studies of Mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology Symposium**, Oxford, v.84, p.62S-76S, 1998. Supplement.
- NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M.; UENO, Y. Survey of Aflatoxin B 1 and Ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, Oxon, n.9, p.77-83, 1997.
- PIÑEIRO, M.S. Diferenciación entre hongos toxicogénicos y atoxicogénicos. In: **SOCIEDADE LATINO AMERICANA DE MICOTOXICOLOGIA MICOTOXINAS - PERSPECTIVAS LATINOAMERICANAS**, 1996, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: UFRRJ, 1996. p.28-31
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 2.ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.; GLENN, D.R.N. A improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.54, p.109-114, 1983.
- PITT, J.I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production Ochratoxin A **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n.2, p.266-269, 1987
- SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4.ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 1995. p.322
- SCOTT, P.M. Toxins of *Penicillium* Species Used in Cheese Manufacture. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.44, n.9, p.702-710, Sept. 1981.
- SCOTT, P.M.; WALBEEK, W.V.; KENNEDY, B.; ANYETI, D. Mycotoxins (Ochratoxin A, Citrinin, and Sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.20, n.6, p.1103-1109, Nov./Dec. 1972.

SMITH, J.E.; ROSS, K. The Toxigenic *Aspergilli*. In: SMITH, J.E.; henderson, R.S. (eds). **Mycotoxin and animal foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.101-118.

STACK, M.E.; MISLIVEC, P.B.; DENIZEL, T.; GIBSON, R.; POHLAND. Ochratoxins A and B, Xanthomegnin, Viomellein and Viiioxanthin production by isolates of *Aspergillus ochraceus* from green coffee beans. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.46, n.11, p.965-968, 1983.

VARGA, J.; KEVEL, E.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin Production by *Aspergillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62. n.12, p.4461-4464, Dec. 1996.

## **CAPÍTULO 4**

### **OCRATOXINA A EM GRÃOS DE CAFÉ BENEFICIADOS, OCORRÊNCIA E SUA RELAÇÃO COM A PRESENÇA DE FUNGOS TOXIGÊNICOS E COM O PADRÃO DA BEBIDA**

#### **RESUMO**

**BATISTA, L. R. Ocratoxina A em Grãos de Café Beneficiados, Ocorrência e sua Relação com a Presença de Fungos Toxigênicos e com o Padrão da Bebida.** Lavras: UFLA, 2000. (Dissertação-Mestrado em Ciência dos Alimentos).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a distribuição da ocratoxina A em grãos de café provenientes de diferentes municípios produtores da região Sul do Estado de Minas Gerais, comparar a presença da toxina com a qualidade da bebida previamente classificada de acordo com o resultado obtido a partir da polifenoloxidase e avaliar a presença de fungos potencialmente ocratoxigênicos e a presença de ocratoxina A. Das 40 amostras analisadas, 12,5% estavam contaminadas com níveis que variaram de 0,47 a 4,82 ng/g, com uma média de 2,45 ng/g. Levando em consideração que não ocorra perda da toxina durante a torração dos grãos de café, os níveis de contaminação representam apenas 5,87% do limite permitido pela FAO. Verificou-se ainda uma relação entre a ocorrência da ocratoxina e diferentes padrões qualitativos da bebida, indicando que a política de melhoria do padrão qualitativo do café reduz também o risco de contaminação por micotoxinas.

---

Comitê Orientados: Dr<sup>a</sup> Sara Maria Chalfoun – EPAMIG (Orientadora)  
Ms Guilherme Prado – FUNED – (Co-orientador)

## ABSTRACT

**BATISTA, L. R. Ochratoxin A in grains coffee beans, Occurrence and its Relationship to the Presence of Toxigenic Fungi and to the Beverage, Standard.** Lavras: UFLA, 2000. (Dissertation of Master's degree in Food Science).

The present study was conducted to evaluate the distribution of ochratoxin A in coffee beans coming from different coffee growing towns in the South Region of Minas Gerais state, to compare the presence of the toxin to the quality of the beverage previously classified according to the result obtained from polyphenoloxidase and evaluate the presence of potentially ochratoxigenic fungi and the presence of ochratoxin A. Out of the 40 samples analyzed, 12,5% were contaminated with levels ranging from 0,47 to 4,82 ng/g, with a mean of 2,45 ng/g. Taking into consideration that no loss of the toxin occurs during the toasting of coffee beans, the levels of contamination represent only 5,87 % of the limit allowed by the FAO. Relationship of ochratoxin A and different qualitative standards of the beverage was still found, denoting that the policy of improvement on the qualitative standard of coffee also decrease the risk of contamination by mycotoxins

---

Guidance Committee: Ds Sara Maria Chalfoun – EPAMIG (Adviser)

Ms Guilherme Prado – FUNED – (Co-adviser)

## 1 INTRODUÇÃO

Os estudos sobre ocratoxina A em grãos de café tiveram início em 1974 com Levi, Trenk e Mohr. Neste primeiro estudo, a metodologia usada para detectar ocratoxina em cevada, utilizando Cromatografia de Camada Delgada, foi modificada para a detecção da toxina em grãos de café. Desde então, várias metodologias e métodos têm sido usados para avaliar a presença de ocratoxina A em grãos e produtos do café. Atualmente, a metodologia mais precisa é baseada na extração com solventes orgânicos, uma purificação da toxina com coluna de imunoafinidade e a detecção e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE. A maior vantagem do uso de colunas de imunoafinidade para a purificação na análises de micotoxinas é a habilidade de extrair essencialmente a toxina produzida em diferentes matrizes, obtendo altas recuperações e produzindo um cromatograma livres de interferentes (Sharman, MacDonald e Gilbert, 1992).

A ocratoxina A presente em amostras de grãos de café é o resultado de dois tipos de contaminação: O primeiro como consequência do crescimento dos fungos produtores da toxina diretamente nos grãos e o segundo, mais recentemente comprovado, é a absorção da toxina presente no solo pelas raízes da planta do café, transportando para os frutos. Os principais fungos produtores de ocratoxina A e que são frequentemente isoladas de grãos de café são do gênero *Aspergillus*, com as espécies pertencentes às Seções *Circundati* e *Nigri* e o gênero *Penicillium*, representado principalmente pela espécie *Penicillium verrucosum*. Todavia, o conhecimento de como e onde ocorre a contaminação e produção da micotoxina ainda não foi totalmente esclarecido. Mantle (2000) demonstrou a possibilidade de que a presença de traços e quantidades superiores a 1 ppb de ocratoxina A [ $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ] podem ser absorvidas do solo pela árvore do café até o fruto. Sendo assim, a presença no solo de substrato favorável à

colonização dos fungos pode contribuir para presença da toxina em grãos de café.

