



ELISÂNGELA DE FÁTIMA REZENDE

**BIODIVERSIDADE, FUNGOS
OCRATOXIGÊNICOS E OCRATOXINA A EM
GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) DE
CULTIVO CONVENCIONAL E ORGÂNICO**

LAVRAS - MG

2010

ELISÂNGELA DE FÁTIMA REZENDE

**BIODIVERSIDADE, FUNGOS OCRATOXIGÊNICOS E OCRATOXINA
A EM GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) DE CULTIVO
CONVENCIONAL E ORGÂNICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luís Roberto Batista

LAVRAS – MG

2010

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

Rezende, Elisângela de Fátima.

Biodiversidade, fungos ocratoxigênicos e ocratoxina A em grãos de café (*Coffea arabica* L.) de cultivo convencional e orgânico / Elisângela de Fátima Rezende. – Lavras : UFLA, 2010.

117 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Luís Roberto Batista.

Bibliografia.

1. *Aspergillus*. 2. Micotoxinas. 3. Café arábica. 4. Fungos toxigênicos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.23

ELISÂNGELA DE FÁTIMA REZENDE

**BIODIVERSIDADE, FUNGOS OCRATOXIGÊNICOS E OCRATOXINA
A EM GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) DE CULTIVO
CONVENCIONAL E ORGÂNICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de novembro de 2010.

Dr. Guilherme Prado FUNED

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza EPAMIG

Dr. Leandro Carlos Paiva IFSMG

Dr. Luís Roberto Batista
Orientador

LAVRAS – MG

2010

Aos meus pais Antônio Carlos e Nair

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por todos os dons principalmente pelo da inteligência e sabedoria. E pela mãe de Deus e minha, Maria, por sua infinita intercessão.

Aos meus amados pais, Antônio Carlos e Nair, que sempre se sacrificaram e se dedicaram por minha educação e formação profissional, por todo amor e por caminharem sempre ao meu lado.

Aos meus irmãos Rogério e Rosemeire por torcerem por mim, por todo apoio e por serem meus verdadeiros amigos. As minhas tias Arlete e Margarida por toda oração, cuidado e amor.

Ao Rafael, por sempre estar do meu lado, nos momentos alegres e nos momentos difíceis. Por todas as demoradas conversas e muitas vezes conselhos.

Ao prof. Dr. Luís Roberto pela orientação, paciência, ensinamentos, confiança e incentivo.

Ao Dr. Guilherme Prado da Fundação Ezequiel Dias, por ser tão receptivo, atencioso, dedicado e responsável.

Ao Dr. Marcelo Cirilo por todo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Samuel da EPAMIG, pelo apoio.

Ao Edson do Pólo de Café da UFLA, por toda ajuda e prontidão.

Ao prof. Dr. Leandro de Machado por indicar o local de coleta das amostras.

As Cooperativas de Poço Fundo e Lavras e a EPAMIG, por cederem as amostras.

Aos colegas do Laboratório de Micologia e Micotoxinas do DCA, Ábiah, Camila, Fabiana Couto, Fabiana Renis, Gislaine, Mariana, Michel, Michelle, Mônica, Thaís, pelo tempo de convívio, conversas, risadas, confraternizações. Em especial a Daiani e Josiane que tanto auxiliaram com

muita dedicação o desenvolvimento desse trabalho. A vocês desejo muito sucesso!

Aos funcionários do departamento de Ciências dos Alimentos, por toda ajuda.

Ao padre Aníbal por toda direção espiritual.

Aos meus amigos, em especial Camila, Jamila e Renata por todos os momentos de descontração, conversas, orações obrigada pela amizade!

A Universidade Federal de Lavras e ao Departamento Ciências dos Alimentos pela oportunidade de realizar o curso.

Agradeço a FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pelo apoio financeiro ao projeto Biodiversidade de fungos ocratoxigênicos em grãos de café de cultivo convencional e orgânico por taxonomia polifásica (Projeto nº: CBB –APQ – 00781-08).

"Ontem foi embora.
Amanhã ainda não veio.
Temos somente hoje, comecemos."

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

Os frutos e grãos de café podem ser contaminados por fungos filamentosos produtores de ocratoxina A desde a lavoura até o armazenamento. A ocratoxina A é a micotoxina mais estudada em grãos e produtos derivados do café devido à sua toxicidade a seres humanos, e é produzida principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Este estudo teve como objetivo avaliar a incidência de ocratoxina A e fungos produtores desta micotoxina em grãos de café de cultivo convencional e orgânico e caracterizar as espécies de fungos toxigênicos que podem colocar em risco o café produzido no sul de Minas Gerais. Foram analisadas 30 amostras de grãos de café de cultivo convencional (20) e orgânico (10) do sul de Minas Gerais. O isolamento foi realizado pela Técnica de Plaqueamento Direto em meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). Os fungos isolados foram purificados e identificados com auxílio de manual de identificação. A produção de ocratoxina A por fungos foi determinada pelo método Plug Agar. Análise de ocratoxina A nos grãos de café, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Dessas amostras foram isolados 480 fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* Seções *Circumdati* e *Nigri*. As espécies ocratoxigênicas identificadas foram *Aspergillus auricoumus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. niger* e *A. niger* Agregado, destes a principal espécie produtora de ocratoxina A foi *A. ochraceus* em ambos os sistemas de cultivo. A ocratoxina A foi detectada em apenas uma amostra de café orgânico colhido por varrição, com concentração de 1,12 µg/Kg. Baseado nos resultados concluiu-se que a presença do fungo produtor de ocratoxina A não está relacionada com a presença da toxina no grão. Não teve diferenças quanto à incidência de *A. ochraceus* produtor de ocratoxina A e nem para a presença da toxina nos grãos de café entre os sistemas de cultivo convencional e orgânico.

Palavras-chave: *Aspergillus*. Micotoxinas. Café. Fungos toxigênicos.

ABSTRACT

The coffee fruits and beans can be contaminated by ochratoxigenic filamentous fungi from the field to storage. The mycotoxin ochratoxin A is the most studied in the coffee because of its toxicity to humans, and it is produced mainly by *Aspergillus* and *Penicillium*. This study aimed to evaluate the incidence of ochratoxin A and fungi producers of ochratoxin A in coffee beans from conventional and organic farming and to characterize the species of toxigenic fungi that could reduce the quality of the coffee produced in southern Minas Gerais. Thirty samples of coffee beans were analyzed from conventional (20) and organic (10) farming in southern Minas Gerais. The isolation was done by Direct Plating Technique in Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC). The isolates were purified and identified with the aid of the identification manual. The production of ochratoxin A by fungi was determined by the Plug Agar. Analysis of ochratoxin A in coffee beans by high performance liquid chromatography (HPLC). There were isolated from these samples 480 filamentous fungi of *Aspergillus* Sections *Nigri* and *Circumdati*. The ochratoxigenic species identified were *Aspergillus auricoumus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, and *A. niger* Aggregate, of the species producing ochratoxin A, *A. ochraceus* was the main species in both cropping systems. Ochratoxin A was detected in only one sample of organic coffee harvested by brush, with a concentration of 1.12 µg/kg. Based on the results could be said that the presence of fungi producing ochratoxin A is not related to the presence of the toxin in grain. There were not differences in the incidence of *A. ochraceus* producing ochratoxin A and in the presence of the toxin in the coffee beans between the systems of conventional and organic crops.

Keywords: *Aspergillus*. Mycotoxin. Coffee. Toxigenic fungi.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Produção de café safra 2010.....	21
Figura 2	Principais países importadores de café em 2009.....	27
Figura 3	Esquema da estrutura do fruto do café.....	30
Figura 4	Estrutura química da ocratoxina A.....	44
Figura 5	a) Fungo do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> em meio de cultura CYA; b) Estrutura microscópica do fungo do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i>	51
Figura 6	a) <i>Aspergillus ochraceus</i> em meio de cultura CYA; b) Estrutura microscópica de <i>Aspergillus ochraceus</i>	53

CAPÍTULO 2

Figura 1	Principais efeitos das médias dos fatores tipo de colheita e tipo de café para os fungos do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> (dados transformados pela raiz quadrada).....	75
Figura 2	Principais efeitos das médias dos fatores tipo de colheita e tipo de café para os fungos do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Circumdati</i> (dados transformados pela raiz quadrada).....	76
Figura 3	<i>Aspergillus</i> Seção <i>Circumdati</i> em meio CYA 25 °C. (a) <i>A. ochraceus</i> ; (b) <i>A. auricomus</i> ; (c) <i>A. sulphureus</i> ; (d) <i>A. ostianus</i>	79
Figura 4	<i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> em meio CYA 25 °C. (a) <i>A. niger</i> ; (b) <i>A. niger</i> Agregado; (c) <i>A. tubingensis</i> ; (d) <i>A. foetidus</i>	79
Figura 5	Mapa perceptual das associações entre fungos filamentosos e colheita do café de amostras da região de Poço Fundo.....	82

CAPÍTULO 3

Figura 1	Cromatograma da curva de calibração com o padrão de ocratoxina A	102
Figura 2	Cromatograma da confirmação da ocratoxina A na amostra	103

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Amostras de café estudadas. Lavras, 2010.....	70
Tabela 2	Porcentagem de fungos encontrados em grãos de café de cultivo convencional e orgânico após plaqueamento com e sem desinfecção superficial. Lavras, 2010	73
Tabela 3	Análise de variância para a contagem de fungos filamentosos do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> . Lavras, 2010	75
Tabela 4	Análise de variância para a contagem de fungos filamentosos do gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Circumdati</i> . Lavras, 2010	76
Tabela 5	Identificação de espécies e isolados potencialmente toxigênicos. Amostras da mesma região de Poço Fundo. Lavras, 2010.....	80

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Amostras de café estudadas. Lavras, 2010.....	97
Tabela 2	Teste de recuperação de ocratoxina A em grãos de café verde. Lavras, 2010.....	101
Tabela 3	Relação entre o nível de contaminação com ocratoxina A e fungos potencialmente ocratoxigênicos presentes em grãos de café de cultivo convencional e orgânico. Lavras, 2010.....	101
Tabela 4	Concentração de ocratoxina A em grãos de café de diferentes regiões. Lavras, 2010	96

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Fungos ocratoxigênicos e ocratoxina A em grãos de café de cultivo orgânico e convencional	15
1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Produção do café no Brasil	20
2.2	Consumo do café	23
2.3	Exportação brasileira do café	26
2.4	Processamento do café	28
2.5	Produção de café: sistema de cultivo convencional e orgânico	32
2.6	Micotoxinas	35
2.6.1	Micotoxinas em café	36
2.6.2	Riscos de ocratoxina A em sistema de cultivo orgânico e convencional	40
2.6.3	Ocratoxina A	42
2.6.4	Ocratoxina A e saúde humana	45
2.7	Fungos produtores de ocratoxina A em café	48
2.7.1	Gênero <i>Aspergillus</i> Seção <i>Nigri</i> e Seção <i>Circumdati</i>	50
	REFERÊNCIAS	54
	CAPÍTULO 2 Fungos ocratoxigênicos em grãos de café de cultivo orgânico e convencional	65
1	INTRODUÇÃO	68
2	MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1	Amostras	70
2.2	Isolamento dos fungos	70
2.3	Identificação de espécies dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> ...	71
2.4	Determinação da produção de ocratoxina A por fungos pelo método Plug Agar	71
2.5	Análise estatística	71
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS	86
	CAPÍTULO 3 Incidência de ocratoxina A em grãos de café de cultivo convencional e orgânico	90
1	INTRODUÇÃO	93
2	MATERIAL E MÉTODOS	96
2.1	Amostras	96
2.2	Isolamento dos fungos	96
2.3	Identificação	97

2.4	Determinação da produção de ocratoxina A por fungos pelo método Plug Agar	97
2.5	Análise de ocratoxina A em grãos de café	97
2.5.1	Padrão de ocratoxina A e elaboração da curva de calibração	97
2.5.2	Extração	98
2.5.3	Purificação em coluna de imunoafinidade	98
2.5.4	Eluição da ocratoxina A	99
2.5.5	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	99
2.5.6	Confirmação da ocratoxina A	100
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
4	CONCLUSÕES	111
	REFERÊNCIAS	112

CAPÍTULO 1 Fungos ocratoxigênicos e ocratoxina A em grãos de café de cultivo orgânico e convencional

RESUMO

O café é um importante produto agrícola para o Brasil, possibilita a geração de milhares de empregos e arrecadação de impostos importantes para a economia do país. O Brasil lidera a produção e exportação mundial de café e o estado de Minas Gerais é responsável pela metade da produção nacional. A bebida do café é uma das mais consumidas mundialmente. Dentre o perfil dos consumidores, existem aqueles que se preocupam com as questões ambientais, sociais e saúde, desse modo, cresce o número de consumidores interessados em produtos orgânicos. O café produzido sob o sistema orgânico não recebe agrotóxicos e adubos químicos de alta solubilidade, estes são substituídos por subprodutos da reciclagem da matéria orgânica vegetal e animal. Como qualquer outro produto agrícola, o café está sujeito à contaminação com fungos produtores de micotoxinas. As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos e podem ter efeitos tóxicos para a saúde dos seres humanos e animais. Para serem produzidas são dependentes de vários fatores, principalmente do clima, temperatura e umidade. A micotoxina mais estudada no café é a ocratoxina A, essa micotoxina pode ter efeito carcinogênico. Vários fungos podem produzir a ocratoxina A, por exemplo, espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Em países de clima tropical espécies ocratoxigênicas do gênero *Aspergillus* são mais comuns. Algumas publicações científicas afirmam que a espécie *A. carbonarius* é o maior produtor de ocratoxina A, e é comumente encontrado em uvas e derivados e em café robusta, pouca contaminação em café arábica. A espécie *A. ochraceus* é relatada em muitos estudos como a principal espécie contaminante dos frutos e grãos de café e é responsável pela produção de ocratoxina A neste produto.

Palavras-chave: Sistema de cultivo convencional. Sistema de cultivo orgânico. Fungos ocratoxigênicos. Ocratoxina A.

ABSTRACT

Coffee is an important agricultural product in Brazil, it makes the creation of thousands of jobs and the tax revenue important to the economy. Brazil leads the world production and exportation of coffee and the state of Minas Gerais is responsible for half of national production. The coffee drink is one of the most consumed worldwide. Among the consumers, there are those who worry about environmental issues, social and health, thus increasing the number of consumers interested in organic products. The coffee produced under the organic system do not receives pesticides and high solubility chemical fertilizers, they are replaced by-products of recycling organic vegetable and animal. Like any other agricultural product, coffee can be contaminated by mycotoxigenic fungi. Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi and can have toxic effects on the health of humans and animals. The mycotoxins production depends on many factors, mainly climate, temperature and humidity. The most studied mycotoxins in coffee is ochratoxin A, these mycotoxins may have a carcinogenic effect. Many fungi can produce ochratoxin A, for example, *Aspergillus* and *Penicillium* species. In tropical countries ochratoxigenic species of the *Aspergillus* genus are most common. Some scientific publications affirm that the species *A. carbonarius* is the major producer of ochratoxin A, and is commonly found in grapes and derivatives and robusta coffee, arabica coffee in little contamination. The species *A. ochraceus* is reported in many studies as the main species contaminating fruits and coffee beans and is responsible for production of ochratoxin A in this product.

Keywords: Cultivation system conventional coffee. Cultivation system organic coffee. Ochratoxigênic fungi. Ochratoxin A.

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícolas responsáveis pela geração de receita no Brasil, é um setor que emprega meio bilhão de pessoas. O país é o maior produtor e exportador de café, o estado brasileiro que mais produz é o estado de Minas Gerais, representando a metade da produção nacional em 2010. Em todo o mundo é crescente o consumo de café e os consumidores são cada vez mais exigentes, procurando produtos de boa qualidade que não ofereçam riscos para a saúde e para o meio ambiente. No cultivo de café convencional são utilizados insumos agrícolas como fungicidas, inseticidas, adubos químicos, entre outros, estes produtos podem poluir e contaminar o meio ambiente, quando não são aplicados de maneira correta, em alguns casos podem deixar resíduos químicos no produto agrícola. Os consumidores preferem alimentos isentos de produtos químicos, o café orgânico, que é produzido com embasamento ecológico – sem o uso de insumos químicos, é foco de interesse tanto de consumidores, quanto do mercado do café.

