

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGELA BOZZA DE ALMEIDA

ESTRATÉGIAS DE CONTROLE E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES
DE OCRATOXINA A

CURITIBA

2015

ANGELA BOZZA DE ALMEIDA

ESTRATÉGIAS DE CONTROLE E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES
DE OCRATOXINA A

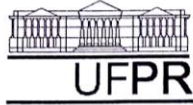
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Dr^a Ida Chapaval Pimentel

Co-Orientadora: Dr^a Patricia do Rocio Dalzoto

CURITIBA

2015



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Estratégias de controle e identificação de fungos produtores de ocratoxina A”

Por

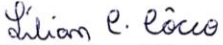
ANGELA BOZZA DE ALMEIDA

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:



Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel (presidente)


Prof. Dr. Benedito Corrêa


Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Beux


Dr^a. Lilian Côcco


Dr^a. Cristiane Vieira Helm


**Dr^a. Renata Rodrigues Gomes
Suplente**

Curitiba, 26 de março de 2015.

Dedico

Aos amores da minha vida:

Meus pais, Maria e Eroni,

meu irmão, Jean

e meu esposo, Thiago.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a Dr^a Ida Chapaval Pimentel e Prof^a Dr^a Patricia do Rocio Dalzoto pela orientação, conselhos e ensinamentos. Muito obrigada pela amizade e parceria nestes anos de trabalho.

Ao Dr. José Alfredo Sturion, Dr^a Cristiane Vieira Helm e Dayanne Andrade (EMBRAPA Floresta) por terem cedido as plantas de erva-mate e pelo auxílio na elaboração dos extratos.

À professora Dr^a Maria Helena Fungaro por ter gentilmente cedido as linhagens padrões de *Aspergillus*.

Ao IAPAR, em especial, à Dr^a Maria Brígida Scholz pelo envio das amostras de café, possibilitando mais este trabalho. Ao professor Dr. Dalton Reynaud dos Santos que me deu a oportunidade de iniciar a pesquisa com café.

Ao Tiago Pedrozo, do departamento de Química da UFPR, pelo auxílio na realização das análises da espectroscopia no infravermelho. Ao Thiago Pires pelo apoio nas análises estatísticas.

Ao Dr. Carlos Itsuo Yamamoto e a Dr^a Lílian Cristina Côcco (LACAUT) pelo empréstimo de materiais e equipamentos e valiosa ajuda nas análises dos dados da espectroscopia no infravermelho. Obrigada por todo apoio e confiança.

À Prof^a Dr^a Beatriz Helena Noronha Sales Maia e Inaiara Casapula pelo auxílio nas análises dos extratos de erva-mate.

À Maria da Graça Toledo por toda sua prestatividade e apoio nas análises cromatográficas da ocratoxina A.

Aos professores do Departamento de Patologia Básica pelo auxílio na elaboração de técnicas específicas. À secretária do Programa de Pós-graduação: Luciana Marques.

Às minhas amigas Carolina Poitevin e Isabela Pauluk Corrêa que me auxiliaram em vários experimentos. Obrigada pela amizade!

À Gheniffer Fornari, Germana Dávila dos Santos e Jason Lee Furuie por toda disponibilidade, carinho e atenção.

À Sabina Moser Tralamazza que mesmo longe, esteve sempre presente.

Aos meus queridos amigos de longa jornada: Mariana Porsani e Paulo Marangoni.

Às minhas grandes amigas: Alline Flores, Cibelle Sbrana, Maria Luiza Araújo, Melissa Giowanella, Nédia Ghisi e Silvia Gutierre. Não tenho palavras para agradecer todos esses anos de parceria e muitas histórias!

Aos integrantes do grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) que fizeram os meus dias mais felizes: Amanda Bombassaro, Andressa Katiski, Caroline Andrade, Fábio Gaio, Líria Cordeiro, Mariana Nascimento, Patrícia Herkert, Rafaela Amatuzzi, Renata Gomes, Viviana Michaluz. Muito obrigada pelo companheirismo e amizade.

À minha paixão, Thiago, por todo seu carinho, paciência e compreensão.

Ao meu irmão, Jean, e minha cunhada, Rayana, pelo carinho e palavras amigas.

Aos meus pais, que eu tanto amo, obrigada por toda a paciência, dedicação, compreensão e por estarem sempre ao meu lado.

À Capes e ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

E à Deus, à Quem tudo pertence.

"Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!"

Mario Quintana

RESUMO

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina encontrada em vários alimentos como, por exemplo, cereais, café, cacau, uva, especiarias, cerveja, vinho, ovos e carnes, sendo produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. O Brasil é o maior produtor e exportador de café, entretanto, a OTA tem sido avaliada com níveis de contaminação variando significativamente no país. Atualmente, muitos países possuem legislações estabelecendo limites máximos de OTA em vários alimentos. Na tentativa de minimizar as concentrações desta micotoxina nos alimentos, são utilizados métodos de controle físicos, químicos ou biológicos. Embora, métodos físicos e químicos de desintoxicação tenham sido testados, nenhum possui realmente a eficácia e segurança necessárias. Dessa forma, recentemente, pesquisas tem relatado a utilização de micro-organismos e extratos de plantas como possíveis controladores da OTA. Neste sentido, os objetivos do presente trabalho foram avaliar fungos isolados de grãos de café na inibição de crescimento e produção de OTA pelos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius*; avaliar o potencial de extratos de erva mate na inibição de crescimento dos mesmos fungos produtores de OTA; e utilizar a técnica da espectroscopia no infravermelho para a elaboração de um modelo quimiométrico eficiente na identificação das espécies de *Aspergillus* produtoras de OTA. Os testes de inibição de crescimento foram realizados pela técnica do crescimento radial. Para a quantificação de OTA, três plugs de 6mm do meio de cultivo foram retirados, após o teste de crescimento, e extraídos com metanol, em seguida avaliados por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE). Para as análises da espectroscopia no infravermelho os fungos foram crescidos por 4 dias a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$, o micélio foi raspado e em seguida os espectros foram capturados no modo transmitância com intervalo espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . O modelo quimiométrico desenvolvido com base na espectroscopia no infravermelho foi capaz de distinguir corretamente as espécies altamente relacionadas, tais como *A. niger* e *A. carbonarius*. No entanto, a diferenciação de *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* não foi possível em todos os casos. Em relação à inibição de crescimento e produção de OTA por fungos, todos os fungos testados foram capazes de inibir tanto o crescimento quanto a produção de OTA. As porcentagens de inibição de crescimento variaram de 18,30% a 100% e porcentagens de inibição da produção de OTA variaram de 43,45% a 100%. A linhagem *A. niger* C187 não toxigênica, apresentou os melhores resultados para ambos os testes. A utilização de extratos de erva-mate na inibição de crescimento de fungos produtores de OTA, apresentou uma inibição discreta para os fungos *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus* (0,54% a 13,27%) com extratos nas concentrações de 0,1g/L, 0,5g/L e 10g/L. Para as espécies *A. niger* e *A. carbonarius* não foi observado inibição em nenhuma das concentrações e extratos testados. Os fungos isolados de grãos de café apresentaram-se como uma alternativa no controle da OTA em alimentos.

Palavras chave: *Aspergillus*; Espectroscopia no infravermelho; Modelo quimiométrico; Inibição; Ocratoxina A.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin found in several foods, such as cereals, coffee, cocoa, grapes, spices, beer, wine, meat and eggs, being produced by fungi *Aspergillus* and *Penicillium* genera. Brazil is the leading producer and exporter of coffee, however, the OTA have been evaluated with levels varying significantly in the country. Currently, many countries have legislation setting maximum limits of OTA in several foods. Control methods are used in order to minimize the concentrations of this mycotoxin in foods, the methods used may be physical, chemical or biological. Although physical and chemical methods of detoxification have been tested, none really has the necessary effectiveness and safety. Thus, recently, studies have reported the use of microorganisms, and plant extracts as possible controllers of OTA. In this regard, the aims of this study were to assess fungi isolated from coffee beans in growth and OTA production inhibition by *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius*; to evaluate the potential of yerba mate extract in inhibiting growth of the same OTA producing fungi; and to use infrared spectroscopy technique for the development of an efficient chemometric model to identify the *Aspergillus* species producing OTA. Growth inhibition test were performed by the radial growth technique. For the quantification of OTA, three plugs 6mm culture medium were removed after growth test, extracted with methanol and then analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). For the analysis of infrared spectroscopy, fungi were grown for 4 days at $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$, the mycelium was then scraped and the spectra were captured in transmittance mode with a spectral range $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. The chemometric model developed based on infrared spectroscopy was able to correctly distinguish the highly related species, such as *A. niger* and *A. carbonarius*. However, the differentiation of *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* was not possible in all cases. With regard, growth and production OTA inhibition by fungi, all the fungi tested were able to inhibit growth and production OTA. The percentage growth inhibition ranged from 18.3% to 100% and the percentage inhibition OTA production ranged from 43.45% to 100%. The strain *A. niger* C187 non-toxigenic, showed the best results for both tests. The use of yerba mate extracts in growth inhibition of OTA producers fungi has shown a slight inhibition to fungi *A. westerdijkiae* and *A. ochraceus* (0.54% to 13.27%) with extracts at concentrations of 0.1g/L, 0.5g/L and 10g/L. For *A. niger* and *A. carbonarius* inhibition was not observed in any of the tested concentrations and extracts. The fungi isolated from coffee beans are presented as an alternative to control the OTA food.

Keywords: *Aspergillus*; Infrared Spectroscopy; Chemometric model; Inhibition; Ochratoxin A.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DA OCRATOXINA A.....	22
FIGURA 2 - VIBRAÇÕES MOLECULARES ENCONTRADAS NAS MOLÉCULAS DE ÁGUA (H ₂ O) E SUAS BANDAS NO ESPECTO NO INFRAVERMELHO.....	41
FIGURA 3 - VISTA GERAL (750-4000 cm ⁻¹) DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO NORMALIZADOS E ALISADOS.....	51
FIGURA 4 - GRÁFICO DE “SCORE” DA PRINCIPAL COMPONENTE 2 vs. PRINCIPALCOMPONENTE 1.....	54
FIGURA 5 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DAS 4 ESPÉCIES DE <i>Aspergillus</i> POR FUNGOS ISOLADOS DE GRÃOS DE CAFÉ.....	64
FIGURA 6 - PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE OTA NAS 4 ESPÉCIES DE <i>Aspergillus</i> PELOS FUNGOS ISOLADOS DE GRÃOS DE CAFÉ.....	66
FIGURA 7 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO E FAVORECIMENTO DE CRESCIMENTO DE <i>A. ochraceus</i> , PRODUTOR DE OTA, POR EXTRATOS AQUOSOS DE ERVA-MATE.....	74
FIGURA 8 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO E FAVORECIMENTO DE CRESCIMENTO DE <i>A. westerdijkiae</i> , PRODUTOR DE OTA, POR EXTRATOS AQUOSOS DE ERVA-MATE.....	75
FIGURA 9 - INFLUÊNCIA DOS EXTRATOS DE ERVA-MATE NOS FUNGOS PRODUTORES DE OTA.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - LINHAGENS USADAS NA ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE FT-IR E SEUS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO NO GENBANK.....	49
TABELA 2 - FREQUÊNCIAS DE ABSORÇÃO DE INFRAVERMELHO CARACTERÍSTICAS DE MICRO-ORGANISMOS E SUA ATRIBUIÇÃO MOLECULAR.....	52
TABELA 3 - PREDIÇÃO DOS GRUPOS.....	55
TABELA 4 - IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS USADAS NESTE ESTUDO E OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO NO GENBANK.....	63

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -MICOTOXINAS MAIS RELEVANTES PARA A SEGURANÇA ALIMENTAR PRODUZIDA POR DIFERENTES GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS.....	21
QUADRO 2 -PRINCIPAIS MICOTOXINAS ENCONTRADAS EM ALGUNS PRODUTOS AGRO-ALIMENTARES.....	22
QUADRO 3 -NÍVEIS DE OTA EM ALGUNS PRODUTOS AGRÍCOLAS, PRODUTOS ANIMAIS E ALIMENTOS PROCESSADOS.....	24
QUADRO 4 -FUNGOS PRODUTORES DE OTA.....	25
QUADRO 5 -LIMITES DE OTA FIXADOS EM ALGUNS PAÍSES PARA CAFÉ VERDE, CAFÉ TORRADO E CAFÉ INSTANTÂNEO.....	31
QUADRO 6 -MORFOTIPOS E TEORES DE CAFEÍNA DAS AMOSTRAS DE FOLHAS DE ERVA-MATE UTILIZADAS NO PRESENTE ESTUDO.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA - Análise de Variância
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC - *American Type Culture Collection*
ATR – Reflectância Total Atenuada
BOD – *Biological Oxygen Demand*
BPA - Boas Práticas Agrícolas
BPAr - Boas Práticas de Armazenamento
BPF - Boas Práticas de Fabricação
BPH - Boas Práticas de Higiene
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento
DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EMAN - *The European Mycotoxin Awareness Network*
EMATER - Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural
FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FIR - Infravermelho Distante
FSS - *Food Safety and Standard*
FT-IR - Infravermelho por Transformada de Fourier
FT-MIR – Infravermelho Médio por Transformada de Fourier
GERCA - Grupo Executivo de Racionalização da Cafeicultura
HACCP - *Hazard Analysis and Critical Control Point*
HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*
IARC - *International Agency for Research on Cancer*
IBC - Instituto Brasileiro do Café
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IR - Infravermelho
ITS – Espaço Interno Transcrito
KBr - Brometo de Potássio
LabMicro - Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular
LMT - Limite Máximo Tolerado
MCP - Procedimento de Múltiplas Comparações
MEA - Ágar Extrato de Malte
MIR - Infravermelho Médio
MSC - Correção do Espalhamento Multiplicativo
NIR - Infravermelho Próximo
OT α - Ocratoxina Alfa
OTA - Ocratoxina A
OTB - Ocratoxina B
OTC - Ocratoxina C
PC – Principais Componentes
PKS - Policetídeo sintetase
PLS - Regressão Parcial dos Mínimos Quadrados
PNR - Peptídica não Ribossômica
R² - Coeficiente de Determinação para Calibração
R² - Coeficiente de Determinação para Validação Externa
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RMSEC - Raiz Quadrada do Erro da Calibração
RMSECV - Raiz Quadrada do Erro da Validação Externa
RNA - Ácido Ribonucléico
RSNF - *Requeriments for the Safety and Nutrition of Food*
tRNA - RNA Transportador
UEL - Universidade Estadual de Londrina
UFPR - Universidade Federal do Paraná
UNEP - *United Nations Environment Programme*
UV - Ultravioleta
WHO - *World Health Organization*
cm - Centímetro
Da - Dalton
dNTP - Dexosirribonucleotídeos Fosfatados
g - grama
L - Litro
mg - Miligrama
MgCl₂ - Cloreto de Magnésio
mL - Mililitro
mM – Milimolar
nm - Nanômetro
U/ μ L - Unidade por Microlitro
Kg - Kilograma
 μ g - Micrograma
 μ L - Microlitro
 μ M - Micromolar
°C - Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Micotoxinas.....	20
3.2 Ocratoxina A.....	22
3.2.1 Efeitos tóxicos da OTA	26
3.2.2 Legislações para OTA	30
3.2.3 Métodos de controle da OTA.....	31
3.2.3.1 Prevenção da contaminação por OTA.....	33
3.2.3.2 Descontaminação de OTA.....	34
3.3 Café	36
3.4 <i>Ilex paraguariensis</i> (erva-mate).....	37
3.5 Espectroscopia no infravermelho.....	40
4. CAPÍTULO I: Aplicação da espectroscopia no infravermelho médio por transformada de Fourier na identificação de espécies de <i>Aspergillus</i> isoladas de grãos de café.	44
4.1 Introdução.....	44
4.2 Materiais e métodos.....	46
4.2.1 Material biológico.....	46
4.2.2 Identificação Molecular	47
4.2.3 Preparação das amostras para espectroscopia FT-IR.....	47
4.2.4 Espectroscopia FT-IR	47
4.2.5 Análise espectros FT-IR	48
4.3 Resultados e discussão.....	49
4.3.1 Identificação morfológica e molecular	49
4.3.2 Análise FT-IR: preparação da amostra	49
4.3.3 Análise FT-IR: Análise espectros.....	50
4.3.4 Análise FT-IR: PLS.....	52
4.4 Conclusão.....	56
5. CAPÍTULO II: Inibição de crescimento e de produção de ocratoxina A em espécies de <i>Aspergillus</i> por fungos isolados de grãos de café.....	57
5.1 Introdução.....	58
5.2 Materiais e métodos.....	59

5.2.1	Material Biológico	59
5.2.2	Identificação dos fungos isolados de grãos de café	60
5.2.3	Inibição de crescimento.....	61
5.2.4	Inibição da produção de OTA.....	61
5.2.5	Detecção de OTA.....	62
5.2.6	Análise estatística.....	62
5.3	Resultados e discussão.....	62
5.3.1	Identificação dos fungos isolados de grãos de café	62
5.3.2	Inibição de crescimento.....	63
5.3.3	Inibição da produção de OTA.....	65
5.4	Conclusão.....	68
6.	CAPITULO III: Influência de extratos aquosos de erva-mate no crescimento de fungos produtores de ocratoxina A.....	70
6.1	Introdução.....	70
6.2	Materiais e métodos.....	72
6.2.1	Material biológico.....	72
6.2.2	Obtenção dos extratos.....	72
6.2.3	Teste de inibição de crescimento.....	73
6.2.4	Análise estatística.....	73
6.3	Resultados e discussão.....	74
6.3.1	Inibição de crescimento.....	74
6.4	Conclusão.....	79
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS	81
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICE A.....	109
	APÊNDICE B.....	113
	APÊNDICE C	116
	APÊNDICE D	117
	APÊNDICE E.....	119

1. INTRODUÇÃO

O café é um produto agrícola de extrema importância econômica e social para o Brasil. A ocratoxina A (OTA) em grãos de café tem sido avaliada com níveis de contaminação variando significativamente no país (BATISTA *et al.*, 2009; IAMANAKA *et al.*, 2014).

Diversos efeitos tóxicos da ocratoxina A têm sido descritos, como inibição da síntese de proteínas, estresse oxidativo e danos no DNA (ALMELA *et al.*, 2007; MECA, RITIENI, 2009). Além disso, esta micotoxina é considerada nefrotóxica, citotóxica, imunossupressora (RINALDI *et al.*, 2007; PATHARAJAN *et al.*, 2011) e segundo a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer, a OTA é possivelmente carcinogênica (IARC, 1993; FIORI *et al.*, 2014).

Vários países estabeleceram limites máximos de ocratoxina A para alimentos. A União Européia introduziu limites de OTA para o café, de 5 µg/kg para café torrado e 10 µg/kg para café solúvel (EUROPEAN COMMISSION, 2006). Em 2011 a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), publicou a RDC nº7 que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Nesta RDC foram dispostos os LMT para OTA em café torrado e solúvel de 10 µg/kg.

Por tais efeitos, como medida de precaução é geralmente recomendado que a incidência de OTA, como de outras micotoxinas, em produtos alimentares, seja minimizada tanto quanto possível. O controle do crescimento dos fungos produtores de micotoxinas é feito através de produtos sintéticos, entretanto, estes produtos podem ser prejudiciais à saúde, assim, pesquisas têm sido realizadas na tentativa de encontrar meios naturais capazes de inibir o crescimento de fungos produtores de micotoxinas.

O controle de fungos produtores de micotoxinas por micro-organismos antagonistas é uma alternativa eficiente para o uso de fungicidas sintéticos (BARBERIS *et al.* 2014). Extratos de plantas surgem com o mesmo objetivo, como a erva-mate, na qual vários compostos químicos foram identificados e acredita-se que eles são os responsáveis pelas propriedades da planta, como ação antioxidante, antimicrobiana e anticancerígena (FUJII *et al.*, 2004).

A OTA deriva do nome de *Aspergillus ochraceus*, do qual foi primeiramente isolada (VAN DER MERWE *et al.*, 1965). Entretanto ela pode ser produzida por

vários outros fungos, tais como *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. westerdijkiae* e *Penicillium verrucosum* (TÉREN, PALÁGYI, VARGA, 1997; SAMSON *et al.*, 2004; FRISVAD *et al.*, 2004; ABRUNHOSA, SANTOS, VENÂNCIO, 2006). No Brasil, estudos têm demonstrado que *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii*, *A. carbonarius* e *A. niger* são as principais espécies responsáveis pela presença de OTA em grãos de café (TANIWAKI *et al.*, 2003; FRISVAD *et al.*, 2007; MATA *et al.*, 2007).

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) tem sido utilizada em várias áreas da microbiologia, como taxonomia (GARON *et al.*, 2010; NAUMANN, 2009), diagnóstico clínico (ESSENDUBI *et al.*, 2007; JINENDRA *et al.*, 2010), controle da qualidade de alimentos (TALLADA *et al.*, 2011), detecção de micotoxinas (DACHOUPAKAN, PUTTHANG, SIRISOMBOON, 2013; BOZZA *et al.*, 2013). Na espectroscopia FT-IR uma amostra é irradiada por luz vermelha, resultando na absorção de energia pelas vibrações moleculares. Os espectros formados podem ser atribuídos a vibrações moleculares de compostos específicos tais como lipídios, proteínas, compostos contendo fosfato como RNA e DNA e fosfolipídios, fornecendo impressões digitais que podem ajudar a classificar espécies de micro-organismos (NAUMANN, 2009).

As espécies de *Aspergillus* produtoras e não produtoras de OTA são extremamente relacionadas e morfologicamente similares. Identificação por marcadores moleculares são muitas vezes limitados e abordagens mais modernas, como perfil polifásico, mostram resultados relevantes, entretanto podem ser demorados e impróprios para o uso rotineiro (TRALAMAZZA *et al.*, 2013).

Assim, os objetivos do presente trabalho estão envolvidos com as estratégias de controle da ocratoxina A em alimentos, sendo avaliado o potencial de inibição do crescimento de fungos potencialmente produtores de ocratoxina A, por extratos de erva-mate. Ao mesmo tempo foi avaliado o potencial inibitório dos fungos isolados de grãos de café frente ao crescimento e produção de ocratoxina A de espécies de *Aspergillus*. Adicionalmente, a técnica de FT-IR foi utilizada para identificação de espécies de *Aspergillus* produtoras de ocratoxina A através do desenvolvimento de um modelo quimiométrico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de fungos isolados de grãos de café e de extratos de erva-mate no controle de fungos produtores de ocratoxina A e utilizar a espectroscopia no infravermelho na identificação de espécies de *Aspergillus*.

2.2 Objetivos específicos

- Adaptar um método tradicional de preparo de amostra para análises por espectroscopia no infravermelho;
- Desenvolver um modelo quimiométrico com base na espectroscopia no infravermelho capaz de identificar corretamente as espécies de *Aspergillus* isoladas de grãos de café;
- Avaliar o potencial de fungos isolados de grãos de café e de extratos de erva-mate na redução de crescimento de fungos produtores de ocratoxina A;
- Analisar o potencial de fungos isolados de grãos de café na redução da produção de ocratoxina A produzida por espécies de *Aspergillus*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Micotoxinas

As micotoxinas são produtos do metabolismo secundário (metabólitos que não são essenciais para o seu normal crescimento, desenvolvimento e reprodução) de algumas espécies de fungos, que quando ingeridas por animais, incluindo o homem, causam alterações biológicas prejudiciais à saúde (ABRUNHOSA, PATERSON, VENÂNCIO, 2010).

Segundo Abrunhosa (2008), as micotoxinas são produzidas a partir das vias metabólicas dos policetídeos, dos terpenóides e de alguns processos que usam aminoácidos essenciais. Possuem baixa massa molecular e estruturas químicas diversificadas. A diversidade das estruturas químicas das micotoxinas vai desde a presença de um único anel heterocíclico a até oito anéis associados, o que está relacionado à diversidade de efeitos tóxicos (EDWARDS, O'CALLAGHAN, DOBSON, 2002).

Desde a idade média tem-se o conhecimento de doenças causadas por micotoxinas, como o "fogo de Santo Antônio". Entretanto, somente na década de 60 as micotoxinas ganharam relevância, quando cem mil perus morreram devido à deficiência e necrose hepática na Inglaterra. Após investigações, foi descoberto que os animais foram alimentados com uma dieta rica em amendoim e este estava altamente contaminado com *Aspergillus flavus*, sendo sua toxina posteriormente denominada aflatoxina (GOLDBLATT, 1969). A aflatoxina pode causar fortes efeitos carcinogênicos e gerar problemas hepáticos (CARDWELL, 2001).

As micotoxinas mais comuns são as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos (deoxinivalenol e toxina T2), zearalenonas e fumonisinas (BHAT *et al.*, 2010; AFSAH-HEJRI *et al.*, 2013). Embora aproximadamente 300 micotoxinas diferentes tenham sido identificadas, apenas 20 tipos de micotoxinas, produzidas por diferentes espécies, são encontradas com frequência em quantidades suficientes para constituírem um verdadeiro risco para a saúde alimentar, como observado no QUADRO 1 (GEISEN, 1998 *apud* SARTORI *et al.*, 2006).

Gênero	Micotoxinas
<i>Alternaria</i>	Ácido tinuazônico, alternariol, alternariol metil-éter
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxina, Ocratoxina, Ácido Ciclopiazônico, Patulina, Citrinina e Ergo Alcalóides
<i>Claviceps</i>	Ergo-alcalóides
<i>Fusarium</i>	Fumonisina, Zearalenona, Deoxinivalenol, Nivalenol, Toxina T2
<i>Penicillium</i>	Aflatoxina, Ocratoxina, Ácido Ciclopiazônico, Patulina, Citrinina e Ergo Alcalóides

QUADRO 1 – MICOTOXINAS MAIS RELEVANTES PARA A SEGURANÇA ALIMENTAR PRODUZIDAS POR DIFERENTES GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS.

FONTE: ABRUNHOSA, 2008; KRKA, CREWS 2008; AFSAH-HEJRI *et al.*, 2013.

As micotoxinas podem ser encontradas em vários produtos agrícolas, como cereais, milho, frutas secas, frutas *in natura*, sementes oleaginosas e especiarias. Entretanto, as micotoxinas são capazes de se acumular ao longo da cadeia alimentar, podendo ser encontradas em produtos pecuários, como o leite, ovos e carne de animais (QUADRO 2) (ABRUNHOSA, 2010; PFOHL- LESZKOWICZ, MANDERVILLE 2007; AFSAH-HEJRI *et al.*, 2013).

Na grande maioria dos casos, as micotoxinas são formadas no campo, enquanto as colheitas agrícolas acontecem (BHAT *et al.*, 2010). Nestas situações são produzidas por fungos que possuem frequentemente uma associação ecológica com a planta. Assim, é comum encontrar a ligação entre certas espécies de micotoxinas com determinados produtos agrícolas (*Aspergillus flavus*/ aflatoxinas em amendoins; *Penicillium expansum*/ patulina em maçãs). Entretanto, as micotoxinas também podem ser formadas no período de pós-colheita, durante o seu transporte e armazenagem, especialmente se as condições não forem as mais adequadas (ABRUNHOSA, 2008; BHAT *et al.*, 2010).

Produtos agrícolas	Micotoxinas
Amendoins	Aflatoxina, ácido clicopiazônico
Café	Ocratoxina A, esterigmatocistina
Carnes e ovos	Patulina, citrinina, ocratoxina A, ácido clicopiazônico
Cereais	Desoxinivalenol, nivalenol, toxina T-2, zearalenona, alternariol, alternariol metil-éter, ácido tenuazônico, fumonisinas, ocratoxina A, citrinina, esterigmatocistina
Figos	Ocratoxina A
Frutos secos	Aflatoxina, ocratoxina A
Maçãs	Patulina, citrinina
Milho	Aflatoxina, desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, fumanisinas, toxina T-2, citrinina
Produtos lácteos	Aflatoxina M ₁ e M ₂ , ácido clicopiazônico, ocratoxina A
Sementes oleaginosas	Aflatoxina, ácido tenuazônico, alternariol
Uvas	Ocratoxina A

QUADRO 2 – PRINCIPAIS MICOTOXINAS ENCONTRADAS EM ALGUNS PRODUTOS AGRO-ALIMENTARES.

FONTE: ABRUNHOSA, 2008.

3.2Ocratoxina A

O grupo das micotoxinas designadas como ocratoxinas (ocratoxina A, B e C), caracteriza-se por possuir uma estrutura molecular que consiste basicamente de uma β -fenilalanina ligada a uma isocumarina, mediante uma ligação amida (FIGURA 1). A ocratoxina A (OTA) apresenta fluorescência verde quando exposta à luz ultravioleta e possui uma molécula de cloro em sua estrutura (EDWARDS, O'CALLAGHAN, DOBSON, 2002).

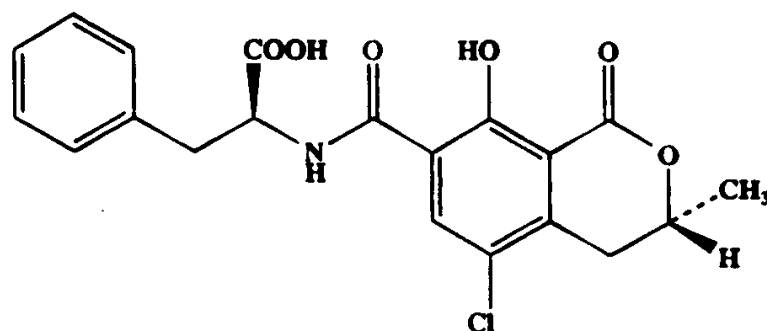


FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DA OCRATOXINA A.

FONTE: VAN DER MERWE *et al.*, 1965.

A OTA possui a fórmula empírica $C_{20}H_{18}O_6NCl$ com uma massa molecular de 403,822 Da. É altamente solúvel em solventes orgânicos polares, solúvel em solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio, fracamente solúvel em água e termoestável (ABRUNHOSA, PETERSON, VENÂNCIO, 2010).

Fuchs *et al.* (1984), observaram que a ocratoxina C pode ser convertida em ocratoxina A, os autores analisaram esta conversão administrando as toxinas de forma oral e intravenosa em ratos.

A via biossintética da OTA ainda não foi totalmente elucidada em qualquer espécie de fungo, mas acredita-se que o grupo isocumarina é um pentacítido formado a partir do malonato de etila e através de uma síntese de policétido, requerendo a presença da enzima policétido sintetase (PKS). A reação de halogenação é também necessária para adicionar o átomo de cloro, esta reação pode ser realizada pela enzima cloroperoxidase ou halogenase, sendo mais provável a última. A porção fenilalanina é sintetizada através da via do ácido chiquímico e provavelmente é ligada a di-hidroisocumarina clorada no carbono 10 por uma sintetase peptídica não ribossômica (PNR) (HARRIS, MANTLE, 2001; GALLO *et al.*, 2009; O'CALLAGHAN *et al.*, 2013).

A contaminação por OTA pode ocorrer principalmente na pré-colheita e em condições de pós-colheita em cereais como trigo, milho, centeio, cevada e aveia. Também ocorre em amendoim, cacau, café, pão, arroz e frutos secos. A presença de OTA nos produtos alimentares tais como café, vinho, cerveja e carnes, é devido à sua relativa estabilidade química durante o processamento industrial (AL-ANATI, PETZINGER, 2006). Outros itens alimentares, como leite, tecidos animais, músculos, órgãos e ovos também podem ser contaminados (DINIS, LINO, PENA, 2007). No quadro 3 estão representados alguns produtos alimentares e concentrações de OTA já descritos.