Os dados sobre ocratoxina A em grãos e produtos do café, ainda que poucos, mostram-se favoráveis, com poucas amostras contaminadas e teores baixos de ocratoxina A e aflatoxinas. Um dos fatores que podem contribuir para estes baixos níveis de contaminação são os grãos de café, que parecem ser um pobre substrato para a produção de ocratoxina (Mantle e Chow, 2000). A ingestão, calculada com base na contaminação média em café verde e assumindo que não haja perdas durante o processamento, corresponderia a 6% da Ingestão Semanal Tolerável Provisória (ISTP) estabelecida pela FAO para ocratoxina A (Soares, 1999).

Visando contribuir com o levantamento de resultados sobre a presença de ocratoxina A em grãos de café, o presente estudo teve como objetivos:

Avaliar a incidência de ocratoxina A em grãos de café cru;

Estudar a distribuição da ocratoxina A em amostras naturalmente contaminadas.

Comparar a presença de ocratoxina A com a qualidade da bebida, previamente classificadas de acordo com o resultado obtidos a partir de análises químicas (polifenoloxidase);

Avaliar a presença de fungos ocratoxigênicos e a concentração de ocratoxina A.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

As amostras de 11 municípios localizados na região Sul do Estado de Minas Gerais foram coletadas na EPAMIG/CTSM-Lavras-MG. Foram analisadas 40 amostras de grãos de café verdes, classificado em diferentes padrões de bebida.

As análises de ocratoxina A foram conduzidas em duas etapas, em dois laboratório diferentes; a extração e a purificação da toxinas foram realizadas no Laboratório da EPAMIG/CTSM de Lavras-MG e a detecção e quantificação e confirmação da toxina por CLAE foi feita no laboratório de Micotoxinas da Fundação Ezequiel Dias -Belo Horizonte - MG.

Para a determinação de ocratoxina A em grãos de café verdes, foi utilizada a metodologia do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (Brasil..., 1999), até a etapa de purificação da toxina; as etapas de detecção e quantificação foram de acordo com Pittet et al. (1996). Esta alteração na metodologia do Ministério da Agricultura e do Abastecimento foi necessária para obter uma recuperação acima de 70%.

Com as alterações realizadas na metodologia, o processo de extração, purificação, detecção e quantificação utilizado neste estudo ficou como descrito posteriormente.

#### **Preparação das amostras**

Cerca de 300 a 500g de cada amostra foram trituradas e homogeneizadas.

### **Extração:**

Pesaram-se 25 gramas de grãos de café finamente trituradas em um erlenmeyer de 500mL e adicionados 200mL da mistura metanol-bicarbonato de sódio 3% (1:1), agitando por 20 minutos em agitador mecânico. Filtrou-se em papel Whatman 4 pregueado; o filtrado foi recolhido e filtrado novamente através de papel de filtro GF/β de microfibras de vidro de 55 mm de diâmetro, com auxílio de pressão reduzida (vácuo). Cinco mililitros do segundo filtrado (que representa 0,625g da amostra) foram transferidos para um balão de 100mL e diluídos até 100mL com solução tampão fosfato (PBS).

### **Purificação:**

A purificação foi realizada com colunas de imunoafinidade (Ochrates-Vicam) através de um fluxo de 2-3mL/min. Após a eluição de toda a amostra, foram colocados 4 mL de metanol grau HPLC em uma seringa, deixando de 6-7 minutos o metanol em contato com a coluna. Após esta eluição, evaporou-se o eluato da amostra com aquecimento (40°C) e nitrogênio até secar. A amostra foi ressuspensa imediatamente em 1 mL da fase móvel (420 mL de acetonitrila – 580 mL de tampão acetato) e agitada em ultrassom. As amostras foram filtradas em membrana 0,45 μm para solventes orgânicos e injetadas no Cromatógrafo Líquido.

### **Quantificação por CLAE**

Condições do equipamento: Conjunto HPLC Shimadzu, Coluna Spherisorb ODS, 5 μm x 4,6 mm; Pré-coluna ODS Hyperesil 5μm, 25 mm x 4,6mm, detector de fluorescência excitação λ = 330 nm a λ = 470 nm, o volume de injeção 100μL com fluxo de 1mL por minuto. Nestas condições, o tempo de retenção foi aproximadamente 15,6 minutos. Todos os solventes utilizados foram os recomendados para HPLC. O pH da fase móvel variou de 3,3 a 3,4.

### **Confirmação da ocratoxina A pela formação de derivados**

Transferir 100  $\mu\text{L}$  do extrato da amostra para um frasco de 2 mL e evaporar até securo em atmosfera de nitrogênio (40 °C). Transferir igualmente 100  $\mu\text{L}$  da solução padrão de ocratoxina A de concentração 0,0025 ng/mL para um outro frasco de 2 mL e evaporar até securo com corrente de nitrogênio (40 °C). Adicionar em cada um dos frascos 300  $\mu\text{L}$  de uma solução de Trifluoreto de Boro a 14% em metanol. Agitar vigorosamente por 1 minuto e aquecer a 80 °C por 10 minutos. Esfriar à temperatura ambiente. Injetar 100  $\mu\text{L}$  de cada extrato derivatizado (padrão e amostra) no cromatógrafo líquido nas mesmas condições da quantificação de ocratoxina A. A confirmação será considerada positiva pelo desaparecimento do pico de ocratoxina A no tempo de retenção de cerca de 15-16 minutos e aparecimento de um novo pico ( éster metílico de ocratoxina ) no tempo de retenção de cerca de 43-44 minutos.

Após a injeção de cada solução padrão nas concentrações 1,68  $\mu\text{g/Kg}$ , 3,36  $\mu\text{g/Kg}$ , 6,72 $\mu\text{g/Kg}$  e 13, 46 $\mu\text{g/Kg}$  para traçar a curva padrão. Em seguida foram injetados 100 $\mu\text{L}$  das amostras.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Porcentagem de Recuperação da Metodologia**

Com a modificação realizada na metodologia do Ministério da Agricultura (Brasil...,1999) a partir da detecção e quantificação em CLAE, foi possível obter uma recuperação acima de 70%, como mostra a tabela 1. Um outro fator importante que auxiliou para obter este nível de recuperação foi a utilização de colunas de imunoafinidade na etapa de purificação. Pela figura 1, é possível observar a alta seletividade da coluna de imunoafinidade, na qual não é detectada a presença de picos interferentes próximos ao tempo de retenção da ocratoxina A.