Como qualquer outro produto, o café está susceptível à contaminação com microrganismos, entre estes, os fungos filamentosos toxigênicos, que tem sido foco de atenção nos últimos anos. A ocratoxina A é um metabólito secundário tóxico que pode ocorrer em vários alimentos incluindo o café, porém a participação do café como fonte de ocratoxina A na dieta humana é insignificante quando comparada à de outros alimentos como os cereais, por exemplo. A ocratoxina A pode causar várias doenças em seres humanos sendo as mais relatadas referentes a alterações nos rins, pois ela possui efeito nefrotóxico, entre outros efeitos tóxicos ao organismo. As principais espécies produtoras de ocratoxina A nas condições climáticas e ambientais do Brasil pertencem ao gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e Seção *Nigri*, e a espécie *A. ochraceus* é a principal produtora de ocratoxina A no café. A produção da

micotoxina no café pode ocorrer desde o campo até o armazenamento. Para evitar a contaminação dos grãos com ocratoxina A são necessárias boas práticas agrícolas, visando o controle da temperatura e umidade dos frutos e grãos de café durante todo o processamento.

O Capítulo 1, o referencial teórico da dissertação, descreve uma revisão sobre o café, seu processamento, fungos produtores de ocratoxina A e ocratoxina A. O Capítulo 2 apresenta resultados da contaminação fúngica e das principais espécies ocratoxigênicas encontradas nos cafés de cultivo convencional e orgânico. O Capítulo 3 apresenta os níveis de contaminação com ocratoxina A nos grãos de café nos dois sistemas de cultivo, traçando assim, um perfil de qual sistema de cultivo é mais propenso à presença da micotoxina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção do café no Brasil

O café é um dos maiores geradores de riquezas do planeta (ESPADALÉ; LAMPURLANÉS; AUBERT, 2008). É responsável por um grande número de empregos em todos os setores da economia, dos setores de máquinas, equipamentos e insumos, passando pela produção no campo e pela indústria, até o setor de serviços, como logística e comércio. A cadeia emprega direta ou indiretamente meio bilhão de pessoas em todo o mundo, ou 8% da população mundial (PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009; SILVA et al., 2008). A cafeicultura para o Brasil possibilita a geração de empregos e arrecadações de impostos importantes para a economia nacional (PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009).

A maior oferta de café, por sua vez, é reflexo do maior uso de máquinas, equipamentos e adubos, ou seja, tem influenciado as ações dos setores que vendem insumos ao setor produtivo de café. Além de fornecer produtos às indústrias de torrefação proporciona, ainda, produtos para as indústrias de balas e doces, de produtos medicinais, cosméticos e de alimentos e bebidas em geral (SANTOS et al., 2009).

O Brasil lidera o ranking da produção mundial de café, respondendo por mais de um terço de toda a produção, seguido pelo Vietnã e Colômbia e, em conjunto, esses países respondem pela metade da produção mundial (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010; MONTEIRO et al., 2010). Brasil fechou 2009 com o beneficiamento de 39,47 milhões de sacas de 60 Kg. A safra 2008/2009 é de bialidade negativa, quando há redução na colheita. Comparando-se aos últimos dez anos, este é o melhor resultado alcançado entre os biênios de baixa, superando em 9,4% o de 2007

(CONAB, 2010). De acordo com a CONAB, para a safra 2009/2010, o Brasil produziu 47,2 milhões de sacas de café de 60 Kg. Foram produzidas 35,30 milhões de sacas de café arábica e 11,73 milhões de sacas de café robusta, o café robusta apresentou um crescimento de aproximadamente 7% quando comparado a safra anterior (CONAB, 2010).

Em 2009, o Brasil teve uma área de 2.092.909 hectares cultivada com as espécies arábica e conilon. O resultado mostra uma redução de 3,54% sobre a superfície de 2.169.795 hectares, existentes na safra 2008. O estado de Minas Gerais concentra a maior área, com um milhão de hectares em produção, predominando a espécie arábica com 98,3%. Espírito Santo é o segundo maior estado produtor, com 479.798 hectares, sendo 295.050 mil hectares com a espécie conilon e 184.748 hectares com a espécie arábica (CONAB, 2009).

Os principais estados produtores de café no Brasil estão representados na Figura 1 (CONAB, 2010).

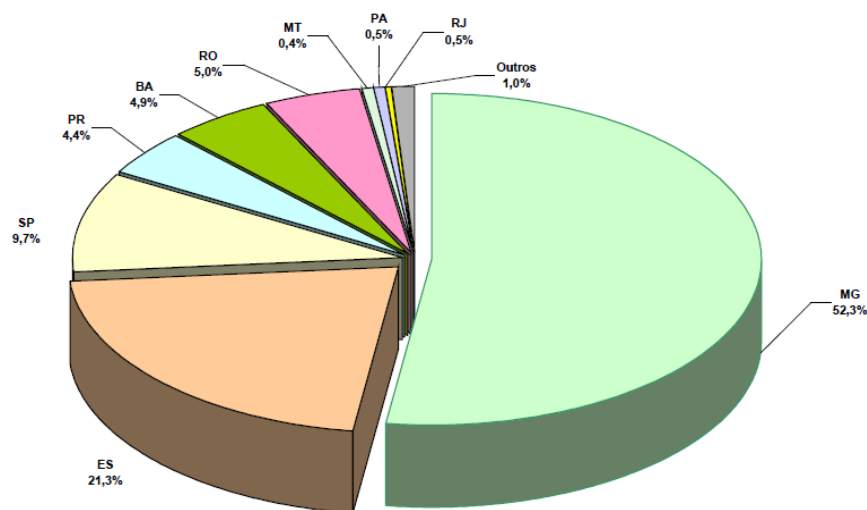


Figura 1 Produção de café safra 2010

Fonte CONAB (2010)

As principais regiões produtoras de Minas Gerais são Sul, Zona da Mata e Cerrado (Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba). O Cerrado Mineiro apresenta o maior crescimento da área plantada, região que incorpora conceitos técnicos modernos de adensamento e mecanização da colheita (SANTOS et al., 2009). De maneira geral, nas fases iniciais da safra 2008/2009, as condições climáticas no estado foram favoráveis para o bom desenvolvimento da cultura, com chuvas regulares e bem distribuídas ao longo do ciclo produtivo dos cafezais. Este fator foi fundamental para o resultado desta safra que, apesar de ser ano de bienalidade desfavorável, apresentou carga produtiva acima das expectativas. Durante as fases de maturação e colheita ocorreram precipitações pluviométricas de intensidade variável, que acabaram por dificultar os trabalhos de colheita e secagem do café, além de prejudicar a qualidade do café de varrição, resultando em maior volume de cafés de baixa qualidade (CONAB, 2009). A produção em Minas Gerais foi de 19.880 milhões de café, sinalizando uma redução de 15,7% em relação à safra 2008 (23.581 milhões) e 20,7% superior à safra 2007 (16.473 milhões), quando as principais regiões produtoras de Minas Gerais passaram por um longo período de estiagem (CONAB, 2009).

A economia cafeeira em Minas Gerais possui forte expressão social, dado o alto emprego de mão-de-obra de baixa qualificação. Considerando-se apenas as atividades relacionadas com a colheita, os gastos com mão de obra podem variar de 40 a 90% do custo total de produção, embora existam variações de acordo com o sistema de produção adotado (SANTOS et al., 2009).

Com o reflexo dos impactos causados pela agricultura convencional - degradação do meio ambiente, redução de mão-de-obra e de subsídios estatais - os alimentos orgânicos vêm ganhando espaço e conquistando um mercado exigente (MALTA et al., 2008). Cria oportunidades, principalmente para pequenos e médios produtores, incluindo comunidades de agricultores familiares (JUAN et al., 2008).

O café orgânico não aparenta ser um modismo, mas sim um novo produto que prenuncia permanência constante e crescente, ganhando mercado a passos largos (ARAÚJO; PAIVA; FILGUEIRA, 2007; NICOLELI; MOLLER, 2006). É o caso das tradicionais lojas de produtos naturais e feiras orgânicas. Entretanto, são os supermercados que ganham destaque, pela busca da variedade e qualidade dos alimentos, visto que estes estabelecimentos representam uma atuação maior no cotidiano dos consumidores (ARAÚJO; PAIVA; FILGUEIRA, 2007).

Os preços destes cafés no mercado nacional e internacional são mais atraentes para os produtores, como consequência de suas características de produção, qualidade e menor oferta (FREIRE; NEVES, 2004). O preço pago pelo café orgânico chega a ser duas vezes o praticado no mercado tradicional em virtude do crescimento da demanda e da pouca oferta, o café orgânico está bastante valorizado (OLIVEIRA et al., 2006).

2.2 Consumo do café

Mundialmente, o café é uma das bebidas mais consumidas (ABRAHÃO et al., 2008; ARRUDA et al., 2009), não só pelas suas características organolépticas, mas também pelo seu efeito estimulante (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). Do mesmo modo, o consumo interno brasileiro de café cresce com o passar dos anos, sendo o brasileiro o segundo maior consumidor de café do mundo, atrás apenas dos norte-americanos (COSTA; DOREA, 2005). No período compreendido entre novembro/2008 e outubro/2009, a ABIC registrou o consumo de 18,39 milhões de sacas, o que representou um acréscimo de 4,15% em relação ao período anterior correspondente (novembro/07 a outubro/08), que havia sido de 17,65 milhões de sacas. Para 2010, a ABIC

projeta um crescimento de 5,0% em volume, o que elevaria o consumo para 19,31 milhões de sacas.

Arruda et al. (2009) realizaram uma pesquisa sobre o consumo do café no Brasil e observaram que 83,3% dos entrevistados são consumidores, ou seja, a porcentagem de pessoas que consome café é significativamente superior à que não consome. É crescente o consumo diário do café, sendo este um produto tradicionalmente presente no café da manhã e lanche da tarde, refletindo os hábitos culturais do brasileiro. O ambiente doméstico é o principal local de consumo de café, seguido de lanchonetes e ambientes de trabalho. As cafeterias são o lugar onde menos se consome café, demonstrando que, apesar do significativo crescimento do setor nos últimos anos e o aperfeiçoamento em serviços e produtos de qualidade, este segmento atinge um perfil específico de consumidores, geralmente apreciadores de café de qualidade superior, dispostos a pagar mais pelo produto, pois valorizam o espaço físico do estabelecimento e os serviços de funcionários especializados em servir café.

Em geral, os consumidores associaram o consumo do café ao hábito, prazer, família, amizade e trabalho. Isso indica que as motivações para o seu consumo refletem o significado social da bebida quer no âmbito doméstico, trabalho ou no círculo de amizade e que este significado está fortemente associado aos hábitos e costumes da sociedade brasileira. O consumo do café transpassa o campo da satisfação das necessidades fisiológicas e envolve também as necessidades psicológicas, como relacionamento, satisfação pessoal e profissional (ARRUDA et al., 2009).

O consumo diário do café pode trazer diversos benefícios para a saúde. O café não é remédio, mas é considerado como uma planta funcional (previne doenças mantendo a saúde) ou mesmo nutracêutica (nutricional e farmacêutico). Isso porque o café não possui apenas cafeína, mas também potássio, zinco, ferro, magnésio e diversos outros minerais, embora em pequenas quantidades

(COSTA; DOREA, 2005). O grão do café também possui aminoácidos, proteínas, lipídeos, além de açúcares e polissacarídeos, mas principalmente possui uma significativa quantidade de polifenóis antioxidantes, chamados ácidos clorogênicos (ABRAHÃO et al., 2008).

A torração é uma etapa essencial para a produção de compostos que conferem as características de aroma e sabor ao café, entre os quais destacam-se algumas substâncias biologicamente ativas, ou seja, que exercem benefícios à saúde humana, como o ácido clorogênico, a trigonelina e a cafeína (LICCIARDI et al., 2005). Entre as atividades biológicas apresentadas por esses compostos citam-se a inibição da biossíntese dos leucotrienos e os efeitos anticarcinogênico, trófico – sobre a microflora intestinal, estimulante do sistema nervoso central e antidepressivo (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). A cafeína atua no organismo humano principalmente como estimulante do sistema nervoso central e diurético, além disso, aumenta a taxa metabólica, relaxa a musculatura lisa dos brônquios, do trato biliar, do trato gastrointestinal e de partes do sistema vascular (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). A ingestão de cafeína em excesso pode causar vários sintomas desagradáveis, inclusive a irritabilidade, dores de cabeça, insônia, diarreia e taquicardia (BRENELLI, 2003).

O mercado de café orgânico é predominantemente constituído por consumidores conscientes das questões ligadas à saúde, que buscam uma melhor qualidade de vida, prevenindo contra certos tipos de doenças causadas pelo excesso de agrotóxicos no organismo e procuram encontrar alimentos de alta qualidade e com gosto autêntico, sentir o sabor e frescor. Este mercado vem ganhando força pela adesão de um público ligado às questões ambientais (não utilização de agrotóxicos e busca de equilíbrio solo/planta) e sociais (respeito e valorização do trabalhador rural), é o chamado comércio ético, cuja imagem

vem sendo sustentável, agroecológica e/ou orgânica, e o consumidor está disposto a pagar mais por isso (MALTA et al., 2008).

2.3 Exportação brasileira do café

A exportação brasileira do café começou a crescer a partir de 1816 (MARTINS, 2008). Nos anos de 1987 até 2000, aproximadamente 25% da produção mundial de cerca de 100 milhões de sacas de café de 60 Kg ao ano eram provenientes do Brasil. Em 1997, esse produto gerou mais de três bilhões de dólares em receitas cambiais para o país. Embora o café tenha, ao longo do tempo, diminuído sua participação nas exportações brasileiras - devido à diversificação de produtos exportados - constitui-se, ainda hoje, um expressivo gerador de divisas. Exemplo disso é que o café, em 2008, representou cerca de 2,37% da pauta de exportação brasileira. Hoje, o Brasil é, ainda, o principal exportador do produto, com uma exportação média, nos últimos três anos de 28,3 milhões de sacas de 60 Kg (CONAB, 2009). Apesar da produção de café em 2009 ter sido menor que no ano de 2008; devido à bienalidade, chuvas irregulares e temperaturas elevadas, menor investimento por causa do alto custo dos insumos (CONAB, 2009), as exportações brasileiras de café em 2009 foram as melhores dos últimos quatro anos. Em 2009, o Brasil exportou 30.309 milhões sacas de café de 60 Kg, um aumento de 3% em relação ao ano de 2008 (CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL - CECAFÉ, 2010).

Quanto à receita, o país alcançou US\$ 4,27 bilhões, queda de 10% em comparação a 2008 (CECAFÉ, 2010). Mesmo considerando a baixa receita de 2009 se comparado com 2008, aumento do volume de café exportado em 2009 garantiu a excelente participação do Brasil com quase um terço do mercado mundial (CECAFÉ, 2010). Em relação à receita, embora os preços tenham sido

impactados pela crise financeira internacional, a média de preço da saca em 2008 foi de US\$ 160,96, em 2009 girou em torno de US\$ 140,77, no mês de dezembro de 2009 o preço médio da saca do café ficou em US\$ 153,91, valor que se aproxima do preço pré-crise (CECAFÉ, 2010).

Atualmente os principais países importadores do produto são Alemanha com 6.074% das importações, EUA (5.896%), Itália (2.509%), Japão (2.159%), Bélgica (2.134%), Espanha (882%), Suécia (721%), França (693%), Eslovênia (656%) e Argentina (625%). Em relação ao ano de 2008, o Brasil aumentou a exportação de café em 2009 para Alemanha e EUA (Figura 2) (CECAFÉ, 2010). O Brasil é o maior exportador mundial (46%), seguido pela Colômbia (13%), Guatemala (6%), Peru (5%) e Honduras (5%). Destes países, todos tiveram uma redução da exportação do café comparado com o ano de 2008, com exceção do Brasil que obteve um aumento de 3% (CECAFÉ, 2010).