Produtos alimentares	Níveis de contaminação	Referências
Grãos	0,25–0,92 µg/Kg	DOMIJAN <i>et al.</i> , 2005
Cacau	0,35–14,8 µg/Kg	AMEZQUETA <i>et al.</i> , 2004
Milho	0,11–0,15 µg/Kg	SHOTWELL <i>et al.</i> , 1969
Figos secos	<0,1–35,1 µg/Kg	SENYUVA <i>et al.</i> , 2005
Frutas secas	0,1–30 µg/Kg	IAMANAKA <i>et al.</i> , 2005
Uvas	0,008–1,6 µg/Kg	SERRA, MENDONÇA, VENÂNCIO, 2006
Grãos de café verde	0–48 µg/Kg	ROMANI <i>et al.</i> , 2000
Leite	0,011–0,058 µg/L	SKAUG, 1999
Rins de porco	0–15 µg/Kg	JORGENSEN, PETERSEN, 2002
Carne de porco	0–2,9 µg/Kg	JORGENSEN, PETERSEN, 2002
Uva passas	0,2–53,6 µg/Kg	MCDONALD <i>et al.</i> , 1999
Arroz	1,0–27,3 µg/Kg	GONZALEZ <i>et al.</i> , 2006
Temperos	4,2–103,2 µg/Kg	THIRUMALA-DEVI <i>et al.</i> , 2001
Trigo, cevada e aveia	0,1–17,8 µg/Kg	SCUDAMORE, PATEL BREEZE, 1999
Trigo, aveia e centeio	0,03–27 µg/Kg	SCOTT <i>et al.</i> , 1972
Comida para bebê	0,06–2,4 µg/Kg	LOMBAERT <i>et al.</i> , 2003
Cerveja	<0,01–0,135 µg/L	VISCONTI, PASCALE, CENTONZE, 2000
Cereal matinal	0,4–8,8 µg/Kg	MOLINIÉ <i>et al.</i> , 2005
Produtos com cacau	0,22–0,77 µg/Kg	TAFURI, FERRACANE, RITIENI, 2004
Suco de uva	<0,003–0,311 µg/L	ZIMMERLI, DICK, 1996
Produtos de porco	<0,03–10,0 µg/Kg	PIETRI <i>et al.</i> , 2006
Café torrado	3,2–17,0 µg/Kg	TSUBOUCHI <i>et al.</i> , 1988
Salame	<0,006–0,40 µg/Kg	MONACI <i>et al.</i> , 2005
Vinho	<0,003–0,388 µg/L	ZIMMERLI, 1996

QUADRO 3 - NÍVEIS DE OTA EM ALGUNS PRODUTOS AGRÍCOLAS, PRODUTOS ANIMAIS E ALIMENTOS PROCESSADOS PELO MUNDO.

FONTE: ABRUNHOSA, PETERSON, VENÂNCIO, 2010.

A ocorrência da OTA em grãos de café foi descrita, pela primeira vez, por Levi, Trenk, Mohr (1974). Esta toxina destaca-se como a mais frequente em amostras de café, seguida pela esterigmatocistina (NAKAJIMA *et al.*, 1997). Desde sua descoberta por Van der Merwe *et al.* (1965), a partir de *Aspergillus ochraceus*, uma variedade de estudos subsequentes vem mostrando a existência de outras espécies fúngicas, principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, como produtoras desta micotoxina (VARGA *et al.*, 2001).

A OTA é produzida em produtos alimentares em todo o mundo por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente em regiões temperadas e subtropicais e *Penicillium*, especialmente em regiões temperadas e mais frias (VAN DER MERWE *et al.*, 1965; ABARCA *et al.*, 1994; FRISVAD *et al.*, 2004; SAMSON *et al.*, 2004; PERRONE *et al.*, 2006). No quadro 4 estão descritas as principais espécies produtoras de OTA dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Espécies de fungos	Referências
Aspergillus seção Circumdati	
<i>A. cretensis</i>	FRISVAD <i>et al.</i> , 2004
<i>A. flocculosus</i>	FRISVAD <i>et al.</i> , 2004
<i>A. melleus</i>	HESELTIME <i>et al.</i> , 1972
<i>A. ochraceus</i>	VAN DER MERWE <i>et al.</i> , 1965; FRISVAD <i>et al.</i> , 2004
<i>A. ostianus</i>	HESELTIME <i>et al.</i> , 1972
<i>A. persii</i>	CIEGLER, 1972
<i>A. petrakii</i>	HESELTIME <i>et al.</i> , 1972
<i>A. pseudoelegans</i>	FRISVAD <i>et al.</i> , 2004
<i>A. roseoglobulosus</i>	FRISVAD <i>et al.</i> , 2004
<i>A. sclerotiorum</i>	FRISVAD <i>et al.</i> , 2004; HESSELTIME <i>et al.</i> , 1972; VARGA <i>et al.</i> , 1996
<i>A. steynii</i>	FRISVAD <i>et al.</i> , 2004
<i>A. sulphureus</i>	FRISVAD <i>et al.</i> , 2004; HESSELTIME <i>et al.</i> , 1972; VARGA <i>et al.</i> , 1996
<i>A. westerdijkiae</i>	FRISVAD <i>et al.</i> , 2004
Aspergillus seção Flavi	
<i>A. alliaceus</i>	VARGA <i>et al.</i> , 1996; BAYMAN <i>et al.</i> , 2002
<i>Petromyces albertensis</i>	FRISVAD <i>et al.</i> , 2006
Aspergillus seção Nigri	
<i>A. carbonarius</i>	HORIE, 1995; SAMSON <i>et al.</i> , 2004
<i>A. lacticoffeatus</i>	SAMSON <i>et al.</i> , 2004
<i>A. niger</i>	SAMSON <i>et al.</i> , 2004; ABARCA <i>et al.</i> , 1994
<i>A. sclerotioniger</i>	SAMSON <i>et al.</i> , 2004
Penicillium	
<i>P. nordicum</i>	LARSEN <i>et al.</i> , 2001
<i>P. verrucosum</i>	PITT, 1987; VAN WALBEEK <i>et al.</i> , 1969; CIEGLER <i>et al.</i> , 1973

QUADRO 4 - FUNGOS PRODUTORES DE OTA.

FONTE: ABRUNHOSA, PETERSON, VENÂNCIO, 2010.

Três principais espécies produtoras de OTA, *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* e *Penicillium verrucosum*, possuem várias diferenças ecológicas e fisiológicas, tornando-se relativamente fácil determinar quais espécies são responsáveis pela formação de OTA em um determinado alimento ou localização geográfica. Em resumo, *A. ochraceus* e espécies estreitamente relacionadas crescem a atividade água baixa e em temperaturas moderadas. Eles são, na sua maioria, associados com os alimentos secos e armazenados, especialmente cereais (PITT, 2002; OSTRY, MALIR, RUPRICH, 2013).

A segunda espécie de *Aspergillus*, *A. carbonarius* (intimamente relacionada com *A. niger*, que produz OTA em menor frequência) cresce em altas temperaturas e produz hifas e esporos pigmentados, que os torna resistentes aos raios UV. Consequentemente *A. carbonarius* é comumente encontrado em uvas e frutas

semelhantes, que maduram na luz do sol e em altas temperaturas (PITT, 2002; OSTRY, MALIR, RUPRICH, 2013).

Os principais alimentos para o crescimento de *Penicillium verrucosum* parecem ser cereais cultivados em regiões temperadas, variando através da Europa central e Canadá, sendo o *P. verrucosum* a principal fonte de OTA em cereais nestas regiões e outras de clima temperado. A OTA também pode ser produzida por fungos toxigênicos que crescem sobre produtos feitos com carne de porco, durante seu amadurecimento (contaminação direta). *Penicillium nordicum*, um importante produtor de OTA cresce em carnes e produtos derivados (RODRIGUEZ *et al.*, 2012). A OTA também é encontrada em carnes provenientes de animais que são alimentados de rações a base de cereais contaminados (contaminação indireta) (DUARTE, LINO, PENA, 2012).

3.2.1 Efeitos tóxicos da OTA

A OTA persiste no organismo por um longo período, tendo uma meia vida de 35 dias em humanos, 72 - 120 horas em porcos e 77 horas em animais ruminantes (AL-ANATI; PETZINGER, 2006). Os elevados tempos médios de vida da OTA em diferentes animais devem-se ao fato desta ser excretada com dificuldade através da urina, devido à sua grande afinidade com algumas proteínas do plasma sanguíneo, essencialmente para a albumina. Kumagai (1985), verificou que ratos deficientes em albumina foram capazes de eliminar mais rapidamente esta micotoxina do que ratos normais. A OTA é, ainda, parcialmente excretada através da via biliar, sendo esta via de excreção a predominante nas espécies que apresentam tempos médios de vida mais baixos, como os ratos, por exemplo, ao contrário do que acontece em humanos e macacos em que a via urinária é a preponderante (ABRUNHOSA, 2008). A OTA é considerada um composto tóxico cumulativo de fácil absorção e lenta eliminação.

A presença da OTA em vários alimentos e sua longa meia vida pode explicar o porquê de que 70 a 100% de todas as pessoas testadas nos Estados Unidos e na Europa possuírem níveis mensurais de OTA no sangue (AL-ANATI; PETZINGER, 2006). Em humanos, a OTA foi primeiramente detectada em sangue de residentes de uma área endêmica da Croácia (PERAICA *et al.*, 2008).

Quando ingerida, a OTA é absorvida pelo trato gastrointestinal, entra na circulação e liga-se às proteínas do soro. A maior toxicidade da OTA em mamíferos está relacionada aos rins, o que se deve, em parte, à reabsorção ativa pelo túbulo proximal, no sistema de transporte de ânions, acumulando altas concentrações de OTA neste órgão (FUNGARO *et al.*, 2004).

A toxicidade da OTA, de forma geral, pode estar relacionada com sua capacidade de interagir e se ligar a certas macromoléculas formando espécies reativas, inibindo a respiração mitocondrial e formando ligações com o DNA (RINGOT *et al.*, 2006 *apud* ABRUNHOSA, 2008).

Vários efeitos tóxicos da OTA têm sido descritos, como inibição da síntese protéica, indução da peroxidação de lipídios, estresse oxidativo e danos no DNA, em espécies e tecidos específicos diferentes (ALMELA *et al.*, 2007; AL-ANATI, PETZINGER, 2006). Entretanto, esta micotoxina é ainda considerada nefrotóxica, citotóxica, e imunossupressora (SUÁREZ-QUIROZ *et al.*, 2004; ABRUNHOSA, SANTOS, VENÂNCIO, 2006; GHALI *et al.*, 2008; LINO *et al.*, 2008; DACHOUPAKAN, *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009). Ela ainda pode induzir mutações gênicas através de mecanismos genotóxicos ainda não muito claros (RINALDI *et al.*, 2007).

Estudos apontam que a OTA é teratogênica em muitos animais, incluindo camundongos, hamsters, coelhos e galinha, entretanto não existem dados sobre efeitos teratogênicos em humanos (MALIR *et al.*, 2014). Porém sabe-se que a exposição à OTA representa um grande risco para fetos e bebês humanos. A OTA é excretada através do leite materno e essas crianças também são expostas aos riscos desta micotoxina, embora a quantidade de OTA encontrada no leite materno ser de cerca de 10 vezes menor do que a encontrada no sangue (BREITHOLTZ-EMANUELSSON *et al.*, 1993).

Os efeitos citotóxicos da OTA estão baseados na inibição e/ou ativação de enzimas, várias das quais utilizam a fenilalanina como um substrato, pois a OTA é um análogo deste aminoácido (AL-ANATI, PETZINGER, 2006). Acredita-se que a fração fenilalanina da molécula de OTA interage como um substrato substituto. A principal enzima alvo é a fenilalanina-tRNA sintetase, a qual é inibida pela OTA em procariontes, micro-organismos eucarióticos, células de mamíferos e em experimentos com animais *in vivo*. Esta inibição causa a redução da síntese

proteica, além disso, a síntese de RNA e a síntese de DNA são alvos da toxicidade da OTA (STORMER, LEA, 1995 *apud* AL-ANATI, PETZINGER, 2006).

Matle, Kulinskaya, Nestler (2005), realizaram um estudo no qual avaliaram a OTA como um agente carcinogênico renal, para isso, os autores administraram 100mg de OTA por dia a ratos Fisher masculinos. Os primeiros tumores foram visualizados após 75 semanas de tratamento; 20% dos ratos desenvolveram carcinoma renal, geralmente associado a nódulos metastáticos, situados ao longo do mesentério abdominal, enquanto alguns tumores se espalharam também para os pulmões.

A OTA foi classificada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como pertencente ao grupo 2B, ou seja, possível carcinogênico humano (IARC, 1993; FIORI *et al.*, 2014).

Esta micotoxina despertou grande interesse de pesquisadores ao ser associada a doenças renais em humanos como a Nefropatia Endêmica dos Balcãs, síndrome caracterizada por apresentar disfunção renal crônica e degenerativa, endêmica na região dos Balcãs (RADIC *et al.*, 1997).

A nefropatia endêmica é uma doença renal que ocorre em algumas áreas rurais da Bósnia, Bulgária, Croácia, Kosovo, Romênia e Servia (PERAICA *et al.*, 2008). A etiologia da doença é ainda desconhecida, apesar de haver um número razoável de hipóteses. As principais características da nefropatia endêmica são a distribuição geográfica limitada, ocorrência em famílias de agricultores, alta mortalidade por uremia e alta incidência de tumores uroteliais (MILETIC-MEDVED, PERAICA, DOMIJAN, 2005).

A teoria da micotoxina sobre a origem da nefropatia endêmica é baseada na analogia entre lesões de rins de porcos causadas pela OTA em países escandinavos e lesões em rins humanos em pacientes com a nefropatia endêmica (KROGH, 1974 *apud* PERAICA *et al.*, 2008). Vários estudos que envolvem as micotoxinas na etiologia da nefropatia endêmica tentaram provar que pessoas que residiam em áreas endêmicas eram mais expostas a OTA que pessoas que residiam em outras regiões. Porém, baixas concentrações de OTA têm sido frequentemente encontradas em alimentos e sangue de pessoas residentes em áreas endêmicas e em sangue de pessoas com doenças renais crônicas em todo o mundo. Mas, este fato não descarta a teoria que as micotoxinas estão envolvidas no desenvolvimento da nefropatia endêmica, pois pessoas em áreas endêmicas estão expostas a

quantidades variáveis de OTA que frequentemente excedem à exposição de áreas não endêmicas. Ainda, os alimentos nunca são contaminados com uma única linhagem de fúngica, e outras micotoxinas nefrotóxicas podem ser produzidas por fungos que produzem a OTA (PERAICA *et al.*, 2008).

Recentemente pesquisas têm indicado que a OTA pode afetar também o sistema neural. Embora o potencial neurotóxico da OTA seja conhecido, os mecanismos moleculares de sua neurotoxicidade ainda não estão bem elucidados (ZHANG *et al.*, 2009). Dados obtidos do estudo feito por Zhang *et al.* (2009), sugerem que a indução da neurotoxicidade da OTA, é ao menos, mediada em parte pela apoptose.

Estudos têm demonstrado que a OTA está relacionada com o estresse oxidativo, medido por um aumento da peroxidação em lipídios e danos no DNA de cérebros de camundongos, características que estão associadas com um número de desordens neurodegenerativas incluindo as doenças de Parkinson e Alzheimer (SAVA, REUNOVA, VALASQUEZ, 2006).

Muitas micotoxinas são imunossupressoras, entre elas, a OTA (BEREK *et al.*, 2001). A atividade imunossupressora da OTA é caracterizada pela redução do tamanho de órgãos vitais do sistema imune, tais como timo, baço e nódulos linfáticos, depressão das respostas dos anticorpos, alterações no número e funções de células do sistema imune, e modulação da produção de citocinas. A atividade imunotóxica da OTA provavelmente resulta de mudanças degenerativas e morte celular por necrose e apoptose, em combinação com uma lenta reposição das células afetadas do sistema imune, devido à inibição da síntese das proteínas (AL-ANATI, PETZINGER, 2006).

Alguns dados mostram que a OTA pode atuar como um desregulador endócrino, por interferir nas enzimas envolvidas na síntese dos esteroides ou hormônios. A OTA não interage diretamente com o receptor, como é o caso da micotoxina zearealenona. Além disso, a OTA pode afetar o sistema reprodutivo masculino, a fertilidade masculina pode ser afetada pela redução da produção de esperma e/ou danos nos testículos (ZINEDINE *et al.*, 2007; VERMA, CHAKRABORTY, 2008; MALIR *et al.*, 2013).

A umidade, temperatura, o tipo de substrato e outros fatores desempenham um papel importante no desenvolvimento de linhagens de fungos produtoras de OTA. Os fatores de afetam o desenvolvimento dos fungos durante a armazenagem

de grãos são, principalmente, a atividade água e temperatura (NORTHOLT *et al.*, 1979). Estudos relacionando estes dois fatores na produção de OTA por espécies de *Aspergillus* em grãos de café têm sido descritos (TANIWAKI *et al.*, 2001; CABRERA *et al.*, 2001; SUÁREZ- QUIROZ *et al.*, 2004).

3.2.2 Legislações para OTA

Em geral, o quadro legislativo de um país estabelece que qualquer alimento que contenha um contaminante em quantidade que é inaceitável do ponto de vista de saúde pública, e em particular, a um nível toxicológico, não pode ser comercializado no país. Os níveis de contaminantes devem ser mantidos tão baixos quanto pode ser alcançado através de boas práticas (EMAN, 2012).

Na união Europeia, a Comissão de regulamento (EUROPEAN COMMISSION n.º 1881/2006, de 19 de dezembro de 2006), estabelece limites máximos específicos de OTA para alimentos como cereais e produtos derivados de cereais não processados, uva passas, grãos de café e café solúvel, vinho, suco de uva, especiarias e produtos para crianças. Limites máximos nacionais adicionais para OTA são estabelecidos nos estados membros da união europeia, como Dinamarca, Hungria, Itália e Alemanha na sua legislação nacional.

Egito e Bósnia e Herzegovina consultam a Comissão de regulamento para a criação de seus limites máximos nacionais para OTA. Embora, os limites estabelecidos não sejam idênticos à União Europeia, eles são muito semelhantes (EMAN, 2012).

Na Rússia, são estabelecidos limites máximos de OTA para vários cereais e produtos de cereais, bem como diversos produtos para crianças. O limite de trigo, cevada, centeio, aveia, produtos de cereais é fixada em 0,005mg/kg, enquanto o limite para produtos específicos para crianças é de 0,5 µg/kg. Na China, o limite de 5,0 mg/kg para OTA está definido para cereais, produtos de cereais, legumes e leguminosas. (RSNF, 2001; GB, 2011).

No Codex Alimentarius, um limite de 5 µg/kg está definido para trigo, cevada e centeio, somente. Esses limites são adotados na Nigéria e Quênia. Na Índia, um limite máximo para OTA é estabelecido para os mesmo produtos da Codex, entretanto, o limite estabelecido é 20 µg/kg (FSS, 2011).

Não há limites específicos para OTA em alimentos fixados no EUA, Canadá, Austrália, Nova Zelândia, México e África do Sul (EMAN, 2012).

Em 2011 a ANVISA, publicou a RDC nº7 que dispõe sobre limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos no Brasil. A legislação inclui cereais e produtos de cereais, feijão, café torrado e café solúvel, vinhos e derivados, suco de uva e polpa de uva, especiarias, alimentos à base de cereais para alimentação infantil, produtos de cacau e chocolate, amêndoa de cacau e frutas secas. Os limites variam de 2 µg/kg (vinho, suco de uva, polpa de uva e alimentos à base de cereais para alimentação infantil) a 30 µg/kg (especiarias). No quadro 5 estão descritos os limites máximos de OTA em café verde, café torrado e café instantâneo em alguns países.

País	Limites de OTA (µg/kg)		
	Café verde	Café torrado	Café instantâneo
Brasil	-	10	10
República Checa	10	10	10
Egito	-	5	10
Finlândia	5	5	5
Alemanha	-	3	6
Grécia	20	-	-
Hungria	15	10	10
Indonésia	-	5	10
Itália	8	4	4
Japão	5	-	-
Malásia	-	5	10
Portugal	8	4	4
Espanha	8	4	4
Suíça	5	5	5
Coreia do Sul	-	<5	<10
Holanda	-	10	10
Vietnã	-	5	10
União Europeia	-	5	10

QUADRO 5 – LIMITES DE OTA FIXADO EM ALGUNS PAÍSES PARA CAFÉ VERDE, CAFÉ TORRADO E CAFÉ INSTANTÂNEO.

LEGENDA: - NENHUM LIMITE FIXADO.

FONTE: GOPINANDHAN, BASAVARAJ, RAGHURAMULU, 2013; EMAN, 2012;

3.2.3 Métodos de controle da OTA

APPCC (Análise de perigos e pontos críticos de controle - Hazard Analysis and Critical Control Point - HACCP) é um sistema de qualidade que identifica, avalia e controla perigos significativos para a segurança alimentar. É uma abordagem estruturada para o controle da segurança alimentar, em todo o sistema mercantil. Este sistema requer uma boa compreensão da relação entre causa e efeito, sendo um elemento chave na gestão de qualidade total. APPCC baseia-se nos fundamentos da qualidade, tais como boas práticas de fabricação (BPF), Boas práticas de higiene (BPH), Boas práticas agrícolas (BPA) e Boas práticas de armazenamento (BPAr) (FAO, 2001).

Ao aplicar o conceito do APPCC para a gestão de risco de um efeito adverso na saúde, como resultado a exposição à micotoxinas, um adequado, saudável e seguro fornecimento de alimentos serão mantidos. A fim de projetar e desenvolver um programa de gestão eficaz baseado em APPCC contra micotoxinas um determinado país deve considerar fatores como o clima, sistema agrícola, técnicas de pré-colheita e pós-colheita, importância para a saúde pública, a disponibilidade de recursos analíticos e até mesmo a economia. Em um sistema de gestão integrado ideal que incorpora o conceito de APPCC, as micotoxinas seriam minimizadas em todas as fases da produção, colheita, processamento e distribuição (FAO/WHO/UNEP, 1999).

Dois projetos foram realizados para aplicar o sistema APPCC no controle da OTA em cereais e café. O primeiro, Projeto PREV OTA, estabelece um sistema APPCC específico para a prevenção de OTA em culturas de cereal na União Européia (OLSEN, 1999; AMÉZQUETA *et al.*, 2009). O segundo projeto foi proposto durante a Conferência Internacional sobre Micotoxinas FAO/WHO/UNEP (1999) para controlar a ocorrência de OTA em culturas de café em todo o mundo. Neste sentido, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a Organização Internacional do Café e a indústria de café européia, juntamente com países produtores de café, distribuíram guias sobre a correta produção de café, colheita, processamento, armazenamento e transporte, sendo também definida uma série de ferramentas necessárias para estabelecer um sistema específico de APPCC (FAO, 2006 *apud* AMÉZQUETA *et al.*, 2009).

Além disso, outras estratégias têm sido desenvolvidas para prevenir o crescimento de fungos produtores de OTA e também descontaminar alimentos e rações (KABAK, 2006; HATHOUT, ALY, 2014).

3.2.3.1 Prevenção da contaminação por OTA

A prevenção como estratégia complementar para descontaminação de micotoxinas é uma questão de grande importância. Geralmente, qualquer abordagem que visa reduzir o impacto tóxico e econômico das micotoxinas deve estar envolvido no máximo possível dos seguintes requisitos: (1) prevenir, destruir, remover ou descontaminar as micotoxinas de alimentos e rações; (2) não produzir ou deixar resíduos tóxicos e/ou cancerígenos ou mutagênicos nos produtos finais; (3) não alterar significativamente a importância tecnológica e propriedades nutricionais de alimentos e rações; (4) ser tecnicamente e economicamente viável (AWAD *et al.*, 2010; KOLOSOVA, STROKA, 2011).

Medidas práticas comuns incluem o plantio de variedades mais resistentes de cereais, seleção de sementes de alta qualidade, gestão preventiva no sentido das infestações de insetos, bem como a gestão adequada de resíduos de culturas que muitas vezes são o inóculo primário de fungos micotoxigênicos (KABAK *et al.*, 2006).

A prevenção de infecções fúngicas durante o crescimento dos cultivos (plantas), a colheita, o armazenamento e distribuição parece ser a forma mais racional e eficiente para evitar as micotoxinas em produtos agrícolas (DOYLE *et al.*, 1982; HUWIG *et al.*, 2001; KOLOSOVA, STROKA, 2011).

Para impedir o crescimento fúngico em grãos, deve-se secá-los totalmente e mantê-los em local fresco. Para prevenir a formação de OTA por *A. ochraceus*, por exemplo, a atividade água do grão deve ser reduzida a menos de 0,8. O armazenamento vedado e a atmosfera controlada, especialmente em regiões tropicais e semitropicais, onde os danos causados por inseto são um problema crítico, é de grande importância. A atmosfera controlada no armazenamento é baseada na aplicação da atmosfera por baixo oxigênio ou alta densidade de dióxido de carbono. A utilização de uma atmosfera melhorada no controle de insetos contribui para o controle de fungos (AMÉZQUETA *et al.*, 2009). A utilização dos agentes antifúngicos durante o armazenamento pode levar a uma diminuição do crescimento do fungo, entretanto, não descontamina produtos já contaminados (AWAD *et al.*, 2010).

Quando as condições são favoráveis para a contaminação por fungos, não é incomum que mais de um tipo de fungo esteja envolvido. Durante o armazenamento, os grãos são frequentemente colonizados por uma sucessão de fungos,

dependendo da temperatura e umidade. Devido a estas interações de várias espécies de fungos o grão pode ser contaminado com um número diferente de micotoxinas (BINDER, 2007). Estudos indicam que importantes interações inter e intra-específicas ocorrem, dependendo das espécies presentes e as condições ambientais prevalentes. O domínio de certas espécies foi demonstrado sob condições de mudanças, especialmente com mudanças no conteúdo de água (KOLOSOVA, STROKA, 2011).

3.2.3.2 Descontaminação de OTA

Para os grãos de café e derivados alguns métodos de processamento podem levar a uma redução da OTA nesses alimentos (AMÉZQUETA *et al.*, 2009). O manufaturamento pós-colheita do café pode ser realizado utilizando dois processos. O método seco consiste em uma fase de secagem natural (no sol) ou uma fase de secagem artificial, seguido de descasque mecânico. No método úmido, as cerejas são despulpadas, os grãos resultantes são secos e descascados. O despulpamento não resulta em qualquer alteração significativa nos teores de OTA. No entanto, há uma diferença entre a remoção da mucilagem por fermentação ou método físico, no último caso há uma redução substancial nos níveis de OTA. Para o método seco há um aumento no teor de OTA, o que sugere uma produção durante a secagem. No entanto, a remoção da casca provoca o desaparecimento ou redução da toxina. Em seguida, a recontaminação durante a fase de armazenamento pode ser permitida através da produção da toxina (SUAREZ-QUIROZ *et al.*, 2005).

Uma vez o café contaminado, o processo de descafeinação industrial pode reduzir os níveis de OTA de 60% a 90% (AMÉZQUETA *et al.*, 2009). Alguns estudos sobre a influência do processo de torrefação sobre os níveis de OTA indicaram uma redução de 77% a 87% (LEVI, TRENK, MOHR, 1974).

Durante a fabricação da bebida, a moagem do café implica na diminuição da OTA em 20%. A vaporização do café pode também promover a diminuição da OTA, com redução de 25%. Em relação à preparação da bebida, existem vários estudos contraditórios: alguns autores apontam que após a preparação, a toxina encontrada no grão de café ainda estava presente (AMÉZQUETA *et al.*, 2009), enquanto Micco *et al.* (1989), observaram uma redução de 90% a 100% de OTA após a preparação

da bebida. Pérez de Obanos *et al.* (2005), apontaram que, dependendo do método de preparação utilizado as perdas de OTA podem variar de 15% a 50%.

Estratégias de descontaminação são classificadas de acordo com o tipo de tratamento – física, química, biológica ou microbiológica – e seu objetivo é reduzir ou eliminar os efeitos tóxicos por OTA, destruir, modificar ou adsorver essa micotoxina, além de não produzir compostos tóxicos ou/e não alterar os parâmetros de qualidade dos alimentos (FAO/WHO/UNEP, 1999; AZIZI, RAHIMI, SHATERI, 2012).

A fim de evitar a OTA, camadas externas que estão em contato com fungos produtores desta micotoxina, devem ser eliminadas, este método é classificado como um tratamento físico para descontaminação de OTA. Este tratamento não é viável para todos os alimentos, como cereais e uvas (AZIZI, RAHIMI, SHATERI, 2012).

Tratamentos térmicos não eliminam completamente a OTA. Processo de congelamento (-20°C) e descongelamento (26°C) e tratamentos de UV e gama são capazes de diminuir a produção dos conídios dos fungos. No entanto, apenas a radiação gama pode destruir a OTA (AMÉZQUETA *et al.*, 2009).

Para a descontaminação de OTA por compostos químicos, vários materiais adsorventes como carvão ativado, colestiramina, silicatos de sódio e alumínio de cálcio (principalmente zeólitos) e bentonita são descritos. Apesar do carvão ativado apresentar uma alta atividade, o seu uso tem sido rejeitado devido a retenção de nutrientes e envenenamento animal (GAMBUTI *et al.*, 2005).

Agentes de refinação do vinho como caseinato de potássio ou carbono ativado têm mostrado efeitos positivos na desintoxicação de OTA, com redução de até 82%, mas eles também têm prejudicado a qualidade do vinho. Uma fibra vegetal insolúvel foi desenvolvida a fim de adsorver OTA de produtos alimentares líquidos, como no caso da cerveja. Atualmente, os materiais adsorventes mais promissores são zeólitos modificados, mostrando bons resultados na descontaminação de alguns produtos alimentares (DAKOVIC´ *et al.*, 2005).

Em relação ao café, tratamentos com acetato de etila, diclorometano e ácido fórmico com cloreto de metileno são capazes de reduzir níveis de OTA (BORTOLI, FABIAN, 1997; HEILMANN *et al.*, 1999).

Existe uma grande procura por uma nova abordagem para prevenir a formação de micotoxinas em alimentos e rações. Embora numerosos métodos físicos e químicos de desintoxicação tenham sido testados, nenhum possui

realmente a eficácia e segurança necessárias. Dessa forma, recentemente, pesquisas têm relatado que muitos micro-organismos, incluindo, bactérias, leveduras, fungos e actinobactérias são capazes de remover ou degradar micotoxinas em alimentos e rações (HATHOUT, ALY, 2014).

A carboxipeptidase A é uma enzima capaz de destruir a OTA (ABRUNHOSA, VENÂNCIO, 2007) e o uso de linhagens de *A. niger* não toxigênicas como origem da carboxipeptidase é sugerida (ABRUNHOSA, SERRA, VENÂNCIO, 2002; VARGA RIGÓ, TÉREN, 2000). Outras enzimas que podem ser obtidas a partir de linhagens de *A. niger* e eficientes para degradar OTA são as lipases, enzimas brutas e metaloenzima (ABRUNHOSA, SANTOS, VENANCIO, 2006; ABRUNHOSA, VENÂNCIO, 2007).

Além disso, bactérias pertencentes aos gêneros *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Butyribrio*, *Phenylobacterium*, *Pleurotus*, *Bacillus* e *Acinetobacter* e fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. versicolor*, *A. wentii* e *A. ochraceus*), *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Phaffia*, *Penicillium* e *Rhizopus* (*R. stolonifer* e *R. oryzae*) e leveduras do gênero *Saccharomyces* são capazes de degradar a OTA in vitro mais que 95%. Entretanto, alguns desses micro-organismos também apresentaram propriedades degradadoras in vivo (FUCHS *et al.*, 2008; AMÉZQUETA *et al.*, 2009; HATHOUT, ALY, 2014).

Na indústria, os processos microbiológicos que reduzem o teor de OTA são: a maltação e a fermentação final na fabricação de cerveja (KROG *et al.*, 1974) e a fermentação maloláctica na produção de vinhos (ICV, 2002).

Várias plantas apresentam atividade antifúngica, assim óleos essenciais e extratos etanólicos e aquosos são descritos como possíveis inibidores de crescimento de fungos produtores de OTA (HUA *et al.*, 2014). Óleos essenciais de boldo, hortelã e cravo podem inibir o crescimento de *A. niger* e *A. carbonarius*, afetando também a biossíntese de OTA (PASSONE, GIRARDI, ETCHEVERRY, 2012). A exposição a vapores destes óleos pode ser uma alternativa efetiva e não tóxica contra a contaminação por OTA em grãos estocados e alimentos.

3.3 Café

O gênero *Coffea* L., 1753, apresenta aproximadamente 100 espécies de cafeeiros (CARVALHO *et al.*, 2001). As evidências botânicas sugerem que a planta do café originou-se na Etiópia Central e os holandeses foram os primeiros a iniciar o seu cultivo comercial em 1658. No Brasil, as primeiras sementes e mudas foram plantadas em Belém do Pará em 1769 e somente em 1820, o Brasil foi considerado um exportador de café (IBC/GERCA, 1981).