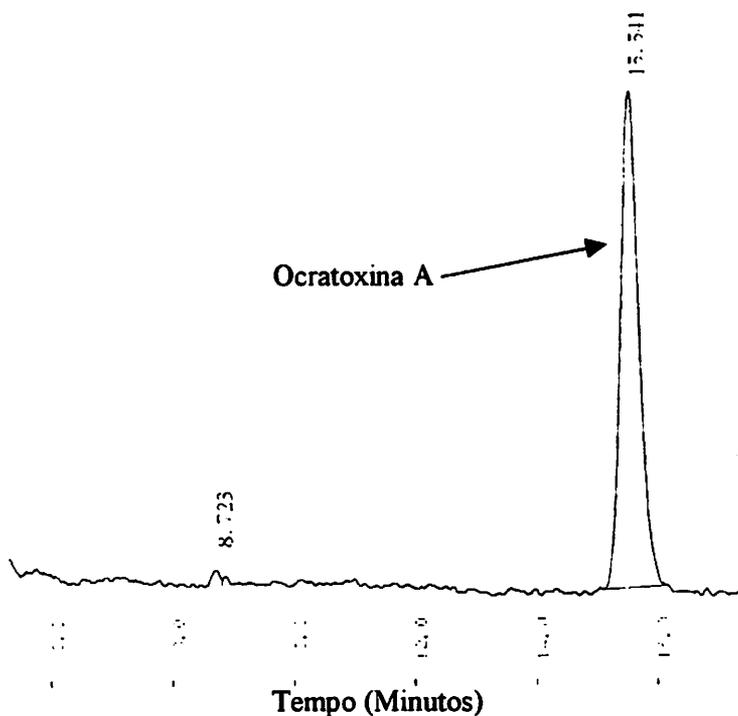
As recuperações obtidas com a presente metodologia variaram de 79,6 a 90,50%, com uma média de 82,64%. Os níveis de recuperação ficaram bem próximo dos obtidos por Terada et al. (1986) e Trucksess et al. (1999), ambos analisando ocratoxina A em grãos de café, e obtiveram 81,5 e 88,33%, respectivamente, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Apesar da ótima recuperação obtida neste estudo as amostras 15 e 37 apresentaram um coeficiente de variação superior a 30%, sendo 32,80 e 35,40%, respectivamente. Este valor de coeficiente de variação acima de 30% tem sido encontrado em outros estudos ( Studer-Rohr et al., 1995; Blanc et al., 1998). Isto ocorre pelo fato de serem poucos os grãos infectados por fungos potencialmente produtores em um saco de café. Com esta falta de homogeneidade, há necessidade de um alto número de análises da mesma amostra em sequência para quantificar o grau de contaminação com ocratoxina A. Em amostras altamente contaminadas, a contaminação com ocratoxina A é mais homogênea (Studer-Rohr et al., 1995).

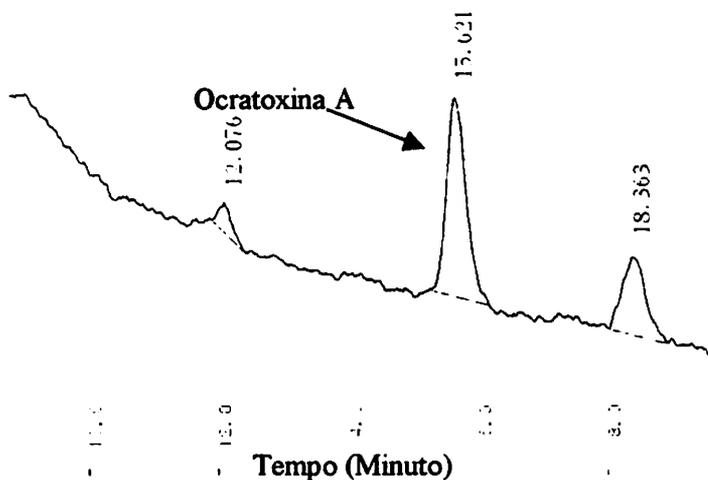
**TABELA 1** Resultados das concentrações da Curva padrão e da Porcentagem de Recuperação

Nível de contaminação em µg/Kg	Nível de contaminação detectada em µg/Kg	Média	Porcentagem de recuperação	Desvio padrão	Coefficiente de variação
	1,49				
1,68	1,48	1,52	90,50	0,061	
	1,59				
	2,84				
3,36	2,86	2,73	81,00	0,21	7,8
	2,48				
	5,14				
6,73	5,17	5,38	80,00	0,39	7,3
	5,84				
	10,26				
13,46	10,68	10,63	79,06		
	10,96				

(a)



(b)



**FIGURA 1.** Cromatograma obtido por CLAE, em (a) padrão de ocratoxina A (62,5 pg) e em (b) amostra de grãos de café deneficiado, naturalmente contaminado (4,84ng/g)

### **3.2 Distribuição de ocratoxina A em amostras naturalmente contaminadas**

Os resultados da tabela 2 mostram que das 40 amostras analisadas, 12,5% (05) apresentaram contaminação com ocratoxina A em concentrações que variaram de 0,64 a 4,14 ng/g, com uma média dos valores positivos de 2,45 ng/g. Estes resultados refletem os obtidos por Trucksess et al. (1999), que detectaram níveis de 0,1 a 4,6 ng/g de ocratoxina A em grãos de café em 9 das 19 amostras. Nakajima et al. (1997) detectaram a presença de ocratoxina A em 14 da 47 amostras analisadas com uma média de 2,6 ng/g. Micco et al. (1989) ao analisar 14 amostras brasileiras observaram que, 10 apresentaram contaminação que variou de 0,2 a 5,5 com uma média de 2,03 ng/g. Dados colhidos pela UNICAMP, de 142 amostras de grãos de café verde analisadas no Brasil, mostram uma contaminação média de 2,4 ng/g. A média de contaminação de ocratoxina A encontrada neste estudo está de acordo com os resultados obtidos em pesquisas no exterior e no Brasil. Entretanto, a porcentagem de amostras contaminadas foi inferior às obtidas por Nakajima et al. (1997), Micco et al. (1989) e Trucksess et al. (1999).

Em nenhuma das amostras analisada foi detectado um valor de contaminação de ocratoxina acima de 5,0 ng/g (valor proposto pelas legislações europeias para grãos de café e cereais).

**TABELA 2** Distribuição de ocratoxina A em amostras de grãos de café beneficiados

Amostra	Níveis de contaminação	Média de contaminação	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
1 - 14	ND ND ND			
15	0.47 0.56 0.94 0.54	0.64	0.21	32.80%
16 - 17	ND ND ND			
18	1.94 1.72 3.12 3.1	2.47	0.74	29.90%
19 - 29	ND ND ND			
30	3.66 3.94 4.82	4.14	0.60	14.50%
31 - 36	ND ND ND			
37	1.87 1.57 0.88	1.44	0.51	35.40%
38	ND ND ND			
39	4.20 3.53 2.94	3.55	0.63	17,7%
40	ND ND ND			

ND = Não detectado, Limite de Detecção do Método = 0,2ng/g e o limite de Quantificação do método = 0,6ng/g.