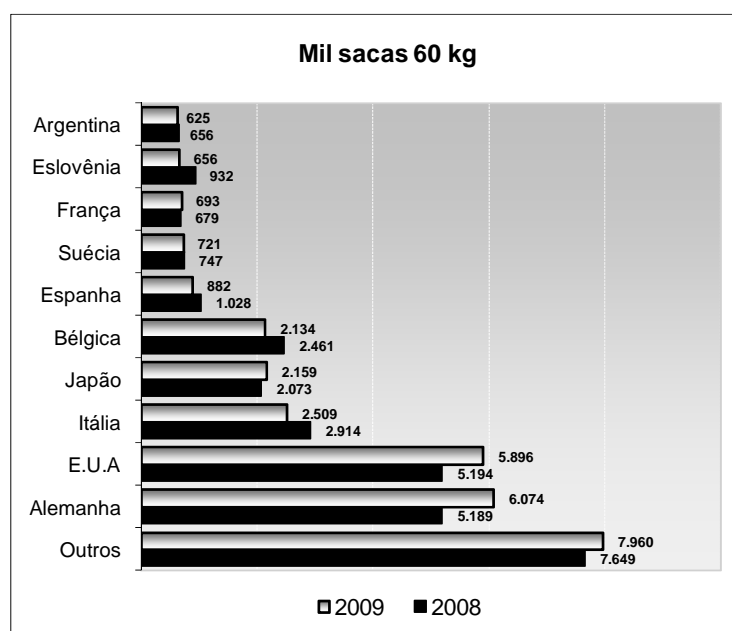


Figura 2 Principais países importadores de café em 2009

Mesmo com o aumento no consumo interno dos produtos orgânicos, a comercialização de café orgânico é direcionada principalmente para a exportação (OLIVEIRA et al., 2006). O mercado consumidor se fortalece em todo o mundo, principalmente nos países desenvolvidos (NICOLELI; MOLLER, 2006). Os maiores mercados estão situados na Europa e nos Estados Unidos, que representam mais de 90% das receitas auferidas nesse setor (ARAÚJO; PAIVA; FILGUEIRA, 2007; CHAGAS; POZZA; GUIMARÃES, 2002; OLIVEIRA et al., 2006). Outro mercado importantíssimo para a exportação de café orgânico é o japonês. O Japão geralmente está muito interessado no café brasileiro e pagam preços bem melhores que o do mercado interno e que outros mercados como o europeu e o americano, pois os produtos orgânicos têm um valor muito importante na cultura japonesa (OLIVEIRA et al., 2006).

O mercado internacional de café orgânico é dominado pelo México que comercializa mais de 30 mil toneladas ao ano e é o maior produtor. Peru (onde 30% da produção de café são orgânicos), Bolívia, Colômbia, Nicarágua, Guatemala, Costa Rica, El Salvador, Brasil e Colômbia são os principais produtores de café orgânico (FREIRE; NEVES, 2004). Os maiores consumidores são Estados Unidos, Alemanha, Países Baixos, Suíça, França, Áustria e Japão (AZEVEDO et al., 2002). As primeiras exportações de café orgânico em grão cru no país ocorreram em 1992, com um embarque inicial de 150 sacas de 60 Kg. Nos últimos nove anos, além do aumento no volume das exportações, as vendas externas são em maior valor agregado (OLIVEIRA et al., 2006).

2.4 Processamento do café

O processamento nos sistemas de cultivo convencional e orgânico baseia-se em colheita, lavagem, separação, secagem, armazenamento e

ensacamento. Os frutos do café provenientes da lavoura podem estar nos estádios verde, maduro ou “cereja”, supermaduros ou “passa” ou secos. Dessa forma, a colheita seletiva é desejável para produção de cafés com qualidade superior. Essa mistura de diferentes tipos de frutos ocorre devido à desuniformidade de maturação, provocada pelas várias floradas ocorridas em diferentes épocas no mesmo ano (CHAGAS; POZZA; GUIMARÃES, 2002). Colheita por derriça, quando realizada precocemente, produzirá cafés com grande porcentagem de frutos verdes, enquanto colheitas tardias, maior porcentagem de frutos secos. A colheita sobre o pano, preferida em relação à colheita no chão, evita o contato dos frutos com o solo e a mistura de frutos recém-colhidos com frutos de varrição, na maioria já em fase de deterioração (BORÉM, 2008; CHAGAS; POZZA; GUIMARÃES, 2002). Após a colheita, o café deve ser transportado para o local de processamento o mais rápido possível, evitando que fique amontoado na área de produção, isso para evitar fermentações indesejáveis, diminuindo os riscos de perda da qualidade e ocorrência de fungos e micotoxinas (BORÉM, 2008).

O café deve ser submetido ao processo de limpeza e separação das impurezas, que pode ser feito por peneiramento manual (abanação), ventilação forçada ou por separadores de ar e peneira (máquinas de pré-limpeza) (FREIRE; NEVES, 2004).

Na lavagem ou separação hidráulica por diferença de densidade, proporciona a separação dos frutos do café em dois lotes, a porção que submerge é formada por frutos cereja, verde e verde-cana, frutos mais densos, e o outro formado por frutos menos densos, representados por café-passa, mal granados ou leitosos, conhecidos como café bóia. As duas parcelas resultantes da separação hidráulica (cerejas e bóias) devem ser secas e armazenadas separadamente (BORÉM, 2008; FREIRE; NEVES, 2004).

O café pode ser processado por via seca ou por via úmida (MORAES; LUCHESE, 2003), a secagem pode ser em terreiro ou secadores artificiais. Na via seca, os frutos são processados na sua forma integral, ou seja, com o exocarpo, produzindo frutos secos, conhecidos como café em coco ou café natural. A secagem é mais lenta pela presença do exocarpo (Figura 3), e o elevado teor de açúcares da mucilagem que aumentam os riscos de ocorrerem fermentações que podem prejudicar a qualidade do café (BORÉM, 2008; CHAGAS; POZZA; GUIMARÃES, 2002; FREIRE; NEVES, 2004).

O preparo via úmida dá origem aos cafés descascados, despulpados ou desmucilados através do processo de fermentação rápida ou desmucilagem (MORAES; LUCHESE, 2003; VILELA et al., 2010). Removendo-se o exocarpo mecanicamente e o mesocarpo por meio de fermentação biológica, resulta em café despulpado, este método é tradicionalmente utilizado na via úmida em todo o mundo. Retirando mecanicamente o exocarpo e a parte do mesocarpo (Figura 3), resulta em café descascado, método comum no Brasil. Quando se remove o exocarpo e mesocarpo, origina o café desmucilado (BORÉM, 2008).

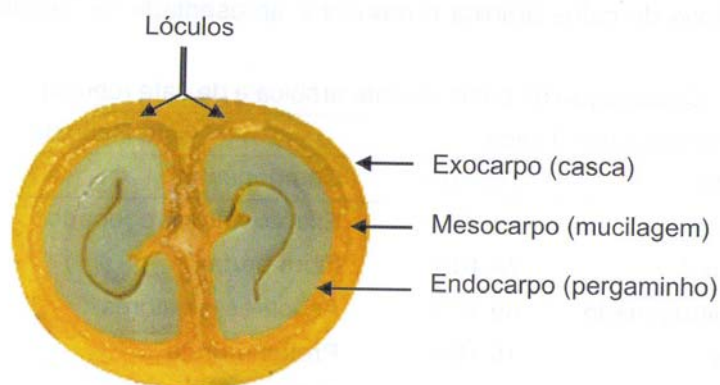


Figura 3 Esquema da estrutura do fruto do café

Fonte Borém (2008)

O processamento via úmida é indicado para áreas onde o período pós-colheita ocorre sob condições de elevada umidade relativa do ar, reduz os riscos de desenvolvimento de microrganismos associados aos frutos, responsáveis por fermentações indesejáveis, além disso, diminui consideravelmente a área de terreiro e o tempo necessário para secagem e reduzir riscos de contaminação dos grãos com fungos toxigênicos. (MORAES; LUCHESE, 2003; VARGA; SAMSON, 2008; VILELA et al., 2010). O método por via úmida é o melhor para prevenir contaminação com ocratoxina A (SUAUREZ-QUIROZ et al., 2005). Por via seca e via úmida os grãos de café, após a abanação, lavagem e separação das frações (cereja, verde e bóia) são encaminhados para a secagem em terreiro ou para secadores artificiais (CHAGAS; POZZA; GUIMARÃES, 2002; FREIRE; NEVES, 2004).

A secagem do café é comparativamente mais difícil de ser executada do que a de outros produtos. Além do elevado teor de açúcares presentes na mucilagem, os frutos normalmente apresentam teores iniciais relativamente altos de umidade (CHALFOUN; PARIZZI, 2008). A secagem pode ser feita em terreiros ou utilizando-se secadores mecânicos. O terreiro de secagem deve ser de construção adequada, recomendando-se o terreiro pavimentado por permitir maior facilidade de operação e limpeza. Inicialmente, o café é esparramado em camadas finas, aumentando-se a espessura gradativamente, à medida que acontece a secagem. Durante a secagem os frutos devem ser protegidos da chuva e do sereno. Os frutos devem ser revolvidos por, no mínimo, 10 vezes ao dia, para acelerar a secagem e evitar o aparecimento de grãos mofados e fermentados (BORÉM et al., 2008; FREIRE; NEVES, 2004). O café colhido não deve, de modo algum, secar diretamente sobre o solo. Esporos de fungos oriundos de outros lotes podem permanecer no solo e contaminar posteriormente todos os demais lotes (BATISTA et al., 2003; CHALFOUN; PARIZZI, 2008). O terreiro para a secagem do café deve ter a superfície lisa e deve ser mantido em boas

condições de higiene. No final da secagem o café deverá apresentar entre 11-12% de umidade, sendo que o tempo total de permanência no terreiro varia entre 10 e 20 dias, dependendo da região e das condições climáticas (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008).

O beneficiamento transforma, pela eliminação das cascas e separação dos grãos, o fruto seco (coco ou pergaminho) em grãos de café que passa a ser a denominação de café beneficiado ou café verde. A operação de beneficiamento deve ser realizada o mais próximo possível da época de comercialização, para que o produto possa manter suas características originais. Para estocar o café em coco ou pergaminho, após a secagem e antes do beneficiamento, são utilizadas tulhas e para o café beneficiado são utilizadas sacas de aniagem. Um fator que precisa ser monitorado durante o armazenamento é a atividade de água (aw) que consiste na água presente no interior dos grãos. Condições inadequadas de armazenamento poderão conferir sabores indesejáveis à bebida (de madeira, mofo, etc). É fundamental conservar o café com 11 a 12% de umidade, já que é bastante higroscópico, podendo absorver umidade do ar se mantido em ambiente inapropriado. Também é recomendável que os armazéns tenham baixa luminosidade, para que o café (principalmente o beneficiado) não perca cor pela exposição excessiva à luz (FREIRE; NEVES, 2004; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008).

2.5 Produção de café: sistema de cultivo convencional e orgânico

A diferença entre a produção de café de cultivo convencional e orgânico baseia-se principalmente nos insumos utilizados durante o cultivo do café. Após a segunda guerra mundial, com as principais economias mundiais destruídas e com a necessidade de reconstrução, o modo de produção mundial baseou-se na produção em massa visando padronizar e agilizar este processo de reconstrução.

Com este objetivo, a população mundial teve seu modo de viver afetado diretamente, pois visavam muito a produção e acabaram deixando a qualidade de vida e do produto em segundo plano. Este modelo de produção se adequou muito bem ao desenvolvimento das indústrias. No entanto, tal padrão não é mais unanimidade, o aumento da produtividade em detrimento da qualidade de vida e do produto vem sendo muito questionado atualmente principalmente nos países mais desenvolvidos (OLIVEIRA et al., 2006). O uso indiscriminado de fertilizantes quintuplicou, o que é hoje uma das maiores preocupações nas diversas partes do mundo (ARAÚJO; PAIVA; FILGUEIRA, 2007). A cultura do café vendido como *commodity* é a terceira no país a receber maiores quantidades de insumos, perdendo apenas para o milho e para a soja (OLIVEIRA et al., 2006). O uso de pesticidas ainda é a principal estratégia para o combate e prevenção de pragas agrícolas, buscando maior produtividade com menores custos. Os pesticidas são potencialmente tóxicos ao homem, mas devido à sua importância econômica, o seu uso é muito difundido e os resíduos de pesticidas são encontrados nos alimentos, água e meio ambiente quando não são devidamente aplicados na quantidade e data correta (CALDAS; SOUZA, 2000).

Os problemas ambientais causados pela agricultura estão em evidência. O fato de apenas produzir e ter lucro, sem observar os efeitos dos insumos modernos utilizados na cafeicultura sobre o ambiente, é fortemente questionado sob o aspecto de sustentabilidade (LIMA et al., 2002). São imprescindíveis as práticas de conservação do solo, manejo ecológico de pragas, de doenças e de plantas invasoras e a destinação correta dos efluentes, resultado do despulpamento do café. Hoje, mais do que nunca, torna-se necessária a recuperação e a preservação da biodiversidade e da água, pois verifica-se, cada vez mais, a escassez desses recursos ao longo dos anos (LIMA et al., 2002).

O café orgânico é produzido sem a utilização de agrotóxicos e adubos químicos de alta solubilidade que são substituídos por subprodutos da

reciclagem da matéria orgânica vegetal e animal, dejetos de animais, biofertilizantes, polpa e casca de café, compostos, húmus de minhoca, etc. Na realidade, a agricultura orgânica enfatiza a prevenção de possíveis pragas à determinada cultura, adaptando suas práticas à realidade de cada região produtora (GRAZIANO et al., 2009).

A agricultura orgânica aplica os conhecimentos da ecologia no manejo da unidade de produção, baseada numa visão holística da unidade de produção. Isto significa que o todo é mais do que os diferentes elementos que o compõem. Na agricultura orgânica, a unidade de produção é tratada como um organismo integrado com a flora e a fauna. Portanto, é muito mais do que uma troca de insumos químicos por insumos orgânicos/ biológicos/ ecológicos. Assim, o manejo orgânico privilegia o uso eficiente dos recursos naturais não renováveis, aliado ao melhor aproveitamento dos recursos naturais renováveis e dos processos biológicos, a manutenção da biodiversidade, a preservação ambiental ao desenvolvimento econômico, bem como, a qualidade de vida humana (FREIRE; NEVES, 2004). A agricultura orgânica deve ser, também, ecologicamente sustentável, economicamente viável, socialmente justa e culturalmente aceitável (ALVARENGA; MARTINS; PAULA, 2002; CHAGAS; POZZA; GUIMARÃES, 2002). Uma das desvantagens do sistema de cultivo de café orgânico seria a menor produção de grãos por safra quando comparados com o sistema de cultivo convencional.

O mercado de orgânicos está em rápida expansão, sobretudo na Europa, e cada produto leva na sua embalagem o carimbo de certificação. Este serve como instrumento de garantia ao comprador de que está consumindo o resultado de um rigoroso sistema de produção, de processos ecológicos que não agredem ao meio ambiente, onde existe a conservação e recuperação da diversidade ambiental. Isto sem mencionar o respeito total às regulamentações trabalhistas,

indispensáveis à certificação orgânica. É um modo de oferecer a transparência exigida pelos consumidores (GRAZIANO et al., 2009; WACHSNER, 2005).

O Sul de Minas Gerais é um dos mais importantes pólos da atividade no país, onde existem cooperativas e armazéns para café orgânico com etapas de beneficiamento e rebeneficiamento (OLIVEIRA et al., 2006). Com café classificado em “peneiras de 16 acima”, as sacas de café orgânico conseguem uma adição de até US\$ 30,00, se comparado ao preço de mercado do café orgânico que não passa por rigoroso processo de seleção. Já os grãos classificados em “peneiras de 16 abaixo”, serão destinados à indústria de torrefação e moagem (OLIVEIRA et al., 2006).

O processo de produção de café orgânico, em sua maioria, origina-se de lavouras de café convencional, as quais passam por um processo de conversão do sistema convencional ao orgânico. Para ser considerado café orgânico, a lavoura deve estar sem uso de defensivos e adubos químicos durante pelo menos três anos (NICOLELI; MOLLER, 2006; OLIVEIRA et al., 2006). Os tratamentos de manejo orgânico apresentam produtividade similar à da testemunha convencional, devido à existência de reservas de nutrientes no solo (THEODORO; GUIMARÃES; GUIMARÃES, 2009).