O Brasil é maior produtor e exportador mundial de café e colheu, na safra 2014, mais de 45,3 milhões de sacas beneficiadas, sendo 32,3 milhões de café arábica e 13,0 milhões de conilon. O Vietnã, segundo maior produtor, deve produzir cerca de 29,3 milhões de sacas. Neste país predomina o cultivo de café conilon (CONAB, 2015).

Sabe-se que há diferenças na qualidade do café entre as espécies, sendo que o café arábica possui melhor qualidade, com concentrações mais elevadas de carboidratos, lipídeos e compostos orgânicos, a exemplo da trigonelina. Já os cafés robustos (conilon) são considerados bebida neutra, possuem maiores teores de cafeína e compostos fenólicos (ILLY; VIANI, 1995 *apud* MALTA; SANTOS; SILVA, 2002).

Estudos mostraram que a mucilagem do café pode ser um bom substrato para diversos micro-organismos. A contaminação ocorre principalmente durante o processamento do café pela via seca, na qual a mucilagem não é retirada (SILVA *et al.*, 2000). Vários autores pesquisaram a microbiota de grãos de café e isolaram bactérias (NAYAK *et al.* 2013), leveduras (VILELA *et al.* 2010) e fungos (IAMANAKA *et al.*, 2014)

A microbiota associada aos grãos de café é bastante diversificada e está diretamente relacionada a alguns sabores e aromas característicos da bebida. Nas bebidas tipo rio e riada (qualidade inferior), a infecção por *Aspergillus* é elevada, o que pode estar relacionado com a taxa de umidade superior a 10% encontrada nestes grãos beneficiados. Nos cafés de bebida mole (qualidade superior) a infecção pelo gênero *Aspergillus* é menor (PIMENTA, CHALFOUN, 2001).

3.4 *Ilex paraguariensis* (erva-mate)

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), planta da família *Aquifoliaceae*, é originária da América do Sul, encontrada na Argentina, Paraguai, Uruguai e no sul

do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Também é cultivada em pequenos nichos nos estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro (MAZUCHOWSKI, 1989; FILIP, FERRARO, 2004). A erva-mate nativa cresce espontaneamente em associação com as araucárias (*Araucaria angustifolia*), preferindo os solos úmidos e sombrios (EMATER, 1991).

Grande parte da produção brasileira de erva-mate destina-se ao consumo na forma de bebidas (chimarrão, composto para chimarrão, chá e tererê). No entanto, por sua composição química complexa em razão da presença de compostos orgânicos bioativos (cafeína, ácidos fenólicos e saponinas) e de outros extratos da planta, são promissoras as perspectivas de sua utilização em novas áreas, como na elaboração de extratos e concentrados ou fonte de produtos farmacêuticos para a fitoterapia (MIRANDA *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2009).

A erva-mate possui alguns morfotipos, ou seja, aspectos que diferenciam plantas de mesmo gênero, espécie e local. A erva-mate do morfotipo amarelinha caracteriza-se por apresentar as folhas em tonalidade mais clara na região do limbo e as nervuras principais e secundárias em tonalidade amarela; no morfotipo cinza as folhas apresentam o limbo com uma tonalidade cinza-esverdeada e as nervuras não tão amarelas, como no morfotipo amarelinha. No morfotipo sassafrás as folhas apresentam o limbo verde escuro brilhante na face adaxial da folha com nervuras num tom mais claro. Os morfotipos podem se diferenciar em relação a elementos nutricionais como Ca, Mn e Fe (REISSMANN *et al.*, 2003 *apud* RIBEIRO, 2005)

A erva-mate é uma bebida estimulante: elimina a fadiga, estimula a atividade física e mental, atuando benéficamente sobre os nervos e músculos e favorecendo o trabalho intelectual. Por possuir vitaminas do complexo B, a erva-mate participa do aproveitamento do açúcar nos músculos, nervos e atividade cerebral. Com a presença de vitaminas C e E, age como defesa antioxidante e apresenta benefícios sobre tecidos do organismo. A presença de sais minerais, juntamente com a cafeína, estimula o trabalho cardíaco, ajudando na circulação do sangue e diminuindo a pressão arterial, devido à cafeína, a qual atua como vasodilatador. Em tais situações também pode ser suprida a sensação de fome (BASSANI, CAMPOS, 1997).

A erva-mate favorece a diurese e atua também sobre o tubo digestório, ativa os movimentos peristálticos, facilita a digestão, suaviza os embaraços gástricos, favorecendo a evacuação e a micção. Pesquisas do Instituto Pasteur de Paris

atribuem também ao mate um papel importantíssimo no processo de regeneração celular (ANDRADE, 1999; VALDUGA, 1994).

A erva-mate é uma fonte natural de compostos redutores de lipídios e antioxidantes. Gao *et al.* 2013, investigaram os efeitos anti-hiperlipidêmicos e antioxidantes do chá mate em um modelo de rato hiperlipidêmico. Em comparação com o grupo controle o chá mate reduziu significativamente o peso corporal e níveis séricos do colesterol total e triglicérides. Além disso, o tratamento com chá mate melhora significativamente a degeneração gordurosa das células do fígado.

Diversos compostos químicos foram identificados na erva-mate e acredita-se que eles são os responsáveis pelas propriedades da planta. Os principais compostos bioativos presentes são os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas. Nesta última classe de compostos encontram-se a cafeína, a teobromina e a teofilina (ALIKARIDIS, 1987), componentes de reconhecida ação sobre o sistema nervoso central, aos quais é atribuída a ação estimulante da erva-mate. Dos três compostos, a cafeína é encontrada em concentrações mais elevadas, 1 a 2% do peso seco da planta, seguida pela teobromina, 0,3 a 0,9% do peso seco (ITO, CROZIER, ASHIHARA, 1997). Dentre as classes de saponinas encontram-se triterpenóides glicosilados, os ácidos ursólicos e oleanóico (GNOATTO *et al.*, 2008). Tais substâncias são responsáveis pelo amargor e espuma do mate, além de outras propriedades biológicas. Entre os compostos fenólicos destaca-se o elevado conteúdo de derivados de cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico e seus isômeros, aos quais se atribui a ação adstringente e antioxidante do produto (CLIFFORD, RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; CARDOSO-JÚNIOR *et al.*, 2007).

A cafeína (1,3,7 trimetilxantina) constitui um componente natural em café, com atividade fungistática, e efeito antimicotoxigênico. Isso acontece, pois as metilxantinas consistem um grupo de compostos capazes de conferir propriedades defensivas naturais a plantas contra micro-organismos. Fujii *et al.* (2004), verificaram o efeito da cafeína sobre o crescimento micelial de fungos isolados de café. A cafeína apresentou antibiose proporcional à dose, com inibição de 52,8 a 100% de *Aspergillus flavus*, 9,4 a 72,5% de *Fusarium semitectum*, 8,8 a 66,8% de *Penicillium* sp., 5,3 a 54,1% de *Fusarium* sp., 4,6 a 39% de *A. niger* e 4,7 a 37% de *A. ochraceus*.

A erva-mate contém altas concentrações de compostos inorgânicos. Os minerais, alumínio, cromo, cobre, ferro, manganês, níquel, potássio e zinco são particularmente interessantes devido a sua importância no metabolismo e no desenvolvimento humano (HECK, DE MEJIA, 2007).

3.5 Espectroscopia no infravermelho

Espectroscopia é o estudo das características físicas de átomos ou moléculas pela radiação da molécula na forma de emissão, absorção ou espalhamento. A radiação eletromagnética possui características de onda e partícula. Quando a luz incide sobre a matéria pode ser absorvida por átomos ou moléculas e estes podem ser excitados a maiores níveis energéticos, dependendo do comprimento de onda e da intensidade da fonte de luz. Este processo se chama absorção. O processo de espalhamento define-se como uma parte da radiação eletromagnética que passa pelo material e se espalha em outras direções. Quando as moléculas excitadas com alta energia retornam a um nível de baixa energia pela radiação, denomina-se emissão (SINGH *et al.*, 2006).

A espectroscopia no infravermelho mede o comprimento de onda e a absorção da luz do infravermelho (IR) que incide na matéria de interesse (OSBORNE, FEARN, HINDLE, 1993). A região do infravermelho se estende de região visível à de micro-ondas. Por convenção, a região de infravermelho é dividida em infravermelho próximo, médio e longo (NAUMANN, 2000).

Os nomes estão relacionados com suas posições em respeito ao espectro visível. O infravermelho distante (FIR), aproximadamente $10 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ($1000 - 30 \text{ }\mu\text{m}$) encontrando-se junto à região das micro-ondas, possui baixa energia e pode ser utilizado na espectroscopia rotatória (relacionada com a rotação das moléculas). O infravermelho médio (MIR), aproximadamente $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ($30 - 1,4 \text{ }\mu\text{m}$) e o infravermelho próximo (NIR) aproximadamente $4000 - 14000 \text{ cm}^{-1}$ ($1,4 - 0,8 \text{ }\mu\text{m}$) podem ser utilizados para estudar as vibrações moleculares e a estrutura rotatório-vibratória associada (SANTOS *et al.*, 2010).

As moléculas apresentam diferentes movimentos de vibrações e cada um deles absorve ou emite uma quantidade de energia diferente que é detectada pelo espectrômetro no infravermelho. Existem diversos movimentos vibracionais, no caso

da água são estiramento simétrico, estiramento assimétrico e flexão (FIGURA 2) (ABRAMS, 1993).

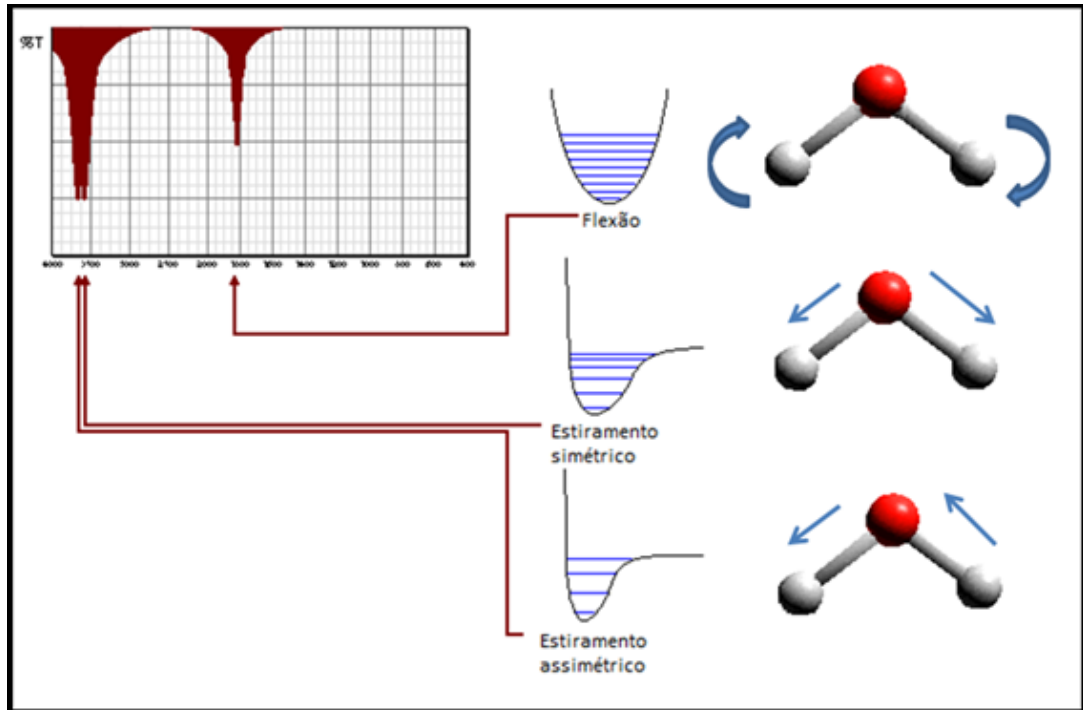


FIGURA 2 – VIBRAÇÕES MOLECULARES ENCONTRADAS NA MOLÉCULA DA ÁGUA (H₂O) E SUAS BANDAS NO ESPECTRO NO INFRAVERMELHO.

FONTE: ABRAMS (1993).

Cada movimento absorve em uma determinada região do espectro, assim uma mesma molécula, dependendo do seu tamanho e diferentes movimentos vibracionais, pode apresentar várias bandas no espectro (SANTOS *et al.*, 2010). Além disso, a informação espectral obtida permite a atribuição, de uma forma qualitativa e quantitativa, de um sinal para os principais constituintes macromoleculares (lipídios, polissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas e etc). Assim, o espectro obtido representa uma “impressão digital molecular” global, que pode ser utilizado para caracterização, diferenciação e identificação de micro-organismos (LECELLIER *et al.*, 2014).

Os espectros de FT-IR de micro-organismos são complexas impressões digitais e requerem extensivos tratamentos dos dados pra obter uma identificação ou classificação satisfatórias. Diferentemente da química, aonde espectros de FT-IR exibem somente poucos picos, podendo ser avaliado a olho nu, espectros

microbianos são usados como impressões digitais e devem ser analisados por técnicas padrões. Os métodos quimiométrico aplicados para estabelecer modelos de classificação precisam garantir uma generalização suficiente, o que é particularmente difícil para amostras biológicas quando comparadas com amostras químicas (KJELDAHL, BRO, 2010).

O campo da quimiometria tem sido aplicado com grande sucesso em vários ramos científicos. As ferramentas quimiométricas permitem a análise de dados multivariados complexos, onde a extração de informação é muito facilitada (KJELDAHL, BRO, 2010).

A calibração multivariada é um processo para criação de um modelo que relaciona concentrações ou propriedades de componentes à absorvância de um conjunto conhecido de amostras de referência, em mais do que um comprimento de onda ou frequência (CÔCCO, 2008).

O PLS (*Partial Least Squares*) é um método no qual todas as variáveis são incluídas no modelo, o que implica que a calibração pode ser realizada eficientemente mesmo na presença de interferentes, não havendo necessidade do conhecimento do número e natureza dos mesmos. As técnicas estatísticas, como o PLS, são realizadas em três estágios: calibração, validação/ otimização e análise de amostras desconhecidas (CÔCCO, 2008).

A espectroscopia no infravermelho já é amplamente utilizada na indústria de alimentos, principalmente de grãos, para determinar a qualidade dos produtos (SINGH *et al.*, 2006). Na Microbiologia, a espectroscopia no infravermelho é utilizada em diversas áreas e com diferentes objetivos, como no estudo de Essendoubi *et al.* (2007), no qual os autores obtiveram sucesso em discriminar diferentes linhagens de *Candida glabrata*, um fungo infeccioso oportunista. Em 2005, Erukhimovitch *et al.*, analisaram o potencial para identificar e discriminar gêneros de fungos como *Fusarium* e *Pythium*, através da espectroscopia no infravermelho próximo.

Este método já foi aplicado para a discriminação de 3 espécies fúngicas de dermatófitos (BASTERT *et al.*, 1999) e para a identificação de 10 espécies de fungos do ar e de origem clínica pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (FISCHER *et al.*, 2006). Em outro estudo a espectroscopia FT-IR foi utilizada com sucesso na diferenciação de 16 isolados pertencentes a 5 espécies de *Fusarium* (NIE *et al.*, 2007). A espectroscopia FT-IR também permitiu a diferenciação de 3 espécies de *Aspergillus* e a discriminação de linhagens produtoras e não produtoras

de aflatoxina (GARON *et al.*, 2010). Shapaval *et al.* (2012), utilizou esta técnica para classificar 59 isolados pertencentes a 19 espécies e 10 gêneros comumente envolvidos na deterioração de alimentos.

4. CAPÍTULO I: Aplicação da espectroscopia no infravermelho médio por transformada de Fourier na identificação de espécies de *Aspergillus* isoladas de grãos de café.

Angela Bozza de Almeida, Carolina Gracia Poitevin, Lílian Cristina Côcco, Carlos Itsuo Yamamoto, Patrícia do Rocio Dalzoto, Ida Chapaval Pimentel.

Resumo:

Na Micologia, um dos principais desafios é diferenciar espécies semelhantes. Métodos baseados na morfologia são geralmente limitados, aumentando assim a demanda por novos campos para se obter resultados melhores e mais confiáveis. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) é proposta como um método alternativo para a classificação dos fungos altamente relacionados, tais como *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus westerdijkiae* ou *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger*. No entanto, as metodologias para o preparo de amostras são demoradas e trabalhosas. Um método tradicional para preparo de amostras foi adaptado para reduzir o tempo e manter a qualidade das análises quimiométricas, em seguida, um modelo foi desenvolvido. Os fungos foram cultivados em meio Sabouraud durante 4 dias, o micélio foi macerado com KBr e analisados por espectroscopia no infravermelho médio por transformada de Fourier (FT-MIR). A regressão parcial dos mínimos quadrados (PLS) foi aplicada aos modelos de comparação de espécies e um teste de previsão foi utilizado para avaliar os modelos. O coeficiente de determinação para calibração e erro quadrático médio de calibração foram 0,94 e 0,23, respectivamente. Na validação externa, apenas um *A. westerdijkiae* não foi corretamente classificado. Os resultados sugerem que a adaptação da metodologia acelerou o processo de preparação da amostra, mantendo a confiabilidade.

Palavras chave: *Aspergillus*; grãos de café; espectroscopia; identificação.

4.1 Introdução

Aspergillus é um dos gêneros economicamente mais importantes de fungos; dessa forma, rigor e estabilidade de sua taxonomia são de interesse prático e significativo (GEISER *et al.*, 2007). Algumas espécies de *Aspergillus* são bem

conhecidas como potenciais produtoras de ocratoxina A (OTA), uma micotoxina capaz de produzir efeitos nefrotóxicos, teratogênicos, imunotóxicos, e cancerígenos em animais (SARTORI *et al.*, 2006) e considerado um potencial cancerígeno em humanos pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1993; PETZINGER, ZIEGLER, 2000) Resultados recentes indicam que *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus steynii*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* são responsáveis pela formação de OTA nos grãos de café (FRISVAD *et al.*, 2007; MATA *et al.*, 2007; VEGA *et al.*, 2006).

Vários estudos sugerem que *A. ochraceus* é a principal espécie que produz OTA nos grãos de café, sendo encontrado com maior frequência que as outras espécies da seção *Circumdati* (STACK *et al.*, 1983). No entanto, Frisvad *et al.* (2004) e Fungaro *et al.* (2004) observaram características específicas de *A. ochraceus* e propuseram uma subdivisão de *A. ochraceus* em duas espécies, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*. Através análise genotípica (FUNGARO *et al.*, 2004) e reorganização taxonômica (FRISVAD *et al.*, 2004), concluiu-se que *A. westerdijkiae* está fortemente relacionada com a presença de OTA nos grãos de café produzidos no Brasil.

A taxonomia de *Aspergillus* seção *Nigri* tem sido extensivamente estudada e foi recentemente revista. Estudos taxonômicos utilizando métodos moleculares levaram à separação do complexo *A. niger* em duas espécies, *A. niger* e *A. tubingensis* (SAMSON, HONG, FRISVAD, 2006).

A sistemática de *Aspergillus* é complexa pela existência de divergência morfológica entre os isolados da mesma espécie. Marcadores moleculares são muitas vezes limitados, levando a exploração de novos campos para obter resultados melhores e mais confiáveis. As abordagens modernas, tais como perfis polifásicos de micro-organismos fornecem resultados relevantes para problemas filogenéticos e taxonômicos; no entanto, eles podem ser demorados e impróprios para utilização na rotina (TRALAMAZZA *et al.*, 2013). A espectroscopia de infravermelho foi reconhecida como uma alternativa valiosa para a caracterização dos fungos (SHAPAVAL *et al.*, 2013).

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica com base na medição de modos vibracionais moleculares fundamentais (LECELLIER *et al.*, 2014). Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier é geralmente utilizada para determinar a composição química de compostos orgânicos. A técnica baseia-se no fato da radiação infravermelha ser absorvida por ligações moleculares

como C-H, O-H, N-H, C=O e C-C. A energia absorvida pelas amostras é resultante de flexão, alongamento e torção das ligações levando a padrões característicos de transmitância e reflectância (NAUMANN *et al.*, 2005; CHALMERS, GRIFFITHS, 2002; GÜNZLER, GREMLICH, 2002). O resultado é apresentado na forma de um espectro de FT-IR e cada banda espectral é caracterizada por sua intensidade e frequência, e o espectro global representa "a impressão digital molecular" (DUYGU *et al.*, 2009; NAUMANN, 2000). Estes perfis espectrais apresentam informações importantes sobre macromoléculas presentes em células, tais como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos (LECELLIER *et al.*, 2014).

A espectroscopia de infravermelho já foi utilizada por vários autores para a identificação de micro-organismos, com destaque para as aplicações desta técnica (SHAPAVAL *et al.*, 2013; ERGIN *et al.*, 2013; MARQUES *et al.*, 2013; ESSENDOUBI *et al.*, 2007; HELM *et al.*, 1991). No entanto, métodos de preparação da amostra são demorados e laboriosos (TRALAMAZZA *et al.*, 2013; LECELLIER *et al.*, 2014; GARON *et al.*, 2010). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi otimizar a técnica tradicional de preparo de amostras, tornando-o mais rápido e mais fácil e também desenvolver um modelo quimiométrico satisfatório para a correta identificação das espécies de *Aspergillus*.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Material biológico

Foram analisados quarenta fungos do gênero *Aspergillus*, isolados a partir da superfície de grãos de café de Londrina, PR (colheita 2011). Os isolados estão mantidos na coleção de cultura do LabMicro (Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil). Características macroscópicas e microscópicas foram observadas (FRISVAD *et al.*, 2004; SAMSON, 2000; PITT, HOCKING, 1997) e os isolados foram identificados ao nível de seção (*Nigri* e *Circumdati*).

Quatro linhagens padrões de *Aspergillus*, todas produtoras de OTA, foram utilizadas: *Aspergillus ochraceus* 40013 (ATCC 22947) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. *Aspergillus niger* UEL 1, *Aspergillus carbonarius* UEL 187 e *Aspergillus westerdijkiae*

UEL 91 foram cedidos pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

4.2.2 Identificação Molecular

Para confirmação das espécies, foi realizado o sequenciamento parcial dos genes da β -tubulina e calmodulina e a região do espaço interno transcrito (ITS) usando oligonucleotídeos iniciadores específicos. Para amplificação do gene β -tubulina foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'); para amplificação do gene calmodulina foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores CL1 (5'-GARTWCAAGGAGGCCTTCTC-3') e CL2A (5'-TTTTGCATCATGAGTTGGAC-3'), os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') foram utilizados na amplificação da região ITS (O'DONNELL *et al.*, 2000; GLASS, DONALDSON, 1995; WHITE *et al.*, 1990).

4.2.3 Preparação das amostras para espectroscopia FT-IR

Para as análises de espectroscopia, linhagens selecionadas por sequenciamento foram selecionadas. As linhagens foram cultivadas em meio Sabouraud (glicose 40g/L, peptona 10g/L e ágar 15g/L) por 4 dias, a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em BOD, em triplicata. O micélio resultante foi raspado com auxílio de um cabo de Kolle e transferido para tubos eppendorfs.

4.2.4 Espectroscopia FT-IR

Imediatamente após a remoção, o micélio foi macerado com KBr seco na proporção de 1:100 e pressionado em pastilhas com uma prensa hidráulica (CrushIR, PIKE Technologies, USA). Espectros foram capturados no modo transmitância a 64 "scans", com resolução espectral 4 cm^{-1} e intervalo espectral de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$, usando um espectrômetro FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA).

4.2.5 Análise espectros FT-IR

As análises quimiométricas foram realizadas com o software Unscrambler (versão 9.7, Camo Software AS, Oslo, Norway). Os espectros de FT-IR foram cortados na região 4000-750 cm^{-1} , para a remoção de interferentes; a região entre 4000- 750 cm^{-1} inclui a maioria das informações bioquímicas (LECELLIER *et al.*, 2014). A região 2393-2283 cm^{-1} , relacionada a contaminação por CO_2 também foi removida. O KBr foi utilizado como branco e o espectro de KBr foi subtraído durante a manipulação espectral. Vários métodos de pré-processamentos matemáticos foram avaliados (APÊNDICE A) e o melhor foi selecionado. Espectros foram normalizados e primeira derivada aplicada aos dados, com Savitzky-Golay com 5 pontos de alisamento seguido pela correção do espalhamento multiplicativo (MSC), para a obtenção de uma boa acurácia no modelo matemático.

No presente estudo, regressão parcial dos mínimos quadrados (PLS) foi o método de classificação utilizado. Com a vantagem de que todos os dados disponíveis podem ser utilizados para determinar o modelo de calibração, foi adotado o método de validação cruzada para avaliar os modelos estabelecidos (LIU *et al.*, 2013; TRAVALLAIE *et al.*, 2011; SZYDLOWSKA-CZERNIAK, 2007). Na validação cruzada de um modelo de calibração, uma ou mais amostras são removidas a partir do conjunto de amostras de calibração. Modelos de calibração são então preparados com as amostras restantes com diferentes números de principais componentes, com a predição da amostra removida determinada para cada modelo. Este processo é repetido até que todas as amostras são atribuídas aos grupos corretos (THERMO GALACTIC, 2013).

O coeficiente de determinação para calibração (R^2), o coeficiente de determinação para validação cruzada (r^2), a raiz quadrada do erro de calibração (RMSEC) e a raiz quadrada do erro de validação externa (RMSECV) foram utilizados para avaliar os parâmetros do modelo PLS.

Para provar que o modelo matemático obtido pode ser utilizado para prever as espécies em estudo, uma validação externa foi realizada com 9 novos isolados fúngicos. Nesta validação externa, o modelo matemático foi utilizado para prever qual grupo os fungos isolados pertenciam. Os espectros para a validação externa foram colhidos 15 após os demais.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Identificação morfológica e molecular

Entre os 40 *Aspergillus* isolados, 30 espécies foram identificadas como pertencentes à seção *Nigri*, sendo, 29 *A. niger* e 1 *A. carbonarius*; 10 isolados da seção *Circumdati* foram identificados como *A. westerdijkiae*.

Doze linhagens selecionadas (TABELA 1) e linhagens padrões foram utilizadas para avaliar a acurácia da metodologia de espectroscopia de transmitância FT-MIR na discriminação de *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*. Devido ao número desigual das linhagens das espécies de interesse, repetições das culturas foram realizadas para que cada grupo tivesse ao menos quatro representantes. Um número uniforme de amostras para cada grupo é necessário, para garantir que o modelo matemático possa representar satisfatoriamente cada grupo.

TABELA 1 – LINHAGENS USADAS NA ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE FT-IR E SEUS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO NO GENBANK.

Linhagens	Genes sequenciados	No. acesso GenBank	Identificação
102 3 F1	ITS	KJ599601	<i>A. westerdijkiae</i>
107 3 F3	ITS	KJ599602	<i>A. westerdijkiae</i>
104 2 F4	ITS	KJ599603	<i>A. westerdijkiae</i>
165 1 B1	β -tubulina	KJ599623	<i>A. westerdijkiae</i>
189 1 A3	β -tubulina	KJ599618	<i>A. westerdijkiae</i>
144 3 K2	β -tubulina, calmodulina	KJ599604/KJ599576	<i>A. carbonarius</i>
177 2 F1	β -tubulina, calmodulina	KJ599619/KJ599597	<i>A. niger</i>
136 1 C1	β -tubulina, calmodulina	KJ599607/KJ599598	<i>A. niger</i>
132 3 L1	β -tubulina, calmodulina	KJ599618/KJ599599	<i>A. niger</i>
187 2 H1	β -tubulina, calmodulina	KJ599619/KJ599596	<i>A. niger</i>
149 2 G1	β -tubulina, calmodulina	KJ599605/KJ599594	<i>A. niger</i>
144 3 I1	β -tubulina, calmodulina	KJ599606/KJ599595	<i>A. niger</i>

FONTE: O AUTOR (2015).

Como não foi encontrado nenhum isolado de *A. ochraceus*, e sabendo do papel desta espécie na produção da OTA, optou-se por realizar repetições da linhagem padrão de *A. ochraceus*.

4.3.2 Análise FT-IR: preparação da amostra

As vantagens da espectroscopia de FT-IR para discriminação e identificação de fungos são bem conhecidas, a técnica é não destrutiva, rápida e não requer o

uso de vários reagentes químicos (GASPARDO *et al.*, 2012; GIVENS, DE BOEVER, DEAVILLE, 1997).

Diversos métodos de preparo de amostras para discriminação e classificação de fungos pela espectroscopia de FT-IR tem sido descritas (LECELLIER *et al.*, 2014; GARON *et al.*, 2010). Em seguida, além de desenvolver um modelo para diferenciar as amostras de fungos corretamente, foi desenvolvido um método de preparação de amostra rápido, fácil e confiável. O método de preparação simplificado desenvolvido consiste na raspagem de micélio do meio sólido, após 4 dias de crescimento e a moagem deste micélio até a obtenção de um pó fino.

O micélio em pó é uma mistura lisa e homogênea que permite uma leitura representativa de todo o organismo, ao invés de uma mistura heterogênea de estruturas maiores e quimicamente distintas, tais como hifas (NAUMANN, 2009). O micélio fúngico tem uma composição bioquímica mais específica e complexa que os esporos, que são metabolicamente inativos (LECELLIER *et al.*, 2014).

Tralamazza *et al.* (2013), também utilizaram micélio em pó em seu estudo e os autores obtiveram resultados muito satisfatórios, identificando corretamente 100% dos isolados, na discriminação entre *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*; no entanto, o método de preparo das amostras requer vários passos, incluindo liofilização e moagem com nitrogênio líquido.

Naumann (2009), desenvolveu uma técnica de preparação da amostra utilizando micélio em pó, no entanto, as amostras foram submetidas a medições por Reflectância Total Atenuada (ATR). Como validação interna o método classificou 99% dos espectros corretamente. O autor escolheu o ATR por ser um método rápido e fácil para pós, em que a amostra é simplesmente colocada sobre o cristal de ATR, enquanto a pesagem e mistura de pequenas quantidades de amostra com KBr, para a preparação da pastilha é um procedimento elaborado.

Entretanto, o uso de pastilhas de KBr elimina a necessidade de uma subsequente preparação de amostra, assim, a variabilidade que pode surgir na preparação de amostra é evitada e os efeitos de dispersão, potencialmente significativos nas medições de transmissão e reflexão, são minimizados (PARODI, DICKERSON, CLOUD, 2013).

4.3.3 Análise FT-IR: Análise espectros

Espectros foram rastreados entre a faixa que apresenta diferença entre as espécies testadas (*A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*). Os espectros foram normalizados e as bandas de absorção de infravermelho apresentados na FIGURA 3 são típicos de amostras biológicas.

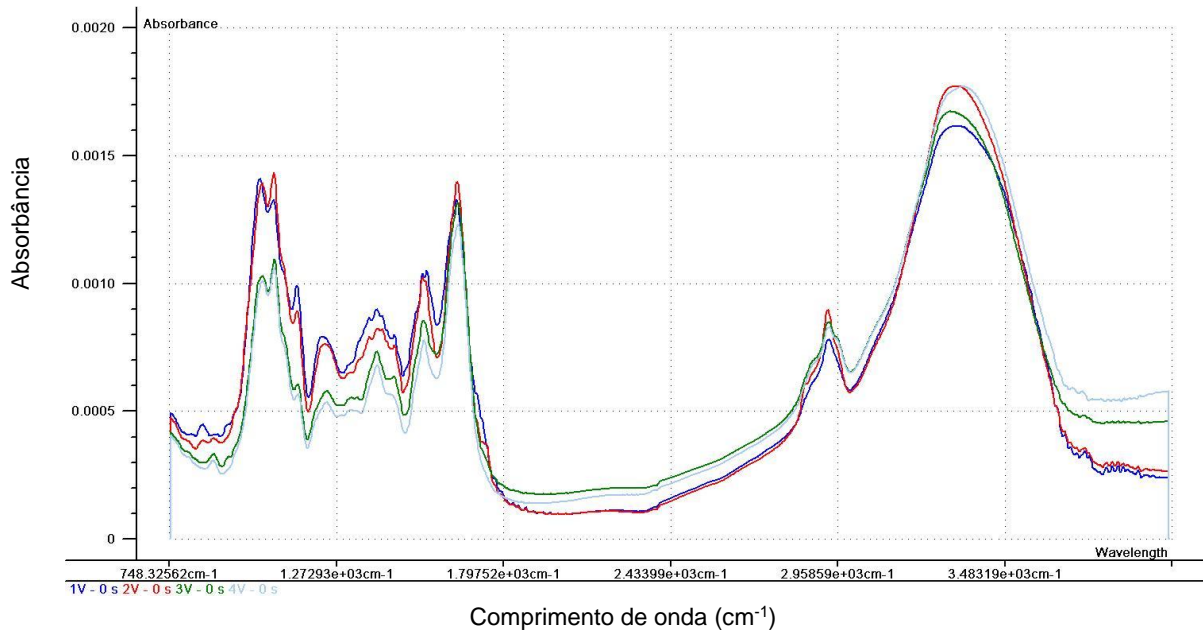


FIGURA 3 – VISTA GERAL (750-4000 CM^{-1}) DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO NORMALIZADOS E ALISADOS.