### 3.3 Distribuição de ocratoxina A em grãos de diferentes qualidades

A tabela 3 mostra os resultados da comparação da qualidade dos grãos com os níveis de contaminação de ocratoxina A. A contaminação com

ocratoxina foi mais freqüente em amostras classificadas como duro e riado do que nas amostras mole, apenas mole e estritamente mole. As amostras classificadas como duro e riado apresentam um maior número de grãos com defeitos e, conseqüentemente, uma maior possibilidade de contaminação com fungos toxigênicos. Sendo assim a presença de ocratoxina A nestas amostras já é esperada devido a sua qualidade inferior e, principalmente, se houver condições favoráveis. Inesperadamente, uma amostra classificada como estritamente mole apresentou um nível de contaminação de 4,14 ng/g. Este resultado não é esperado, uma vez que os mesmos fungos que produzem as micotoxinas são os responsáveis por alterações indesejáveis na qualidade organoléptica do café.

**Tabela 3. Relação entre a qualidade dos grãos e a presença de ocratoxina A.**

<b>Qualidade dos Grãos</b>	<b>N. de amostras</b>	<b>N. de amostras contaminadas</b>	<b>Média de contaminação</b>
Estritamente mole	07	01	4,14 ng/g
Mole	02	00	-----
Apenas Mole	03	00	-----
			0,64ng/g
Duro	20	03	1,44 ng/g
			3,55 ng/g
Riado	08	01	2,47 ng/g

### **3.4 Distribuição de ocratoxina A e presença dos fungos potencialmente ocratoxigênicos**

Os dados da tabela 4 mostram que das 40 amostras analisadas, em 57,5% (23) foi detectada a presença de fungos da Seção *Circundati*, potencialmente produtores de ocratoxina A. Como nas demais culturas o café também está

sujeito à contaminação com fungos produtores de toxina, a presença dos fungos foi independente da qualidade.

Em 45% (18) das amostras, foi detectada a presença dos fungos potencialmente toxigênicos, mas não a presença da ocratoxina A. Isto ocorre pois os fungos não encontraram condições ideais para a produção da toxina. Ao longo do processamento, os fungos não foram capazes de quebrar uma resistência natural que o café possui, como a cafeína e o ácido tânico.

**Tabela 4. Relação entre os níveis de contaminação de ocratoxina A e a presença de fungos potencialmente ocratoxigênicos A.**

<b>Amostra</b>	<b>Média de contaminação (ng/g)</b>	<b>Presença de fungos potencialmente ocratoxigênicos</b>
1)	ND	01 (01 <i>Aspergillus sulphureus</i> )
2)	ND	00
3)	ND	03 (02 <i>Aspergillus ochraceus</i> ) (01 <i>Aspergillus sclerotiorum</i> )
4)	ND	02 (01 <i>Aspergillus elegans</i> ) (01 <i>Aspergillus sulphureus</i> )
5)	ND	00
6)	ND	02 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i> )
7)	ND	03 (02 <i>Aspergillus ochraceus</i> ) ( 01 <i>Aspergillus petrakii</i> )
8)	ND	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i> )
9)	ND	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i> )
10)	ND	00
11)	ND	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i> )
12)	ND	00
13)	ND	00
14)	ND	00
15)	0,64	02 (01 <i>Aspergillus sulphureus</i> ) (01 <i>Aspergillus insulicola</i> )
16)	ND	00
17)	ND	00
18)	2,47	03 (02 <i>Aspergillus ochraceus</i> ) (01 <i>Aspergillus sulphureus</i> )
19)	ND	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i> )
20)	ND	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i> )
21)	ND	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i> )
22)	ND	01 (01 <i>Aspergillus elegans</i> )
23)	ND	00
24)	ND	00
25)	ND	01 ( <i>Aspergillus sulphureus</i> )
26)	ND	01 ( <i>Aspergillus ochraceus</i> )
27)	ND	03 ( <i>Aspergillus ochraceus</i> )
28)	ND	00
29)	ND	00
30)	4,14	02 (01 <i>Aspergillus auricomus</i> ) (01 <i>Aspergillus ochraceus</i> )
31)	ND	00
32)	ND	00
33)	ND	00
34)	ND	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i> )
35)	1,44	05 (05 <i>Aspergillus ochraceus</i> )
36)	ND	00
37)	3,55	01 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i> )
38)	ND	00
39)	ND	03 (01 <i>Aspergillus ochraceus</i> ) (01 <i>Aspergillus sulphureus</i> ) (01 <i>Aspergillus sclerotiorum</i> )
40)	ND	02 (02 <i>Aspergillus sulphureus</i> )

Em 12,5% (5) amostras foi detectada a presença da toxina e de fungos potencialmente toxigênicos. Isto mostra que em alguma fase do processamento, os fungos encontraram condições ideais para a produção da toxina, quebrando, assim, uma resistência natural que o café possui. Alguns isolados de *Aspergillus ochraceus* são capazes de degradar a cafeína e produzir a ocratoxina A (Tsubouchi et al. 1985)

Os baixos níveis de ocratoxina A encontrados nas amostras de grãos de café e a alta porcentagem de fungos potencialmente toxigênicos presentes mostram que o café não é um substrato favorável à produção de ocratoxina e a presença destes fungos não indica necessariamente a presença da ocratoxina A.

### **3.5 Riscos de intoxicação ao consumidor com relação às amostras analisadas**

De acordo com o JECFA um nível seguro aceitável de ocratoxina A é de 100 ng/peso corpóreo/semana cerca de 14,3 ng/peso corpóreo/dia (Soares, 1999). Para uma pessoa de 60 Kg isso significa aproximadamente 857 ng/dia. Se levarmos em consideração que não ocorra perda de ocratoxina A durante a torração e o preparo da bebida do café, para um consumidor de 60 Kg que consome 4 xícaras de café por dia (24 g de café torrado), que é o consumo *per caput* nos países europeus (Stegen et al. 1997), e considerando o valor médio encontrado neste estudo, 2,45 ng/g, a ingestão de ocratoxina A corresponderia a 58,8ng/dia. Dessa maneira, as amostras de grãos de café após a torração iriam contribuir com cerca de 6,85% do limite permitido pelo JECFA.