2.6 Micotoxinas

As micotoxinas produzidas por fungos toxigênicos em produtos agrícolas e processados possuem grande potencial de risco à saúde dos consumidores (PATERSON; LIMA, 2010). As micotoxinas para serem produzidas, são dependentes do clima, da susceptibilidade da planta, fatores ambientais (como temperatura, danos causados por insetos, ataque de pragas, contaminação com fungos), composição química dos grãos, cultivo e manejo do

produto, nutrientes, genética dos microrganismos, de falhas no armazenamento, entre outros (PATERSON; LIMA, 2010).

2.6.1 Micotoxinas em café

Os países em desenvolvimento são os que mais produzem alimentos e sofrem mais com a contaminação dos alimentos com micotoxinas, pois a grande maioria está em áreas favoráveis ao desenvolvimento desses metabólitos, regiões de clima tropical com alta umidade e temperatura e muitas vezes não possuem recursos para a detecção, controle e redução dos alimentos contaminados (PATERSON; LIMA, 2010; SHERIF; SALAMA; ABDEL, 2009; TURNER; SUBRAHMANYAM, 2009).

Os alimentos de modo geral, assim como os frutos e grão de café, possuem os nutrientes essenciais para o desenvolvimento de fungos, e são naturalmente contaminados por micotoxinas (GARCIA et al., 2009; PALACIOS-CABRERA et al., 2004). O desenvolvimento de infecções microbianas nos grãos de café pode comprometer tanto o seu aspecto visual quanto o gosto e o aroma (PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009; PRADO et al., 2008). Além da depreciação qualitativa, os fungos associados aos grãos de café podem produzir micotoxinas (BATISTA et al., 2003). Assim, os alimentos estão sujeitos à invasão por fungos e contaminação com micotoxinas no campo, durante e após a colheita, no processamento, no transporte e na estocagem, quando não são empregadas técnicas adequadas de processamento (DUARTE; PENA; LINO, 2010; NOONIM et al., 2008a; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008). Atualmente existe uma preocupação séria por parte dos grandes países importadores quanto ao controle da contaminação por fungos toxigênicos e conseqüentemente quanto à presença de micotoxinas (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2003).

Os fungos produtores de ocratoxina A podem permanecer durante ou após o processamento, resultando em perigo potencial. Por outro lado, verificou-se que, quando removida a mesocarpo, um importante substrato para o desenvolvimento de fungos, os fungos ocratoxigênicos também foram eliminados (SUAREZ-QUIROZ et al., 2005). A colonização interna pelos fungos pode ser explicada por danos causados por insetos, ácaros ou condições climáticas adversas. Outra explicação é a ocorrência da ruptura de estruturas da parede celular por alterações nas pectinas, celuloses, hemiceluloses e ligninas nos frutos. Estes compostos conferem uma estrutura mais rígida aos frutos do café, e a degradação natural torna os frutos mais susceptíveis à ocorrência fúngica (BATISTA; CHALFOUN, 2007).

Devido ao contato com o solo, que é uma fonte natural de fungos toxigênicos, incluindo produtores de ocratoxina A, os níveis de contaminação com esta micotoxina em grãos de café são geralmente maiores nas frações varrição e bóia e secas em terreiro de terra (BATISTA et al., 2003; SILVA et al., 2008). O terreiro de terra aumenta o risco de contaminação com ocratoxina A em grãos de café (BATISTA et al., 2003). A fração varrição devido aos riscos de exposição à ocratoxina A deve ser reduzida através da adoção de boas práticas agrícolas e não ser utilizada para fins de consumo humano e animal (BATISTA; CHALFOUN, 2007; BATISTA et al., 2009; JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES - JECFA, 2001; SILVA et al., 2008). Com relação aos pontos de coleta ao longo de toda a cadeia produtiva, a secagem no terreiro e o armazenamento na tulha são os principais pontos críticos de controle (SILVA et al., 2008).

O exocarpo (casca) dos grãos de café é o principal substrato para o desenvolvimento de fungos ocratoxigênicos e uma fonte importante de ocratoxina A, assim, a limpeza, via úmida, e métodos de padronização são eficazes na redução de níveis de ocratoxina A, retirando o

exocarpo, uma série de microrganismos produtores de ocratoxina A são eliminados e acelera a secagem, diminuindo o risco de desenvolvimento de fungos neste estágio e produção da toxina (BATISTA et al., 2009; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; SUAREZ-QUIROZ et al., 2005).

Deve-se levar em conta também as instalações e condições de armazenamento das tulhas, onde se observam grande acúmulo de poeira proveniente do processo de beneficiamento. Isso pode acarretar a disseminação de fungos ocratoxigênicos de uma safra para outra ou agravar as contaminações já ocorridas, dependendo do tempo de armazenamento (SILVA et al., 2008). Além do risco de produzir ocratoxina A, fungos que crescem em grãos estocados, podem reduzir a taxa de germinação ao longo do tempo com perda de carboidratos, proteínas e óleo total, e induz o aumento de umidade e quantidade de ácidos graxos livres, e outras mudanças químicas (DUARTE; PENA; LINO, 2010).

Nos últimos 10 anos muitas investigações relativas à ocratoxina A em café e seus produtos têm sido conduzidas (PRADO et al., 2008). Investigação sobre ocorrência de ocratoxina A em café verde, torrado e solúvel produzido no Brasil é rigorosamente avaliada por muitos autores (BATISTA et al., 2009; FERRAZ et al., 2010; PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; SILVA et al., 2008).

Os níveis de contaminação variam significativamente, de 0,12 µg/Kg – 109 µg/Kg (ALMEIDA et al., 2007; BATISTA et al., 2003; GOLLÜCKE; TANIWAKI; TAVARES, 2004; LEONI et al., 2001; PRADO et al., 2008; TANIWAKI et al., 2003). A Comunidade Européia estabeleceu limite de 5 ng/g para grãos de café torrado e moído e 10 ng/g para café solúvel (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES - CEC, 2006; JECFA, 2001). No Brasil a agência nacional de vigilância sanitária estabeleceu na consulta pública nº 100 o limite máximo tolerado de ocratoxina A em grãos de café torrado e café

solúvel uma concentração de 10 ng/g (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2009). Para grãos de café verde ainda não foi definido um limite máximo de ocratoxina A (PRADO et al., 2008). Estes limites têm por finalidade assegurar a integridade da saúde aos efeitos tóxicos causados pela ocratoxina A (BATISTA et al., 2003), já que o café pode ser um risco de exposição humana a micotoxina (ILIC et al., 2007; PARDO et al., 2004).

Durante o processamento industrial, a torra do grão de café pode reduzir grande parte da toxina concentrada, entretanto não é possível eliminá-la (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007; FERRAZ et al., 2010), altas temperaturas são necessárias para uma redução nas concentrações de micotoxinas (BOKHARI, 2007; BULLERMAN; BIANCHINI, 2007; FERRAZ et al., 2010; VARGA; SAMSON, 2008), a ocratoxina A é estável a maioria dos processamentos (FERRAZ et al., 2010). A torrefação do café pode reduzir de 13 a 93% a concentração de ocratoxina A (BOKHARI, 2007; FERRAZ et al., 2010; PÉREZ; GONZÁLEZ; LÓPEZ, 2005), essa variação na redução da ocratoxina A deve-se às diferentes formas de inoculação da toxina, metodologia analítica utilizada e a forma como a toxina é eliminada.

A presença de um fungo produtor de toxina não implica que a toxina associada também esteja presente, já que muitos fatores então envolvidos em sua formação. Do mesmo modo, a ausência do fungo não garante que o produto esteja livre da toxina, o fungo pode ter sido exterminado, mas a toxina fica intacta (TURNER; SUBRAHMANYAM, 2009).

Estudos mostram que a presença de ocratoxina A no café é resultado de falhas na colheita, no processamento, precárias condições de secagem e armazenamento inadequado, o que permite a proliferação de fungos toxigênicos (ESPADALÉ; LAMPURLANÉS; AUBERT, 2008; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; ZINEDINE; MAÑES, 2009). Melhoria das práticas agrícolas

e melhor armazenamento e transporte têm reduzido o crescimento de fungos toxigênicos nos frutos utilizados para o consumo humano (ASTORECA et al., 2009).

Apesar de muitos anos de pesquisa e a introdução de Boas Práticas na Agricultura (BPA) e na produção de alimentos, e Boas Práticas de Fabricação (BPF), na estocagem e cadeia de distribuição micotoxinas continuam sendo um problema (DUARTE; PENA; LINO, 2010). Assim, torna-se evidente que a presença de ocratoxina A no café é sempre uma indicação de falhas graves nas práticas de colheita e armazenamento de grãos (PALACIOS-CABRERA et al., 2004).

2.6.2 Riscos de ocratoxina A em sistema de cultivo orgânico e convencional

Pesquisas visando a análise da concentração de ocratoxina A e riscos de contaminação entre sistemas de cultivo convencional e orgânico são realizadas nos últimos anos. O principal produto agrícola alvo de estudos pelos pesquisadores são os cereais de um modo geral.

No estudo de Juan et al. (2008), as amostras de cereais orgânicos mostraram maior incidência de contaminação com ocratoxina A que amostras de cereais de cultivo convencional. Da mesma forma, as 400 amostras de grãos de cereais poloneses de cultivo convencional e orgânico estudados por Czerwiecki, Czajkowska e Witkowska (2002a, 2002b), a frequência de ocratoxina A nas amostras de cultivo orgânico foram substancialmente superiores que de cultivo convencional. Uma relação análoga foi observada para amostras de centeio analisados por Jorgensen e Jacobsen (2002), que encontraram uma concentração maior de ocratoxina A para produção orgânica que para produção convencional, ambos para grãos e farinha. Em amostras de arroz, a maior contaminação dos produtos procederam de práticas orgânicas, resultados observados por González

et al. (2006). González et al. (2007) determinaram uma incidência ligeiramente maior de ocratoxina A no pão de produção orgânica, quando comparado com a produção convencional. Jestoi et al. (2004), analisando os níveis de micotoxina em grãos, não observaram diferença significativa para a concentração da toxina entre sistema de cultivo convencional e orgânico, embora a concentração média total da micotoxina tenha sido ligeiramente superior para produtos orgânicos.

Estes resultados demonstram maior contaminação com micotoxinas em produtos de cultivo orgânico. Essa tendência de contaminação pode ser consequência da produção orgânica, que não permite a utilização de produtos químicos, como pesticidas, fungicidas e reguladores de crescimento. Isto pode permitir a colonização de diversos fungos e consequente produção de micotoxinas. A proibição de utilização de fungicidas promove a exposição dos grãos a contaminações com fungos, entre eles os ocratoxigênicos (GONZÁLEZ et al., 2006; JESTOI et al., 2004; JUAN et al., 2008).

Por outro lado, existem relatos de maior contaminação com micotoxina em produtos de cultivo convencional do que produtos de cultivo orgânico (BAKUTIS; BALIUKONIENE; LUGAUSKAS, 2006). Benbrook (2005) observou comparando diferentes estudos que em amostras de alimentos de cultivo convencional a contaminação foi 50% mais frequente do que as amostras orgânicas. Para este autor, sistemas de cultivo convencional aumentam o risco de contaminação com fungos toxigênicos, por falta da biodiversidade e dependência de monoculturas, diminui a competição dos fungos toxigênicos com outros microrganismos e favorece a produção de micotoxinas em condições favoráveis. Nas culturas orgânicas existem maior biodiversidade e consequentemente maior competição pelo substrato, o que pode não ser favorável para a produção de toxina.

Há discordância entre os resultados de diferentes pesquisas, alguns estudos não mostram diferenças de contaminações com micotoxinas entre os

produtos orgânicos ou convencionais, embora alguns tenham relatado maior risco de contaminação em alimentos orgânicos e outros afirmam que os alimentos convencionais apresentam risco maior. Na realidade, a maioria dos estudos concluem que mais investigações são necessárias antes que possamos avaliar a segurança dos produtos agrícolas (JESTOI et al., 2004). Bakutis, Baliukoniene e Lugauskas (2006) afirmaram que a contaminação do substrato com micotoxina envolve um conjunto de fatores como região geográfica, condições climáticas e processamento do produto, da colheita ao armazenamento, e estes fatores são mais influentes na produção da micotoxina do que o sistema de cultivo.

2.6.3 Ocratoxina A

Ocratoxina A ocorre em diferentes gêneros alimentícios e bebidas, incluindo uma variedade de cereais, amendoim, arroz, grãos, café (verde e torrado), cerveja, uva e derivados, carnes, frutas secas, especiarias, nozes, castanha do Pará, pimentões vermelhos, suco de maçã, pão, entre outros (ASTORECA et al., 2009; BATISTA et al., 2009; CECI et al., 2007; DUARTE; PENA; LINO et al., 2010; PRADO et al., 2008; SILVA et al., 2007; VARGA; SAMSON, 2008).

Esses alimentos são considerados de maior contribuição para a exposição humana à ocratoxina A, estimado a 87% nos estados Europeus. Como esses alimentos fazem parte da dieta normal das populações, a ocratoxina A tem sido detectada em fluidos biológicos como leite humano e plasma, apontada como um indicador risco contaminação (ALMEIDA et al., 2007; LINO et al., 2008). Além do mais, o problema também é decorrente da exposição ocupacional natural, desde que tem sido detectado em trabalhadores de várias indústrias e fazendas (DUARTE; PENA; LINO, 2009). Acredita-se que a ocorrência da ocratoxina A seja favorecida por condições ambientais como

clima, tempo de estocagem e de transporte e condições de processamento, como umidade, processos mecânicos ou de secagem (PETZINGER; WEIDENBACH, 2002; ROMANI et al., 2000).

Após a descoberta das aflatoxinas, a ocratoxina foi o segundo grupo de micotoxinas a serem estudados, cujo interesse de estudo cresceu na última década (NIESSEN et al., 2005; SHERIF; SALAMA; ABDEL, 2009). A ocratoxina A é um metabólito secundário produzido por espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (GIL-SERNA et al., 2011; VARGA; SAMSON, 2008), frequentemente encontrado como contaminante em alimentos (BANDO et al., 2007; FERRACIN et al., 2009; PATIÑO et al., 2005; PERRONE et al., 2007; SHERIF; SALAMA; ABDEL, 2009; SILVA et al., 2007). Foi descrita pela primeira vez por Van der Merwe, Steyne, Fourie, Scott e Theron em 1965 (ZINEDINE; MAÑES, 2009). A ocratoxina A caracteriza-se por possuir um átomo de cloro em sua estrutura, responsável em parte pelo caráter tóxico (EDWARDS; ÓCALLAGHAN; DOBSON, 2002), são derivadas de dihidróxidometil-isocumarina vinculadas a L- β -fenilalanina mediante uma ligação amida (PITT et al., 2000; VARGA; SAMSON, 2008) e sua estrutura química é: 1-fenilalanina-*N*-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1*H*-2-benzopirano-7-il)carbonil]-(*R*)-isocumarina (KHOURY; ATOUI, 2010) (Figura 4).

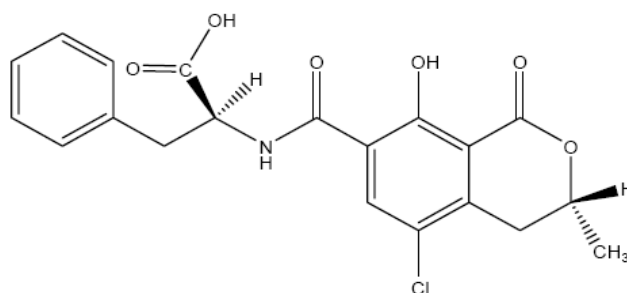


Figura 4 Estrutura química da ocratoxina A

Fonte Khoury e Atoui (2010)

Ocratoxina A é o membro mais tóxico do grupo das ocratoxinas, que também inclui ester metil, ester etil, também conhecido como ocratoxina C (OTC), 4-hidróxiocratoxina A (4-OH OTA), ocratoxina B (falta um átomo de cloro no C5 do sistema de anéis de dihidro-metil-isocumarina) e estes ésteres de metil e etil e ocratoxina α (OT α ; aqui a metade da fenilalanina está em falta). A ocratoxina A é altamente solúvel em solventes orgânicos polares, levemente solúvel em água e solúvel em hidrogênio aquoso de carbonato de sódio, apresenta ponto de fusão de 90 e 171 °C. Ocratoxina A exibe absorção ultravioleta a $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm; ϵ) = 333 (6400) (DUARTE; PENA; LINO, 2010).