LEGENDA: AZUL ESCURO – *A. carbonarius*; VERMELHO – *A. niger*; VERDE – *A. westerdijkiae*; AZUL CLARO – *A. ochraceus*.

FONTE: O AUTOR (2015).

Os espectros de *A. niger* e *A. carbonarius* estão mais próximos entre si do que os demais espectros, do mesmo modo, os espectros de *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* são altamente similares (FIGURA 3). O espectro padrão reflete a análise morfológica e fisiológica, pois *A. niger* e *A. carbonarius* ambos pertencem a seção *Nigri*, que compreende fungos com conídios pretos ou quase pretos (PERRONE *et al.*, 2007). *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* pertencem a seção *Circumdati*, a qual compreende fungos do gênero *Aspergillus* com conídios que vão do amarelo ao ocre (SAMSON, HONG, FRISVAD, 2006).

É possível distinguir regiões com diferentes padrões de bandas conhecidos por ser característicos de certos compostos químicos: polissacarídeos (1185-900 cm^{-1}); proteínas, lipídios e compostos de fosfato (1485-1185 cm^{-1}); amidas (1800-1485

cm⁻¹); e lipídios (2996-2800 cm⁻¹) (TRALAMAZZA *et al.*, 2013; NAUMANN *et al.*, 1991).

A. niger e *A. carbonarius* apresentaram os maiores picos para a banda de 1542cm⁻¹, designada “amida II” (TABELA 2). Além disso, existe uma diferença na amplitude da banda entre *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*. As banda em 1400 e 1458 cm⁻¹ são atribuídas aos lipídeos. Enquanto estes dois picos são distintos nos espectros de *A. carbonarius* e *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* apresentaram um único pico nesta região.

TABELA 2 - FREQUÊNCIAS DE ABSORÇÃO DE INFRAVERMELHO CARACTERÍSTICAS DE MICRO-ORGANISMOS E SUA ATRIBUIÇÃO BIOMOLECULAR.

Frequência (cm ⁻¹)	Banda molecular	Atribuição biomolecular
4000-3500	O–H	Grupos hidroxila Lipídeos
3200-2800	CH ₂ , CH ₃	
	N–H	Proteínas
1780-1700	C=O	Ácidos graxos
1695-1625	C=O, C–N	Proteínas (amida I)
	N–H	
1560-1525	C–N	Proteínas (amida II)
	N–H	
1480-1400	CH ₃ , CH ₂	Lipídios
	C=O	
1300-1200	P=O	Ácidos nucléicos
1200-900	C–O–C, C–O, P=O, C–C/C–O	Ribose, glicogênio, ácidos nucleicos
900-700	C–H	Grupos aromáticos

FONTE: LECELLIER *et al.*, 2014; NAUMANN, 2000.

No geral, todos os picos relacionados com proteínas, lipídios e água eram mais fortes nos espectros de *A. niger* e *A. carbonarius*.

4.3.4 Análise FT-IR: PLS

O pré-processamento de dados espectrais de FT-IR tornou-se parte integrante da modelagem quimiométrica. O objetivo do pré-processamento é a remoção de fenômenos físicos no espectro para melhorar a regressão multivariada posterior, o modelo de classificação ou a análise exploratória (RINNAN, VAN DEN

BERG, ENGELSEN, 2009). Por exemplo, a normalização compensa as diferenças de absorção devido a variação de tamanho de amostra ou espessura de amostra (WENNING, SCHERER, 2013). O uso de combinações de métodos de pré-processamento é abundante na literatura e, em princípio, qualquer sequência de métodos de pré-processamento é possível (RINNAN, VAN DEN BERG, ENGELSEN, 2009).

Geralmente, as primeiras ou segundas derivadas são utilizadas, mas a decisão sobre qual aplicar normalmente é feita por tentativa e erro, pois isso depende do tipo do problema de identificação e o grupo de organismo que está sendo estudado. Um efeito positivo do cálculo das derivadas é a eliminação de desvios da linha de base que podem ter sido induzidos por dispersão de luz não específica (WENNING, SCHERER, 2013).

Vários métodos de pré-processamento, incluindo o MSC, atenuam o efeito de dispersão da luz. Com o sistema de partículas, é geralmente assumida que as informações removidas do espectro pela aplicação deste método empírico são essencialmente a manifestação física de espalhamento de luz, e não há nenhuma perda significativa de informação química. Assim, o desempenho de modelos de regressão multivariada é melhorado por meio da estimativa de informações químicas a partir dos espectros corrigidos (CHEN, THENNADIL, 2012). Neste trabalho, normalização, primeira derivada com 5 pontos de alisamento e finalmente o MSC foram adotados, pois esta combinação produziu um modelo final mais preciso do que outros tipos de pré-processamento.

A figura 4 mostra o gráfico de “score” dos dois primeiros principais componentes (PCs) ou variáveis latentes de PLS, com análise de 22 espectros. Este gráfico mostra quatro grupos (*A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*) no espaço bidimensional. Os grupos 1 e 2 correspondem aos isolados da seção *Nigri* e os grupos 3 e 4 consistem em isolados da seção *Circumdati*. Nota-se que há uma grande separação entre as duas seções, mostrando que o modelo foi capaz de discriminar corretamente as seções *Nigri* e *Circumdati*.

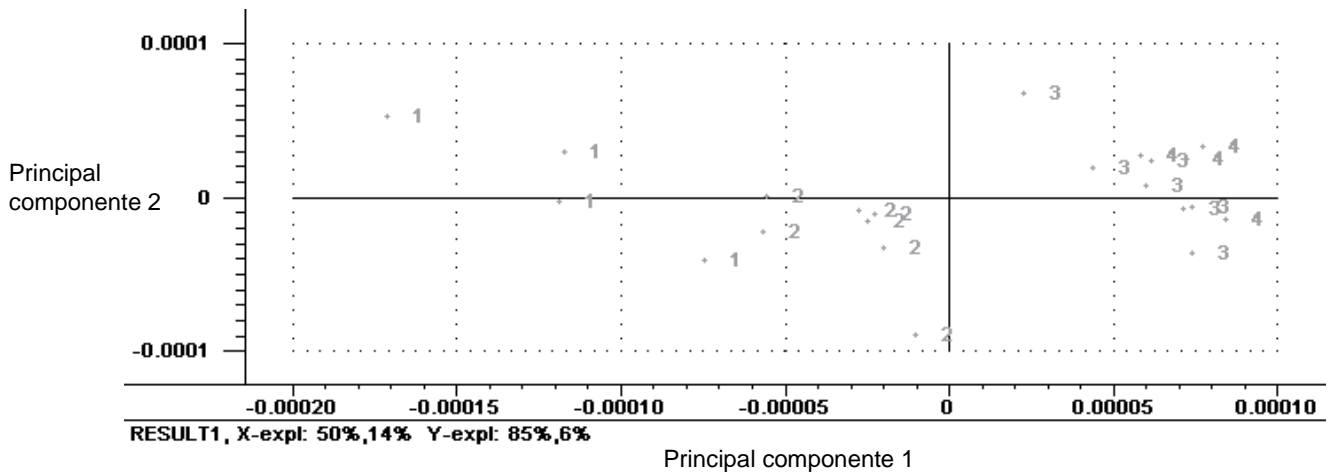


FIGURA 4 – GRÁFICO DE “SCORE” DA PRINCIPAL COMPONENTE 2 VS. PRINCIPAL COMPONENTE 1.

LEGENDA: GROUPO 1 – *A. carbonarius*; GROUPO 2 – *A. niger*; GROUPO 3 – *A. westerdijkiae*; GROUPO 4 – *A. ochraceus*.

A maior proximidade foi observada nos isolados dos grupos 3 e 4 e não houve uma separação clara entre esses grupos. A discriminação entre *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* ocorreu apenas em 2004 (FRISVAD *et al.*, 2004), antes ambas as espécies eram consideradas como *A. ochraceus*. O grupo 2 (*A. niger*) é melhor definido que o grupo 1 (*A. carbonarius*) e há uma separação entre esses grupos.

O desempenho dos modelos de calibração PLS foi avaliado por R^2 , r^2 , RMSEC e RMSECV. Um bom modelo deve ter um baixo RMSEC e RMSECV (com uma pequena diferença) e um alto coeficiente de determinação (mais próximo de 1) (WILLIAMS, 2001).

Com três PCs, altos valores de R^2 (0,94) e r^2 (0,86) e baixos valores de RMSEC (0,23) e RMSECV (0,37) foram observados, mostrando que o modelo pode discriminar corretamente os grupos testados. Um maior número de PCs pode ser utilizado para melhorar a calibração do modelo matemático, embora dentro de um limite para evitar erros resultantes do “over-fitting”.

“Over-fitting” é prejudicial pois não incorpora características preditivas de dados ao modelo, mas também ruído, o que resulta no mau desempenho do modelo na fase de predição. As consequências do “over-fitting” são mais graves para modelos de calibração multivariada e esta é a razão pela qual a seleção de componentes é considerada um passo crítico na modelagem (FABER, RAJKÓ, 2007). Métodos de regressão com menos PCs podem fornecer melhores previsões

de futuras observações. Ramadã *et al.* (2006), para evitar o “over-fitting”, também utilizou 3 PCs.

Cuadraro *et al.* (2005), propuseram critérios para avaliar resultados dos modelos utilizando valores de R^2 . De acordo com os autores, o modelo mostra excelente precisão quando os valores de R^2 são 0,90 ou superiores; boa precisão quando os valores de R^2 estão entre 0,70 e 0,89 e uma discriminação entre boa e baixa quando os valores estão entre 0,50 e 0,69.

Para confirmar a qualidade do modelo, foi realizada uma validação externa; na qual utilizou-se espectros de FT-IR de 9 amostras como entrada e realizou-se a classificação utilizando o modelo PLS. Nesta validação, o modelo classificou corretamente 88,88% das amostras (TABELA 3), com RMSEC de 0,35.

TABELA 3 – PREDIÇÃO DOS GRUPOS.

Linhagens	Identificação	Grupo atual	Grupo predito	Correspondência
1	<i>A. carbonarius</i>	1	1	Sim
7	<i>A. carbonarius</i>	1	1	Sim
2	<i>A. niger</i>	2	2	Sim
8	<i>A. niger</i>	2	2	Sim
16	<i>A. niger</i>	2	2	Sim
3	<i>A. westerdijkiae</i>	3	3	Sim
11	<i>A. westerdijkiae</i>	3	3	Sim
4	<i>A. ochraceus</i>	4	3	Não
4R	<i>A. ochraceus</i>	4	4	Sim

A discriminação de espécies altamente relacionadas, tais como *A. niger* e *A. carbonarius* confirma a robustez do modelo. Entretanto, o modelo não diferenciou corretamente *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*: um isolado do grupo 4 (*A. ochraceus*) foi predito como pertencente ao grupo 3 (*A. westerdijkiae*).

A seção *Circumdati* é especialmente conhecida por sua produção de ocratoxina A. Esta toxina é nomeada após ser descrita primeiramente em *A. ochraceus*, esta espécie levantou grande interesse devido ao seu papel na contaminação do café. Curiosamente, algumas linhagens de *A. ochraceus* já foram re-identificadas como *A. westerdijkiae*; dessa forma, muitas das linhagens relatadas como *A. ochraceus* podem de fato ser *A. westerdijkiae* (MORELLO *et al.*, 2007).

Esta dificuldade em diferenciar *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* também é observada quando análises morfológicas, fisiológicas e por biologia molecular são realizadas; assim, podemos dizer que os espectros de FT-IR não contém diferenças significativas que ajudem a diferenciar esses dois grupos.

4.4 Conclusão

O modelo quimiométrico desenvolvido neste estudo, com base na espectroscopia de transmitância FT-MIR, que foi capaz de distinguir corretamente entre espécies altamente relacionadas, tais como *A. niger* e *A. carbonarius*. No entanto, devido à semelhança química entre *A. ochraceus*, e *A. westerdijkiae*, a diferenciação destas duas espécies não foi possível em todos os casos.

A adaptação do método tradicional de preparação de amostra provou ser muito rápido, sendo completado em 4 dias, e fácil de aplicar, com poucos passos de processamento. No entanto, acredita-se que mais testes devem ser realizados com um número adicional de linhagens para uma classificação exata de espécies de fungos.

Agradecimentos:

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro de nossa pesquisa. Ao laboratório de Infravermelho do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pela valiosa assistência. À Prof^a Dr^a Maria Helena Fungaro, por ceder gentilmente as linhagens de fungos utilizadas como controle.

5. CAPÍTULO II: Inibição de crescimento e de produção de ocratoxina A em espécies de *Aspergillus* por fungos isolados de grãos de café.

Angela Bozza de Almeida, Isabela Pauluk Corrêa, Thiago Pires, Patricia do Rocio Dalzoto, Ida Chapaval Pimentel.

Resumo:

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina encontrada em vários produtos agrícolas que podem representar problemas de segurança alimentar. OTA é produzida por fungos *Aspergillus* e *Penicillium*, é nefrotóxica, imunotóxica, hepatotóxica e pode ser carcinogênica. Alguns países possuem legislação que limita a concentração de OTA em alimentos; algumas medidas preventivas podem ser tomadas para este fim, entre eles, evitar o crescimento fúngico e a produção de OTA. Os métodos biológicos têm sido cada vez mais considerados como uma alternativa aos tratamentos físicos e químicos. Neste estudo, oito fungos (duas linhagens de *Rhizopus oryzae*, *Lichtheimia ramosa*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*), isolados de grãos de café foram avaliadas quanto a capacidade de redução do crescimento de *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* e quanto a capacidade de inibir a produção de OTA. Todos os fungos testados foram capazes de inibir o crescimento de todas as espécies de *Aspergillus* e a produção de OTA, ao passo que a linhagem de *A. niger* C187 apresentou os melhores resultados para ambos os testes. A linhagem *Lichtheimia ramosa* C118 apresentou o menor potencial de redução de crescimento, os demais fungos apresentaram um potencial de redução superior a 70% para todas as espécies de *Aspergillus* testadas. Em relação à inibição da produção de OTA, *Lichtheimia ramosa* C118 e *Aspergillus flavus* C176 inibiram completamente a produção da micotoxina por *A. ochraceus* e a *A. niger* C187 não-toxigênica inibiu completamente a produção de OTA por *A. niger*. Os resultados indicam que as linhagens testadas podem ser utilizadas como uma alternativa no controle do crescimento de fungos produtores de OTA e controle da produção desta micotoxina em grãos de café.

Palavras chave: Fungos, grãos de café, *Aspergillus*, inibição de crescimento, produção de ocratoxina A.

5.1 Introdução

Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, ocorrendo em uma variedade de produtos alimentares antes e durante a armazenagem (GALLO *et al.*, 2009). A OTA é nefrotóxica, imunotóxica, hepatotóxica (CASTEGNARO *et al.*, 1998; PETZINGER, ZIEGLER, 2000; AL- ANATI, PETZINGER, 2006; PATHARAJAN *et al.*, 2011) e tem sido avaliada como potencial carcinogênico (grupo 2B) pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) (IARC, 1993; FIORI *et al.*, 2014). Vários efeitos tóxicos da OTA têm sido descritos, como inibição da síntese proteica, estresse oxidativo e danos no DNA (RINGOT *et al.*, 2006; RINALDI *et al.*, 2007; ALMELA *et al.*, 2007; MECA, RITIENI, 2009). Como uma medida de prevenção, a União Europeia fixou níveis máximos permitidos de OTA em 5 µg/Kg para café torrado (grãos ou moído) e 10 µg/Kg para café solúvel (“Commission regulation” No. 123/2005). No Brasil, os níveis máximos permitidos de OTA em café torrado (grãos ou moído) e café solúvel são de 10 µg/Kg (ANVISA RDC No. 7/2011).

Em regiões temperadas a OTA é produzida principalmente por espécies de *Penicillium*, enquanto em áreas tropicais e subtropicais a OTA é produzida por espécies de *Aspergillus* (VARGA *et al.*, 2001; MASOUD, KALTOFT, 2006). Os principais fungos produtores de OTA em café são *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus steynii*, *Aspergillus ochraceus* e espécies afins (seção *Circumdati*), e *Aspergillus carbonarius*, com um menor número de isolados de *Aspergillus niger* (seção *Nigri*) (TANIWAKI *et al.*, 2003; VEGA *et al.*, 2006; MATA *et al.*, 2007, FRISVAD *et al.*, 2007).

Estratégias têm sido empregadas para prevenir e controlar o crescimento de fungos produtores de OTA em grãos. Produtos químicos e antifúngicos têm sido utilizados para o controle de micotoxinas em pós-colheita em vários alimentos. Entretanto, estes produtos podem levar a um aumento do risco de resíduos tóxicos em alimentos (HUA *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2008; BAIRD *et al.*, 1991), em adição, o uso indiscriminado de antifúngicos pode resultar em resistência fúngica (MA, MICHAILIDES, 2005). Assim, o interesse atual por métodos de controle biológico para OTA em alimentos tem aumentado; pesquisadores demonstraram o potencial de bactérias, leveduras e fungos na inibição do crescimento de fungos que produzem OTA e também na inibição da produção ou degradação desta micotoxina.

Fiori *et al.* (2014), avaliaram 4 linhagens de leveduras (*Cyberlindnera jadinii*, *Candida friedrichii*, *Candida intermedia* e *Lachancea thermotolerans*) contra *A. carbonarius* produtor de OTA e sua capacidade de remover OTA do suco de uva. Segundo os autores *C. intermedia* e *L. thermotolerans* mostraram uma significativa habilidade em inibir *A. carbonarius* em cachos de uva e em experimentos “in vitro”. Masoud e Kaltolf (2006), também obtiveram resultados satisfatórios testando leveduras envolvidas na fermentação do café na inibição do crescimento e produção de OTA por *A. ochraceus*. As leveduras *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum* foram utilizadas para reduzir o crescimento de *A. ochraceus*, a maioria das leveduras apresentou uma porcentagem de inibição superior a 60%, também impediu a biossíntese de OTA no meio MEA. Piotrowska e Zakowska, 2005, testaram bactérias lácticas na eliminação de OTA e uma alta eliminação foi observada por *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus* de 70.5% e 87.5% respectivamente. Estudos utilizando fungos são escassos na literatura, Barberis *et al.*, (2014), estudaram o efeito de fungos isolados do solo na produção de OTA por *Aspergillus carbonarius*, os autores identificaram diversos gêneros capazes de inibir a produção de OTA, como: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Acremonium* e *Geotrichum*.

Neste trabalho, o objetivo foi avaliar o potencial de inibição de crescimento e produção de OTA de oito fungos isolados de grãos de café contra *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus* produtores de OTA.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Material Biológico

Oito fungos foram selecionados a partir de um isolamento realizado de grãos de café verde, de acordo com as diferenças morfológicas. Os fungos foram identificados pela taxonomia clássica de acordo com Samson *et al.* (2000) e De Hoog (2000), sendo, dois isolados de *Rhizopus* spp., um isolado de *Lichtheimia* sp. e cinco isolados de *Aspergillus* spp. Todos os isolados foram depositados na coleção de culturas de microrganismos de LabMicro (Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, Brasil).

Para os testes de redução foram utilizados *A. westerdijkiae* 91, *A. niger* 1 e *A. carbonarius* 187, produtores de OTA, cedidos pelo Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. *A. ochraceus* 40013 (ATCC 22947), também produtor de OTA foi obtido do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz.

As linhagens padrão de *Aspergillus* foram avaliadas quanto a produção de OTA por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), produzindo as concentrações: *A. ochraceus* 1,84 µg/L, *A. westerdijkiae* 1,45 µg/L, *A. niger* 0,40 µg/L e *A. carbonarius* 12,30 µg/L (APÊNDICE B).

5.2.2 Identificação dos fungos isolados de grãos de café

Para confirmação das espécies a extração de DNA foi realizada segundo Badali *et al.*, (2009), os isolados foram sequenciados usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região do espaço interno transcrito (ITS), e em alguns casos, o gene parcial da β -tubulina. Oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') foram utilizados para amplificar a região ITS e Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') foram utilizados para amplificar o gene β -tubulina (WHITE *et al.*, 1990; GLASS, DONALDSON, 1995).

Para a região ITS, a reação de amplificação de DNA ocorreu em um volume de 25 µL, contendo 1x buffer, 2,5mM de MgCl₂, 0,31mM de dNTPs, 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 0,03 U/µL Taq DNA Polymerase (Applied Biosystems). A reação de PCR ocorreu em um termociclador automático sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 30 ciclos a 94°C por 35 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 7 minutos. Para a amplificação de DNA do gene parcial da β -tubulina também ocorreu em um volume de 25 µL contendo, 1x buffer, 2,5mM de MgCl₂, 0,30mM de dNTPs, 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 0,03 U/µL Taq DNA Polymerase (Applied Biosystems). A reação de PCR ocorreu em um termociclador automático sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos a 94°C por 50 segundos, 60°C por 50 segundos e 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C

por 7 minutos. Os fragmentos foram sequenciados em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

5.2.3 Inibição de crescimento

Todos os fungos foram crescidos em meio Sabouraud (glicose 40g/L, peptona 10g/L e ágar 15 g/L) por 7 dias a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$. A concentração de esporos dos fungos isolados de grãos de café foi estimada por microscopia usando uma câmara de contagem (Neubauer) e a suspensão foi diluída para uma concentração final de 10^6 esporos/mL. Em placas de Petri contendo meio Sabouraud, 0,1 mL da suspensão de esporos foi espalhada na superfície do meio. Um plug de 6mm de meio de cultura foi removido do centro da placa e outro plug de 6mm contendo micélio de fungos produtores de OTA o substituiu. As placas foram incubadas a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 7 dias e o experimento foi realizado em 4 repetições. Como controle, fungos produtores de OTA foram crescidos em meio Sabouraud.

O diâmetro das colônias foi medido após 7 dias de crescimento e avaliados pela fórmula de inibição de crescimento: $\% \text{ redução} = ((D_c - D_s) / D_c) \times 100$, sendo, D_c o diâmetro do controle e D_s o diâmetro das amostras (EDGINTON, KNEW, BARRON, 1971).

5.2.4 Inibição da produção de OTA

Após 7 dias de incubação, OTA foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Barberis *et al.*, 2014, com algumas modificações. A partir das placas dos testes de inibição, três plugs, com 6mm de diâmetro, foram removidos utilizando 1 cm de distância cada, do centro da colônia (ponto de inoculação) à borda da placa. A extração de OTA iniciou com a adição de 1,5 mL de metanol, a mistura permaneceu em repouso por 1 hora no escuro e centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos. As soluções foram filtradas através de lã de vidro, evaporadas até a secagem, redissolvidas em fase móvel (acetoneitrila/água/ácido acético, 50:48:2), filtradas novamente em filtro de seringa 0,22 μm (Millex, Millipore Co, Bedford, Mass), e posteriormente injetadas no equipamento de CLAE.

Para determinar a redução da produção da OTA foi utilizada a fórmula mencionada previamente: % Redução= $((C_c - C_s) / C_c) \times 100$. Onde, C_c é a concentração de OTA do controle e C_s a concentração de OTA das amostras.

5.2.5 Detecção de OTA

A análise de CLAE foi realizada de acordo com Bragulat *et al.* (2001), com algumas modificações. A detecção de OTA foi realizada com o equipamento de HPLC Varian com “autosampler” modelo 410 (50492) e detector de fluorescência modelo 363 (00956). A separação foi realizada pela coluna Varian C18, 250 x 4,6mm, 5 μ m, sob condições isocráticas. A fase móvel (acetonitrila/água/ácido acético, 50:48:2) foi bombeada a 1,0 ml/min, o comprimento de onda de excitação e emissão foram de 330nm e 470nm, respectivamente. O volume de injeção foi de 50 μ L e o tempo de retenção por volta de 8 minutos. A curva com os padrões foi construída de 0,1 a 15 μ g/L de OTA (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA), com coeficiente de correlação de 0,999774. A micotoxina foi quantificada correlacionando as áreas dos picos extraídos das amostras com a curva padrão (APÊNDICE C).

5.2.6 Análise estatística

A fim de inferir diferenças na inibição do crescimento e produção de OTA pelos fungos estudados, os procedimentos estatísticos foram realizados para detectar as variações significativas entre os tratamentos. A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas (DAVIS, 2002) foi aplicada, seguido pelo método de Tukey para procedimentos de múltiplas comparações (MCP) (TUKEY, CIMINERA, HEYSE, 1985). A metodologia permite encontrar contrastes relevantes entre o desempenho dos fungos entre si ou com o tratamento controle. A análise de resíduo foi aplicada para verificar os modelos. Todos os cálculos foram realizados com o programa R Ambiente para análise estatística (IHAKA, GENTLEMAN, 1996).

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Identificação dos fungos isolados de grãos de café

Uma alternativa para o controle de OTA em alimentos é a utilização de micro-organismos capazes de reduzir o crescimento de fungos produtores de OTA, bem como a produção de micotoxinas. Neste contexto, fungos foram avaliados quanto à capacidade para reduzir o crescimento e produção de OTA em espécies de *Aspergillus*.

Os fungos selecionados para os testes de redução foram sequenciados para a confirmação das espécies (TABELA 4). Estes fungos têm sido descritos na literatura (BOZZA *et al.*, 2009; MAGNOLI *et al.*, 2008; PIMENTA, VILELA, 2003; SILVA *et al.*, 2008) como contaminantes habituais de grãos de café.

TABELA 4 – IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS USADAS NESTE ESTUDO E OS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ACESSO NO GENBANK.

Código	Identificação	No. acesso GenBank	Gene sequenciado
C113	<i>Rhizopus oryzae</i>	KP784371	ITS
C183	<i>Rhizopus oryzae</i>	KP784372	ITS
C118	<i>Lichtheimia ramosa</i>	KP784373	ITS
C107	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	KJ599602	ITS
C187	<i>Aspergillus niger</i>	KJ599619	β -tubulina
C122	<i>Aspergillus tamarii</i>	KP784375	ITS
C143	<i>Aspergillus fumigatus</i>	KP784370	β -tubulina
C176	<i>Aspergillus flavus</i>	KP784374	ITS

5.3.2 Inibição de crescimento

Todos os oito fungos testados reduziram o crescimento de *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* e *A. niger* (FIGURA 5). A linhagem *L. ramosa* C118 mostrou os menores potenciais de redução (18,3% *A. ochraceus*, 46,32% *A. westerdijkiae*, 67,9% *A. carbonarius*, 63,95% *A. niger*), os demais fungos apresentaram potencial de redução superior a 70% para todas as espécies de *Aspergillus* testadas. A linhagem *A. niger* C187 inibiu completamente o crescimento de *A. westerdijkiae*.

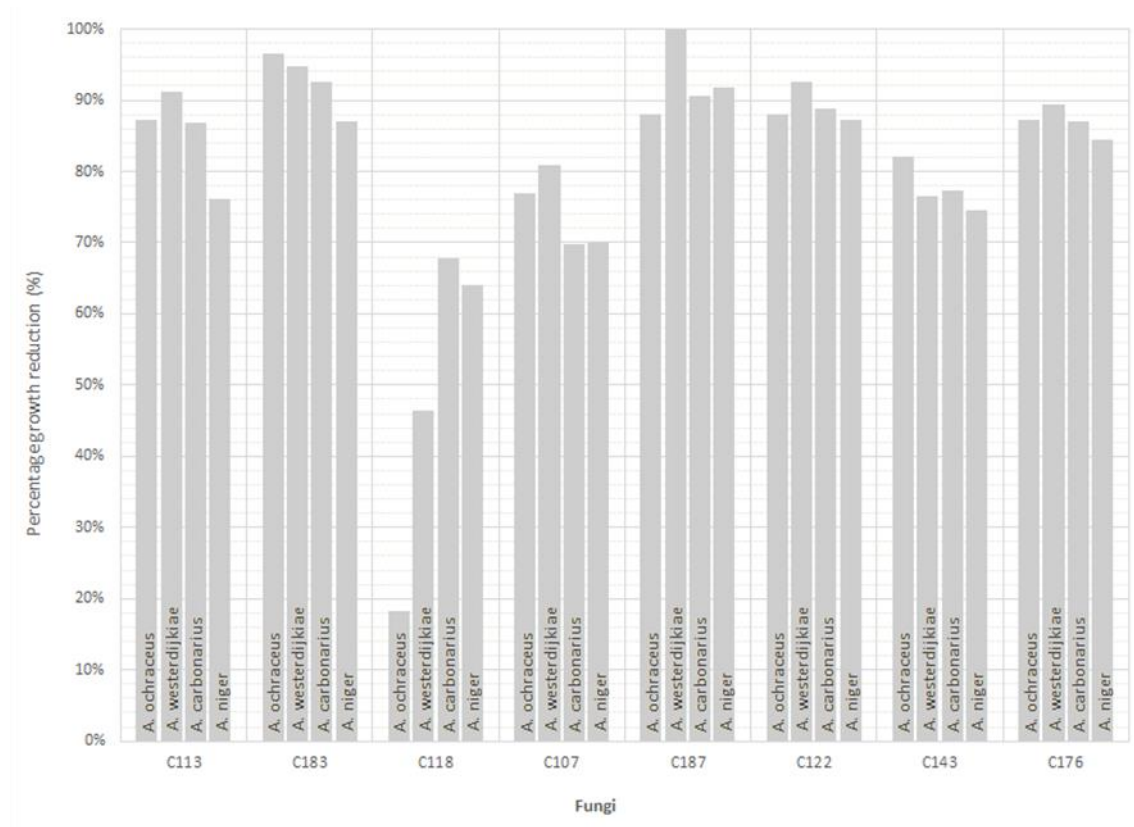


FIGURA 5 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DAS QUATRO ESPÉCIES DE *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* e *A. niger*) POR FUNGOS ISOLADOS DE GRÃOS DE CAFÉ.

LEGENDA: *R. oryzae* C113 e C183; *L. ramosa* C118; *A. westerdijkiae* C107; *A. niger* C187; *A. tamari* C122; *A. fumigatus* C143 e *A. flavus* C176.

A análise estatística mostrou resultados significativos de inibição de crescimento para todos os fungos testados, quando comparada com o tratamento controle (p-valor crítico <0,025) (APÊNDICE D).

Kogkaki *et al.* (2015), avaliaram a interação de *Aspergillus carbonarius* produtor de OTA e fungos associados a uvas. Os autores relataram que houve um ligeiro efeito inibidor sobre o crescimento das duas linhagens de *A. carbonarius* por *A. ibericus*. No entanto, os fungos raramente tiveram um efeito considerável sobre o crescimento de *A. carbonarius*. Ao contrário do que relatado por Kogkaki *et al.* (2015), no presente estudo, todos os fungos testados reduziram o crescimento das quatro espécies de *Aspergillus* produtoras de OTA testadas, o menor percentual de redução para *A. carbonarius* foi de 67,9% por *L. ramosa* C118.

A utilização de fungos no controle de crescimento de fungos produtores de micotoxinas é pouco mencionado na literatura, sendo leveduras e bactérias testadas

pela maioria dos autores (FIORI *et al.*, 2014; MASOUD *et al.*, 2006), mostrando, assim, a importância dos dados obtidos neste estudo.