No Brasil, o consumo *per caput* de café é de 3 a 4 xícaras, cerca de 25g de café torrado e moído. Considerando um adulto brasileiro de 70 Kg, este adulto teria um consumo diário de 61,25 ng/dia, o que corresponderia a 6,12% do limite permitido pelo JECFA.

Estes resultados refletem os obtidos na revisão feita por Soares (1999), segundo a qual a ingestão calculada com base na contaminação média de café verde consumida no Brasil, levando em consideração que não haja perdas durante a torração, corresponderia a 6% do nível estabelecido pela FAO.

O JECFA, diante do problema de ocratoxina A em café, questiona se a ingestão de ocratoxina A em café é significativa para o consumidor a ponto de merecer limites específicos (Soares, 1999).

Com relação aos resultados obtidos neste estudo, os grãos de café não são a maior fonte de ocratoxina A na dieta dos consumidores, contribuindo com aproximadamente 6% do limite permitido pelos órgãos fiscalizadores (FAO e JECFA).

## 4 CONCLUSÕES

Com relação aos resultados obtidos a partir das análise de ocratoxina A em grãos de café verde, conclui-se:

Das amostras analisadas, 57,5% apresentaram-se associadas com fungos potencialmente toxigênicos;

Os níveis de ocratoxina A encontrados em 12,5% das amostras analisada variaram de 0,64 a 4,14 ng/g em médias;

A baixa relação entre amostras contaminadas com ocratoxina A e amostras apresentando associadas com fungos toxigênicos comprova a exigência de condições mais rigorosas para que ocorra a toxigênese em relação ao desenvolvimento dos fungos;

A presença de ocratoxina A foi mais freqüente em amostras de qualidade duro e riado do que em amostras estritamente mole, mole e apenas mole;

A presença dos fungos potencialmente toxigênicos não indicou a presença de ocratoxina A nas mesmas amostras;

Os níveis de ocratoxina A encontrados neste estudo representam aproximadamente 6,12% do consumo diário permitido pelo JECFA, mostrando que os grãos de café não são os responsáveis pela maior fonte na dieta de ocratoxina A.

As amostras de grãos de café apresentaram níveis seguros de contaminação de ocratoxina A.

## 4.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A distribuição qualitativa uniforme da microbiota entre os municípios estudados indica que as variações quanto aos índices de contaminação devem estar relacionadas com diferenças nas condições ambientais e de manejo da cultura entre localidades. Os fungos identificados fazem parte da contaminação externa e interna dos grãos, que irão se desenvolver a partir do momento em que as condições ambientais estejam favoráveis. A presença de fungos potencialmente produtores de ocratoxina A não indica necessariamente que as amostras de grãos de café beneficiado possam estar contaminadas com a toxina. Este potencial toxigênico irá depender de fatores extrínsecos como temperatura, atividade de água, composição química do substrato, interação com outros microrganismos e outros

Os baixos níveis de ocratoxina A constatados nas amostras analisadas, apesar da presença dos fungos potencialmente ocratoxigênicos, justificam-se pela própria composição química dos grãos de café, pelo teor de umidade ideal para o armazenamento adverso ao desenvolvimento dos fungos e à toxigênese, bem como pelos cuidados adotados visando a preservação da qualidade nas fases de colheita e preparo.

Tais fatos sugerem ser o café de boa qualidade uma fonte para a dieta pouco significativa quanto ao fornecimento de micotoxinas, entre elas a ocratoxina A.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

- BLANC, M.; PITTET, A.; MUÑOZ-BOX, R.; VIANI, R. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, n.2, p. 673-675, Feb. 1998.
- BRASIL. Decretos e Leis. **Metodologia analítica para determinação de Ocratoxina A por cromatografia líquida de alta eficiência**, DIÁRIO OFICIAL DA REPUBLICA FEDERATIVA DO BRASIL, Brasília, n. 138, 46-47, jul. 1999.
- LEVI, C.P.; TRENK, H.L.; MOHR, H. K. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v. 57, n.4, p.866-870, 1974.
- MANTLE, P.G. Uptake of radiolabelled ochratoxin A from soil by coffee plants. **Phytochemistry**, St. Paul, v.53, n.4, p.377-378. Apr. 2000.
- MANTLE, P.G; CHOW, A.M. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.56, p.105-109, 2000.
- MICCO, C.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C. A study the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, Hants, v.6, n.3, p.333-339, 1989.
- NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M.; UENO, Y. Survey of Aflatoxin B 1 and Ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity Chromatography. **Food and Agricultural Immunology**, Oxon, n.9, p.77-83, 1997.
- PITTET, A.; TORNARE, D.; HUGGETT, A.; VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated

soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v.44, n.11, p.3564-3569, 1996.

SHARMAN, M.; MacDONALD, S.; GILBERT, J. Automated Liquid Chromatographic Determination of Ochratoxina A in Cereals and Animal Products Using Immunoaffinity Column Clean-up. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.603, p.285-289, 1992.

SOARES, L.S. Ocratoxinas e aflatoxinas em café brasileiro. In: SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/IRD, 1999. p. 447-452.

STEGEN, G.V.D; JÖRISSEN, U.; PITTET, A.; SACCON, M.; STEINER, W. VINCENZI, M.; WINKLER, M.; ZAPP, J.; SCHLATTER, CHR. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). **Food Additives and Contaminants**, Hants, v.14, n.3, p.211-216, 1997.

STUDER-ROHOR, I.; DIETRICH, D.R.; SCHLATTER, J.; SCHLATTER, C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food Chemistry and Toxicology**, Oxford, v.33, n.5, p.341-355, 1995.

TERADA, H.; TSUBOUCHI, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in coffee beans e coffee products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v.69, n.6, p.960-964, 1986.

TRUCKSESS, M. W., GILER, J., YOUNG, K., WHITE, K. D., e PAGE, S. W. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee-1997. SCOTT, P.B. Note on Analysis of Aflatoxins in Green Coffee. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v. 82, n.1, p.85-89, 1999.

TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE. Caffeine degradation e increased ochratoxin A production by toxigenic strains of *Aspergillus ochraceus* isolated from green coffee beans. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.90, p.181-186, 1985.

## **ANEXOS**

**ANEXO A**

**Meios de Cultura**

**Página**

**182**

## ANEXOS A

Meios de cultura utilizados para o isolamento e na identificação dos fungos e do potencial toxigênico.