Diversos países estabeleceram limites máximos para a ocratoxina A no setor dos cereais e outros produtos, no entanto, poucos têm legislação para os grãos de café. CEC estabeleceram regulamentos para a ocratoxina A, 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para grãos de cereais crus (incluindo arroz cru e trigo sarraceno, café verde e torrado), 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para café solúvel e 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para todos os produtos derivados de cereais (CEC, 2006). No Brasil, a concentração de ocratoxina A em café torrado e solúvel é de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ estabelecida pela Consulta Pública nº 100 de dezembro de 2009 (ANVISA, 2009).

2.6.4 Ocratoxina A e saúde humana

A exposição humana a micotoxinas pelo consumo de alimentos contaminados é questão de saúde pública em todo mundo (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002). Vários trabalhos estão sendo desenvolvidos para documentar a ocorrência de ocratoxina A em alimentos para o homem e em rações para animais (SILVA et al., 2007). Estas toxinas fúngicas, uma vez formadas, podem entrar na cadeia de produção de alimentos através da contaminação de ingrediente ou gênero alimentício consumido pelos humanos ou na cadeia alimentar de animais que são destinados ao consumo humano. Também são vias importantes de contaminação com micotoxinas, ingestão de água contaminada, inalação de esporos e contato direto por via cutânea (DUARTE; PENA; LINO, 2009; SHERIF; SALAMA; ABDEL, 2009; TURNER; SUBRAHMANYAM, 2009; ZINEDINE; MAÑES, 2009).

Graves problemas de saúde e morte podem ter ocorrido a partir do consumo de micotoxinas. As micotoxinas são inevitavelmente consumidas ou ingeridas pelos animais ou seres humanos (PATERSON; LIMA, 2010).

As micotoxinas podem afetar muitos processos celulares diversos e têm um amplo espectro de efeitos toxicológicos (SHERIF; SALAMA; ABDEL, 2009). Ainda não definitivamente demonstrado, ocratoxina A foi suspeito de ser um dos muitos agentes etiológicos da Nefropatia Endêmica de Balkan (BEN), doença degenerativa dos rins, descrita nos últimos cinquenta anos como uma patologia típica de humanos na área dos Balkans, sudeste da Europa, onde são geralmente encontrados alimentos contaminados com ocratoxina A e onde pessoas sofriam com nefropatia crônica intersticial e ou tumores no trato urinário, têm alta concentração (2-40 ng/mL) de ocratoxina A em seus sangues assim como em seus alimentos (1-35 µg/Kg) (CREPPY; BAUDRIMONT; BETBEDER, 1995; DUARTE; PENA; LINO, 2010; JECFA, 2001).

Essa toxina também apresenta efeito teratogênico e embriotóxico, a ocratoxina A pode atravessar a placenta (JECFA, 2001), genotóxico, neurotóxico, nefrotóxico, possível carcinogênico grupo 2B (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 1993), imunossupressor. A ocratoxina A inibe a proliferação de linfócitos B e afeta as fases tardias da ativação de linfócitos T *in vitro*, em relação ao sistema imune humoral, e induz regressão de IgG, IgA e IgM. No entanto, tanto os efeitos imunológicos e teratogênicos têm sido observados apenas em doses muito mais elevadas do que aquelas que causam nefrotoxicidade (DUARTE; PENA; LINO, 2009; FERRACIN et al., 2009; FUNGARO; SARTORI, 2009; JUAN et al., 2008; VARGA; SAMSON, 2008). Também foram descritas evidências de uma possível correlação entre ocratoxina A e desenvolvimento de tumores do trato urinário de seres humanos (DIRHEIMER, 1996; MITCHELL et al., 2004; PITT et al., 2000). Resultados de vários estudos sugerem que pacientes que sofrem de doenças renais ou urinárias apresentam significativamente maior concentração de ocratoxina A no sangue que indivíduos saudáveis (MALLY; HARD; DEKANT, 2007).

Assintomáticos durante anos, a doença progride lentamente para fase final de insuficiência renal (MALLY; HARD; DEKANT, 2007). Efeitos adversos tardios à saúde devido à exposição a pequenas quantidades de micotoxinas são muito variados e incluem principalmente o câncer (SHERIF; SALAMA; ABDEL, 2009), estima-se que cerca de 35% dos casos de câncer humano estejam diretamente relacionados à dieta (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002).

A ocratoxina A é lentamente absorvida pelo trato gastrointestinal, é distribuída através do sangue, principalmente para os rins, e as concentrações inferiores podem ser encontradas no fígado, músculos e gordura (VARGA; SAMSON, 2008). Transferência para o leite tem sido demonstrada em ratos,

coelhos e seres humanos, mas pouco é transferido para o leite dos ruminantes, devido ao metabolismo de ocratoxina pela microflora ruminal (VARGA; SAMSON, 2008). O principal metabólito de ocratoxina A em todas as espécies examinadas é α ocratoxina. Este metabólito tem sido relatado sendo menos tóxico que a ocratoxina A. A ocratoxina A é excretada através da urina e fezes e a contribuição relativa de cada uma dessas rotas em diferentes espécies é influenciada pela extensão da recirculação entero-hepática de ocratoxina A e sua ligação com macromoléculas do soro (VARGA; SAMSON, 2008). Estes fatores são também importantes na determinação da meia-vida da ocratoxina A, que varia muito entre as espécies. Tem uma meia-vida longa em mamíferos não-ruminantes, por exemplo, 24-39 h em camundongos, 55-120 h em ratos, 72-120 h em suínos, 510 h em macacos. Em humanos, ocratoxina A é eliminada lentamente (RICHARD, 2007; VARGA; SAMSON, 2008) devido a longa meia-vida para eliminação (cerca de 35 dias no soro), como consequência da sua ligação às proteínas plasmáticas, a sua circulação entero e sua reabsorção da urina (LINO et al., 2008), por ser lipossolúvel e não prontamente excretada, ela acumula no tecido adiposo (PITT, 2000; PITT et al., 2000). O adiamento da excreção da toxina no homem pode ser devido a uma reabsorção durante a circulação enterohepática, consequência da reabsorção a partir da urina após a secreção tubular e à extensa ligação protéica. A toxina é ingerida na maioria das refeições, portanto humanos podem não estar livres da toxina por um longo período (PETZINGER; WEIDENBACH, 2002). Para a exposição à ocratoxina A, os biomarcadores se restringem à quantificação da própria toxina nos fluidos biológicos. A utilização da determinação de ocratoxina A na urina foi sugerida como biomarcador simples para estimar a exposição a essa micotoxina (BANDO et al., 2007).

A toxicidade de ocratoxina A parece estar relacionada à sua capacidade de inibir a síntese protéica competindo com a fenilalanina na reação catalisada

pela fenilalanil-tRNA sintetase e outros sistemas que exigem esse aminoácido, e aumenta a peroxidação lipídica, levando a um maior dano celular e mitocondrial (DIRHEIMER, 1996; TURNER; SUBRAHMANYAM, 2009).

Vários países têm elaborado legislações que permitem a concentração máxima de ocratoxina A em produtos agrícolas e derivados (BATISTA; CHALFOUN, 2007). Foi estabelecida a ingestão semanal tolerável de ocratoxina A em 112 ng/Kg de peso corporal correspondendo a aproximadamente 14 ng/kg de peso corporal por dia, com base na deterioração da função renal em suínos (JECFA, 2001). Estes limites têm por finalidade assegurar a integridade da saúde da população destes países, não expondo assim os consumidores aos efeitos tóxicos causados pela ocratoxina A. De lado com a saúde e perspectiva toxicológica, exposição à ocratoxina A, também apresenta uma faceta econômica na pecuária animal, que diminui a produtividade (leite, ovos e perda de peso) e aumenta a taxa de mortalidade. A concentração de ocratoxina A em leite bovino é menor, embora a concentração possa variar de acordo com a ingestão da micotoxina (DUARTE; PENA; LINO, 2010).

2.7 Fungos produtores de ocratoxina A em café

A biodiversidade da microbiota presente em frutos e grãos de café depende da variedade do café, método de processamento, fatores ambientais como umidade, temperatura, e os microrganismos contaminantes do solo (BATISTA et al., 2009).

Os principais gêneros produtores de ocratoxina A são *Aspergillus* e *Penicillium* (DUARTE; PENA; LINO, 2009; ESPADALÉ; LAMPURLANÉS; AUBERT, 2008; GIL-SERNA et al., 2011; LINO et al., 2008). As espécies do genero *Penicillium* são encontradas geralmente em regiões temperadas, temperaturas abaixo de 30 °C e com atividade de água abaixo 0.80 (JECFA,

2001) e o principal produtor é *Penicillium verrucosum*. Os *Aspergillus* são encontrados em regiões de clima tropical, as principais espécies do gênero *Aspergillus* produtores de ocratoxina A são *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus sulphureus* e *Aspergillus sclerotiorum* (BATISTA et al., 2009; SILVA et al., 2008; VARGA; SAMSON, 2008; ZINEDINE; MAÑES, 2009). Estas espécies diferem-se em seus nichos ecológicos, o tipo de alimento que contaminam e diferenças geográficas (DUARTE; PENA; LINO, 2010; JUAN et al., 2008). Apesar de *A. niger* ser mais comum em café do que *A. carbonarius*, ele apresenta um baixo potencial toxigênico sendo, portanto, de pouca importância como fonte de ocratoxina em café (FUNGARO; SARTORI, 2009; PALACIOS-CABRERA et al., 2005; TANIWAKI et al., 2003). Também é comum encontrar *A. ochraceus* em café, esta espécie é o maior produtor de ocratoxina A no café (BATISTA et al., 2009).

Fatores ambientais são essenciais para que espécies de *Aspergillus* sintetizem ocratoxinas (ASTORECA et al., 2007). A umidade e composição química dos grãos de café, temperatura, pH, cultivo e manejo do produto podem influenciar o desenvolvimento de microrganismos e sua atividade metabólica (SILVA et al., 2008; VARGA; SAMSON, 2008). As mudanças drásticas de temperatura podem causar estresse metabólico em fungos, que podem resultar em maior ou menor produção de toxina. No transporte de café, há sempre um risco de aumento no teor de umidade, podendo favorecer o desenvolvimento de fungos toxigênicos e a produção da micotoxina (PALACIOS-CABREIRA et al., 2004; VARGA; SAMSON, 2008).

O processamento do café por via úmida auxilia na redução de fungos toxigênicos e a produção de ocratoxina A. O principal objetivo do tratamento é a remoção do exocarpo, endocarpo e mesocarpo (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008). A variedade de grãos com exocarpo mais resistente apresenta maior resistência à penetração e proliferação de fungos e, conseqüentemente, a

produção de micotoxinas é dificultada ou suprimida (PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009).

Alimentos que têm nutrientes essenciais para o crescimento fúngico contribuem para o surgimento dos mesmos e a deterioração dos alimentos e rações (GARCIA et al., 2009). Alguns estudos confirmam que o café cru é um substrato adequado para o crescimento de *A. ochraceus* e produção de ocratoxina A (PALACIOS-CABREIRA et al., 2004). Outros estudos, porém, afirmam que a cafeína ou algum outro componente do café inibem a produção *in vitro* (ASTORECA et al., 2007).

2.7.1 Gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* e Seção *Circumdati*

As espécies produtoras de ocratoxina A mais frequentemente detectadas no café em países de clima tropical pertencem ao gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e Seção *Nigri* (GIL-SERNA et al., 2011). Os *Aspergillus* estão entre os fungos mais comuns deterioradores de alimentos e outros materiais (SAMSON; HONG; FRISVAD, 2006).

Os Black *Aspergillus*, que compreendem espécies da Seção *Nigri*, são mundialmente distribuídos, são espécies comuns de ambiente (NOONIM et al., 2008b) e têm um impacto na sociedade moderna, responsáveis pela deterioração dos alimentos e biodeterioração de muitos produtos agrícolas (SAMSON et al., 2004; VARGA; SAMSON, 2008). Estão relacionados com alimentos, saúde e biotecnologia. Mudanças e danos em alimentos causados por *Aspergillus* podem ser sensorial, nutricional, e natureza qualitativa como: pigmentação, descoloração, podridão, perda de odores e flavor (NOONIM et al., 2008b; PERRONE et al., 2007). Os fungos dessa Seção possuem conídios de coloração marrom-escuro a negros (Figura 5a), com estruturas dos conidióforos

unisseriados ou bisseriados (Figura 5b), vesículas esféricas e hifas hialinas ou levemente pigmentadas próximo ao ápice (BELLÍ et al., 2004).

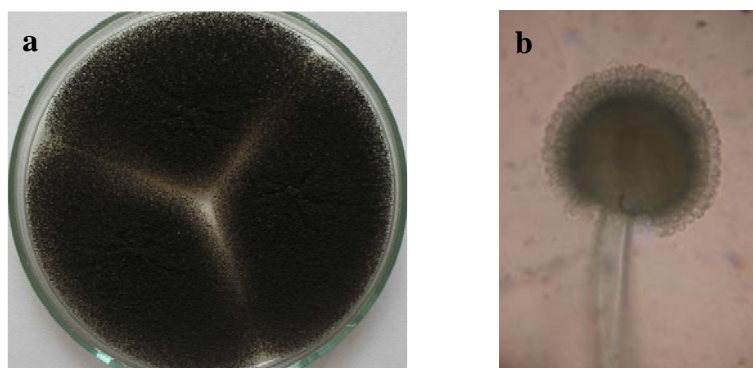


Figura 5 a) Fungo do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* em meio de cultura CYA; b) Estrutura microscópica do fungo do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*

Aspergillus da Seção *Nigri* fazem parte do grupo de *Aspergillus* ocratoxigênicos onde *A. carbonarius* é o mais representativo. Alguns autores indicaram que muitas espécies fortemente relacionadas *A. carbonarius* e *A. niger* são encontrados muitas vezes em associação, e são produtores de ocratoxina A em alimentos de regiões tropicais e subtropicais, nomeadamente em frutos amadurecidos, especialmente uvas e frutas secas e café, com alta resistência à luz solar e luz ultravioleta, assim como temperaturas relativamente altas (DUARTE; PENA; LINO, 2010).

A espécie *Aspergillus niger* é comum em café e é citado em muitos trabalhos (BATISTA et al., 2009; ESPADALÉ; LAMPURLANÉS; AUBERT, 2008; PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008). *Aspergillus niger* é citado como produtor de ocratoxina A (ASTORECA et al., 2009; NOONIM et al., 2008a) e também como de várias substâncias entre elas ácido cítrico, ácido glucônico, ácido fumárico, citrato de ferro e enzimas extracelulares como pectinases, proteases, amiloglicosidase, catalase, α -amilase,

celulase, lipase, estas são de importância biotecnológica úteis nas fermentações nas indústrias, incluindo a indústria de alimentos, e aplicação em bioprocessos (ASTORECA et al., 2009; BLUMENTHAL, 2004). *A. niger* é uma das poucas espécies de fungos considerada como GRAS (Generally Recognized as Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration), devido à sua baixa toxigenicidade (SAMSON et al., 2004; VARGA; RIGÓ; TÉREN, 2000). *A. niger* também possui características anti-toxina, este fato é promissor, pois poderia permitir a eliminação biológica desta micotoxina de substratos sólidos, como grãos verdes e cereais. Em alternativa, este fungo pode proporcionar uma fonte de enzimas que poderiam ser utilizadas para a desintoxicação de ocratoxina A em produtos agrícolas contaminados. Novos estudos estão em andamento para analisar a possibilidade de degradar ocratoxina A de produtos agrícolas sob diferentes condições de cultivo, e para determinar quais as enzimas participam no processo de desintoxicação (VARGA; RIGÓ; TÉREN, 2000).