Zhu *et al.* (2015), avaliaram a inibição de crescimento de *A. ochraceus* e *A. carbonarius* por leveduras, as linhagens *Metschnikowia aff. Fructicola* M179, *Pichia kluyveri* M117, *Candida zemplinina* M3, *Saccharomyces cerevisiae* M114 e C297 apresentaram efeito inibitório significativo para ambos os fungos. Segundo os autores as porcentagens de inibição variam 26,45% a 100% para *A. carbonarius* e 79,56% a 100% para *A. ochraceus*. No presente estudo, as porcentagens de inibição variaram diferentemente das reportadas por Zhu *et al.*, 67,9% a 92,57% para *A. carbonarius* e 18,3% a 96,59% para *A. ochraceus*. Em outro estudo, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram avaliadas na inibição de *A. carbonarius* e *A. ochraceus*, todas as linhagens de leveduras testadas apresentaram habilidade na inibição de crescimento dos fungos com níveis superiores a 65% (Cubaiu *et al.*, 2012).

Piotrowska *et al.* (2014), avaliaram a inibição de *A. westerdijkiae* por bactérias lácticas (*Lactobacillus*) e *Saccharomyces cerevisiae*. O crescimento de *A. westerdijkiae* foi completamente inibido por *Saccharomyces cerevisiae*, entretanto, apresentou uma discreta inibição pela bactéria láctica. No presente estudo as porcentagens de inibição para *A. westerdijkiae* variaram de 46,36% por *L. ramosa* e 100% por *A. niger*.

5.3.3 Inibição da produção de OTA

Em relação à produção de OTA, todos os fungos testados foram capazes de reduzir a produção desta micotoxina. *L. ramosa* C118, *A. niger* C187, *A. tamari* C122 e *A. fumigatus* C143 apresentaram os mais altos potenciais de redução para os fungos da seção *Circumdati* (100%, 96,53%, 99,35% e 98,97 para *A. ochraceus* e 98,42%, 99,26%, 95,97% e 95,44% para *A. westerdijkiae* respectivamente), para os fungos da seção *Nigri* (*A. niger* e *A. carbonarius*), a linhagem *A. niger* C187 mostrou o maior potencial para redução de OTA, 100% e 83,73 respectivamente (FIGURA 6).

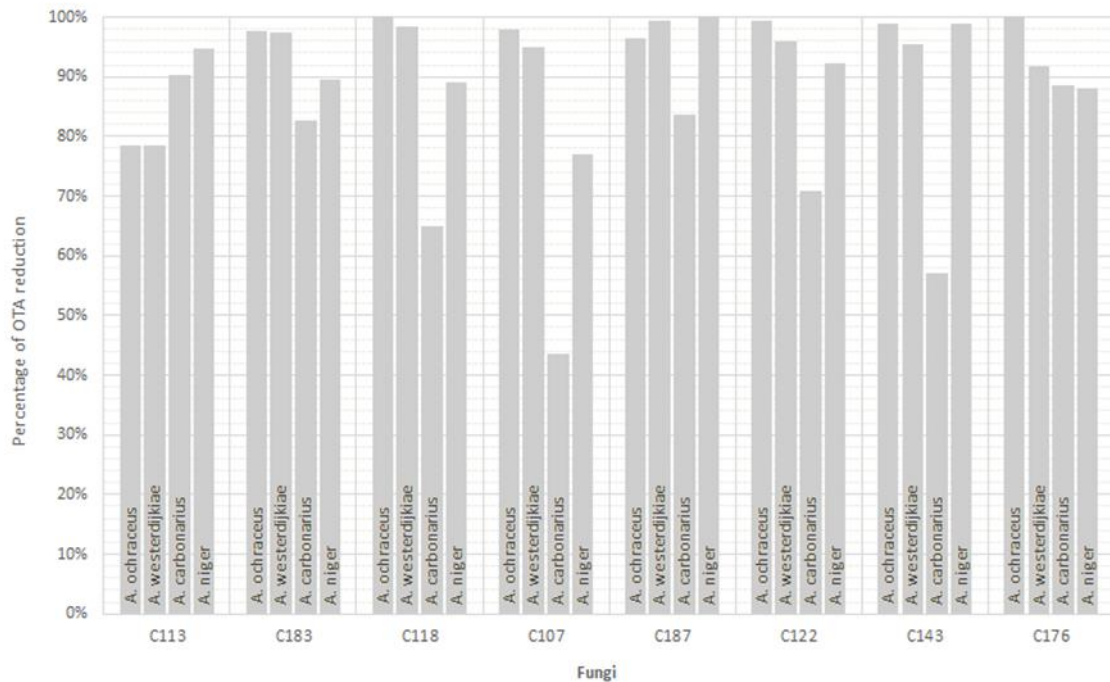


FIGURA 6 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE OTA NAS QUATRO ESPÉCIES DE *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* e *A. niger*) POR FUNGOS ISOLADOS DE GRÃOS DE CAFÉ.

LEGENDA: *R. oryzae* C113 e C183; *L. ramosa* C118; *A. westerdijkiae* C107; *A. niger* C187; *A. tamari* C122; *A. fumigatus* C143 e *A. flavus* C176.

Barberis *et al.* (2014), avaliaram o efeito de fungos isolados do solo na produção de OTA por *A. carbonarius*, os resultados evidenciaram que todas as linhagens de *A. niger* testadas inibiram completamente a produção de OTA por *A. carbonarius*. Em nosso estudo, *A. niger* C187 (não toxigênico) conseguiu reduzir completamente a produção de OTA por *A. niger*, porém nenhum dos fungos testados foi capaz de inibir em 100% a produção de OTA por *A. carbonarius*. Abrunhosa, Serra e Venâncio (2002), avaliaram o potencial de biodegradação da OTA por fungos isolados de uvas e 27 fungos *A. niger* testados degradaram mais que 80% de OTA. Os autores concluíram que a atividade de degradação de OTA por esses fungos pode estar envolvida com a carboxipeptidase. Bejaoui *et al.* (2006), testaram espécies da seção *Nigri* (*A. carbonarius*, *A. niger* e *A. japonicus*) na biodegradação de OTA e concluíram que *A. niger* pode ser uma espécie interessante no processo de detoxificação. Abrunhosa *et al.* (2006), isolaram um extrato de enzima de *A. niger* responsável pela degradação de OTA, este extrato de enzima exibe uma elevada

atividade hidrolítica nesta micotoxina, em que 99,8% da OTA inicial foi convertida em OT α após 25 horas. Em 2007, Abrunhosa e Venâncio isolaram e purificaram a enzima responsável pela hidrólise da OTA, isolada de *A. niger*. De acordo com os autores, os resultados sugerem que a enzima hidrolítica é uma metaloenzima, como a carboxipeptidase, a atividade hidrolítica da OTA pela carboxipeptidase A é bem descrita (PITOUT 1969; VARGA, RIGÓ, TÉREN, 2000).

Duas linhagens de *Rhizopus oryzae* foram testadas em nosso estudo, mostrando porcentagens de inibição de OTA superiores a 78%. A linhagem *R. oryzae* C113 apresentou as porcentagens de inibição: 78,41% *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus*, 90,35% *A. carbonarius* e 94,84% *A. niger*. A linhagem *R. oryzae* C183 apresentou as seguintes porcentagens de inibição: 97,47% *A. westerdijkiae*, 97,56% *A. ochraceus*, 82,67% *A. carbonarius* e 89,61% *A. niger*. Ambos apresentaram forte evidência estatística para a inibição da produção de OTA por *A. carbonarius*, contrastando com o tratamento controle. VARGA *et al.* 2005, avaliaram o potencial degradação de micotoxinas por isolados de espécies de *Rhizopus*. OTA foi degradada com sucesso por *R. stolonifer*, *R. microsporus*, *R. homothallicus* e *R. oryzae*, os isolados de *Rhizopus* ainda foram capazes de degradar mais que 95% da OTA em 16 dias. A cinética da degradação de OTA por *Rhizopus* foi comparada com *A. niger* pelos autores, eles viram similaridades entre a cinética da degradação de OTA por *Rhizopus* e por *A. niger*, sugerindo que a atividade da carboxipeptidase A pode ser responsável pela decomposição de OTA nestes isolados, assim como em *A. niger*. Segundo Valero *et al.* (2006), outros fungos tem a capacidade de degradar a OTA pela atividade da carboxipeptidase, tais como *Alternaria*, *Cladosporium* e *Trichoderma*.

Barberis *et al.* (2014), testaram outros fungos, incluindo um isolado de *Absidia* sp., este isolado inibiu cerca de 90% da produção de OTA por *A. carbonarius*. No presente estudo, a linhagem *L. ramosa* C118 (anteriormente *Absidia idahoensis* var. *thermophila*) (LINDE *et al.*, 2014), reduziu em 100% a produção de OTA por *A. ochraceus*. A inibição de OTA produzida por *A. carbonarius* foi inferior do que o apresentado no trabalho de Barberis *et al.* (2014), de 60,03%. Abrunhosa, Serra e Venâncio (2002), testaram *Aspergillus* das seções *Flavi* e *Circumdati*. Uma linhagem de *A. ochraceus* (seção *Circumdati*) apresentou porcentagem de inibição de OTA de 95% a 100%. A linhagem da seção *Circumdati* neste estudo, *A. westerdijkiae* C107, reduziram a produção de OTA em 43,45% em *A. carbonarius*, 76,89% *A. niger*,

94,96% *A. westerdijkiae* e 97,97% *A. ochraceus*. Em relação à *A. flavus* C176, representante da seção *Flavi*, apresentou redução de 100% de OTA produzida por *A. ochraceus*. No estudo anterior, Abrunhosa, Serra e Venancio (2002), dois isolados de *A. flavus* degradaram a OTA em porcentagens variando de 50% a 80%.

A linhagem *R. oryzae* C113 apresentou os menores potenciais de redução nos fungos da seção *Circumdati* (78,41% *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus*). Para a seção *Nigri*, a linhagem *A. westerdijkiae* C107 mostrou os menores potenciais de redução de OTA (76,89% *A. niger* e 43,45% *A. carbonarius*).

Segundo Valero *et al.* (2006), existem três fatores envolvidos na redução de OTA por fungos: Limitação no crescimento do fungo, geralmente leva a uma redução na produção de OTA; os fungos antagonistas consomem nutrientes específicos necessário para sintetizar a OTA e ainda a degradação de OTA por outros fungos. É importante ressaltar que houve uma redução significativa de crescimento em espécies que produzem OTA e isso pode ter sido causado pela competição de espaço. No entanto, quando os fungos interagem podem excretar substâncias que se difundem para outros fungos, bloqueando o crescimento e a síntese de OTA.

5.4 Conclusão

A OTA é uma micotoxina encontrada em vários produtos agrícolas, o que leva a problemas de segurança alimentar. A utilização de métodos biológicos (leveduras, bactérias e fungos) é conhecida por vários autores como uma das alternativas mais promissoras para controlar a produção de micotoxinas. Desse modo, o potencial inibitório de 8 fungos isolados de grãos de café foi avaliado contra o crescimento *Aspergillus* produtores OTA e contra a produção desta micotoxina por estes fungos. A linhagem *A. niger* C187 não toxigênica, apresentou os melhores resultados, levando em consideração os testes de inibição de crescimento e produção de OTA. Todos os fungos testados causaram inibição de crescimento e produção de OTA pelas espécies de *Aspergillus*.

Estes resultados indicam que as linhagens de fungos testadas podem ser eficientes agentes no controle de OTA em produtos alimentares. Esses dados também podem incentivar novas pesquisas sobre fungos, visando a sua utilização como possíveis agentes de redução da contaminação por micotoxinas.

Agradecimentos:

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro de nossa pesquisa. A Central Analítica do departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná pelo valioso auxílio. Estamos gratos a Prof^a. Dr^a. Maria Helena Fungaro, da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, por ceder as linhagens de fungos utilizadas como controle.

6. CAPITULO III: Influência de extratos aquosos de erva-mate no crescimento de fungos produtores de ocratoxina A

Angela Bozza de Almeida, Cristiane Vieira Helm, Dayanne Andrade, Beatriz de Noronha, Inaiara Casapula, Patricia do Rocio Dalzoto, Ida Chapaval Pimentel.

Resumo

A ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário produzido por algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* e devido sua grande estabilidade molecular é dificilmente degradada. A OTA também pode estar relacionada com doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer e Parkinson, além de ser potencialmente carcinogênica. O controle das micotoxinas está centralizado no uso de fungicidas sintéticos, mas a crescente exigência por produtos naturais tem incentivado a busca por métodos alternativos de controle. Muitas plantas medicinais possuem propriedades antimicrobianas que podem ser aplicadas como inibidores do crescimento de fungos produtores de micotoxinas, dentre elas, a erva-mate. A partir de seis plantas coletadas na cidade de Ivaí do Sul (Paraná, Brasil), foram elaborados extratos aquosos das folhas erva-mate, posteriormente testados contra espécies de *Aspergillus* produtoras de OTA (*A. niger*, *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus*). Foi observado que os extratos, nas concentrações de 1 g/L, 5 g/L e 10 g/L inibiram o crescimento dos fungos da seção *Circumdati* (*A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*), na concentração de 100 g/L todos os extratos favoreceram o crescimento dos fungos da seção *Circumdati*. Os extratos de erva-mate, nas concentrações testadas, não influenciaram no crescimento de *A. carbonarius* e *A. niger*, quanto à inibição ou o favorecimento do crescimento colonial. Palavras chave: Extratos; erva mate; *Aspergillus*; inibição de crescimento.

6.1 Introdução

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por várias espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. No Brasil, as espécies relatadas como principais produtoras de OTA são *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. melleus*, *A. steynii*, *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae* (COPETTI *et al.*, 2013; COPETTI *et al.*, 2010;

TANIWAKI *et al.*, 2003; VEGA *et al.*, 2006; MATA *et al.*, 2007, FRISVAD *et al.*, 2007).

Esta micotoxina tem sido encontrada em vários itens alimentares como grãos, pães, nozes, especiarias, café, cerveja e vinho e em níveis elevados em alimentos para animais (OTTENEDER, MAJERUS, 2001; WANGIKAR, DWIVEVI, TELOG, 2005). Baseado em estudos experimentais em animais, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer tem classificado a OTA como possivelmente carcinogênica humana (IARC, 1993).

O ser humano está exposto à OTA diretamente pelo consumo de alimentos contaminados, como cereais e seus derivados (fontes vegetais), bem como derivados de carne (origem animal) (CZERWIECKI, CZAJKOWSKA, WITKOWSKA-GWIAZDOWSKA, 2002; DUARTE, PENA, LINO, 2010). A OTA já foi detectada em leite materno, devido à ingestão de alimentos contaminados (GROSSO *et al.*, 2003; ALI *et al.*, 2013).

O crescimento fúngico em alimentos é geralmente controlado por fungicidas sintéticos, entretanto, os agentes antimicrobianos naturais também têm mostrado importantes propriedades antifúngicas (LÓPEZ-MALO, ALZADORA, GUERRERO, 2000; LÓPEZ *et al.*, 2004). Extratos obtidos a partir de plantas com propriedades antimicrobianas podem ser utilizados para controlar fungos micotoxigênicos em alimentos e rações animais, evitando assim, o uso de produtos químicos (GARCIA *et al.*, 2013). O efeito antimicrobiano pode ser atribuído a diversas substâncias antioxidantes, principalmente compostos fenólicos, tais como polifenóis e flavonoides (EBANA, MADUNAGU, 1993; RADULOVIC, STOJANOVIC, PALIC, 2006; GARCIA *et al.*, 2013).

Diversos compostos químicos foram identificados na erva-mate e acredita-se que eles são os responsáveis pelas propriedades da planta. Os principais compostos bioativos presentes são os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas. Nesta última classe de compostos encontram-se a cafeína, a teobromina e a teofilina (ALIKARIDIS, 1987). A cafeína (1,3,7 trimetilxantina) possui atividade fungistática, e efeito antimicotoxigênico, isso acontece, pois as metilxantinas consistem um grupo de compostos capazes de conferir propriedades defensivas naturais a plantas contra micro-organismos. Fujii *et al.* (2004), verificaram que a cafeína foi capaz de inibir o crescimento micelial de fungos isolados de café.

Neste contexto, o propósito deste estudo foi testar o potencial inibitório de extratos aquosos de folhas da erva-mate contra espécies de *Aspergillus* potencialmente produtoras de ocratoxina A.

6.2 Materiais e métodos

6.2.1 Material biológico

As folhas de erva-mate foram coletadas em um erval comercial na cidade de Ivaí do Sul, no estado do Paraná e cedidas pela EMBRAPA Florestas (Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias), situada na cidade de Colombo, Paraná.

A linhagem de *Aspergillus ochraceus* 40013 (ATCC 22947) produtora de ocratoxina A foi obtida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz localizado na cidade do Rio de Janeiro. As linhagens de *Aspergillus niger* UEL, *Aspergillus carbonarius* 187 UEL e *Aspergillus westerdijkiae* 91 UEL, também produtoras de ocratoxina A, foram cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular da UEL (Universidade Estadual de Londrina).

6.2.2 Obtenção dos extratos

Foram coletadas folhas seis plantas de erva-mate e estas foram selecionadas de acordo com o teor de cafeína, (3 plantas com alto teor e 3 plantas com baixo teor), sendo, 3 delas pertencentes ao morfotipo “amarelinha” e 3 pertencentes ao morfotipo “sassafrás” (QUADRO 6).

Amostra	Morfotipo	Teor de cafeína (g/100g)
4-56-2	Amarelinha	3,39
3-158-2	Amarelinha	1,13
6-156-6	Amarelinha	1,33
4-76-2	Sassafrás	2,16
7-61-3	Sassafrás	2,33
3-65-1	Sassafrás	0,36

QUADRO 6 – MORFOTIPOS E TEORES DE CAFEÍNA DAS AMOSTRAS DE FOLHAS DE ERVA-MATE UTILIZADAS NO PRESENTE ESTUDO.

O extrato foi elaborado segundo ROSAL *et al.* (2009), com modificações. As folhas de erva-mate foram inicialmente secas em micro-ondas, com 2 ciclos de 3

minutos cada e posteriormente foram moídas em moinho com peneira de gramatura 0,5 g/m². Foram elaboradas 4 concentrações de extrato aquoso das folhas de erva-mate: 1 g/L, 5 g/L, 10 g/L e 100 g/L. Para tal, foram utilizados frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL, nos quais foram pesadas 0,1g, 0,5g, 1,0g e 10,0g de folhas moídas em seguida foi adicionado 100 mL de água ultrapura. As amostras foram fervidas por 15 minutos, filtradas com filtro de papel comum (15,0 cm de diâmetro) e acondicionadas em frascos de vidro fechados e mantidos em freezer, à -20°C, para posterior análise.

6.2.3 Teste de inibição de crescimento

Foi utilizado o método de diluição em ágar para avaliar a atividade dos extratos aquosos de erva-mate, descrito por Hadecek e Greger (2000). Neste método, diferentes concentrações do extrato testado são incorporadas ao meio de cultivo fundido (LÓPEZ, 2010). Para este teste utilizou-se as linhagens padrões de *Aspergillus* produtoras de OTA.

Em placas de Petri esterilizadas foi depositado 1 mL de extrato e em seguida vertido o meio ágar Sabouraud fundido. Posteriormente, utilizando um vazador de rolhas, foi retirado um disco de 6mm de diâmetro do centro de cada placa e inserido um disco de meio ágar Sabouraud contendo micélio das linhagens padrões de *Aspergillus* após 7 dias de incubação em BOD à 28±0,5°C.

A porcentagem de inibição foi determinada utilizando a fórmula (EDGINTON, KNEW, BARRON, 1971): % redução= ((Dc-Dt)/Dc) x100, onde, Dc é o diâmetro médio da colônia das linhagens padrões de *Aspergillus* no controle de crescimento (sem extrato), e Dt é o diâmetro médio da colônia das linhagens padrões de *Aspergillus* crescidas na placa contendo o extrato testado. O controle positivo utilizado foi o fluconazol (20mg/mL).

6.2.4 Análise estatística

Realizou-se uma Análise de Variância (ANOVA) segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) para todas as medições de crescimento radial. Quando encontrada significância para o teste F, as análises foram complementadas com o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software

ASSISTAT 7.6 2011 (SILVA, 1996). Os dados foram transformados para $\log(x+2)$ com o intuito de estabelecer a normalidade dos dados.

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Inibição de crescimento

O teste de inibição de crescimento de fungos produtores de ocratoxina A por extratos aquosos de erva-mate foram realizados em meio Sabouraud. Nas figuras 7 e 8 observam-se os resultados de inibição para os fungos *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, respectivamente.

A maioria dos extratos, nas concentrações de 1 g/L, 5 g/L e 10 g/L inibiram o crescimento dos fungos da seção *Circumdati*, exceto o extrato 6-156-6-A na concentração de 5 g/L, que não foi capaz de inibir o crescimento de *A. ochraceus* (-1,41%) e os extratos 3-1582-A e 3-65-1-S na concentração de 10 g/L, que não inibiram o crescimento de *A. westerdijkiae* (-1,12% e -0,18% respectivamente). A concentração de 100 g/L de todos os extratos (4-56-2-A, 6-156-6-A, 3-158-2-A, 3-65-1-S, 7-61-3-S e 4-76-2-S) favoreceu o crescimento dos fungos da seção *Circumdati* (FIGURA 9).

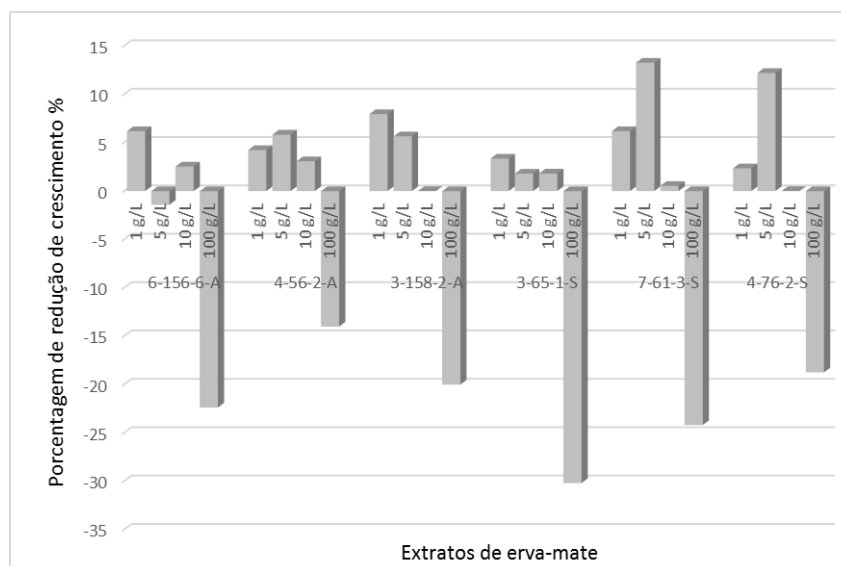


FIGURA 7 – PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO E FAVORECIMENTO DE CRESCIMENTO DE *A. ochraceus*, PRODUTOR DE OTA, POR EXTRATOS AQUOSOS DE ERVA-MATE.

NOTA – OS VALORES NEGATIVOS INDICAM FAVORECIMENTO DE CRESCIMENTO.

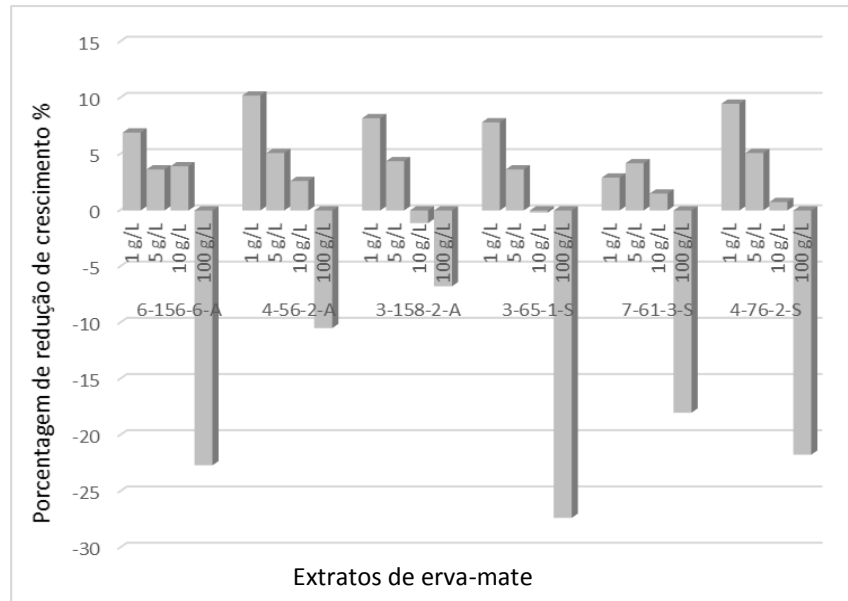


FIGURA 8 – PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO E FAVORECIMENTO DE CRESCIMENTO DE *A. westerdijkiae*, PRODUTOR DE OTA, POR EXTRATOS AQUOSOS DE ERVA-MATE.

NOTA – OS VALORES NEGATIVOS INDICAM FAVORECIMENTO DE CRESCIMENTO.

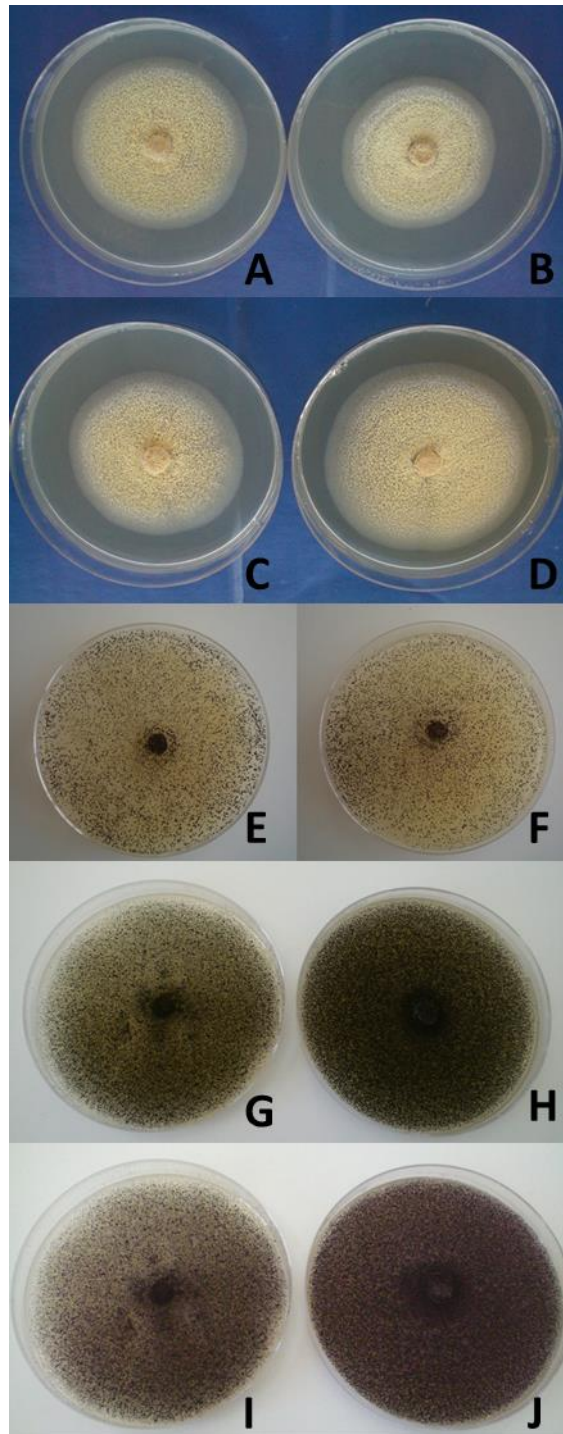


FIGURA 9 – INFLUÊNCIA DOS EXTRATOS DE ERVA-MATE NOS FUNGOS PRODUTORES DE OTA.

LEGENDA: A - CONTROLE NEGATIVO DE *A. ochraceus*; B – INIBIÇÃO CRESCIMENTO DE *A. ochraceus* EM MEIO ACRESCIDO DO EXTRATO 7-61-3-S, NA CONCENTRAÇÃO DE 5 g/L (INIBIÇÃO DE 13,27%); C - CONTROLE NEGATIVO DE *A. ochraceus*; D – FAVORECIMENTO DE CRESCIMENTO DE *A. ochraceus* EM MEIO ACRESCIDO DO EXTRATO 4-76-2-S, NA CONCENTRAÇÃO DE 100 g/L (AUMENTO DE 18,73%); E - CONTROLE NEGATIVO DE *A.*

carbonarius; F - CRESCIMENTO DE *A. carbonarius* EM MEIO ACRESCIDO DO EXTRATO 3-65-1-S, NA CONCENTRAÇÃO DE 1 g/L; G - CONTROLE NEGATIVO DE *A. niger*; H – FAVORECIMENTO NA ESPORULAÇÃO DE *A. niger* EM MEIO ACRESCIDO DO EXTRATO 3-158-2-A, NA CONCENTRAÇÃO DE 10 g/L; I - CONTROLE NEGATIVO; J - FAVORECIMENTO NA ESPORULAÇÃO DE *A. niger* EM MEIO ACRESCIDO DO EXTRATO 6-156-6-A, NA CONCENTRAÇÃO DE 100 g/L.

Os extratos de erva-mate, nas concentrações testadas não influenciaram no crescimento de *A. carbonarius* e *A. niger*, quanto à inibição ou o favorecimento do crescimento colonial. Entretanto, para *A. niger* foi observado um aumento na esporulação destes fungos (FIGURA 9).

A inibição de *A. ochraceus* variou de 0,54% a 13,27%, sendo que a maior porcentagem de inibição foi observada na concentração de 5 g/L do extrato 7-61-3-S. Para *A. westerdijkiae* a inibição do crescimento variou de 0,75% a 10,22%, na concentração de 1 g/L do extrato 4-56-2-A.

Quando realizada a análise de variância observou-se uma diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$), entre os fatores testados: fungos, extratos e concentrações. Não houve diferença significativa em relação a inibição do crescimento de *A. niger* e *A. carbonarius* em relação aos extratos e concentrações testadas. Entre às espécies *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*, observou-se que *A. westerdijkiae* foi mais suscetível à inibição pelos extratos e concentrações testadas em comparação com *A. ochraceus*, sendo os dados estatisticamente diferentes (APÊNDICE E).

Dentre os extratos testados, somente o 4-56-2-A e o 3-65-1-S foram estatisticamente diferentes dos demais. Quanto à concentração dos extratos, a de 100 g/L foi estatisticamente diferente das outras concentrações testadas. Quando avaliada a interação entre fungos e extratos observou-se que o único extrato estatisticamente diferente dos demais foi o extrato 7-61-3-S, o qual apresentou um padrão de inibição semelhante para as espécies *A. ochraceus* e *A. westerdijkiae*.

Soliman e Badeaa (2002), utilizaram a mesma metodologia do presente trabalho para avaliar óleos essenciais de 12 plantas na inibição de crescimento de fungos produtores de micotoxinas (*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *Fusarium moniliforme*). Os óleos essenciais de tomilho, canela (< 500 ppm), calêndula (< 200 ppm), hortelã, manjericão e “quyssum” (3000 ppm) foram capazes de inibir completamente os fungos em todos os testes. Os autores observaram que a

inibição dos fungos foi dependente das concentrações dos óleos essenciais utilizados, ao contrário do que foi visto no presente trabalho, onde não existe dependência de dose, já que na concentração de 100 g/L observou-se um aumento no crescimento das colônias.

Em 2009, Rosal *et al.*, avaliaram extratos aquosos de folhas de *Mentha sativa* sobre o desenvolvimento micelial do fungo *Penicillium*. Foram testadas 3 concentrações do extrato 20%, 40% e 80%, e observou-se que os extratos não foram eficazes no controle de *Penicillium*, e que houve um crescimento micelial até a concentração de 40%, com uma pequena redução na concentração de 80%. Os resultados do trabalho de Rosal *et al.* (2009), foram semelhantes aos resultados obtidos no presente trabalho, nos quais foi observado um baixo potencial de inibição dos extratos e concentrações testadas, com a maior porcentagem de inibição de 13,27%.