### Solução concentrada de Czapek com traços de metais (Klich e Pitt, 1988)

NaNO <sub>3</sub>	30,0 g
KCl	5,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,0 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,05 g
Água destilada	100,0 mL

### CYA (Czapek Yeast Extract Agar) (Klich e Pitt, 1988)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
Solução concentrada de Czapek	10,0 mL
Extrato de Levedura	5,0 g
Sacarose	30,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1,0 L

### CYA20S (Czapek Yeast Extract Agar com 20% de sacarose) (Klich e Pitt, 1988)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
Solução concentrada de Czapek	10,0 mL
Extrato de Levedura	5,0 g
Sacarose	200,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1,0 L

**MEA (Malte Extract Agar) (Klich e Pitt, 1988)**

Extrato de Malte	20,0 g
Peptona	1,0 g
Glucose	20,0 g
Agar	20,0 g
Água destilada	1 L

**AFPA (*Aspergillus flavus e parasiticus* Agar)**

Peptona	10,0 g
Citrato de ferro amoniacal	0,5 g
Extrato de Levedura	20,0 g
Dicloran	2 mg
	(ou 1,0 mL da solução 0,2% em etanol)
Clorofenicol	100 mg
Agar	15 g
Água destilada	1 L

**MA (Malt Agar)**

Extrato de Mate	20,0 g
Agar	20,0 g
Água destilada	1 L

**YES (Yeast Extract Sucrose)**

Extrato de levedura	20,0 g
Sacarose	150,0 g
Agar	20,0 g
Água destilada	1 L

**CAM (Cocconut Agar Medium) (Lin e Dianese, 1976)**

Frasco de leite de coco	200,0 mL
Agar	15,0 g
Água destilada	1 L

## ANEXO B - Seção de fotos

Página

Figura 1 Colônias de <i>Aspergillus ochraceus</i> em meio CYA.....	181
Figura 2 Colônias de <i>Aspergillus petrakii</i> em meio CYA.....	181
Figura 3 Colônias de <i>Aspergillus sulphureus</i> em meio CYA.....	181
Figura 4 Colônias de <i>Aspergillus melleus</i> em meio CYA.....	182
Figura 5 Colônias de <i>Aspergillus lanosus</i> em meio CYA.....	182
Figura 6 Colônias de <i>Aspergillus insulicola</i> em meio CYA.....	182
Figura 7 Colônias de <i>Aspergillus elegans</i> em meio CYA.....	183
Figura 8 Colônias de <i>Aspergillus ostianus</i> em meio CYA.....	183
Figura 9 Colônias de <i>Aspergillus auricomus</i> em meio CYA.....	183
Figura 10 Colônias de <i>Aspergillus niger var niger</i> em meio CYA.....	184
Figura 11 Colônias de <i>Aspergillus foetidus</i> em meio CYA.....	184
Figura 12 Colônias de <i>Aspergillus niger var awamori</i> em meio CYA.....	184
Figura 13 Colônias de <i>Aspergillus sydowii</i> em meio CYA.....	185
Figura 14 Colônias de <i>Aspergillus versicolor</i> em meio CYA.....	185
Figura 15 Colônias de <i>Aspergillus flavus var flavus</i> em meio CYA.....	185
Figura 16 Colônias de <i>Aspergillus tamarii</i> em meio CYA.....	186
Figura 17 Colônias de <i>Eurotium amstelodami</i> em meio CYA20S.....	186
Figura 18 Colônias de <i>Eurotium chevalieri</i> em meio CYA20S.....	186
Figura 19 Colônias de <i>Penicillium glabrum</i> em meio CYA.....	187
Figura 20 Colônias de <i>Penicillium citrinum</i> em meio CYA.....	187
Figura 21 Colônias de <i>Penicillium brevicompactum</i> em meio CYA.....	187
Figura 22 Colônias de <i>Penicillium crysogenum</i> em meio CYA.....	188
Figura 23 Colônias de <i>Penicillium expansum</i> em meio CYA.....	188
Figura 24 Colônias de <i>Penicillium solitum</i> em meio CYA.....	188

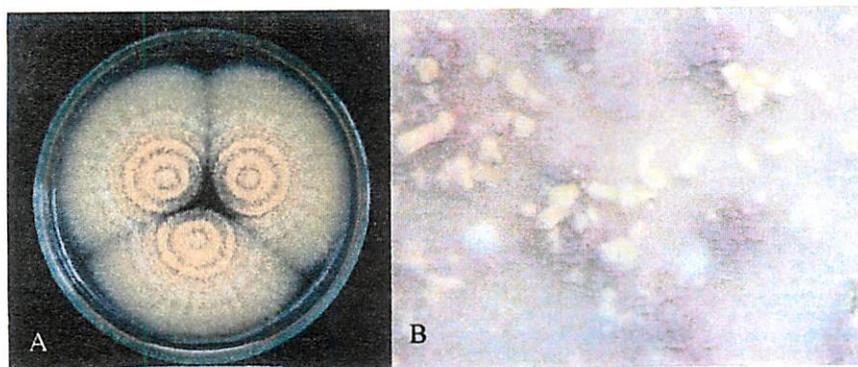


Figura 1. Em A colônia de *Aspergillus ochraceus* meio CYA, após 7 dias de incubação a 25°C. Em B os escleródios rosa a púrpuro produzidos pela maioria das espécies identificadas

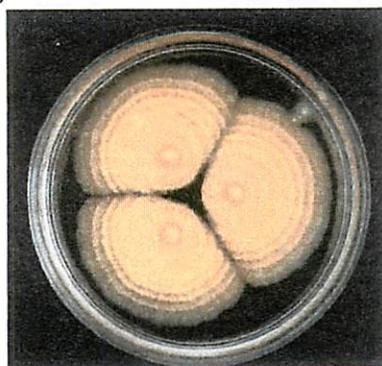


Figura 2. Colônia de *Aspergillus petrakii* meio CYA, após 7 dias de incubação a 25°C.

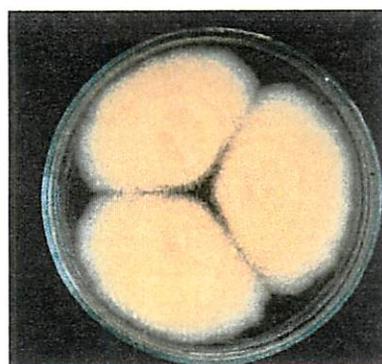


Figura 3. Colônia de *Aspergillus sulphureus* meio CYA, após 7 dias de incubação a 25°C.

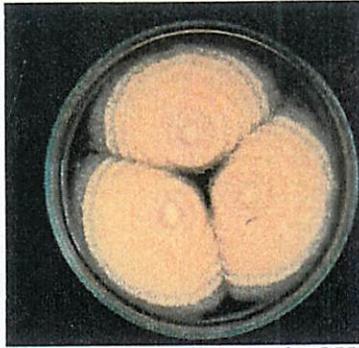


Figura 4. Colônia de *Aspergillus melleus* meio CYA, após 7 dias de incubação a 25°C.