A Seção *Nigri* é um dos mais difíceis grupos para classificação e identificação (PATERSON; LIMA, 2010; PERRONE et al., 2007; SAMSON et al., 2007), análises de métodos moleculares e metabólitos secundários são necessários para a identificação (VARGA; SAMSON, 2008).

Aspergillus da Seção *Circumdati* possuem espécies importantes para a biotransformação de esteróides em alcalóides, enquanto os escleródios de várias espécies contêm compostos inseticidas, e são também importantes produtores de ocratoxina A (VARGA; SAMSON, 2008).

Dentre os fungos do gênero *Aspergillus* da Seção *Circumdati*, *A. ochraceus* (Figura 6a e 6b) é o mais comum em café e o maior produtor de ocratoxina A (BATISTA et al., 2009; ESPADALÉ; LAMPURLANÉS; AUBERT, 2008). Mas esta micotoxina também pode ser produzida por outras espécies de fungos como *A. elegans*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae* (BATISTA et al., 2009; GIL-SERNA et al., 2011; PARDO et al., 2006; TANIWAKI et al.,

2003). Gil-Serna et al. (2011) afirmam que as espécies de *A. steynii* e *A. westerdijkiae* podem representar maior potencial de risco de produção de ocratoxina A devido à alta produção da micotoxina e a diversidade de alimentos que essas espécies podem contaminar, mas os riscos de produção de ocratoxina A por *A. elegans* e *A. ochraceus* não são descartados.

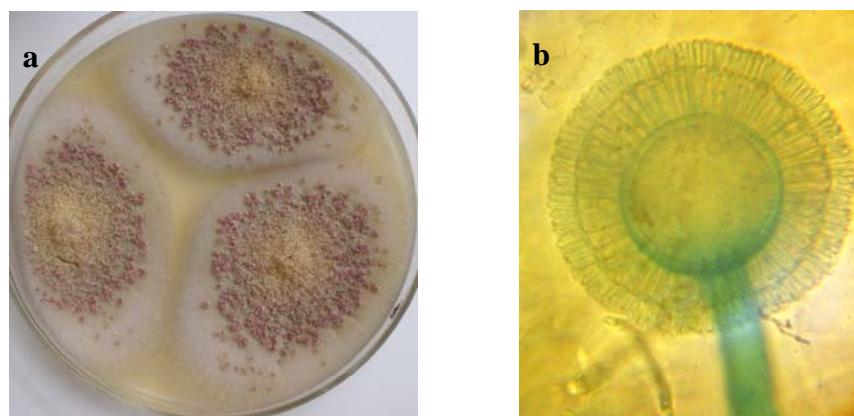


Figura 6 a) *Aspergillus ochraceus* em meio de cultura CYA; b) Estrutura microscópica de *Aspergillus ochraceus*

Aspergillus ochraceus pode ser encontrado em uma ampla gama de produtos alimentares armazenados, incluindo cereais. Ele também pode infectar os grãos de café durante a secagem ao sol e é uma fonte de ocratoxina A em grãos de café verde (JECFA, 2001). É capaz de se desenvolver em uma grande faixa de temperatura de 8 a 30 °C, sendo que a temperatura ótima de crescimento varia de 25 °C a 30 °C e atividade de água mínima para o seu desenvolvimento é de 0,76; já para a produção de ocratoxina A, a atividade de água mínima é de 0,85 com a faixa ótima variando de 0,95-0,99 (JECFA, 2001; PALACIOS-CABRERA et al., 2005).

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1799-1804, dez. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Consulta pública nº. 100**. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 19 nov. 2010.

ALMEIDA, A. P. et al. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 300-303, June 2007.

ALVARENGA, M. I. N.; MARTINS, M.; PAULA, M. B. Manejo ecológico da propriedade cafeeira orgânica. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 214/215, p. 21-31, jan./abr. 2002.

ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2169-2180, set. 2009.

ARAÚJO, D. F. S.; PAIVA, M. S. D.; FILGUEIRA, J. M. Orgânicos: expansão de mercado e certificação. **Holos**, Porto Alegre, v. 3, p. 138-149, out. 2007. Número Especial.

ARRUDA, A. C. et al. Justificativas e motivações do consumo e não consumo de café. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 754-763, out./dez. 2009.

ASTORECA, A. et al. Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* Aggregate strains on irradiated peanut seeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 131-135, Feb. 2009.

_____. Ochratoxin A production in relation to ecophysiological factors by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from different substrates in Argentina. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 388, n. 1/3, p. 16-23, Dec. 2007.

AZEVEDO, M. S. F. R. et al. Conversão de cafezais convencionais em orgânicos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 214/215, p. 53-61, jan./abr. 2002.

- BAKUTIS, B.; BALIUKONIENE, V.; LUGAUSKAS, A. Factos predetermining the abundance of fungi and mycotoxins in grain from organic and conventional farms. **Ekologija**, Sverdlovsk, v. 3, n. 1, p. 122-127, Aug. 2006.
- BANDO, E. et al. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 3, p. 175-180, jun. 2007.
- BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de ochratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun. 2007.
- BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2009.
- _____. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Sept. 2003.
- BELLÍ, N. et al. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 84, n. 6, p. 591-594, Apr. 2004.
- BENBROOK, C. **Breaking the mold**: impacts of organic and conventional farming systems on mycotoxins in food and livestock feed. Boulde: The Organic Center, 2005. 58 p.
- BLUMENTHAL, C. Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Thichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 39, n. 3, p. 214-228, June 2004.
- BOKHARI, F. M. Mycotoxins and toxigenic fungi in arabic coffee beans in saudi arabia. **Advances in Biological Research**, Islamabad, v. 1, n. 1/2, p. 56-66, Jan./Apr. 2007.
- BORÉM, F. M. Processamento do café. In: _____. **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2008. p. 127-158.

BORÉM, F. M. et al. Armazenamento do café. In: BORÉM, F. M. (Ed.). **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2008. p. 349-388.

BRENELLI, E. C. S. A extração de cafeína em bebidas estimulantes: uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 136-138, jan./fev. 2003.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 140-146, Nov. 2007.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319-323, jun. 2002.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 529-537, out. 2000.

CECI, E. et al. Ochratoxin A detection by HPLC in target tissues of swine and cytological and histological analysis. **Food Chemistry**, Barking, v. 105, n. 1, p. 364-368, Mar. 2007.

CHAGAS, S. J. E.; POZZA, A. A. A.; GUIMARÃES, M. J. C. L. Aspectos da colheita, preparo e qualidade do café orgânico. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 214/215, p. 127-135, jan./abr. 2002.

CHALFOUN, S. M.; PARIZZI, F. C. Fungos toxigênicos e micotoxinas em café. In: BORÉM, F. M. (Ed.). **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA, 2008. p. 511-543.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Commission regulation n° 1881/2006**: setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Brussels, 2006. 364 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira café safra 2009**: quarta estimativa, safra 2009. Brasília, 2009. 15 p.

_____. **Acompanhamento da safra brasileira café safra 2010**: terceira estimativa, safra 2010. Brasília, 2010. 19 p.

CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL. **Balço das exportações brasileiras de café de 2009**. Brasília, 2010. 4 p.

COSTA, T. H. M.; DOREA, J. G. Novos fatos e velhos mitos sobre o café. **Brasília Médica**, Brasília, v. 42, n. 3/4, p. 15-20, set. 2005.

CREPPY, E. E.; BAUDRIMONT, I.; BETBEDER, A. M. Prevention of nephrotoxicity os ochatoxin A, a food contaminant. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 82, n. 3, p. 869-877, Dec. 1995.

CZERWIECKI, L.; CZAJKOWSKA, D.; WITKOWSKA, G. A. On ochratoxin A and fungal flora in polish cereals from conventional and ecological farms, part 1: occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1997. **Food Additives and Contaminantes**, London, v. 19, n. 5, p. 470-477, May 2002a.

_____. 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 Contaminantes**, London, v. 19, n. 11, p. 1051-1057, Nov. 2002b.

DIRHEIMER, G. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 7, p. 45-48, Aug. 1996.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Ochratoxina A non-conventional sources: a review. **Microchemical Journal**, New York, v. 93, n. 2, p. 115-120, Nov. 2009.

_____. Review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 2, p. 187-198, Apr. 2010.

EDWARDS, S. G.; ÓCALLAGHAN, J.; DOBSON, A. D. W. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, n. 12, p. 1005-1025, Dec. 2002.

ESPADALÉ, R. M. A.; LAMPURLANÉS, X. S.; AUBERT, A. C. Exposición laborala hongos en uma planta de procesamiento de café. **Medicina y Seguridad del Trabajo**, Madrid, v. 54, n. 211, p. 31-37, marzo 2008.

FERRACIN, L. M. et al. Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* Aggregate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p. 241-248, Nov. 2009. Special Number.

FERRAZ, M. B. M. et al. Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 6, p. 872-877, June 2010.

FREIRE, M. S. R.; NEVES, M. C. **Sistemas de produção 02 cultivo do café orgânico**. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 2004. 95 p.

FUNGARO, M. H. P.; SARTORI, D. An overview on molecular markers for detection of ochratoxigenic fungi in coffee beans. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p. 1-9, Nov. 2009. Special Number.

GARCIA, D. et al. Predicting mycotoxins in foods: a review. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 8, p. 757-769, Dec. 2009.

GIL-SERNA, J. et al. Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* Section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 2, p. 343-345, Feb. 2011.

GOLLÜCKE, A. P. B.; TANIWAKI, M. H.; TAVARES, D. Q. Investigação de ocratoxina A em café verde brasileiro destinado à exportação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 641-645, out./dez. 2004.

GONZÁLEZ, L. et al. Dietary intake of ochratoxin A from conventional and organic bread. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 118, n. 1, p. 87-91, Aug. 2007.

_____. Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 223-227, Mar. 2006.

GRAZIANO, G. O. et al. Produtores e o perfil da oferta de produtos orgânicos no Brasil: um estudo exploratório. In: CONGRESSO SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, 48., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SBE, 2009. 1 CR-ROM.

ILIC, Z. et al. Survey of Vietnamese coffee beans for the presence of ochratoxigenic Aspergilli. **Mycopathologia**, New York, v. 163, n. 3, p. 177-182, Mar. 2007.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, v. 56, p. 489-521, June 1993.

JESTOI, M. et al. Levels of mycotoxins and sample cytotoxicity of selected organic and conventional grain-based products purchased from Finnish and Italian markets. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 48, n. 4, p. 229-307, Sept. 2004.

JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Buenos Aires, 2001. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm#1.0>>. Acesso em: 21 abr. 2010.

JORGENSEN, K.; JACOBSEN, J. S. Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992 and 1999. **Food Additives and Contaminantes**, London, v. 19, n. 12, p. 1184-1189, Dec. 2002.

JUAN, C. et al. Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, n. 1, p. 525-530, Mar. 2008.

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

LEONI, L. A. B. et al. Ochratoxina A em grãos de café brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 105-107, jan./abr. 2001.

LICCIARDI, R. et al. Avaliação físico-química de cafés torrados e moídos, de diferentes marcas comerciais, da região Sul de Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 425-429, out. 2005.

LIMA, P. C. et al. Estabelecimento de cafezal orgânico. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 23, n. 214/215, p. 33-52, jan./abr. 2002.

LINO, C. M. et al. Levels of ochratoxin A in serum from urban and rural Portuguese populations and estimation of exposure degree. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 3, p. 879-885, Mar. 2008.

MALLY, A.; HARD, G. C.; DEKANT, W. Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: lessons from toxicity studies in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 11, p. 2254-2260, Nov. 2007.

MALTA, M. R. et al. Caracterização de lavouras cafeeiras cultivadas sob o sistema orgânico no sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1402-1407, set./out. 2008.

MARTINS, A. L. **História do café**. São Paulo: Contexto, 2008. 315 p.

MITCHELL, D. et al. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 439-445, Aug. 2004.

MONTEIRO, M. A. M. et al. Influência da torra sobre a aceitação da bebida café. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 57, n. 2, p. 145-150, mar./abr. 2010.

MORAES, M. H. P.; LUCHESE, R. H. Ochratoxin A on green coffee: influence of harvest and drying processing procedures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 19, p. 5824-5828, Sept. 2003.

NICOLELI, M.; MOLLER, H. D. Análise da competitividade dos custos do café orgânico sombreado irrigado. **Custos e @gronegocio On Line**, Recife, v. 2, n. 1, p. 29-44, jan./jun. 2006.

NIESSEN, L. et al. Advances in the molecular diagnosis of ochratoxin A-producing fungi. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, n. 4, p. 324-334, May 2005.

NOONIM, P. et al. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 197-202, Dec. 2008a.

_____. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 7, p. 1727-1734, July 2008b.

OLIVEIRA, L. H. et al. Caracterização e análise da cadeia produtiva de café orgânico do sul de minas gerais: subsídios para o aumento das exportações. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E ADMINISTRAÇÃO RURAL, 40., 2006, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBE, 2006. 1 CD-ROM.

PALACIOS-CABEIRA, H. et al. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 24-28, Jan./Mar. 2005.

_____. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 7, p. 531-535, Oct. 2004.

PARDO, E. et al. Non-specificity of nutritional substrate for ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus*. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 4, p. 351-358, June 2006.

_____. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, London, v. 10, n. 1, p. 45-50, Feb. 2004.

PASIN, L. A. A. P.; ALMEIDA, J. R.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 1129-1132, out. 2009.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research International**, Dublin, v. 43, n. 7, p. 1902-1914, Aug. 2010.

PATIÑO, B. et al. PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 104, n. 2, p. 207-214, Oct. 2005.

PÉREZ, A. O.; GONZÁLEZ, E. P.; LÓPEZ, A. C. Influence of roasting and brew preparation on the ochratoxin A content in coffee infusion. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, n. 5, p. 463-471, May 2005.

- PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 59, n. 1, p. 53-66, Dec. 2007.
- PETZINGER, E.; WEIDENBACH, A. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. **Livestock Production Science**, Philadelphia, v. 76, n. 3, p. 245-250, Sept. 2002.
- PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 17-22, Dec. 2000.
- PITT, J. I. et al. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 41-46, Dec. 2000.
- PRADO, G. et al. Ocorrência de ocratoxina A em café torrado e moído comercializado em Minas Gerais: 2003/2005. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, n. 10, p. 24-28, mar. 2008. Edição Especial.
- RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses an overview. **International Journal of Food microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1/2, p. 3-10, Oct. 2007.
- ROMANI, S. et al. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 9, p. 3616-3619, Sept. 2000.
- SAMSON, R. A. et al. Diagnostic tools to identify Black Aspergilli. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 59, n. 1, p. 129-145, Oct. 2007.
- _____. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* Section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 50, n. 1, p. 45-61, Oct. 2004.
- SAMSON, R. A.; HONG, S. B.; FRISVAD, J. V. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 44, n. 8, p. 133-148, Sept. 2006.
- SANTOS, V. E. S. et al. Análise do setor de produção e processamento de café em Minas Gerais: uma abordagem matriz insumo-produto. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Piracicaba, v. 47, n. 2, p. 363-388, jul. 2009.

SHERIF, S. O.; SALAMA, E. E.; ABDEL, M. A. W. Mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 212, n. 4, p. 347-368, July 2009.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. B.; SCHWAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 521-526, July/Sept. 2008.

_____. Incidência de *Aspergillus* produtores de micotoxinas em frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, n. 7, p. 30-37, set. 2003. Edição Especial.

SILVA, O. F. et al. Avaliação da microbiota patogênica e ocratoxina a em cafês produzidos na região do cerrado e estado de Rondônia: safra 2003/2004. **Revista Brasileira Armazenamento**, Viçosa, MG, n. 10, p. 9-14, jun. 2008. Edição Especial.

SILVA, R. A. et al. Inquérito sobre o consumo de alimentos possíveis de contaminação por micotoxinas na ingesta alimentar de escolares da cidade de Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 439-447, mar./abr. 2007.

SUAREZ-QUIROZ, M. et al. Effect of the post-harvest processing procedure on OTA occurrence in artificially contaminated coffee. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 339-345, Sept. 2005.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

THEODORO, V. C. A.; GUIMARÃES, A. N. M.; GUIMARÃES, R. J. Response of coffee crop (*Coffea arabica* L.) in agroecologic transition to diferent soil management. **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 56-66, Jan./June 2009.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S. S. A. P. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 632, n. 2, p. 168-180, Jan. 2009.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 1/2, p. 1-7, July 2000.