Rosal *et al.* (2009), levantaram como hipótese a baixa concentração de óleos essenciais presentes nas soluções testadas, já que esse princípio ativo seria o responsável pela inibição de crescimento de vários fungos, como *Alternaria*, *Fusarium*, *Sclerotium* e *Aspergillus*. Segundo Rosal *et al.* (2009), a metodologia utilizada para elaboração dos extratos não favoreceu uma eficiente extração dos óleos essenciais.

O efeito do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* foi avaliado no crescimento de espécies potencialmente patogênicas de *Aspergillus*, por Carmo *et al.*, (2008). As concentrações dos óleos essenciais testadas (20 µL/mL, 40 µL/mL e 80 µL/mL) foram capazes de inibir o crescimento de *A. niger*, *A. flavus* e *A. fumigatus*. As concentrações de 80 e 40 µL/mL causaram 100% de inibição da esporulação em todos os fungos testados.

Basílico e Basílico em 1999, avaliaram os efeitos inibitórios de óleos essenciais de orégano, hortelã, manjeriço, salvia e coentro no crescimento de *A. ochraceus*. Os autores verificaram que na concentração de 1000 ppm óleos essenciais de orégano e hortelã inibiram completamente o crescimento do fungo em 21 dias, enquanto o manjeriço foi efetivo em menos de 7 dias. Óleos essenciais de salvia e coentro não apresentaram nenhum efeito na inibição do crescimento de *A. ochraceus*.

6.4 Conclusão

Dentre as estratégias aplicadas para o controle de crescimento de fungos produtores de OTA está a utilização de fungicidas, entretanto o uso de fungicidas químicos pode levar a um aumento de resíduos tóxicos nos alimentos, além da resistência fúngica. Na busca de alternativas, as substâncias antifúngicas naturais surgem como promissoras na substituição dos fungicidas sintéticos. Dessa forma, extratos de plantas de erva-mate foram avaliadas quanto a capacidade de inibir o crescimento de fungos produtores de OTA. *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus* apresentaram uma discreta inibição (0,54% a 13,27%) pelos extratos nas concentrações de 0,1g/L, 0,5g/L e 10g/L, entretanto na concentração de 100g/L as duas espécies apresentaram um favorecimento no crescimento. Já para as espécies *A. niger* e *A. carbonarius* não foi observado inibição em nenhuma das concentrações e extratos testados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O modelo quimiométrico desenvolvido a partir da espectroscopia de infravermelho médio por transformada de Fourier foi capaz distinguir corretamente espécies altamente relacionadas como *A. niger* e *A. carbonarius*;
- A adaptação do método tradicional de preparo de amostra provou ser muito rápida e de fácil execução;
- Todos os fungos testados causaram inibição de crescimento e produção de OTA pelas espécies de *Aspergillus*;
- *A. westerdijkiae* e *A. ochraceus* apresentaram uma discreta inibição pelos extratos nas concentrações de 0,1g/L, 0,5g/L e 10g/L, entretanto na concentração de 100g/L as duas espécies apresentaram um favorecimento no crescimento;
- Nas espécies *A. niger* e *A. carbonarius* não foi observado inibição em nenhuma das concentrações e extratos testados.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Utilizar um número maior de isolados para os testes do modelo quimiométrico desenvolvido a partir da espectroscopia de infravermelho médio por transformada de Fourier, elevando a confiabilidade dos dados;
- Testar novas concentrações de esporos dos fungos isolados de grãos de café contra espécies de *Aspergillus* produtoras de ocratoxina A;
- Utilizar a cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) na detecção e quantificação de compostos de interesse nos extratos de erva-mate e diferentes concentrações avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, G.; CASTELLÀ, G.; CABAÑES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, 1994.
- ABRAMS, C. B. IR Tutor. **Columbia University, Perkin Elmer Ltda., Beaconsfield, Bucks**, 1993.
- ABRUNHOSA, L. J. **Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos**. 236 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2008.
- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. **Toxins**, v. 2, p. 1078-1099, 2010.
- ABRUNHOSA, L.; SANTOS, L.; VENÂNCIO, A. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. **Food Biotechnology**, v. 20, p. 231-242, 2006.
- ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7493-7496, 2002.
- ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1909-1914, 2007.
- AFSAH-HEJRI, L.; JINAP, S.; RADU, S.; SHAKIBAZADEH, S. A review on mycotoxins in food and feed: Malaysia case study. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 12, p. 629-651, 2013.
- AL-ANATI, L.; PETZINGER, E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p.79-90, 2006.
- ALI, R.; ISMAIL, M.; BHALLI, J. A.; MOBEEN, A.; KHAN, Q. M. Effect of temperature on ochratoxin A production in common cereals by *Aspergillus* species. **The Journal of Animal e Plant Sciences**. v. 23, p. 1316-1320, 2013.

ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal Ethnopharmacology**, v. 20, p. 121-144, 1987.

ALMELA, L.; ROBE, V.; SANCHEZ, B.; TORELLA, F.; PEREZ-LOPEZ, J.; GABALDON, J. A. Ochratoxin A in red paprika: relationship with the origin of the raw material. **Food Microbiology**, v. 24, p. 319-327, 2007.

AMEZQUETA, S.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A. L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, v. 20, p. 326-333, 2009.

AMEZQUETA, S.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; DE CERAIN, A. L. Validation of a high-performance liquid chromatography analytical method for ochratoxin A quantification in cocoa beans. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, p. 1096–1106, 2004.

ANDRADE, F. M., **Diagnóstico da Cadeia Produtiva da *Ilex paraguariensis* St. Hill Erva-Mate**. São Mateus do Sul-PR, Consultoria, p. 92, 1999.

ANVISA – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** - RDC No. 7 de 18 Fevereiro 2011. Limites Máximos Permitidos (LMT) Para Micotoxinas em Alimentos no Brasil, 2011.

AWAD, W. A.; GHAREEB, K.; BÖHM, J.; ZENTEK, J. Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. **Food Additives and Contaminants Part A**, v. 27, p. 510-520, 2010.

AZIZI, I. G.; RAHIMI, K.; SHATERI, S. Ochratoxin: Contamination and toxicity (A review). **Global Veterinaria**, v. 8, p. 519-524, 2012.

BADALI, H.; CARVALHO, V. O.; VICENTE, V.; ATTILI-ANGELIS, D.; WIATKOWSKI, I. B.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; DE HOOG, G. S. *Cladophialophora saturnica* sp. nov., a new opportunistic species of Chaetothyriales revealed using molecular data. **Medical Mycology**, v. 47, p. 55-66, 2009.

BAIRD, R. E.; BRENNEMAN, T. B.; BELL, D. K.; MURPHY, A. P. The effects of the fungicide propiconazole (Tilt) on the ground nut shell mycobiota. **Mycological Research**, v. 95, p. 571-576, 1991.

BARBERIS, C. L.; PENA, G.; CARRANZA, C.; MAGNOLI, C. E. effect of indigenous mycobiota on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* isolated from soil. **Mycotoxin Research**, v. 30, p. 1-8, 2014.

BASÍLICO, M. Z.; BASÍLICO, J. C. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and Ochratoxin A production. **Letters in Applied Microbiology**. v. 29, p. 238-241, 1999.

BASSANI, V. L.; CAMPOS, A. M. **Desenvolvimento de extratos secos e nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hill; aquifoliacea (erva-mate) visando à exploração do potencial vegetal como fonte de produtos.** In: 1º CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA-MATE, Curitiba. **Anais**. Curitiba-PR, p. 69-83, 1997.

BASTERT, J.; KORTING, H. C.; TRAENKLE, P.; SCHMALRECK, F. Identification on dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). **Mycoses**, v. 42, p. 525-528, 1999.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN S. M.; SILVA, C. F.; CIRILLO, M.; VARGA, E. A.; SCHWAN, R. F. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, v. 20, p. 784-790, 2009.

BAYMAN, P.; BAKER, J. L.; DOSTER, M. A.; MICHAILIDES, T. J.; MAHONEY, N. E. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied and Environment Microbiology**, v. 68, p. 2326–2329, 2002.

BEJAOU, H.; MATHIEU, F.; TAILLANDIER, P.; LEBRIHI, A. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 255, p. 203-208, 2006.

BEREK, L.; PETRI, I. B.; MESTERHAZY, A.; TEREK, J.; MOLNAR, J. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. **Toxicology In Vitro**, v. 15, p. 25-30, 2001.

BHAT, R.; RAVISHANKAR, V. R.; KARIM, A. A. Mycotoxins in food and feed: Present status and future concerns. **Comprehensive Reviews in food science and food safety**, v. 9, p. 57-81, 2010.

BINDER, E. M. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 133, p. 149-166, 2007.

BORTOLI, G.; FABIAN, M. **A process to remove mycotoxins from green coffee.** European patent numbers: PCT/EP 97/02014 (1997/04/22) and PCT/EP 98/06760 (1998/10/28), 1997.

BOZZA, A.; TRALAMAZZA, S. M.; REYNAUD, D. T.; GABARDO, J.; VALASKI, J. C.; MARANGONI, P. R.; PIMENTEL, I. C. Fungi isolation associated with coffee grains of the cv. Iapar 59 picked from the ground and trees at different harvest times. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 1-6, 2009.

BOZZA, A.; TRALAMAZZA, S. M.; RODRIGUEZ, J. I.; SCHOLZ, M. B. S.; REYNAUD, D. T.; DALZOTO, P. R.; PIMENTEL, I.C. Potential of Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) to detection and quantification of ochratoxin A: a comparison between reflectance and transmittance techniques. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**. v. 3, n. 4, p. 1242-1247, 2013.

BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 139-144, 2001.

BREITHOLTZ-EMANUELSSON, A.; OLSEN, M.; OSKARSSON, A.; PALMINGER, I.; HULT, K. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. **Journal of AOAC International**, v. 76, p. 842–846, 1993.

CABRERA, H. A. P.; TANIWAKI, M. H.; MENEZES, H. C.; IAMANAKA, B. T., SALGADO, S. A. **Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee as affected by alternating temperatures and different water activity values.** 19th ASIC Coffee Conference, Trieste, Italy, 14–18 May 2001.

CARDOSO-JÚNIOR, E. L.; FERRARESE-FILHO, O.; CARDOSO-FILHO, L.; FERRARESE, M. L. L.; DONADUZZI, C. M.; STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds contents in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 1-10, 2007.

CARDWELL, K. F. Mycotoxin contamination of foods in Africa: Anti-nutritional factors. **Food Nutrition Bulletin**, v.21, p. 488-492, 2001.

CARMO, E. S.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; SOUSA, F. B. Effect of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, p. 91-97, 2008.

CARVALHO, L. M.; SILVA, E. A. M.; AZEVEDO, A. A.; MOSQUIM, P. R.; CECON, P. R. Aspectos morfofisiológicos dos cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-416, 2001.

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

CHALMERS, J. M.; GRIFFITHS, P. R. **Handbook of Vibrational Spectroscopy** p. 1–5. Wiley, Chichester, UK, 2002.

CHEN, P. J.; MOORE, T.; NESNOW, S. Cytotoxic effects of propiconazole and its metabolites in mouse and human hepatoma cells and primary mouse hepatocytes. **Toxicology In Vitro**, v. 22, p. 1476-1483, 2008.

CHEN, Y. C.; THENNADIL, S. N. Insights into information contained in multiplicative scatter correction parameters and the potential for estimating particle size from these parameters. **Analytica Chimica Acta**, v 746, p. 37-46, 2012.

CIEGLER, A. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 18, p. 631–636, 1972.

CIEGLER, A.; FENNELL, D. I.; SANSING, G. A.; DETROY, R. W.; BENNETT, G. A. Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: Classification into subgroups. **Applied of Microbiology**, v. 26, p. 271–278, 1973.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents on mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, p. 13-21, 1990.

CÔCCO, L. C. **Previsão de propriedades físico-químicas e composição química da gasolina a partir de espectros no infravermelho**. 828 f. Tese (Doutorado em Engenharia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CONAB(**safras**) Disponível em <<http://www.conab.gov.br>> (acessado em: 27/02/2015).

COPETTI, M. V.; IAMANAKA, B. T.; NESTER, M. A.; EFRAIM, P.; TANIWAKI, M. H. Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture. **Food Chemistry**, v. 136, p. 100-104, 2013.

COPETTI, M. V.; PEREIRA, J. L.; IAMANAKA, B. T.; PITT, J. I.; TANIWAKI, M. H. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 67–70, 2010.

CUADRADO, M. U.; CASTRO, M. D. L.; JUAN, P. M. P.; GÓMEZ-NIETO, M. A. Comparison and joint use of near infrared spectroscopy and Fourier transform mid infrared spectroscopy for the determination of wine parameters. **Talanta**, v. 66, p. 218-224, 2005.

CUBAIU, L.; ABBAS, H.; DOBSON, A. D. W.; BUDRONI, M.; MIGHELI, Q. A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. **Toxins**, v. 4, p. 1468-1481, 2012.

CZERWIECKI, L.; CZAJKOWSKA D.; WITKOWSKA-GWIAZDOWSKA A. On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 2: occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1998. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p.1051-1057, 2002.

DACHOUPAKAN, C.; PUTTHANG, R.; SIRISOMBOON, P. Application of near infrared spectroscopy to detect aflatoxigenic fungal contamination in rice. **Food Control**, v. 33, p. 207-214, 2013.

DACHOUPAKAN, C.; RATOMAHENINA, R.; MARTINEZ, V.; GUIRAUD, J. P.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 14-23, 2009.

DAKOVIC´, A.; TOMAŠEVIC´-CˇANOVIC´, M.; DONDUR, V.; ROTTINGHAUS, G. E.; MEDAKOVIC´, V.; ZARIC´, S. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 46, p. 20–25, 2005.

DAVIS C. S. **Statistical methods for the analysis of repeated measurements**. New York: Springer; 2002.

DE HOOG, G. S.; GUARRO J.; GENÉ J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**, ed. 2. Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili, Utrecht / Reus; 2000.

DINIS, A. M. P.; LINO, C. M.; PENA, A. S. Ochratoxin A in nephropathic patients from two cities of central zone in Portugal. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 553-557, 2007.

DOMIJAN, A. M.; PERAICA, M.; ZLENDER, V.; CVJETKOVIC, B.; JURJEVIC, Z.; TOPOLOVEC-PINTARIC, S.; IVIC, D. Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Republic of Croatia. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 427–432, 2005.

DOYLE, M. P.; APPLEBAUM, R. S.; BRACKETT, R. E.; MARTH, E. H. Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. **Journal of Food Protection**, v.45, p. 946-971, 1982.

DUARTE, S. C.; LINO, C. M.; PENA, A. Food safety implications of ochratoxin A in animal-derived food products. **The Veterinary Journal**, v. 192, p. 286–292, 2012.

DUARTE S. C.; PENA A.; LINO, C. M. A. Review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**. v. 272, p. 187-198. 2010.

DUYGU, D.; BAYKAL, T.; AÇIKGÖZ, D.; YILDIZ, K. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for biological studies. **Journal of Science**, v. 22, p. 117-121, 2009.

EBANA, R. U. B.; MADUNAGU, V. E. Antimicrobial effect of *Strophanthus hispidus* and *Secamone afzelii* on some pathogenic bacteria and their drug resistant strains. **Nigerian Journal Botanical** v. 6, p. 27–31, 1993.

EDGINTON, L. V.; KNEW, K.L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopatology**, v. 62, n. 7, p. 42-44, 1971.

EDWARDS, S. G.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, A. D. W. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research**, London, v. 106, p. 1005-1025, 2002.

EMAN – European Mycotoxins Awareness Network. **Mycotoxins Legislation Worldwide**, 2012.

<<http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=79>> acessado em 28/02/15.

EMATER. Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Curitiba, 1991.

ERGIN, Ç.; ILKIT, M.; GÖK, Y.; ÖZEL, M. Z.; ÇON, A. H.; KABAY, N.; SÖYLEYICI, S.; DÖGEN, A. Fourier transform infrared spectral evaluation for the differentiation of clinically relevant *Trichophyton* species. **Journal of Microbiology Methods**, v. 93, p. 218-223, 2013.

ERUKHIMOVITCH, V.; TSROR, L.; HAZANOVSKY, M.; TALYSHINSKY, M.; MUKMANOV, I.; SOUPRUN, Y.; HULEIHEL, M. Identification of fungal phytopathogens by Fourier-transform infrared (FTIR) microscopy. **Journal of Agricultural Technology**, v. 1, p. 145-152, 2005.

ESSENDUBI, M; TOUBAS, D; LEPOUSE, C; LEON, A; BOURGEADE, F; PINON, J; MANFAIT, M; SOCKALINGUM, G. D. Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, p. 325- 31, 2007.

EUROPEAN COMMISSION – **Commission Regulation** (EC) n°1881/2006 of 19 december 2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. 2006.

FABER, N. M; RAJKÓ, R. How to avoid over-fitting in multivariate calibration - The conventional validation approach and an alternative. **Analytica Chimica Acta**, v. 595, p. 98-106, 2007.

FAO. Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. **FAO Food and Nutrition Paper**, v. 73, p. 1–124, 2001.

FAO, 2006. Reducing OTA in coffee. In AMEZQUETA, S.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A. L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, v. 20, p. 326-333, 2009.

FAO/WHO/UNEP. **Minimising risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP Concept**. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference On Mycotoxins, 8 b, p. 1–13, 1999.

FILIP, R.; FERRARO, G. Researching on new species of “Mate”: *Ilex brevicuspis*: phytochemical and pharmacology study. **European Journal Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 50-54, 2004.

FIORI, S.; URGEGHE, P. P.; HAMMAMI, W.; RAZZU, S.; JAOUA, S.; MIGUELI, Q. Biocontrol activity of four non- and low fermenting yeasts strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. **International Journal of food Microbiology**, v. 189, p. 45-50, 2014.

FISCHER, G.; BRAUN, S.; THISSEN, R.; DOTT, W. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, p. 63-77, 2006.

FRISVAD, J. C.; FRANK, M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUJIPERS, A. F. A.; SAMSON, R. A. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 23–43, 2004.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O.; VRIES, R.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; CABAÑES, F. J.; EHRLICH, K.; SAMSON, R. A. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 31-37, 2007.

FRISVAD, J. C.; THRANE, U.; SAMSON, R. A.; PITT, J. I. Important mycotoxins and the fungi which produce them. **Advances in Food Mycology**, v. 571, p. 3–31, 2006.

FSS - **Food Safety and Standard** (Contaminants, Toxins and Residues) Regulation in India, 2011.

FUCHS, R.; HULT, K.; PERAICA, M.; RADIC, B.; PLESTINA, R. Conversion of ochratoxin C into ochratoxin A in vivo. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 41-42, 1984.

FUCHS, S.; SONTAG, G.; STIDL, R.; EHRLICH, V.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1398–1407, 2008.

FUJII, S.; ASSUNÇÃO, F. G. A.; TANIWAKI, M. H.; SCHOLZ, B. S.; GÓMEZ, R. J. H. C.; HIROOKA, E. Y. Atividade fungistática “in vitro” de cafeína em fungos associados com grãos de café. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 26, n. 3, p. 279-285, 2004.

FUNGARO, M. H. P.; VISSOTTO, P. C.; SARTORI, D.; VILASBOAS, L. A.; FURLANETO, M. C.; TANIWAKI, M. H. A Molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* on coffee beans. **Current Microbiology**, New York, v. 49, p.123-127, 2004.

GALLO, A.; PERRONE, G.; SOLFRIZZO, M.; EPIFANI, F.; ABBAS, A.; DOBSON, A. D. W.; MULÈ, G. Characterisation of a pks gene which is expressed during ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. **International Journal of Food Microbiology**, v.129, p. 8-15, 2009.

GAMBUTI, A.; STROLLO, D.; GENOVESE, A.; UGLIANO, M.; RITIENI, A.; MOIO, L. Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56, p. 155–162, 2005.

GAO, H.; LIU, Z.; WAN, W.; QU, X.; CHEN, M. Aqueous extract of yerba mate tea lowers atherosclerotic risk factors in a rat hyperlipidemia model. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 1225-1231, 2013.

GARCIA, D.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. *Equisetum arvense* hydro-alcoholic extract: phenolic composition and antifungal and antimycotoxigenic effect against *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in stored maize. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 93, p. 2248-2253, 2013.

GARON, D.; EL KADDOUMI, A.; CARAYON, A.; AMIEL, C. FT-IR spectroscopy for rapid differentiation of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* and characterization of aflatoxigenic isolates collected from agricultural environments. **Mycopathologia**, v.170, n. 2, p. 131-142, 2010.

GASPARDO, B.; DEL ZOTTO, S.; TORELLI, E.; CIVIDINO, S. R.; FIRRAO, G.; DELLA RICCIA, G.; STEFANON, B. A rapid method for detection of fumonisins B1 and B2 in corn meal using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy implemented with integrating sphere. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1608-1612, 2012.

GB 2761-2011 **Maximum Levels of Mycotoxins in Foods in China.**

GEISEN, R. PCR methods for the detection of mycotoxin producing fungi. 1998 In: SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; MARTINS, M. K.; PAULA, M. R. F.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. PCR methods for the detection of ochratoxin producing fungal species in coffee beans. **Research in Microbiology**, Paris, v.157, n. 4, p. 350-354, 2006.

GEISER, D. M.; KLICH, M. A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S. W.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Study in Mycology**, v. 59, p. 1-10, 2007.

GHALI, R.; HMAISSIA-KHLIFA, K.; GHORBEL, H.; MAAROUFI, K.; HEDILI, A. CLAE determination of ochratoxin A in high consumption Tunisian foods. **Food Control**, 2008.

GIVENS, D. I.; DE BOEVER, J. L.; DEAVILLE, E. R. The principles, practices and some future applications of near infrared spectroscopy for predicting the nutritive value of foods for animals and humans. **Nutrition Research Reviews**, v. 10, p. 83-114, 1997.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environment and Microbiology**, v. 61, p. 1323-1330, 1995.

GNOATTO, S. C.; DASONVILLE-KLIMPT, A.; DO NASCIMENTO, A.; GALÉRA, P.; BOUMEDIENE, K.; GOSMANN, G.; SONNET, P.; MOSLEMI, S. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 1864-1877, 2008.

GOLDBLATT, L. A. Aflatoxin. **Academic Press**, New York, 1969.

GONZALEZ, L.; JUAN, C.; SORIANO, J. M.; MOLTO, J. C.; MANES, J. Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 223–227, 2006.

GOPINANDHAN, T. N.; BASAVARAJ, K.; RAGHURAMULU, Y. Ochratoxin A, contamination in coffee – A revisit. **Indian Coffee**, p. 16-21, junho, 2013.

GROSSO, F.; SAID S.; MABROUK I.; FREMY, J.M.; CASTEGNARO, M.; JEMMALI M. New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal disease in Tunisia. **Food Chemistry and Toxicology**. v. 41, p. 1133-1140, 2003.

GÜNZLER, H.; GREMLICH, H. U. **IR Spectroscopy: An Introduction**. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002.

HADECEK, F.; GREGER H.; Testing of Antifungal Natural Product: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HARRIS, J. P.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 709–716, 2001.

HATHOUT, A. S.; ALY, S. E. Biological detoxification of mycotoxins: a review. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 905-919, 2014.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007

HEILMANN, W.; REHFELDT, A. G.; ROTZOLL, F. Behavior and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. **European Food Research Technology**, v. 209, p. 297–300, 1999.

HELM, D.; LABISCHINSKI, H.; SCHALLEHN, G.; NAUMANN, D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 69-79, 1991.

HESELTINE, C. W.; VANDEGRAFT, E. E.; FENNELL, D. I.; SMITH, M. L.; SHOTWELL, O. L. Aspergilli as ochratoxin producers. **Mycologia**, v. 64, p. 539–550, 1972.

HORIE, Y. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. **Nippon Kingakkai Kaiho**, v. 36, p. 73–76, 1995.

HUA, H.; XING, F.; SELVARAJ, J. N.; WANG, Y.; ZHAO, Y.; ZHOU, L.; LIU, X.; LIU, Y. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. **PLOS One**, v. 9, p. 1-10, 2014.

HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, p. 179-188, 2001.

IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; MENEZES, H. C.; VICENTE, E.; FUNGARO, M. H. P. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 1258–126, 2005.

IAMANAKA, B. T.; TEIXEIRA, A. A.; TEIXEIRA, A. R. R.; COPETTI, M. V.; BRAGAGNOLO, N.; TANIWAKI, M. K. The mycobiota of coffee beans and its influence on the coffee beverage. **Food Research Internacional**, v. 62, p. 353-358, 2014.

IARC - **International Agency for Research on Cancer**. Ochratoxin A. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and micotoxins. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. v. 56, Lyon: IARC, p. 489-452, 1993.

IBC/GERCA. – **Cultura de café no Brasil**: Manual de recomendações. 4 ed. Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 504 p.1981.

ICV, **Institute Francais du Vin**. Ochratoxine A dans les vins. Etat des connaissances. ICV, 9, 2002.

IHAKA R.; GENTLEMAN, R. R. A. Language for Data Analysis and Graphics. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, v. 5, p. 299, 1996.

ILLY, A.; VIANI, R. **Expresso coffe: the chemistry of quality**. San Diego: Academic Press, 1995. In: MALTA, M. R.; SANTOS, M. L.; SILVA, F. A. M. Qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p.1385-1390, 2002.

ITO, E.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Theophylline metabolism in higher plants. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1336 p. 323-330, 1997.

JINENDRA, B.; TAMAKI, K.; KUROKI S.; VASSILEVA, M.; YOSHIDA, S.; TSENKOVA R. Near-Infrared Spectroscopy and Aquaphotomics: Novel Approach for Rapid In Vivo Diagnosis of Virus-Infected Soybean. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 397, n.4, p. 685-690, 2010.

JØRGENSEN, K.; PETERSEN, A. Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from healthy Danish slaughter pigs. **Food Additives and Contaminants**, v, 19, p. 562–567, 2002.

KABAK, B.; DOBSON, A. D. W.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 593–619, 2006.

KJELDAHL, K.; BRO, R. Some common misunderstandings in chemometrics. **Journal of Chemometrics**, v. 24, p. 558-564, 2010.

KOGKAKI, E. A.; NATSKOULIS, P. I.; MAGAN, N.; PANAGOU, E. Z. Effect of interaction between *Aspergillus carbonarius* and non-ochratoxigenic grape-associated fungal isolates on growth and ochratoxin A production at different water activities and temperatures. **Food Microbiology**, v. 46, p. 521-527, 2015.

KOLOSOVA, A.; STROKA, J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: A review. **World mycotoxin Journal**, v. 4, p. 225-256, 2011.

KROG, P. Mycotoxin porcine nephropathy: a possible model for Balkan endemic nephropathy. 1974. In: PERAICA, M.; DOMIJAN, A. M.; MILETIC-MEDVED, M.; FUCHS, R. The involvement of micotoxins in the development of endemic nephropathy. **Wiener Klinische Wochenschrift**, p. 402-407, 2008.

KRSKA, R.; CREWS, C. Significance, chemistry and determination of ergot alkaloids: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, p. 722–31, 2008.

KUMAGAI, S. Ochratoxin A: plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin deficient rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 10, p. 941-943, 1985.

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. **Applied and Environment Microbiology**, v. 67, p. 3630–3635, 2001.

LECELLIER A.; GAYDOU, V.; MOUNIER, J.; HERMET, A.; CASTREC, L.; BARBIER, G.; ABLAIN, W.; MANFAIT, M.; TOUBAS, D.; SOCKALINGUM, G. D. Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds. **Food Microbiology**, In press: p. 1-9, 2014.

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**, New York, v. 57, p. 866-870, 1974.

LINDE, J.; SCHWARTZE, V.; BINDER, U.; LASS-FLÖRL, C., VOIGT, K.; HORN, F. De Novo whole-genome sequence and genome annotation of *Lichtheimia ramosa*. **Genome Announcements**, v. 2, p. 1-2, 2014.

LINO, C. M.; BAETA, M. L.; HENRI, M.; DINIS, A. M. P.; PENA, A. S.; SILVEIRA, M. I. N. Levels of ochratoxin A in serum from urban and rural Portuguese populations and estimation of exposure degree. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 879-885, 2008.

LIU, J.; WEN, Y.; DONG, N.; LAI, C.; ZHAO, G. Authentication of lotus root powder adulterated with potato starch and/ or sweet potato starch using Fourier transform mid-infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3103-3109, 2013.

LOMBAERT, G. A.; PELLAERS, P.; ROSCOE, V.; MANKOTIA, M.; NEIL, R.; SCOTT, P. M. Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, p. 494–504, 2003.

LÓPEZ, P. V. A. **Bioprospecção de extratos de *Croton urucurana* Baill e seus fungos endofíticos**. 138 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2010.

LOPEZ, A. G.; THEUMER, M. G.; ZYGADLO, J. A., RUBINSTEIN, H.R. Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides* fumonisin B1 production in corn grain. **Mycopathologia**. v. 158, p. 343–349, 2004.

LÓPEZ-MALO, A.; ALZADORA, S. M.; GUERRERO, S. **Natural antimicrobials from plants, in Minimally Processed Fruit and Vegetables: Fundamental Aspects and Applications**, ed. by ALZAMORA, S. M.; TAPIA, M., LOPEZ-MALO, A., Aspen, Gaithersburg, p. 237–264, 2000.

MA, Z.; MICHAILIDES, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 24, p. 853-863, 2005.

MACDONALD, S.; WILSON, P.; BARNES, K.; DAMANT, A.; MASSEY, R.; MORTBY, E.; SHEPHERD, M.J. Ochratoxin A in dried vine fruit: Method development and survey. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, p. 253–260, 1999.

MAGNOLI, C. E.; ASTORECA, A. L.; PONSONE, M. L.; BARBERIS, C. L.; FERNANDEZ-JURI, M. G.; DALCERO, A. M. Ochratoxin- and Aflatoxin-producing fungi associated with green and roasted coffee samples consumed in Argentina. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 4, p. 419-427, 2008.

MALIR, F.; OSTRY, V.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; NOVOTNA, E. Ochratoxin A: Developmental and reproductive toxicity – An overview. **Birth Defects Research B**, v. 98, p. 493-502, 2013.

MANTLE, P.; KULINSKAYA, E.; NESTLER, S. Renal tumourigenesis in male rats in response to chronic dietary ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 1, p. 58-64, 2005.

MARQUES, A. S.; NICÁCIO, J. T. N.; CIDRAL, T. A.; MELO, M. C. N.; LIMA, K. M. G. The use of near infrared spectroscopy and multivariate techniques to differentiate *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* inoculated into pulp juice. **Journal of Microbiology Methods**, v. 93, p. 90-94, 2013.

MASOUD, W.; KALTOFT, C. H., The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 229-234, 2006.

MATA, M. M.; TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; SARTORI, D.; OLIVEIRA, A. L. M.; FURLANETO, M. C.; FUNGARO, M. H. P. Agrobacterium-mediated insertional mutagenesis of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 148-151, 2007.

MAZUCHOWSKI, J. Z. **Manual da erva-mate**. Curitiba: Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural, 104 p. 1989.

MECA, G.; RITIENI, A. Production and analysis of ochratoxin A produced by *Aspergillus ochraceus* ITEM 5137 in submerged culture. **Food Chemistry**, v. 117, p. 470-472, 2009.

MICCO, C.; GROSSI, M.; MIRAGLIA, M.; BRERA, C. A. Study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, v. 6, p. 333–339, 1989.

MILETIC-MEDVED, M.; PERAICA, M.; DOMIJAN, A. M. Recent data on endemic nephropathy and related urothelial tumors in Croatia. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 117, p. 604-609, 2005.

MIRANDA, D. C.; ARÇARI, D. P.; PEDRAZZOLI, J.; BASTOS, D. H. M.; RIBEIRO, M. L. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂ – induced DNA damage and DNA repair in mice. **Megagenesis**, v. 23, p. 261-265, 2008.

MOLINIÉ, A.; FAUCET, V.; CASTEGNARO, M.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. **Food Chemistry**, v. 92, p. 391–400, 2005.

MONACI, L.; PALMISANO, F.; MATRELLA, R.; TANTILLO, G. Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, p. 184–187, 2005.

MORELLO, L. G.; SARTORI, D.; MARTINEZ, A. L. O.; VIEIRA, M. L. C.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of β -tubulin gene by using real-time PCR. **International Journal Food Microbiology**, v. 119, p. 270-276, 2007.

NAKAJIMA, M.; TSUBOUCHI, H.; MIYABE, M.; UENO, Y. Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. **Food Agricultural Immunological**, London, v. 9, p. 77-83, 1997.