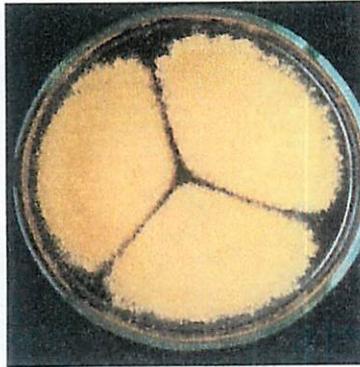


Figura 5. Colônia de *Aspergillus lanosus* meio CYA, após 7 dias de incubação a 25°C

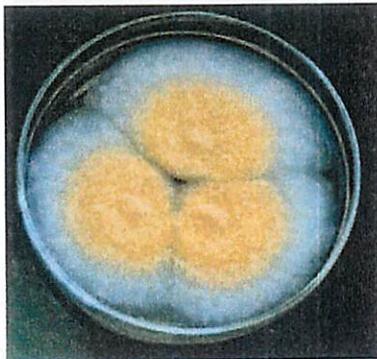


Figura 6. Colônia de *Aspergillus insulicola* meio CYA, após 7 dias de incubação a 25°C

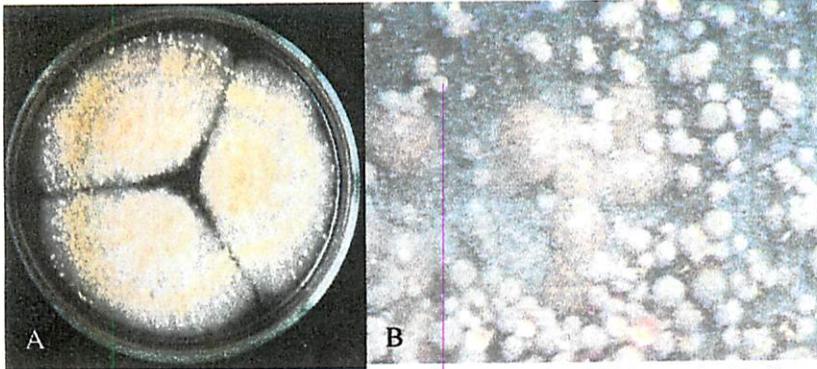


Figura 7. Em A colônia de *Aspergillus elegans* meio CYA, após 7 dias de incubação a 25°C. Em B os escleródios produzidos pelos isolados.



Figura 8. Colônia de *Aspergillus ostianus* meio CYA, após 15 dias de incubação a 25°C



Figura 9. Colônia de *Aspergillus auricomus* meio CYA, após 15 dias de incubação a 25°C

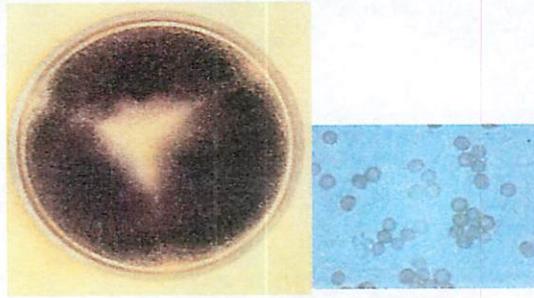


Figura 10. Colônia de *Aspergillus niger* var *niger* em meio CYA, após 7 dias de incubação, na foto menor os esporos distintamente rugosos do *Aspergillus niger* var *niger* uma das principais características utilizadas para diferenciar as espécies pertencentes a Secção *Nigri*.

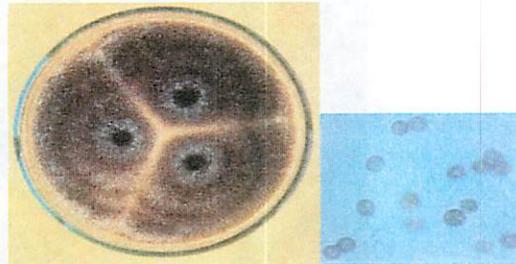


Figura 11. Colônia de *Aspergillus foetidus* em meio CYA, após 7 dias de incubação, na foto menor os esporos lisos com a maturidade do *Aspergillus foetidus* uma das principais características utilizadas para diferenciar as espécies

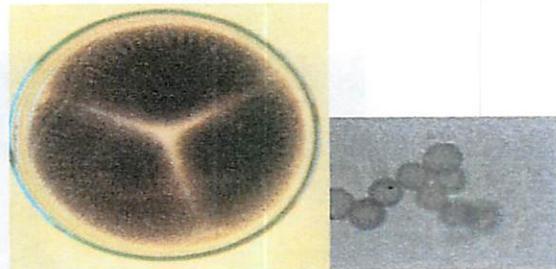


Figura 12. Colônia de *Aspergillus niger* var *awamori* em meio CYA, após 7 dias de incubação, na foto menor os esporos finamente rugosos do *Aspergillus niger* var *awamori* uma das principais características utilizadas para diferenciar as espécies esporos do *Aspergillus niger* var *awamori*



Figura 13. Colônias de *Aspergillus sydowii* em meio CYA com 7 dias de incubação a 25°C.

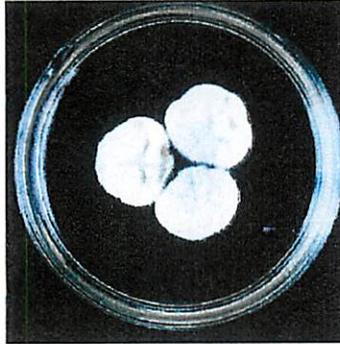


Figura 14. Colônias de *Aspergillus versicolor* em meio CYA com 7 dias de incubação a 25°C.

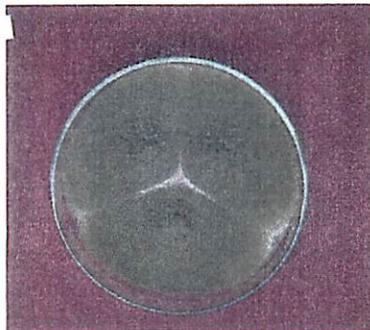


Figura 15. Colônias de *Aspergillus flavus var flavus* em meio CYA com 7 dias de incubação a 25°C.

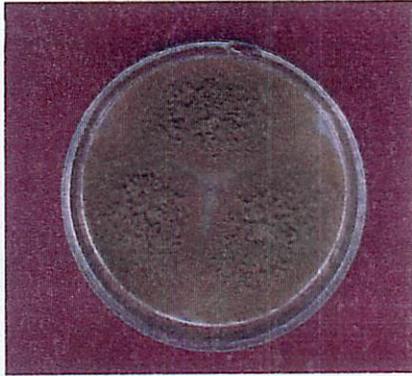


Figura 16. Colônias de *Aspergillus tamarii* em meio CYA com 7 dias de incubação a 25°C.