VARGA, J.; SAMSON, R. A. *Aspergillus in the genomic era*. Netherlands: Wageningen Academic, 2008. 336 p.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, Dec. 2010.

WACHSNER, S. Produtos orgânicos: que negócio é esse? **A Lavoura**, Rio de Janeiro, v. 655, p. 1-2, mar. 2005.

ZINEDINE, A.; MAÑES, J. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 4, p. 334-344, Apr. 2009.

CAPÍTULO 2 Fungos ocratoxigênicos em grãos de café de cultivo orgânico e convencional

RESUMO

Algumas espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são produtores de um metabólito secundário tóxico, denominado de micotoxinas, dentre elas, a mais estudada em frutos e grãos de café é a ocratoxina A. No café, os microrganismos de maior relevância quanto à produção dessa micotoxina pertencem ao gênero *Aspergillus*, Seção *Circumdati* e Seção *Nigri*. Este estudo objetivou pesquisar a incidência de fungos ocratoxigênicos e identificar as espécies isoladas de grãos de café de cultivo orgânico e convencional da região sul de Minas Gerais. Foram analisadas 30 amostras de grãos de café arábica (*Coffea arabica* L.), sendo 20 amostras de café convencional e 10 amostras de café orgânico. O isolamento dos fungos filamentosos foi realizado pela Técnica de Plaqueamento Direto em meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). A identificação foi realizada com base nas características macro e micro morfológicas e no potencial toxigênico pela técnica Plug Agar. De todas as amostras de grãos analisadas, 480 fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Circumdati* e à Seção *Nigri* foram isolados e identificados. As espécies ocratoxigênicas identificadas foram: *Aspergillus auricoumus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. niger* e *A. niger* Agregado. A espécie produtora de ocratoxina A mais frequente entre os isolados foi *A. ochraceus*, correspondendo a 89,55%. Não houve diferença estatística para presença das espécies identificadas e de *A. ochreus* ocratoxigênicos entre os sistemas de cultivo convencional e orgânico, o que sugere que o risco de contaminação é igual para os dois sistemas de cultivo. Também foi possível observar que nem todos os isolados de *A. ochraceus* foram produtores de ocratoxina A, ou seja, a presença dessa espécie ocratoxigênica não implica a produção da micotoxina *in vitro*.

Palavras-chave: *Aspergillus ochraceus*. Ocratoxina A. Café arábica.

ABSTRACT

Some species of fungi of *Aspergillus* and *Penicillium* genus produce a toxic secondary metabolite, called mycotoxins, among which the most studies on fruit and coffee beans is ochratoxin A. In coffee, the microorganisms of more relevance in the production of this mycotoxin belong to the *Aspergillus* genus, *Circumdati* Section and *Nigri* Section. This study aimed to investigate the incidence of ochratoxigenic fungal and identify the species isolated from coffee beans from organic and conventional crops in the south of Minas Gerais. Thirty samples of arabica coffee beans (*Coffea arabica* L.) were analysed, 20 samples of conventional coffee and 10 samples of organic coffee. The isolation of filamentous fungi was done by Direct Plating Technique in Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC). The identification was based on macro and micro morphological characteristics and potential toxigenic was based in Plug Agar technique. Of all the grain samples analyzed, 480 filamentous fungi belonging to *Aspergillus*, *Circumdati* Section and *Nigri* Section were isolated. Ochratoxigenic species identified were: *Aspergillus auricoumus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus* and *A. niger* Aggregate. The species producing ochratoxin A that was more frequently isolated was *A. ochraceus*, corresponding to 89.55%. There were no statistical difference for presence of identified species of *Aspergillus* and *A. ochreus* ochratoxigenic between systems of conventional and organic crops, which suggests that the risk of contamination is the same for both cropping systems. It was also noted that not all isolates of *A. ochraceus* were producers of ochratoxin A, the presence of this species ochratoxigenic not entail the production of ocratoxina A *in vitro*.

Keywords: *Aspergillus ochraceus*. Ochratoxin A. Arabic coffee.

1 INTRODUÇÃO

Como nos demais produtos agrícolas, os frutos e grãos de café estão sujeitos à contaminação por microrganismos durante diferentes fases de desenvolvimento, do campo até a estocagem (DUARTE; PENA; LINO, 2010; NOONIM et al., 2008; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; VILELA et al., 2010). A presença desses fungos não afeta apenas a qualidade do café, sabor, aroma e bebida, como também coloca em risco a segurança do produto final devido à produção de metabólitos secundários tóxicos, as micotoxinas, que podem ser nocivos aos consumidores (BATISTA et al., 2003; VILELA et al., 2010).

Entre as micotoxinas de importância para saúde humana a mais estudada em grãos e derivados do café é a ocratoxina A (BATISTA et al., 2009; FERRAZ et al., 2010). Esse metabólito secundário possui efeito teratogênico, nefrotóxico, imunossupressor, possível carcinogênico (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 1993; JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES - JECFA, 2001).

Vários trabalhos foram realizados analisando presença de fungos e potencial ocratoxigênico em grãos e frutos de café (BATISTA et al., 2009; NOONIM et al., 2008; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; VILELA et al., 2010). No café, o principal gênero produtor dessa micotoxina é *Aspergillus* Seção *Circumdati* e Seção *Nigri* (BATISTA et al., 2003, 2009; GIL-SERNA et al., 2011). As principais espécies do gênero *Aspergillus* produtores de ocratoxina A são *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. sulphureus*, *A. sclerotiorum* e *A. westerdijkiae* (BATISTA et al., 2009; FRISVAD et al., 2004; GIL-SERNA et al., 2011; PERRONE et al., 2007; SAMSON et al., 2004; TANIWAKI et al., 2003; ZINEDINE; MAÑES, 2009). *Aspergillus ochraceus* é comumente encontrado em grãos de café e é um importante produtor de ocratoxina A

(BATISTA et al., 2009; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004b; VILELA et al., 2010). *Aspergillus carbonarius* é comum em vinho e em café robusta, sua presença em grãos de café no Brasil é pouco frequente, ao contrário da Tailândia, onde essa espécie é comumente isolada (NOONIM et al., 2008; TANIWAKI et al., 2003).

Este estudo teve como objetivo identificar fungos toxigênicos em grãos de café de cultivo orgânico e convencional da região sul de Minas Gerais, bem como avaliar qual sistema de cultivo apresenta maior risco de contaminação com ocratoxina A produzidas por fungos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foram analisadas 30 amostras (Tabela 1) de grãos de café arábica (*Coffea arabica* L.) cedidas pelas Cooperativas dos municípios de Lavras e Poço Fundo – MG. Dessas amostras, 10 eram de café orgânico e 20 de café convencional. As amostras foram analisadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos – Micologia e Micotoxinas - do Departamento de Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Lavras.

Tabela 1 Amostras de café estudadas. Lavras, 2010

Nº de amostras	Café	Colheita	Cidade
5	Orgânico	Pano	Poço Fundo
3	Orgânico	Varrição	Poço Fundo
1	Orgânico	Pano	Sto. Ato. Amparo
1	Orgânico	Varrição	Sto. Ato. Amparo
4	Convencional	Varrição	Poço Fundo
4	Convencional	Pano	Poço Fundo
12	Convencional	Pano	Lavras

2.2 Isolamento dos fungos

Para o isolamento dos fungos filamentos contaminantes dos grãos de café, foi utilizada a Técnica de Plaqueamento Direto em meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) sendo 100 grãos de café sem desinfecção superficial e 100 grãos com desinfecção superficial com álcool 70% e hipoclorito a 1%, conforme Samson et al. (2000). As placas foram incubadas em BOD de 25 °C por 5-7 dias.

2.3 Identificação de espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*

Os fungos isolados foram purificados e identificados conforme Klich (2002), Pitt (2000), Pitt e Hocking (1997) e Samson et al. (2000).

As culturas foram purificadas em Malt Agar 2% (MA) a 25 °C, logo após os isolados foram inoculados em placa de Petri contendo os meios de cultura padronizados conforme os manuais de identificação, Czapeck Yeast Agar (CYA), incubados às temperaturas de 25 °C e 37 °C por 7 dias e Malt Extract Agar (MEA) a 25 °C por 7 dias. Após o crescimento, foram observadas as características morfológicas (macroscópicas e microscópicas) descritas conforme Klich (2002).

2.4 Determinação da produção de ocratoxina A por fungos pelo método Plug Agar

Para determinação do potencial de produção de ocratoxina A, os isolados da Seção *Circumdati* foram inoculados em meio YES (Yeast Extract Sucrose Agar) e os da Seção *Nigri* CYA (Czapek Yeast Agar) a 25 °C por 7 dias, conforme Filtenborg e Frisvad (1980). Foi utilizado o padrão de OTA (Sigma-Aldrich), Placas de Cromatografia de Camada Delgada (Merk-Sílica Gel 60, 20x20) e como Fase móvel TEF-Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (60:30:10).

2.5 Análise estatística

Para correlacionar os níveis de contaminação com fungos produtores de ocratoxina A nas amostras de grãos de café dos dois sistemas de cultivo, foi utilizado o método de análise de correspondência simples, conforme descrito por

Greenacre (1993). Esta técnica consiste na aplicação dos componentes principais, como a tabela de contingência, neste caso, a tabela mostra o nível de frequência de contaminação em uma coluna e o tipo de café em linhas. A proporção de café total da amostra corresponde ao perfil das variáveis indicadas na coluna. Analogamente, o perfil para as variáveis de linhas é produzido. Quanto à análise de comparação entre as Seções *Circumdati* e *Nigri* nos dois sistemas de cultivo, foi feita uma análise descritiva simples de médias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras analisadas, 100% foram contaminados com fungos (Tabela 2). Os principais gêneros encontrados neste estudo também foram detectados em grãos de café de outras pesquisas realizadas no Brasil e no exterior: *Aspergillus*, Seções *Circumdati*, *Flavi*, *Fumigati*, *Nigri* e *Versicolor* (BATISTA et al., 2009; PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009; VILELA et al., 2010), *Cladosporium* (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; VILELA et al., 2010), *Eurotium* (JOOSTEN et al., 2001), *Fusarium* (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; VILELA et al., 2010), Leveduras (PARDO et al., 2004; VILELA et al., 2010), *Mucor* (BOKHARI, 2007), *Penicillium* (PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009; VILELA et al., 2010), *Rizopus* (LEONG et al., 2007; PARDO et al., 2004) e *Tricoderma*.

Tabela 2 Porcentagem de fungos encontrados em grãos de café de cultivo convencional e orgânico após plaqueamento com e sem desinfecção superficial. Lavras, 2010

Fungos	Orgânico com Desinfecção	Orgânico sem Desinfecção	Convencional com Desinfecção	Convencional sem Desinfecção
<i>Aspergillus</i>	3,6	49,8	7,6	62,3
<i>Cladosporium</i>	0,9	0,08	6,9	5,0
<i>Eurotium</i>	0,24	0	0,4	1,8
<i>Fusarium</i>	53,1	33,3	28,5	24,1
<i>Mucor</i>	0,5	0	0	0,9
<i>Penicillium</i>	5,3	11,8	3,9	4,9
<i>Rhizopus</i>	0	0,3	0,7	0,2
<i>Tricotherma</i>	0	0	0	0,16
Leveduras	36,4	4,9	51,9	0,6

Analisando os grãos plaqueados sem desinfecção, o gênero *Aspergillus*, que é alvo de estudo comum entre pesquisadores da área, foi encontrado em

aproximadamente 58,7% das amostras. Pardo et al. (2004) encontraram incidência de 93% de contaminação dos grãos de café com fungos do gênero *Aspergillus*. Bokhari (2007) estudou os fungos ocratoxigênicos em grãos de café da Arábia Saudita e o gênero *Aspergillus* também foi predominante.

Os *Aspergillus* da Seção *Circumdati* e *Nigri* corresponderam a 56,54% do total de fungos contaminantes dos grãos de café. Esse resultado foi semelhante ao de Batista et al. (2003), que observaram 54,78% para as mesmas seções do gênero. Leong et al. (2007) encontraram estas duas seções responsáveis por 75% da contaminação nas amostras de café. Neste trabalho, a Seção *Circumdati* correspondeu a 27,29% e a Seção *Nigri* a 29,25% do total de isolados. Em um estudo realizado por Batista et al. (2009), 41% dos isolados identificados pertenciam à Seção *Circumdati* e 25% à Seção *Nigri*. Pardo et al. (2004) encontraram 67,40% de grãos infectados com *Aspergillus* seção *Nigri*. No presente estudo, observou-se distribuição uniforme de fungos filamentosos da Seção *Circumdati* e Seção *Nigri* entre as amostras de café orgânico e convencional (Figuras 1 e 2; Tabelas 3 e 4). Batista et al. (2003) também relataram distribuição uniforme dos fungos filamentosos em amostras de café entre regiões estudadas.

Tabela 3 Análise de variância para a contagem de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*. Lavras, 2010

FV ^a	GL ^b	SQ ^c	QM ^d	F ^e	Valor-P ^f
Colheita	1	22.342	22.342	4.69	0.049
Café	1	4.935	4.935	1.04	0.329
Colheita*Café	1	0.009	0.009	0.00	0.967
Erro	12	57.136	4.761		
Total	15	82.191			

OBS: Dados transformados pela raiz quadrada

^a FV – Fonte de variação

^b GL – Grau de liberdade

^c SQ – Soma dos quadrados

^d QM – Quadrado médio

^e F – Teste de F

^f Valor-P – Nível de significância

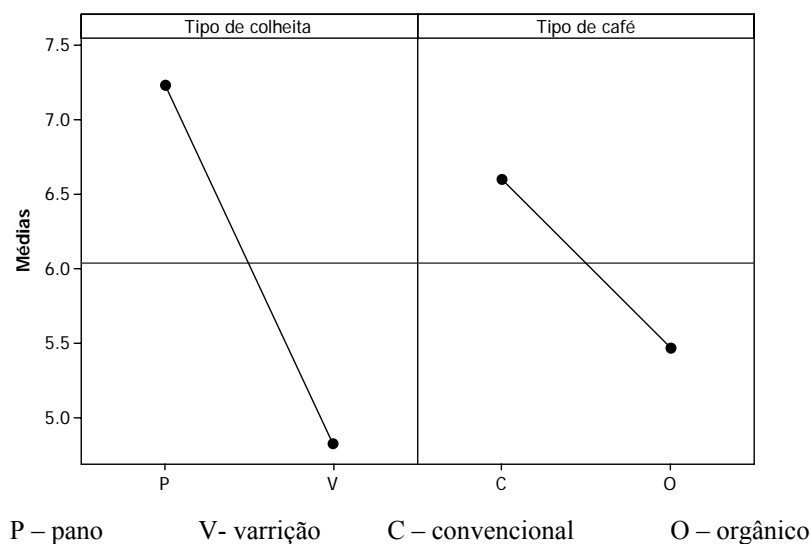


Figura 1 Principais efeitos das médias dos fatores tipo de colheita e tipo de café para os fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* (dados transformados pela raiz quadrada)

Tabela 4 Análise de variância para a contagem de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*. Lavras, 2010

FV ^a	GL ^b	SQ ^c	QM ^d	F ^e	Valor-P ^f
Colheita	1	1.071	1.071	0.19	0.672
Café	1	1.016	1.016	0.18	0.680
Colheita*Café	1	0.007	0.007	0.00	0.973
Erro	12	68.377	68.377		
Total	15	70.811	70.811		

OBS: Dados transformados pela raiz quadrada.