NAUMANN A. A novel procedure for strain classification of fungal mycelium by cluster and artificial neural network analysis of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectra. **Analyst**, v. 134, p. 1215-1223, 2009.

NAUMANN, D. Infrared spectroscopy in Microbiology. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, ed. R. A Meyers, Chichester, p. 102-131, 2000.

NAUMANN, A.; NAVARRO-GONZÁLEZ, M.; PEDDIREDDI, S.; KÜES, U.; POLLE, A. Fourier transform infrared microscopy and imaging: detection of fungi in wood. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 829-835, 2005.

NAUMANN, D.; HELM, D.; LABISCHINSKY, H.; GIESBRECH. P. **The characterization of microorganisms by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)**. In: Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis. Nelson WH, editor. New York: v. 43, 1991.

NAYAK, S.; HARSHITHA, M. J.; SAMPATH, C.; ANILKUMAR, H. S.; RAO, C. V. Isolation and characterization of caffeine degrading bacteria from coffee pulp. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 86-91, 2013.

NIE, M.; ZHANG, W. Q.; XIAO, M.; LUO, J. L.; BAO, K.; CHEN, J. K.; LI, B. FT-IR spectroscopy and artificial neural network identification of *Fusarium* species. **Journal of Phytopathology**, v. 155, p. 364–367, 2007.

NORTHOLT, M. D.; EGMOND, H. P. V.; PAULSCH, E. Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. **Journal of Food Protection**, v. 42, p. 485–490, 1979.

O'CALLAGHAN, J.; COGHLAN, A.; ABBAS, A.; GARCIA-ESTRADA, C.; MARTÍN, J. F.; DOBSON, A. D. W. Functional characterization of the polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Penicillium verrucosum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 172-181, 2013.

O'DONNELL, K.; KISTLER, C.; TACKE, B. K.; CASPER, H. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 97, p. 7905-7910, 2000.

OLSEN, M. **Prevention of ochratoxin A in cereals: OTA PREV.** Quality of Life and Management of Living Resources. Project n. QLK1-CT-1999-00433, 1999.

OSBORNE, B. G.; FEARN, T.; HINDLE, P. H. Theory of near-infrared spectrometry. **Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis**, 1993.

OSTRY, V.; MALIR, F.; RUPRICH, J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. **Toxins**, v. 5, p. 1574-1586, 2013.

OTTENDER, H.; MAJERUS, P. Ochratoxin A (OTA) in coffee: nation-wide evaluation of data collected by German food control 1995-1999. **Food Additives and Contaminants**. v. 8, p. 431-435, 2001.

PARODI, G.; DICKERSON, P.; CLOUD, J. Pollen identification by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 67, p. 342-348, 2013.

PASSONE, M. A.; GIRARDI, N. S.; ETCHEVERRY, M. Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus* section *Nigri* growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, p. 198–206, 2012.

PATHARAJAN, S.; REDDY, K. R. N.; KARTHIKEYAN, V.; SPADARO, D.; LORE, A.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Potential of yeast antagonists on *in vitro* biodegradation of ochratoxin A. **Food Control**, v. 22, p. 290-296, 2011.

PERAICA, M.; DOMIJAN, A. M.; MILETIC-MEDVED, M.; FUCHS, R. The involvement of micotoxins in the development of endemic nephropathy. **Wiener Klinische Wochenschrift**. p. 402-407, 2008.

PÉREZ DE OBANOS, A.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A. Influence of roasting and brew preparation on the ochratoxin A content in coffee infusion. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 463–471, 2005.

PERRONE, G.; MULE, G.; SUSCA, A.; BATTILANI, P.; PIETRI, A.; LOGRIECO, A. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, n.1, p.680-685. Jan. 2006.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRLICH, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R. A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Study in Mycology**, v. 59, p. 53-66, 2007.

PETZINGER, E.; ZIEGLER, K. Ochratoxin A from a toxicological perspective. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, p. 91-98, 2000.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R. A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 61–99, 2007.

PIETRI, A.; BERTUZZI, T.; GUALLA, A.; PIVA, G. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscles and in pork products from northern Italy. **Italian Journal of Food Science**, v. 18, p. 99–106, 2006.

PIMENTA, C. J.; CHALFOUN, S. M. Composição microbiana associada ao café coco e beneficiado colhido em diferentes estádios de maturação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.3, p. 677- 682, mai./jun., 2001.

PIMENTA, J. C.; VILELA E. R. Microbial composition and ochratoxin in coffee (*Coffea arabica* L.) under different waiting times of drying. **Science and Agrotechnology**, v. 27, n. 6, 2003.

PIOTROWSKA, M.; ROSZAK, J.; STANCZYK, M.; PALUS, J.; DZIUBALTOWSKA, E.; STEPNIK, M. Effects of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* on growth of *Aspergillus westerdijkiae* and ochratoxin A production and toxicity. **World mycotoxin Journal**, v. 7, p. 313-320, 2014.

PIOTROWSKA, M.; ZAKOWSKA, Z. The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. **Polish Journal of Microbiology**, v. 54, p. 279-286, 2005.

PITOUT, M. J. The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. **Biochemical Pharmacology**, v. 18, p. 485-491, 1969.

PITT, J. I. **Biology and Ecology of Toxigenic *Penicillium* Species**. In Mycotoxins and Food Safety; DEVRIES, J. W.; TRUCKSEESS, M. W.; JACKSON, L. S., Eds.; Kluwer Academic, Plenum Publishers: New York, NY, USA,; p. 29–41, 2002.

PITT, J. I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. **Applied and Environment Microbiology**, v. 53, p. 266–269, 1987.

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

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

RAMADAN, Z.; JACOBS, D.; GRIGOROV, M.; KOCHHAR, S. Metabolic profiling using principal component analysis, discriminant partial least squares, and genetic algorithms. **Talanta** 68: 1683-1691, 2006.

REISSMANN, C. B.; DUNISH, O.; BOEGER, M. R. Beziehung Zwischen ernarungbiologishen (Fe, Mn, Ca) und Strukturellen Merkmalen Ausgewahlter mophotipen der Mate Pflanze (*Ilex paraguariensis*). Boden, Wald and Wasser. In: RIBEIRO, M. M. **Influência da adubação nitrogenada na incidência de *Gyropsylla spegazziniana* (Heiptera: Psyllidae) praga da erva-mate cultivada**. 150f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal – Silvicultura). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2005.

RINALDI, G.; MANCINI, E.; FERRUZZA, S.; SAMBUY, Y.; PERUZZI, G. Effect of red winw on ochratoxin A toxicity in intestinal Caco-2/TC7 cells. **Toxicology In Vitro**, v. 21, p. 204-210, 2007.

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y. J.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico- biological interactions**, v. 159, n. 1, p. 18-46, 2006. In: ABRUNHOSA, L. J. **Estratégias para o controle de ocratoxina A em alimentos**. 236 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2008.

RINNAN, A.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **TRAC-trend Anal Chemistry**, v. 10, p. 1201-1222, 2009.

RODRIGUEZ, A.; RODRIGUEZ, M.; MARTIN, A.; NUNEZ, F.; CORDOBA, J. J. Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. **Food Control**, v. 27, p. 118–126, 2012.

ROMANI, S.; SACCHETTI, G.; CHAVES LOPEZ, C.; PINNAVAIA, G. G.; DALLA ROSA, M. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3616–3619, 2000.

ROSAL, L. F.; LEITE, C. D.; MAIA, A. J.; FARIA, C. M.; BALDIN, I.; ARCONDES, M. M.; MARCONDES, M. M. Avaliação *In vitro* do uso do extrato aquoso de hortelã em diferentes concentrações sobre o crescimento micelial de *Penicillium* sp. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, p. 1678-1681, 2009.

RSNF - **Requirements for the safety and nutrition of foods** of the Unified Sanitary-Epidemiological and Hygiene Requirements of the Commission of the Customs Union of Russia, Belarus and Kazakhstan.; 2. Chapter 1. Hygienic Requirements in respect of the Safety and Nutritional Value of Foodstuffs' of 14 November 2001.

SAMSON, R. A. **List of names of Trichocomaceae published between 1992 and 1999**. In: Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus*. SAMSON, R. A.; PITT, J. I., eds.: Harwood Academic Publishers, Amsterdam: p. 73-79, 2000.

SAMSON, R. A.; HONG, S. B.; FRISVAD, J. C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Medical Mycology**, v. 44, p. 133-148, 2006.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJIPERS, A. F. A.; FRANK, J. M.; FRISVAD, J. C. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 45–61, 2004.

SANTOS, C.; FRAGA, M. E.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 168-175, 2010.

SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; MARTINS, M. K.; FERREIRA DE PAULA, M. R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. **Research in Microbiology**, v.157, p. 350-354, 2006.

SAVA, V.; REUNOVA, O; VELASQUEZ, A. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin A. **Neuritoxiology**, v. 27, p. 82-92, 2006.

SCOTT, P. M.; VAN WALBEEK, W.; 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**, v. 20, p. 1103–1109, 1972.

SCUDAMORE, K. A.; PATEL, S.; BREEZE, V. Surveillance of stored grain from the 1997 harvest in the United Kingdom for ochratoxin A. **Food Additives and Containants**, v. 16, p. 281–290, 1999.

SENYUVA, H. Z.; GILBERT, J.; OZCAN, S.; ULKEN, U. Survey for co-occurrence of ochratoxin A and aflatoxin B1, in dried figs in Turkey by using a single laboratory-validated alkaline extraction method for ochratoxin A. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1512–1515, 2005.

SERRA, R.; MENDONCA, C.; VENÂNCIO, A. Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. S35–S39, 2006.

SHAPAVAL, V.; SCHMITT, J.; MORETRO, T.; SUSO, H. P.; SKAAR, I.; ASLI, A. W.; LILLEHAUG, D.; KOHLER, A. characterization of food spoilage fungi by FTIR spectroscopy, **Journal of Applied Microbiology**, p. 1-9, 2012.

SHOTWELL, O. L.; HESSELTINE, C. W.; GOULDEN, M. L. Ochratoxin A: Occurrence as natural contaminant of a corn sample. **Applied Microbiology**, v. 17, p. 765–766, 1969.

SILVA, F. A. S.; The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: **International Conference on Computer in Agriculture**, v. 6, p. 294-298, Cancun, 1996.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; ABREU, L. M.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. **Food Microbiology**, v. 25, p. 951-957, 2008.

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**, v. 60, p. 251–260, 2000.

SINGH, C. B.; PALIWAL, J.; JAYAS, D. S.; WHITE, N. D. G. Near-infrared spectroscopy: Applications in the grain industry. **The Canadian Society for Bioengineering**, n. 6, 2006.

SKAUG, M.A. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v 16, p. 75–78, 1999.

SOLIMAN, K. M.; BADEAA, R. I. effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**. v. 40, p. 1669-1675, 2002.

STACK, M. E.; MISLIVEC, P. B.; DENIZEL, T.; GIBSON, R.; POHLAND, A. E. Ochratoxins A and B, xanthomegnin, viomellein and vioxanthin production by isolates of *Aspergillus ochraceus* from green coffee beans. **Journal of Food Protection**, v. 46, p. 965-968, 1983.

STORMER, F. C.; LEA, T. Effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation. **Toxicology**, v. 95, p. 45-50, 1995. In: AL-ANATI, L.; PETZINGER, E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p.79-90, 2006.

SUÁREZ-QUIROZ, M.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR_GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, v. 21, p. 629-634, 2004.

SUÁREZ-QUIROZ, M.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. P. Effect of the post-harvest processing procedure on OTA occurrence in artificially contaminated coffee. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 339–345, 2005.

SZYDŁOWSKA-CZERNIAK, A. MIR spectroscopy and partial least-squares regression for determination of phospholipids in rapeseed oils at various stages of technological process. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1179-1187, 2007.

TAFURI, A.; FERRACANE, R.; RITIENI, A. Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. **Food Chemistry**, v. 88, p. 487–494, 2004.

TALLADA, J. G.; WICKLOW, D. T.; PEARSON, T. C.; ARMSTRONG, P. R. Detection of fungus-infected corn kernels using near-infrared reflectance spectroscopy and color imaging. **Transactions of the ASABE**, v. 54, n. 3, p. 1151-1158, 2011.

TANIWAKI, M. H.; URBANO, G. R.; PALACIOS, H. A. C.; LEITAO, M. F. F.; MENEZES, H. C.; VICENTINI, M. C.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, N. N. **Influence of water activity on mould growth and ochratoxin A production in coffee**. 19th ASIC Coffee Conference, Trieste, Italy, 14–18 May, 2001.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; LAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Califórnia, v.82, p.173–179, 2003.

TAVALLAIE, R.; TALEBPOUR, Z.; AZAD, J.; SOUDI, M. R. Simultaneous determination of pyruvate and acetate levels in xanthan biopolymer by infrared spectroscopy: effect of spectral pre-processing for solid-state analysis. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1124-1130, 2011.

TÉREN, J.; PALÁGYI, A.; VARGA, J. Isolation of ochratoxin–producing aspergilli from green coffee beans of different origin. **Cereal Research Communications**, v. 25, p. 303-304, 1997.

THERMO GALACTIC, **User's manual PLS plus IQ**, 2013.

THIRUMALA-DEVI, K.; MAYO, M. A.; REDDY, G.; EMMANUEL, K. E.; LARONDELLE, Y.; REDDY, D. V. Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, p. 830–835, 2001.

TRALAMAZZA, S. M.; BOZZA, A.; DESTRO, J. G. R.; RODRÍGUEZ, J. I.; DALZOTO, P. D.; PIMENTEL, I. C. Potential of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) to differentiate environmental *Aspergillus* fungi species *A. niger*, *A. ochraceus* and *A. westerdijkiae* using two different methodologies. **Applied Spectroscopy**, v.67, n.3, p. 274-278, 2013.

TSUBOUCHI, H.; TERADA, H.; YAMAMOTO, K.; HISADA, K.; SAKABE, Y. Ochratoxin A found in commercial roast coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 540–542, 1988.

TUKEY, J. W.; CIMINERA, J. L.; HEYSE, J. F. Testing the Statistical Certainty of a Response to Increasing Doses of a Drug. **Biometrics**, v. 41, p. 295–301, 1985

VALDUGA, E., **Caracterização química e anatômica da folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e de espécies utilizadas na adulteração do mate**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 1994.

VALERO, A.; FARRÉ, J. R.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S. Effects of fungal interaction on ochratoxin A production by *A. carbonarius* at different temperatures and aw. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 160–164, 2006.

VAN der MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, D. B.; THERON, J. J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. **Nature**, London, v. 205, p. 1113, 1965.

VAN WALBEEK, W.; SCOTT, P. M.; HARWIG, J.; LAWRENCE, J. W. *Penicillium viridicatum* Westling: A new source of ochratoxin A. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 15, p. 1281–1285, 1969.

VARGA, J.; KEVEI, E.; RINYU, E.; TÉREN, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environment Microbiology*, v. 62, p. 4461–4464, 1996.

VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 321–328, 2005.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J.; MESTERHÁZY, Á. Recent advances in ochratoxin research I: Production, detection and occurrence of ochratoxins. **Cereal Research Communications**, v. 29, p. 85–100, 2001.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p.1–7, 2000.

VEGA, F. E.; POSADA, F.; GIANFAGNA, T. J.; CHAVES, F.; PETERSON, S. W. An insect parasitoid carrying an ochratoxin producing fungus. **Naturwissenschaften**, v. 93, p. 297-299, 2006.

VERMA, R.; CHAKRABORTY, D. *Emblica officinalis* aqueous extract ameliorates ochratoxin induced lipid peroxidation in the testes of mice. **Acta Polonica Pharmaceutica - Drug Research**, v. 65, p. 187–194, 2008.

VIEIRA, M. A.; MARASCHIN, M.; PAGLIOSA, C. M.; PODESTÁ, R.; AMBONI, R. D. M. Análise de compostos fenólicos, metilxantinas, tanino e atividade antioxidante de resíduo de processamento de erva-mate: uma nova fonte potencial de antioxidantes. In: INTERNATIONAL WORKSHOP – ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION, 2, 2009, São Paulo. **Anais...**São Paulo: UNIP, p. 1-11, 2009.

VILELA, D. M.; PEREIRA, G. V. M.; SILVA, C. F.; BATISTA, L. R.; SCHWAN, R. F. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea Arabica* L.). **Food Microbiology**, v. 27, p. 1128-1135, 2010.

VISCONTI, A.; PASCALE, M.; CENTONZE, G. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 888, p. 321–326, 2000.

WANGIKAR, P. B.; DWIVEDI, P.; TELOG, A. G. Teratogenic effects rabbits of simultaneous exposure to ochratoxin A and aflatoxin B1 with special reference to microscopic effect. **Toxicology**. v. 130, p. 33-62, 2005.

WENNING, M.; SCHERER, S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 7111-7120, 2013.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis MA, GELFAN, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. eds.3: in Academic Press, San Diego: p.15-322, 1990.

WILLIAMS, P. C. **Implementation of near-infrared technology**. In: Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. WILLIAMS, P. C.; NORRIS, K. H., eds. American Association of Cereal Chemists, v. 145, 2001.

ZHANG X.; BOESCH-SAADATMANDI, C.; LOU, Y.;; WOLFFFRAN, S.; HUEBBE, P.; RIMBACH, G. Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. **Genes and Nutrition**, v. 4, p. 41-48, 2009.

ZHU, C.; SHI, J.; JIANG, C.; LIU, Y. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts. **Food Control**, v. 50, p. 125-132, 2015.

ZIMMERLI, B.; DICK, R. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 655–668, 1996.

ZINEDINE A.; SORIANO, J. M.; MOLTO, J. C.; MANES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulation and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 4, p. 1–18, 2007.

APÊNDICE A

Métodos de pré-processamentos matemáticos realizados, a partir de dados do infravermelho, para a seleção do melhor conjunto de pré-processamentos matemáticos.

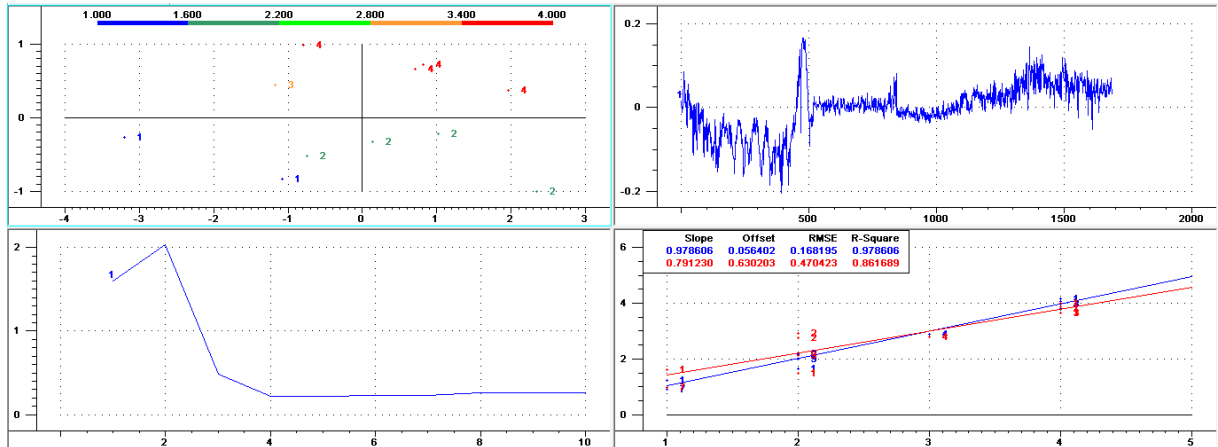


FIGURA- Sem aplicação de modelos quimiométrico.

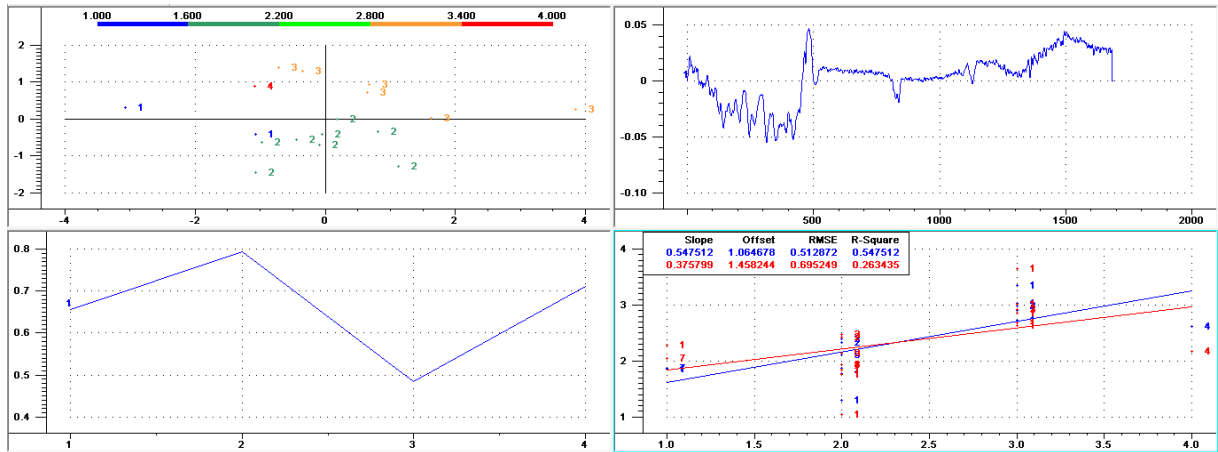


FIGURA- Modelo quimiométrico: Alisamento com 5 pontos.

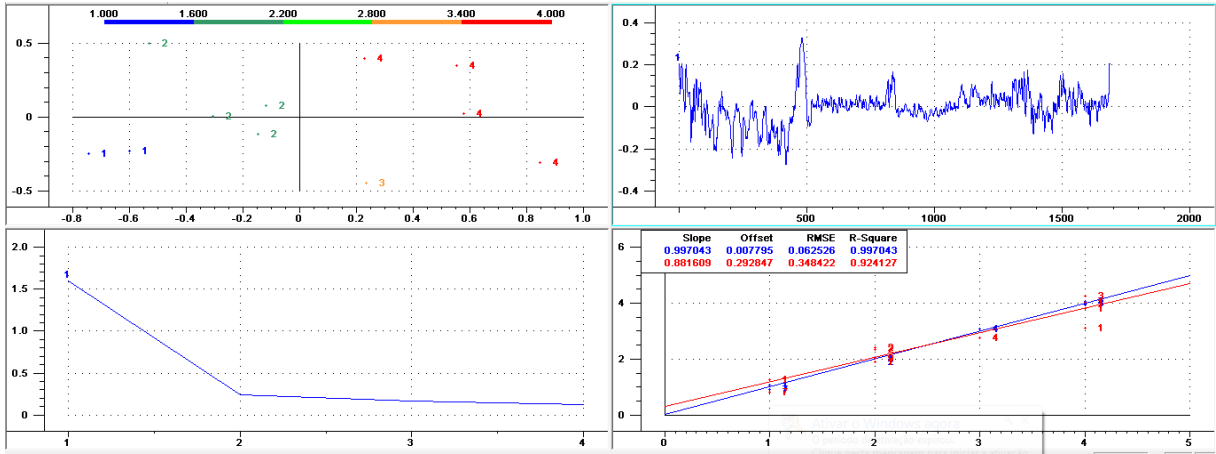


FIGURA- Modelo quimiométrico: Alisamento com 5 pontos e MSC.

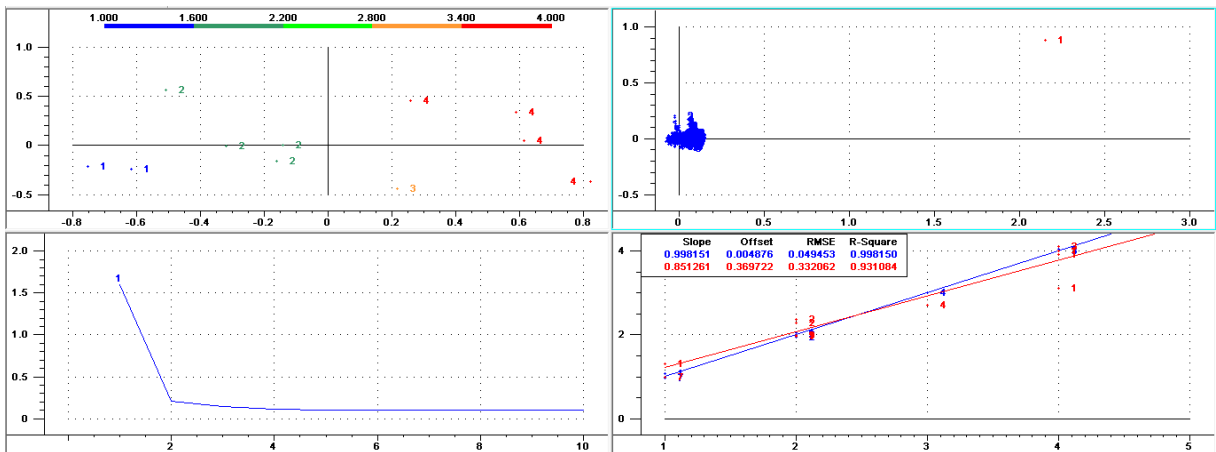


FIGURA- Modelo quimiométrico: Linha de base e MSC.

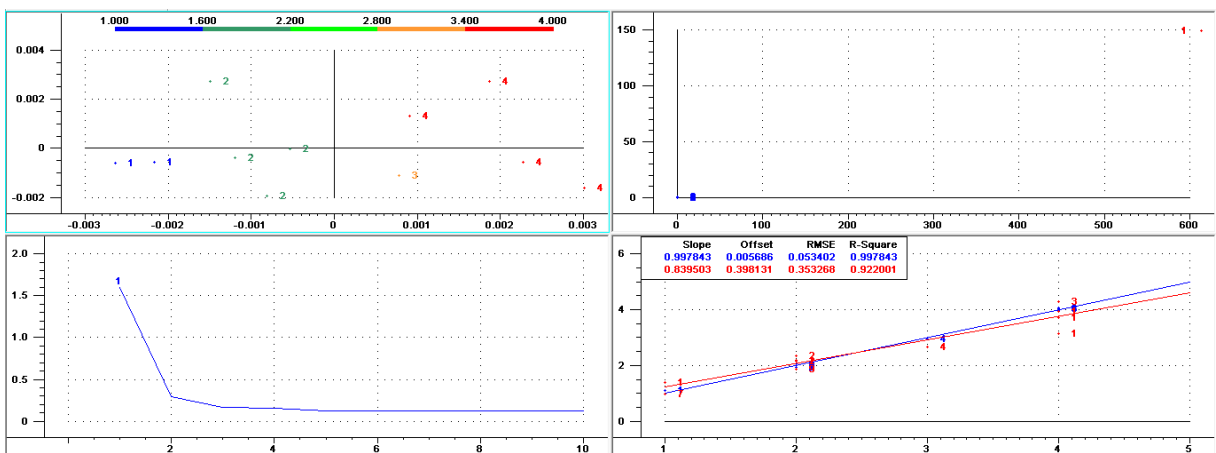


FIGURA- Modelo quimiométrico: Linha de base e normalização.

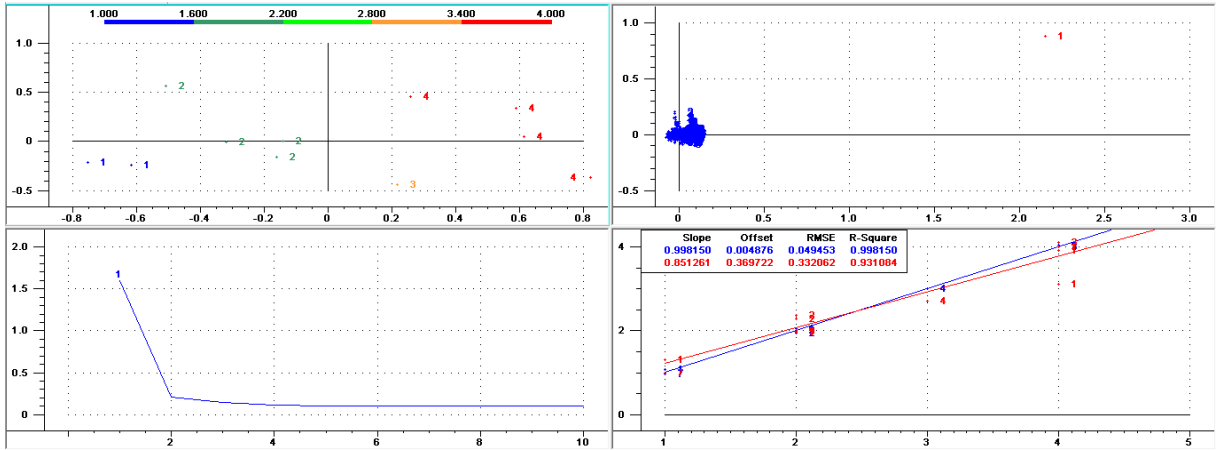


FIGURA- Modelo quimiométrico: MSC.

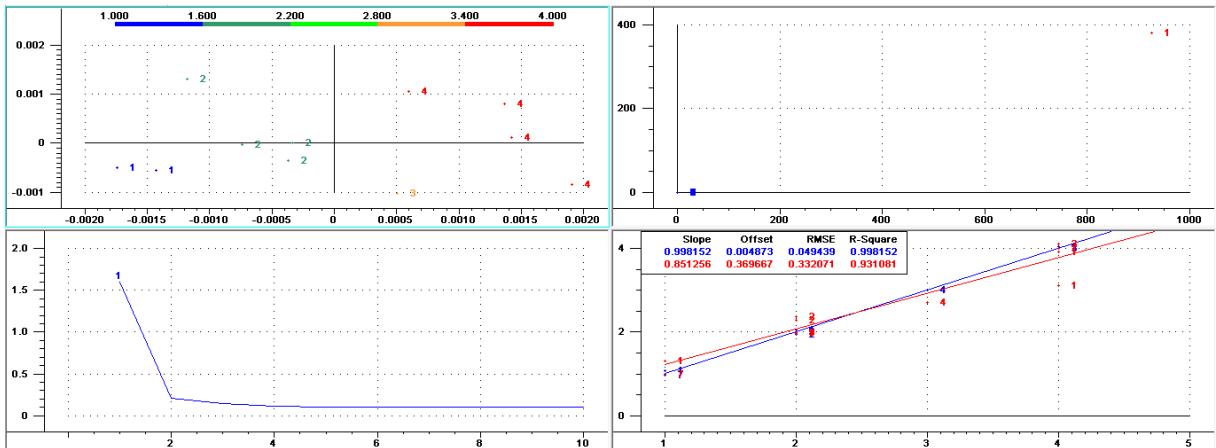


FIGURA- Modelo quimiométrico: Normalização e MSC.

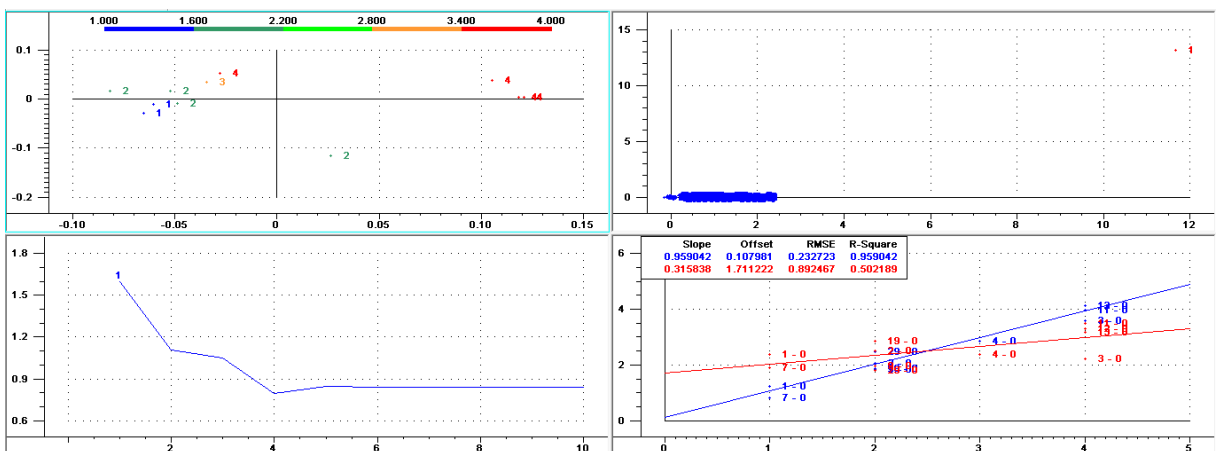


FIGURA- Modelo quimiométrico: Primeira derivada.