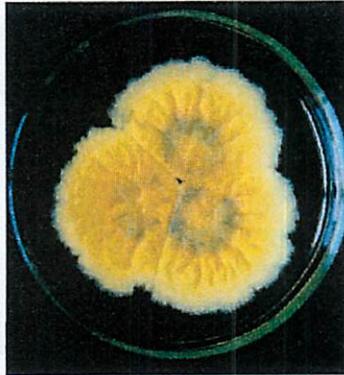


Figura 17. colônia de *Eurotium amstelodami* em meio CYA20S após 7 dias de incubação a 25°C.

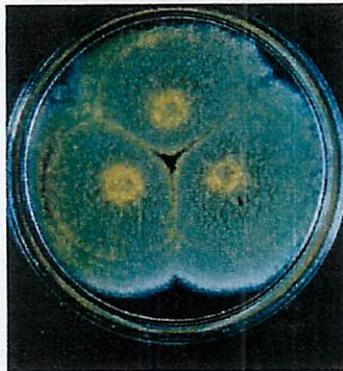


Figura 18. colônia de *Eurotium chevalieri* em meio CYA20S após 7 dias de incubação a 25°C.

***Penicillium* monoverticilado**

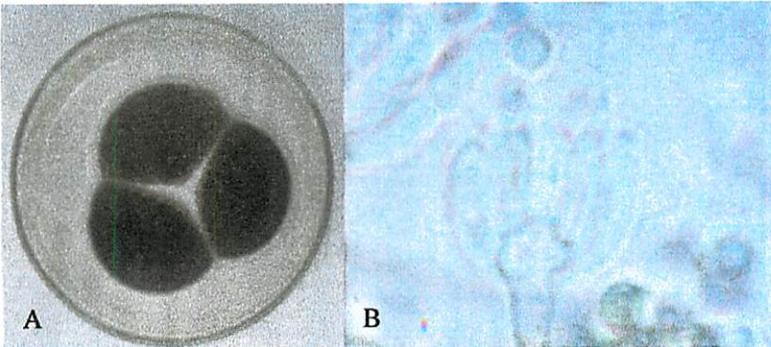


Figura 19. Em A colônia de *Penicillium glabrum* em meio CYA após 7 dias de incubação a 25°C. Em B o penicilli com uma ramificação

***Penicillium* Biverticilado**

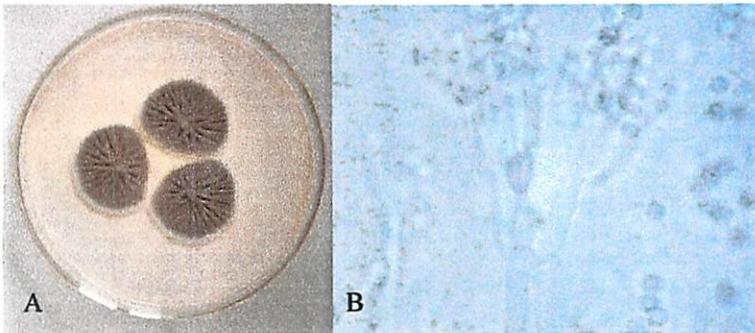


Figura 20. Em A colônia de *Penicillium citrinum* em meio CYA após 7 dias de incubação a 25°C. Em B as duas ramificações características da espécie

***Penicillium* Terverticilado**

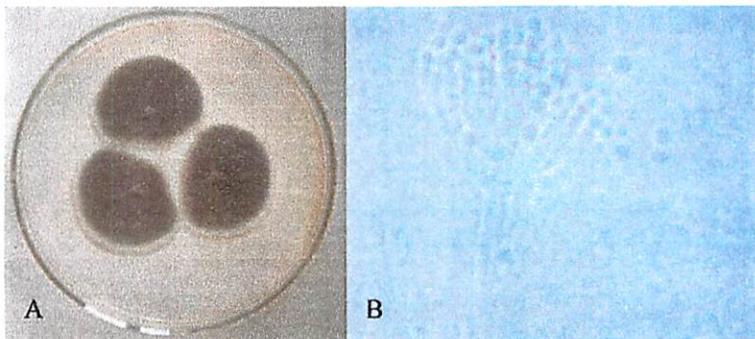


Figura 21. Em A colônia de *Penicillium brevecompactum* em meio CYA após 7 dias de incubação a 25°C. Em B o Penicilli terverticilado característico da espécie

3261 51, 51  
Pel a análise da  
larícula 6 ps de  
su verificando  
91  
Contudo, as  
recolhidos q do  
comparando  
Pode observar  
91 Sidas 2 - - -

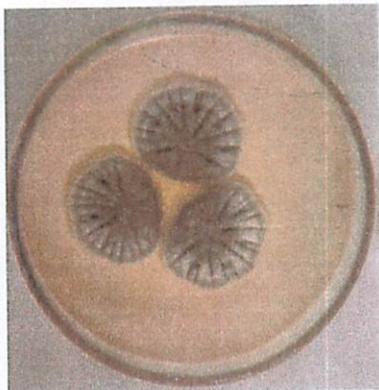


Figura 22. Colônia de *Penicillium crysogenum* em meio CYA após 7 dias de incubação a 25°C.

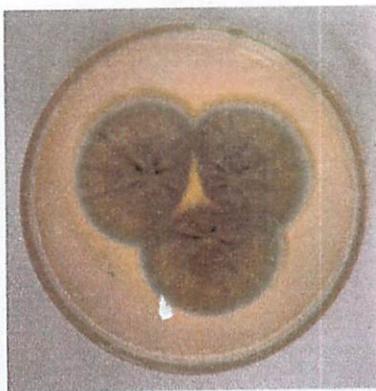


Figura 23. Colônia de *Penicillium expansum* em meio CYA após 7 dias de incubação a 25°C.

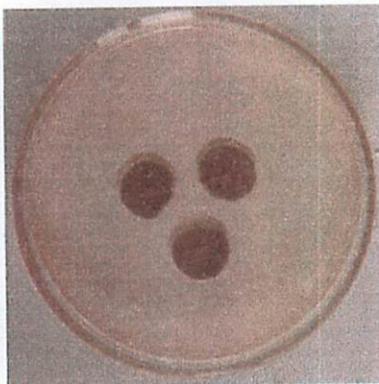


Figura 24. Colônia de *Penicillium solitum* em meio CYA após 7 dias de incubação a 25°C.