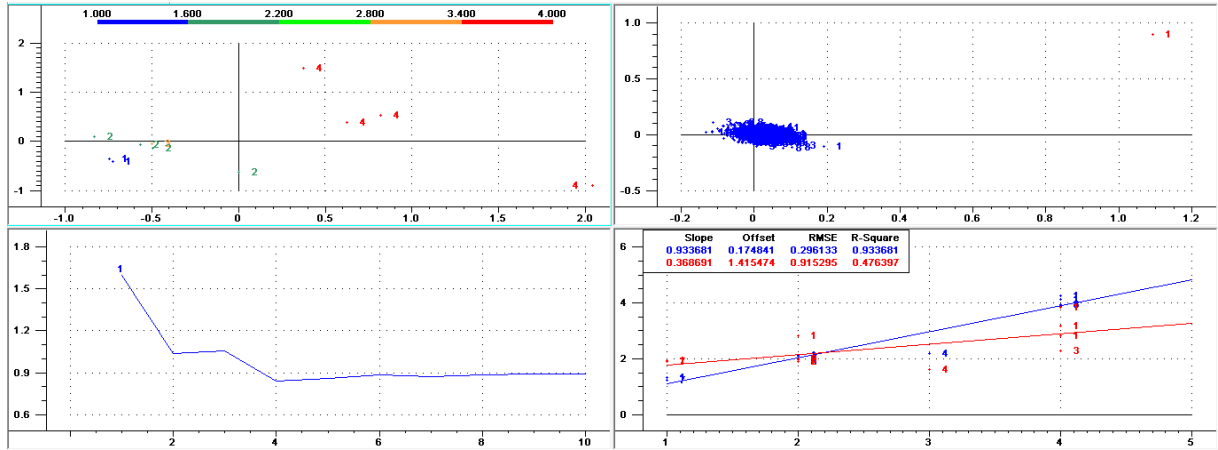


FIGURA- Modelo quimiométrico: Primeira derivada e normalização

APÊNDICE B

Produção de OTA pelos fungos *A. westerdijkiae* 91 UEL, *A. ochraceus* 40013 (ATCC 22947), *A. carbonarius* 187 UEL e *A. niger* 1 UEL.

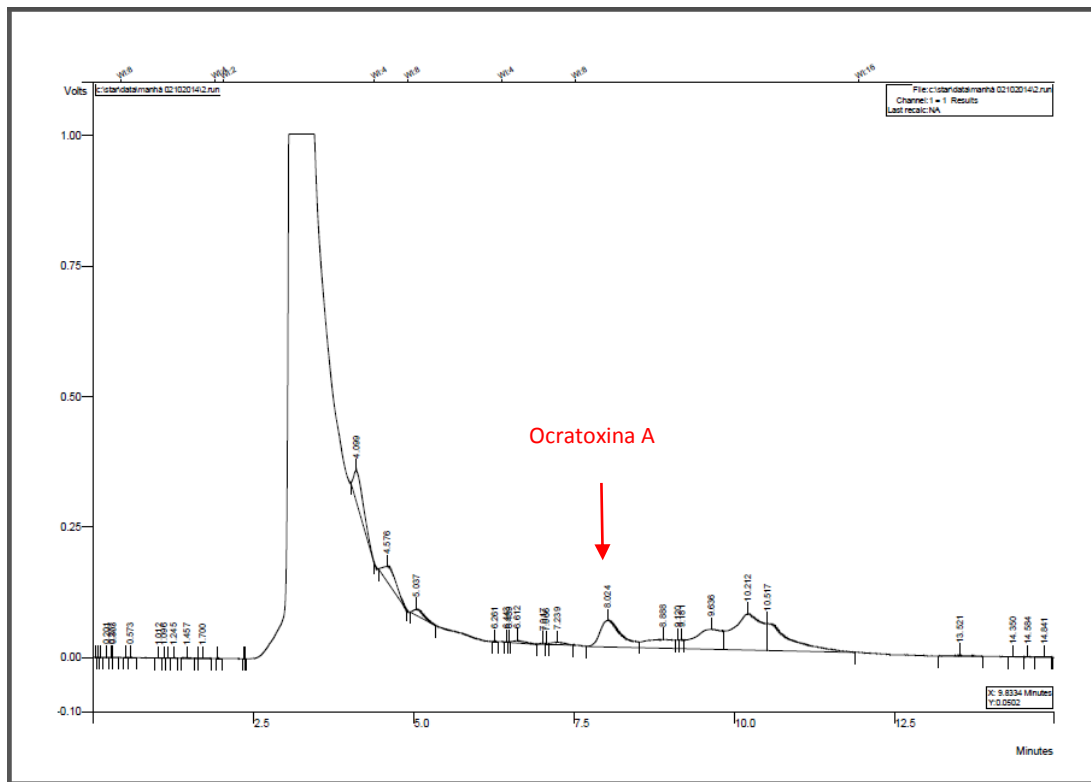


FIGURA- Produção de OTA por *A. westerdijkiae* 91 UEL.

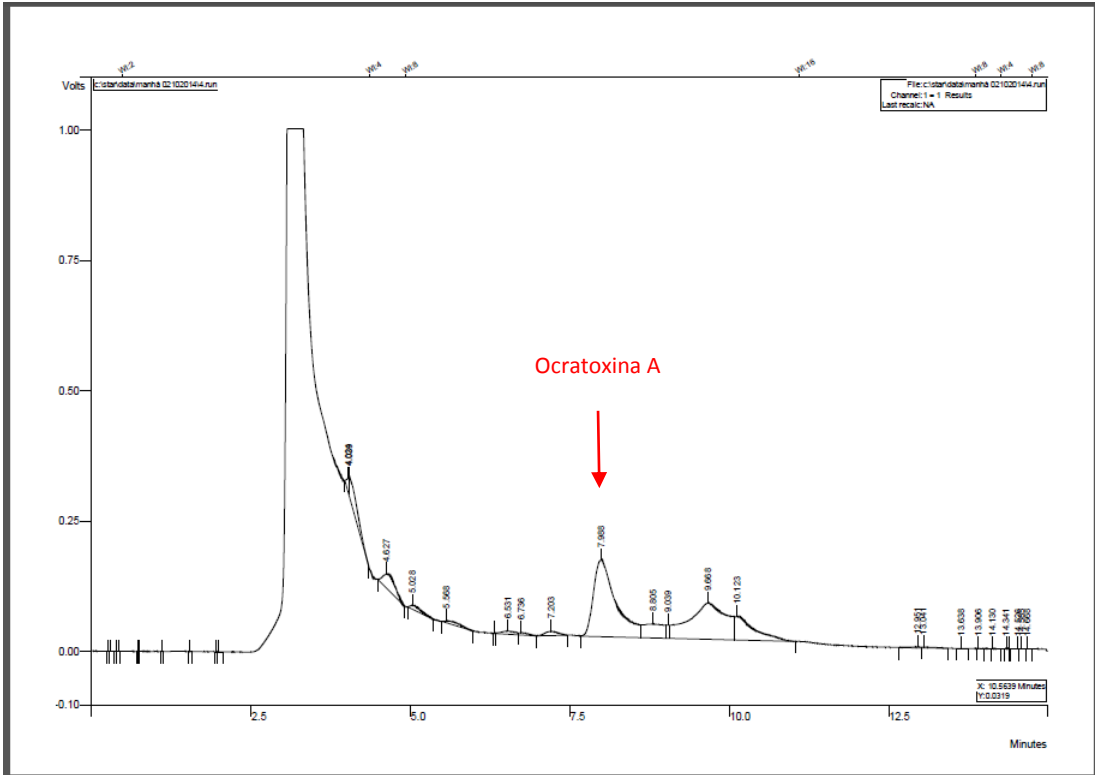


FIGURA- Produção de OTA por *A. ochraceus* 40013 (ATCC 22947).

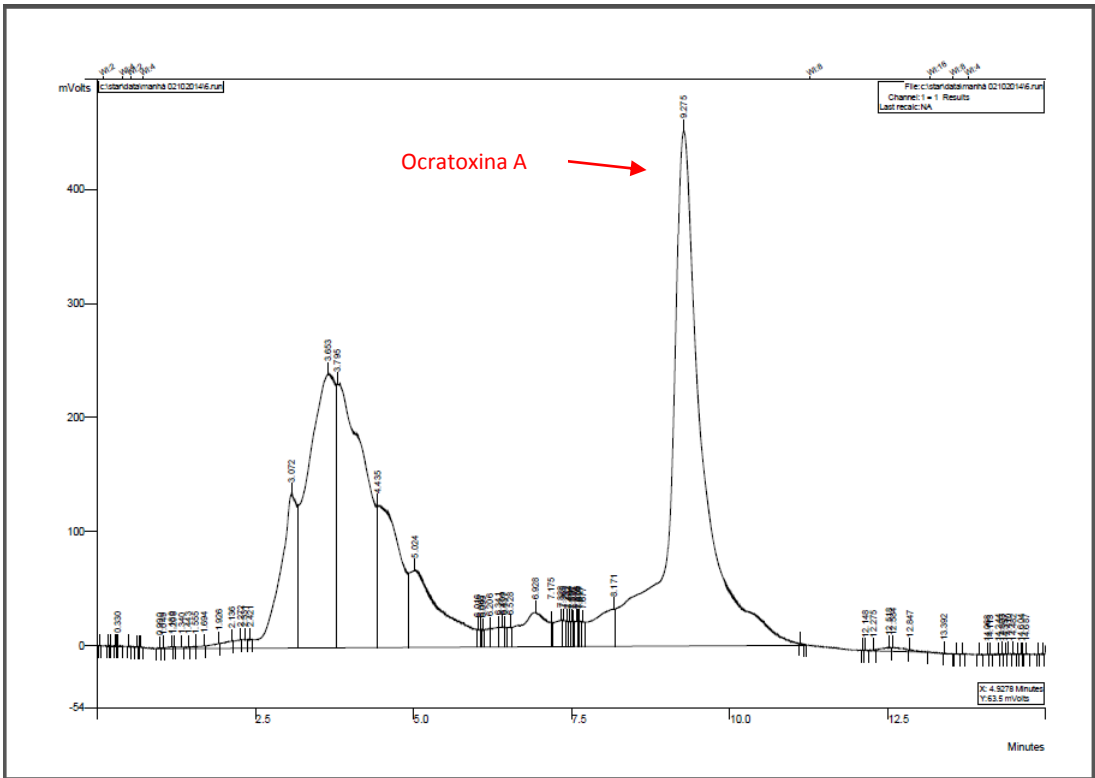
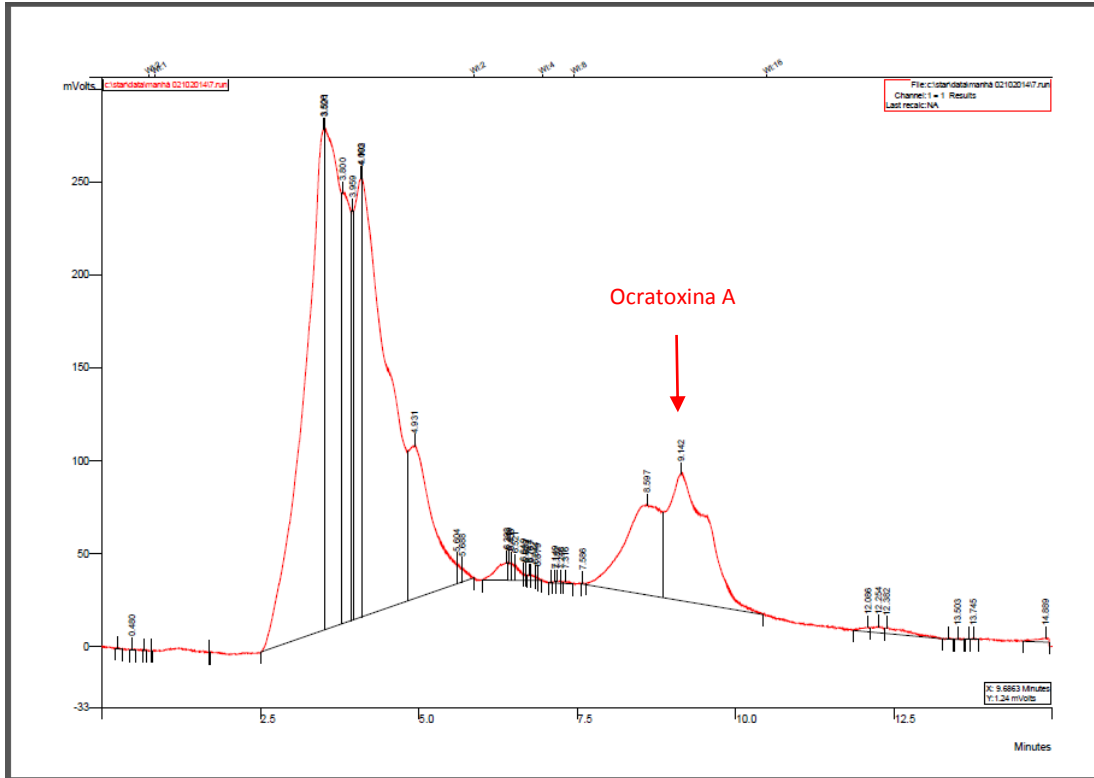


FIGURA- Produção de OTA por *A. carbonarius* 187 UEL.



APÊNDICE D

Níveis de significância para inibição de crescimento e de produção de OTA por *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* e *A. niger*.

Table A : Tukey's method for Multiple Comparison Test (MCT) significances for growth inhibition

	<i>A. ochraceus</i>		<i>A. westerdijkiae</i>		<i>A. carbonarius</i>		<i>A. niger</i>	
	z value	Pr(> z)	z value	Pr(> z)	z value	Pr(> z)	z value	Pr(> z)
C113 - C107	-2,853	0,09947 .	-2,266	0,3634	-5,067	<0.001 ***	-2,197	0,40752
C118 - C107	16,408	<0.001 ***	7,608	<0.01 ***	0,552	0,99979	2,132	0,45134
C122 - C107	-3,091	0,052 .	-2,59	0,1912	-5,669	<0.001 ***	-6,203	<0.001 ***
C143 - C107	-1,427	0,88791	0,971	0,9884	-2,257	0,36841	-1,68	0,75916
C176 - C107	-2,853	0,1006	-1,861	0,6404	-5,117	<0.001 ***	-5,169	<0.001 ***
C183 - C107	-5,469	<0.001 ***	-3,075	0,0536 .	-6,772	<0.001 ***	-6,073	<0.001 ***
C187 - C107	-3,091	0,05185 .	-4,209	<0.01 ***	-6,17	<0.001 ***	-7,818	<0.001 ***
Control - C107	21,52	<0.001 ***	17,805	<0.01 ***	20,718	<0.001 ***	24,939	<0.001 ***
C118 - C113	19,261	<0.001 ***	9,874	<0.01 ***	5,618	<0.001 ***	4,329	<0.001 ***
C122 - C113	-0,238	1	-0,324	1	-0,602	0,9996	-4,006	0,00217 **
C143 - C113	1,427	0,88791	3,237	0,0331 *	2,809	0,11277	0,517	0,99987
C176 - C113	0	1	0,405	1	-0,05	1	-2,972	0,07344 .
C183 - C113	-2,616	0,1795	-0,809	0,9966	-1,706	0,74332	-3,877	0,00349 **
C187 - C113	-0,238	1	-1,942	0,5842	-1,104	0,97388	-5,621	<0.001 ***
Control - C113	24,374	<0.001 ***	20,071	<0.01 ***	25,784	<0.001 ***	27,136	<0.001 ***
C122 - C118	-19,499	<0.001 ***	-10,198	<0.01 ***	-6,22	<0.001 ***	-8,335	<0.001 ***
C143 - C118	-17,834	<0.001 ***	-6,637	<0.01 ***	-2,809	0,11235	-3,812	0,00435 **
C176 - C118	-19,261	<0.001 ***	-9,469	<0.01 ***	-5,669	<0.001 ***	-7,301	<0.001 ***
C183 - C118	-21,877	<0.001 ***	-10,683	<0.01 ***	-7,324	<0.001 ***	-8,205	<0.001 ***
C187 - C118	-19,499	<0.001 ***	-11,816	<0.01 ***	-6,722	<0.001 ***	-9,95	<0.001 ***
Control - C118	5,113	<0.001 ***	10,198	<0.01 ***	20,166	<0.001 ***	22,807	<0.001 ***
C143 - C122	1,665	0,76817	3,561	0,0107 *	3,411	0,01909 *	4,523	<0.001 ***
C176 - C122	0,238	1	0,728	0,9984	0,552	0,99979	1,034	0,98265
C183 - C122	-2,378	0,29592	-0,486	0,9999	-1,104	0,97386	0,129	1
C187 - C122	0	1	-1,619	0,7952	-0,502	0,9999	-1,615	0,79656
Control - C122	24,611	<0.001 ***	20,395	<0.01 ***	26,386	<0.001 ***	31,142	<0.001 ***
C176 - C143	-1,427	0,88785	-2,833	0,1059	-2,859	0,09801 .	-3,489	0,01433 *
C183 - C143	-4,042	0,00179 **	-4,047	<0.01 **	-4,515	<0.001 ***	-4,393	<0.001 ***
C187 - C143	-1,665	0,76841	-5,18	<0.01 ***	-3,913	0,00319 **	-6,138	<0.001 ***
Control - C143	22,947	<0.001 ***	16,834	<0.01 ***	22,975	<0.001 ***	26,619	<0.001 ***
C183 - C176	-2,616	0,17951	-1,214	0,9537	-1,655	0,77349	-0,905	0,99278
C187 - C176	-0,238	1	-2,347	0,3135	-1,053	0,98045	-2,649	0,16712
Control - C176	24,374	<0.001 ***	19,667	<0.01 ***	25,834	<0.001 ***	30,108	<0.001 ***
C187 - C183	2,378	0,29607	-1,133	0,9693	0,602	0,9996	-1,744	0,71853
Control - C183	26,989	<0.001 ***	20,881	<0.01 ***	27,49	<0.001 ***	31,013	<0.001 ***
Control - C187	24,611	<0.001 ***	22,014	<0.01 ***	26,888	<0.001 ***	32,757	<0.001 ***

Signif. codes: ~ 0 ***
0,001 **
0,01 *
0,05 .
> 0.1

Table A : Tukey's method for Multiple Comparison Test (MCT) significances for OTA inhibition

	<i>A. ochraceus</i>		<i>A. westerdijkiae</i>		<i>A. carbonarius</i>		<i>A. niger</i>	
	z value	Pr(> z)	z value	Pr(> z)	z value	Pr(> z)	z value	Pr(> z)
C113 - C107	0,342	1	-1,484	0,8636	-2,192	0,41155	-1,379	0,9061
C118 - C107	-2,248	0,3745	-1,818	0,6702	-0,22	1	-0,237	1
C122 - C107	-1,152	0,9661	-2,555	0,2061	-0,431	0,99997	-2,305	0,3387
C143 - C107	-0,09	1	-1,657	0,7727	0,069	1	-3,481	0,0148 *
C176 - C107	-2,248	0,3744	-1,616	0,7964	-2,273	0,35857	-2,243	0,378
C183 - C107	0,031	1	-1,732	0,7265	-2,231	0,38588	-2,283	0,3523
C187 - C107	-0,058	1	-2,651	0,1655	-1,689	0,75331	-4,495	<0.01 ***
Control - C107	3,071	0,0547	0,742	0,9982	1,561	0,82609	0,383	1
C118 - C113	-2,59	0,1904	-0,334	1	1,971	0,56349	1,142	0,9679
C122 - C113	-1,493	0,8592	-1,071	0,9783	1,761	0,70797	-0,926	0,9915
C143 - C113	-0,432	1	-0,174	1	2,261	0,36593	-2,102	0,4713
C176 - C113	-2,59	0,1909	-0,133	1	-0,081	1	-0,864	0,9947
C183 - C113	-0,311	1	-0,249	1	-0,039	1	-0,904	0,9928
C187 - C113	-0,399	1	-1,167	0,9632	0,502	0,9999	-3,116	0,0479 *
Control - C113	2,73	0,1378	2,225	0,3888	3,752	0,0054 **	1,762	0,7071
C122 - C118	1,096	0,9749	-0,737	0,9983	-0,21	1	-2,068	0,4961
C143 - C118	2,158	0,4339	0,161	1	0,29	1	-3,244	0,0318 *
C176 - C118	0	1	0,202	1	-2,053	0,50574	-2,006	0,5389
C183 - C118	2,279	0,355	0,086	1	-2,01	0,5359	-2,046	0,5112
C187 - C118	2,19	0,4126	-0,833	0,9959	-1,469	0,8699	-4,258	<0.01 ***
Control - C118	5,319	<0.001 ***	2,56	0,2029	1,781	0,69505	0,62	0,9995
C143 - C122	1,061	0,9795	0,898	0,9931	0,5	0,9999	-1,176	0,9616
C176 - C122	-1,096	0,9749	0,939	0,9908	-1,842	0,65396	0,062	1
C183 - C122	1,183	0,9602	0,822	0,9962	-1,8	0,68222	0,022	1
C187 - C122	1,094	0,9753	-0,096	1	-1,259	0,94294	-2,19	0,4123
Control - C122	4,223	<0.001 ***	3,297	0,0275 *	1,991	0,54952	2,689	0,1517
C176 - C143	-2,158	0,4338	0,041	1	-2,342	0,31652	1,238	0,9481
C183 - C143	0,121	1	-0,075	1	-2,3	0,34183	1,198	0,9571
C187 - C143	0,033	1	-0,994	0,9866	-1,759	0,70984	-1,014	0,9847
Control - C143	3,162	0,0426 *	2,399	0,2843	1,491	0,85993	3,864	<0.01 **
C183 - C176	2,279	0,3551	-0,116	1	0,042	1	-0,04	1
C187 - C176	2,19	0,4123	-1,035	0,9826	0,583	0,99969	-2,252	0,3713
Control - C176	5,319	<0.001 ***	2,358	0,308	3,833	0,00391 **	2,626	0,1755
C187 - C183	-0,089	1	-0,919	0,992	0,541	0,99982	-2,212	0,3976
Control - C183	3,04	0,0599	2,474	0,2444	3,791	0,00455 **	2,666	0,1596
Control - C187	3,129	0,0455 *	3,393	0,0198 *	3,25	0,03174 *	4,878	<0.01 ***

Signif. codes: ~ 0 ***
0,001 **
0,01 *
0,05 .
> 0.1

For evaluation of the method, OTA concentration was taken with log transformation.

APÊNDICE E

Análise estatística da inibição e/ou favorecimento de crescimento dos fungos produtores de OTA por extratos de erva-mate.

=====

ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) - Homepage <http://www.assistat.com>
 Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.14/05/2012

=====

EXPERIMENTO FATORIAL
 QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	3	1.08552	0.36184	6178.3366 **
Fator2(F2)	5	0.00204	0.00041	6.9802 **
Fator3(F3)	3	0.05927	0.01976	337.3653 **
Int. F1xF2	15	0.00263	0.00018	2.9966 **
Int. F1xF3	9	0.06075	0.00675	115.2525 **
Int. F2xF3	15	0.00437	0.00029	4.9696 **
Int.F1x2x3	45	0.01079	0.00024	4.0948 **
Tratamentos	95	1.22538	0.01290	220.2425 **
Resíduo	192	0.01124	0.00006	
Total	287	1.23662		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
3	192	3.8777	6178.336	<0.001
5	192	3.1069	6.9802	<0.001
15	192	2.1263	2.9966	<0.001
3	192	3.8777	337.3653	<0.001
9	192	2.4942	115.2525	<0.001
15	192	2.1263	4.9696	<0.001
45	192	1.6527	4.0948	<0.001
95	192	1.4794	220.2425	<0.001

Fator 1 = Fungos

Fator 2 = Extratos

Fator 3 = Concentrações

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

 1 0.88386 b
 2 1.00000 a
 3 0.87121 c
 4 1.00000 a

dms = 0.00330

Médias do fator 2

 1 0.94073 ab
 2 0.93524 c
 3 0.93636 bc
 4 0.94324 a
 5 0.93900 abc
 6 0.93806 bc

dms = 0.00450

Médias do fator 3

 1 0.92904 c
 2 0.93001 bc
 3 0.93251 b
 4 0.96352 a

dms = 0.00330

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

 B
 A -----
 B1 B2 B3 B4 B5

 A1 0.8882 bAB 0.8788 bC 0.8805 bBC 0.8939 bA 0.8803 bBC
 A2 1.0000 aA 1.0000 aA 1.0000 aA 1.0000 aA 1.0000 aA
 A3 0.8747 cA 0.8622 cB 0.8650 cB 0.8790 cA 0.8757 bA
 A4 1.0000 aA 1.0000 aA 1.0000 aA 1.0000 aA 1.0000 aA

Continuação
Fator 1 x Fator 2 (AxB)

B
A -----
B6

A1 0.8815 bBC
A2 1.0000 aA
A3 0.8707 cAB
A4 1.0000 aA

dms para colunas = 0.0081 dms para linhas = 0.0090
Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

Fator 1 x Fator 3 (AxC)

C
A -----
C1 C2 C3 C4

A1 0.8674 bBC 0.8615 bC 0.8704 bB 0.9361 bA
A2 1.0000 aA 1.0000 aA 1.0000 aA 1.0000 aA
A3 0.8487 cC 0.8585 bB 0.8596 cB 0.9180 cA
A4 1.0000 aA 1.0000 aA 1.0000 aA 1.0000 aA

dms para colunas = 0.0066 dms para linhas = 0.0066
Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

Fator 2 x Fator 3 (BxC)

C
B -----
C1 C2 C3 C4

B1 0.9291 aC 0.9379 aB 0.9306 aBC 0.9654 bA
B2 0.9279 aB 0.9296 abcB 0.9306 aB 0.9528 cA
B3 0.9261 aC 0.9286 bcBC 0.9356 aB 0.9552 cA
B4 0.9296 aB 0.9345 abB 0.9326 aB 0.9763 aA
B5 0.9316 aBC 0.9245 cC 0.9336 aB 0.9663 bA
B6 0.9300 aB 0.9251 cB 0.9321 aB 0.9651 bA

dms para colunas = 0.0090 dms para linhas = 0.0081
Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC					
A	B1C1	B1C2	B1C3	B1C4	B2C1
A1	0.8652 bDEF	0.8881 bD	0.8690 bDE	0.9306 bBC	0.8731 bDE
A2	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A3	0.8512 bFGH	0.8633 cFG	0.8533 bFGH	0.9309 bAB	0.8386 cH
A4	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA

Continuação

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC					
A	B2C2	B2C3	B2C4	B3C1	B3C2
A1	0.8631 bEF	0.8652 bDEF	0.9137 bC	0.8572 bEFG	0.8571 bEFG
A2	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A3	0.8553 bFGH	0.8573 bFGH	0.8976 bCD	0.8471 bFGH	0.8571 bFGH
A4	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA

Continuação

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC					
A	B3C3	B3C4	B4C1	B4C2	B4C3
A1	0.8731 bDE	0.9345 bBC	0.8711 bDE	0.8788 bDE	0.8652 bDEF
A2	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A3	0.8692 bEF	0.8865 cDE	0.8471 cFGH	0.8593 cFGH	0.8652 bEFG
A4	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA

Continuação

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC					
A	B4C4	B5C1	B5C2	B5C3	B5C4

A1	0.9606 bA	0.8612 bEFG	0.8388 cG	0.8750 bDE	0.9461 bAB
A2	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A3	0.9445 bA	0.8653 bEFG	0.8592 bFGH	0.8593 bFGH	0.9191 cBC
A4	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA

Continuação
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC				
A	B6C1	B6C2	B6C3	B6C4
A1	0.8768 bDE	0.8430 bFG	0.8751 bDE	0.9311 bBC
A2	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A3	0.8430 cGH	0.8572 bFGH	0.8533 cFGH	0.9294 bAB
A4	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA

dms para colunas = 0.0162 dms para linhas = 0.0230
Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

C				
AxB	C1	C2	C3	C4
A1B1	0.8652 bcdC	0.8881 bB	0.8690 bC	0.9306 cdA
A1B2	0.8731 bcB	0.8631 cdB	0.8652 bB	0.9137 deA
A1B3	0.8572 bcdeB	0.8571 cdeB	0.8731 bB	0.9345 cdA
A1B4	0.8711 bcB	0.8788 bcB	0.8652 bB	0.9606 bA
A1B5	0.8612 bcdeB	0.8388 eC	0.8750 bB	0.9461 bcA
A1B6	0.8768 bB	0.8430 deC	0.8751 bB	0.9311 cdA
A2B1	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A2B2	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A2B3	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A2B4	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A2B5	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A2B6	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A3B1	0.8512 cdeB	0.8633 cdB	0.8533 bB	0.9309 cdA
A3B2	0.8386 eC	0.8553 deB	0.8573 bB	0.8976 efA
A3B3	0.8471 deC	0.8571 cdeBC	0.8692 bB	0.8865 fA
A3B4	0.8471 deC	0.8593 cdeBC	0.8652 bB	0.9445 bcA
A3B5	0.8653 bcdB	0.8592 cdeB	0.8593 bB	0.9191 deA
A3B6	0.8430 deB	0.8572 cdeB	0.8533 bB	0.9294 cdA

A4B1	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A4B2	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A4B3	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A4B4	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A4B5	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA
A4B6	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA	1.0000 aA

dms para colunas = 0.0230 dms para linhas = 0.0162
Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

B				
AxC	-----			
	B1	B2	B3	B4

A1C1	0.8652 dB	0.8612 cdB	1.0000 aA	0.8512 defB
A1C2	0.8881 cB	0.8388 eD	1.0000 aA	0.8633 deC
A1C3	0.8690 cdBC	0.8750 cB	1.0000 aA	0.8533 defC
A1C4	0.9306 bBC	0.9461 bB	1.0000 aA	0.9309 aBC
A2C1	0.8731 cdB	0.8768 cB	1.0000 aA	0.8386 fC
A2C2	0.8631 dB	0.8430 deC	1.0000 aA	0.8553 defBC
A2C3	0.8652 dBC	0.8751 cB	1.0000 aA	0.8573 defBC
A2C4	0.9137 bBC	0.9311 bB	1.0000 aA	0.8976 bC
A3C1	0.8572 dB	1.0000 aA	1.0000 aA	0.8471 efB
A3C2	0.8571 dB	1.0000 aA	1.0000 aA	0.8571 defB
A3C3	0.8731 cdB	1.0000 aA	1.0000 aA	0.8692 cdB
A3C4	0.9345 bB	1.0000 aA	1.0000 aA	0.8865 bcC
A4C1	0.8711 cdB	1.0000 aA	1.0000 aA	0.8471 efC
A4C2	0.8788 cdB	1.0000 aA	1.0000 aA	0.8593 defC
A4C3	0.8652 dB	1.0000 aA	1.0000 aA	0.8652 cdeB
A4C4	0.9606 aB	1.0000 aA	1.0000 aA	0.9445 aB

Continuação

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

B		
AxC	-----	
	B5	B6

A1C1	0.8653 cB	1.0000 aA
A1C2	0.8592 cdC	1.0000 aA
A1C3	0.8593 cdBC	1.0000 aA
A1C4	0.9191 bC	1.0000 aA

A2C1	0.8430 dC	1.0000 aA
A2C2	0.8572 cdBC	1.0000 aA
A2C3	0.8533 cdC	1.0000 aA
A2C4	0.9294 bB	1.0000 aA
A3C1	1.0000 aA	1.0000 aA
A3C2	1.0000 aA	1.0000 aA
A3C3	1.0000 aA	1.0000 aA
A3C4	1.0000 aA	1.0000 aA
A4C1	1.0000 aA	1.0000 aA
A4C2	1.0000 aA	1.0000 aA
A4C3	1.0000 aA	1.0000 aA
A4C4	1.0000 aA	1.0000 aA

dms para colunas = 0.0217 dms para linhas = 0.0180
Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 0.93877

CV% = 0.82

Ponto médio = 0.91304