^a FV – Fonte de variação

^b GL – Grau de liberdade

^c SQ – Soma dos quadrados

^d QM – Quadrado médio

^e F – Teste de F

^f Valor-P – Nível de significância

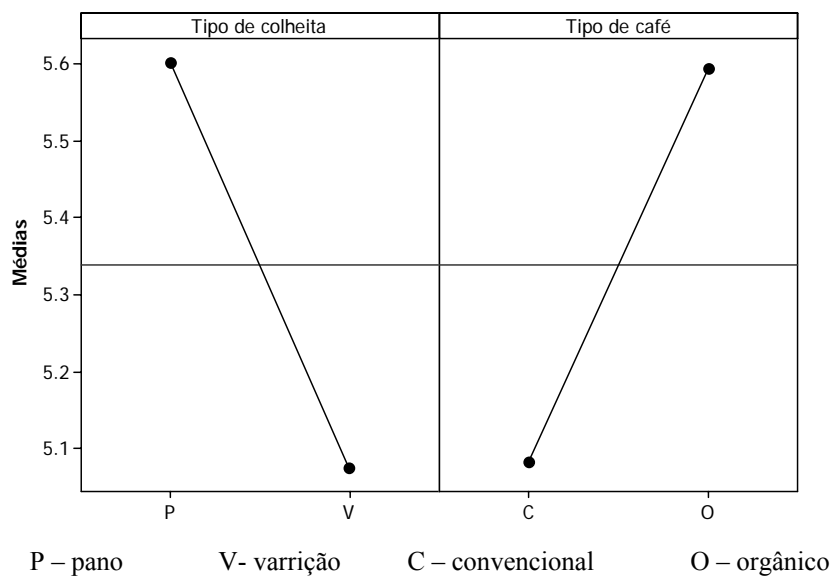


Figura 2 Principais efeitos das médias dos fatores tipo de colheita e tipo de café para os fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* (dados transformados pela raiz quadrada)

Considerando os sistemas de cultivo separadamente, no sistema orgânico, os *Aspergillus* da Seção *Circumdati* e *Nigri* corresponderam a 48,14% do total de fungos contaminantes dos grãos, 25,31% dos isolados foram identificados como Seção *Circumdati* e 22,82% como Seção *Nigri*. No sistema convencional, os *Aspergillus* da Seção *Circumdati* e *Nigri* corresponderam a 59,97% do total de fungos contaminantes, 28,10% Seção *Circumdati* e 31,87% Seção *Nigri*. As Figuras 1 e 2 e as Tabelas 3 e 4 apresentam análise estatística das contaminações com gênero *Aspergillus* da Seção *Circumdati* e Seção *Nigri* em amostras de grãos de café de cultivo convencional e orgânico. Estatisticamente, as diferenças encontradas não foram significativas.

Ainda analisando as Tabelas 3 e 4 e as Figuras 1 e 2, o tipo de colheita pano apresentou diferença significativa para fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*. Os frutos de café colhidos em pano são frutos que estavam no cafeeiro, podendo estar nos estádios verdes, maduros ou passa (BATISTA et al., 2009), e recebem maior insolação. Os Black *Aspergillus* são mais resistentes à luz UV devido à coloração dos esporos, o que confere maior capacidade de competição pelo substrato, e pode justificar a presença de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* no pano (ABARCA et al., 2003; DUARTE; PENA; LINO, 2010; PITT; HOCKING, 1997; ROMERO et al., 2005). O pano utilizado na colheita também poderia estar contaminado com esporos de fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri*, e facilitar a contaminação dos frutos e grãos de café.

De todas as amostras analisadas foram obtidos e identificados 480 isolados do gênero *Aspergillus*, com base nas características morfológicas. Desses isolados, 277 eram do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* e 203 Seção *Circumdati*. Da seção *Circumdati*, a espécie mais comum tanto para café de cultivo convencional quanto orgânico foi *A. ochraceus* (169) (Figura 3), representando 35,20% do total de isolados, proporção semelhante às relatadas em outros estudos com frutos e grãos de café (BATISTA et al., 2003; SILVA;

BATISTA; SCHWAN, 2008; TANIWAKI et al., 2003). Outros autores encontraram proporções diferentes à deste estudo, como Urbano et al. (2001), que relataram 10.3% de *A. ochraceus* entre isolados de grãos de café convencional, a maioria deles detectados também em café arábica no estágio de secagem. Batista et al. (2009) encontraram *Aspergillus ochraceus* também como espécie mais comum, no entanto, em maior proporção (93%). Em outro estudo, Batista e Chalfoun (2007) encontraram resultado semelhante, 91,81% de *A. ochraceus* em diferentes frações de café. A variação encontrada entre os autores citados anteriormente pode ser devido às diferentes cultivares, localidades e ano de estudo. Devido à especial importância dessa espécie para a qualidade e segurança do café, em função de sua ampla distribuição e potencial toxigênico, *A. ochraceus* tem sido alvo de inúmeros estudos com grãos e frutos de café (BATISTA et al., 2003; SILVA et al., 2000; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004a; TANIWAKI et al., 2003; VILELA et al., 2010).

Considerando todas as amostras, a espécie do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* mais comum no sistema de cultivo convencional foi *A. tubingensis* (Figura 4) com 42,70% dos isolados. No sistema de cultivo orgânico, a principal espécie foi *A. foetidus* (Figura 4) com 35,80%. Trabalhos semelhantes, com grão de café verde, entretanto apenas com sistema de cultivo convencional, foram realizados no Brasil (TANIWAKI et al., 2003) e em outros países, como Arábia Saudita (BOKHARI, 2007) e Vietnã (ILIC et al., 2007; LEONG et al., 2007), em todos estes estudos *A. niger* foi a espécie predominante. *A. niger* é amplamente distribuído no ambiente (URBANO et al., 2001) e é isolado não apenas de grãos de café, mas também de outros alimentos como uva e derivados (MAGNOLI et al., 2004; PERRONE et al., 2007). As concentrações de ocratoxina A e espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos em uvas cultivadas em sistema convencional e orgânico foram analisadas por Ponsone et al. (2007), estes autores observaram

que a presença desses fungos não é influenciada pelo sistema de cultivo e sim pelo estágio de maturação dos frutos.

As demais espécies encontradas neste trabalho (Figura 3) também foram identificadas em outras pesquisas com café, como *A. auricomus* (19 isolados) e *A. sulphureus* (8 isolados), que também foram relatados por Batista et al. (2009), *A. niger* e *A. niger* Agregado (Figura 4) relatados por Batista et al. (2009) e Silva, Batista e Schwan (2008).

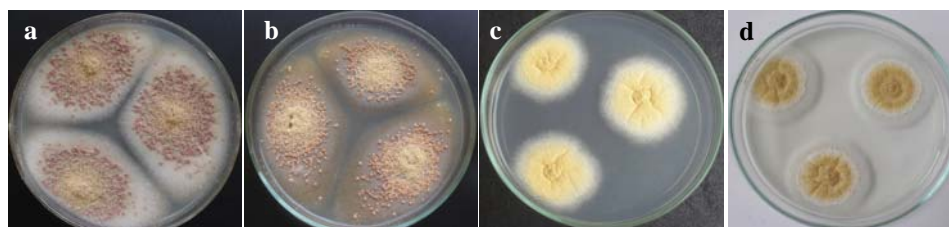


Figura 3 *Aspergillus* Seção *Circumdati* em meio CYA 25 °C. (a) *A. ochraceus*; (b) *A. auricomus*; (c) *A. sulphureus*; (d) *A. ostianus*

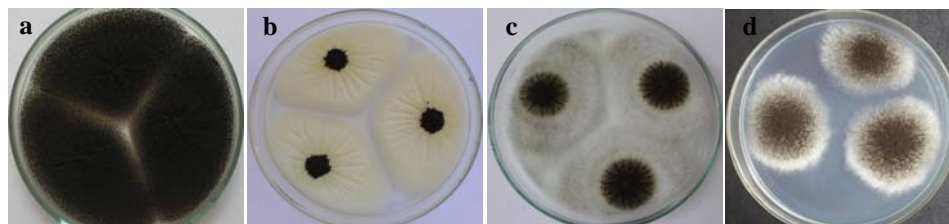


Figura 4 *Aspergillus* Seção *Nigri* em meio CYA 25 °C. (a) *A. niger*; (b) *A. niger* Agregado; (c) *A. tubingensis*; (d) *A. foetidus*

Todos os 480 isolados foram testados quanto à capacidade de produzir ocratoxina A pela técnica Plug Agar. Considerando as 30 amostras de grãos de café, *A. ochraceus* foi a principal espécie produtora desta micotoxina, resultados semelhantes foram encontrados por Batista et al. (2003).

Analisando as oito amostras de café de cultivo convencional e as oito de cultivo orgânico procedentes da região de Poço Fundo - MG, foi possível observar que dos 107 isolados da Seção *Circumdati*, 62,62% (n = 67) produziram ocratoxina A (Tabela 5).

Tabela 5 Identificação de espécies e isolados potencialmente toxigênicos. Amostras da mesma região de Poço Fundo. Lavras, 2010

Espécie	No. De isolados identificados	No. De isolados potencialmente toxigênicos^a
Café orgânico (8)		
Seção <i>Circumdati</i>		
<i>A. auricomus</i>	7	4
<i>A. ochraceus</i>	49	32
<i>A. ostianus</i>	1	1
<i>A. sulphureus</i>	2	ND
Seção <i>Nigri</i>		
<i>A. foetidus</i>	22	ND
<i>A. niger</i>	7	ND
<i>A. niger</i> Agregado	10	2
<i>A. tubingensis</i>	12	ND
Café convencional (8)		
Seção <i>Circumdati</i>		
<i>A. auricomus</i>	ND	ND
<i>A. ochraceus</i>	45	28
<i>A. ostianus</i>	2	2
<i>A. sulphureus</i>	1	ND
Seção <i>Nigri</i>		
<i>A. foetidus</i>	20	ND
<i>A. niger</i>	33	4
<i>A. niger</i> Agregado	15	ND
<i>A. tubingensis</i>	13	ND

^a ND – não detectado pelo método Plug Agar.

Os valores foram aproximados dos obtidos por Batista et al. (2003), que identificaram 74,6% das espécies da Seção *Circumdati* como produtoras de ocratoxina A, em grãos de café convencional. Dos fungos produtores de ocratoxina A, a principal espécie produtora foi *A. ochraceus* 89,55% (Tabela 5). Entre os isolados de *A. auricomus* e *A. ostianus* observou-se isolados capazes de produzir a micotoxina (Tabela 5) Batista et al. (2003, 2009) também relataram essas espécies como potencialmente ocratoxigênicas.

Apesar da análise de correspondência não estabelecer a significância estatística das associações e não avaliar o efeito independente de cada característica, esta análise combina vantagens de métodos não lineares e de métodos multidimensionais, o que permite a descrição das características que ocorrem conjuntamente na cultura do café, e a identificação de perfis diferenciados das espécies ocratoxigênicas encontradas. Através do mapa (Figura 5) gerado a partir da análise de correspondência, foi possível observar que nas amostras de café da região de Poço Fundo, *A. ochraceus* foi a espécie produtora de toxina encontrada com maior frequência em ambos os sistemas de cultivo. A similaridade da frequência dessa espécie foi notória nos dois sistemas de cultivo avaliados, bem como o tipo de colheita (pano e varrição). Em se tratando das demais espécies (*A. niger* e *A. niger* Agregado), verifica-se que nenhum sistema de cultivo e tipo de colheita caracterizou-se quanto à presença do isolado.

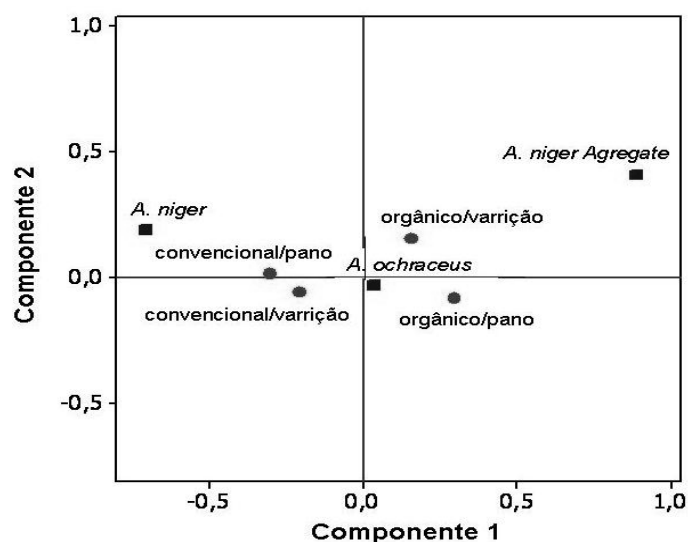


Figura 5 Mapa perceptual das associações entre fungos filamentosos e colheita do café de amostras da região de Poço Fundo

Quanto às espécies produtoras de ocratoxina A relatadas por outros autores, Batista et al. (2003) encontraram *A. ochraceus* e *A. sulphureus* como as principais espécies, Pardo et al. (2004) encontraram 23.1% de *Aspergillus ochraceus* produtores de ocratoxina A. Urbano et al. (2001) obtiveram resultados semelhantes aos do presente trabalho, com 88.1% de *A. ochraceus* produtores da toxina. Batista et al. (2009) analisaram fungos ocratoxigênicos em grãos de café convencional processados por via úmida e via seca, dos fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati*, 92,69% foram identificados como *A. ochraceus* e destes, 95% produziram ocratoxina A. Taniwaki et al. (2003) encontraram 75% desta espécie com capacidade de produzir tal toxina.

Além dessas espécies relatadas como produtoras de ocratoxina A, estudos recentes também mostram a possibilidade de outras espécies serem potencialmente produtoras da micotoxina em café, como *A. elegans*, *A. steynii* e *A. westerdijkiae* (BATISTA et al., 2009; GIL-SERNA et al., 2011; PARDO et

al., 2006). Gil-Serna et al. (2011) afirmam que as espécies de *A. steynii* e *A. westerdijkiae* podem representar maior risco de produção da micotoxina devido à sua capacidade de produzir grande quantidade da mesma e a diversidade de alimentos que essas espécies podem contaminar, contudo, esses autores não descartam a possibilidade de que *A. elegans* e *A. ochraceus* produzam a mesma toxina.

Ainda comparando os resultados das amostras de grãos de café da região de Poço Fundo, dos 132 isolados da Seção *Nigri* 4,54% foram capazes de produzir ocratoxina A (Tabela 3). Pardo et al. (2004) encontraram 7,3% dos isolados da Seção *Nigri* como produtores da ocratoxina A, já Urbano et al. (2001) encontraram 11.5% em estudo semelhante, diferindo desses resultados, Batista et al. (2003, 2009) não encontraram nenhum dos isolados da Seção *Nigri* ocratoxigênicos.

Dos isolados produtores de ocratoxina A pertencentes à Seção *Nigri* analisados neste trabalho, quatro (10%) eram *A. niger* e dois (8%) *A. niger* Agregado. Este resultado vai de acordo com o relatado por Noonim et al. (2008), que encontrou apenas 13% dos isolados de *A. niger* como produtores de ocratoxina A.

Não foi encontrado no presente trabalho *A. carbonarius* que é descrito por outros pesquisadores como uma importante espécie produtora de ocratoxina A. *Aspergillus carbonarius* é a espécie da Seção *Nigri* com maior potencial de produção de ocratoxina A (PARDO et al., 2004), entretanto, não é uma espécie tão comum em grãos de café quanto *A. niger* (NOONIM et al., 2008). Essa afirmação foi reforçada pelos estudos de Taniwaki et al. (2003), que encontram 62,95% de *A. niger* e 6,19% de *A. carbonarius* em grãos de café e identificaram como ocratoxigênicos apenas 3% dos isolados de *A. niger* enquanto nos isolados de *A. carbonarius* essa proporção foi de 77%. Noonim et al. (2008) e Pardo et al.

(2004) observaram que a contaminação com *A. carbonarius* é ligeiramente superior em café robusta do que em café arábica.

De acordo com Mühlencoert et al. (2004) a divergência em alguns casos sobre a produção de ocratoxina A em *Aspergillus* sugere que a síntese de ocratoxina A é dependente da interação de vários fatores ambientais mais do que o simples fato de crescimento, ou seja, a incapacidade de produzir ocratoxina A em determinadas condições não justifica qualquer conclusão sobre a habilidade geral para a produção da micotoxina. A produção de metabólitos secundários como as micotoxinas não são essenciais para o organismo. Os fatores ambientais irão regular os genes e enzimas envolvidas na produção de ocratoxina A (MÜHLENCOERT et al., 2004).

4 CONCLUSÃO

Os sistemas de cultivo de café orgânico e convencional não se diferiram quanto à contaminação dos grãos por espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* e Seção *Circumdati*. Também não houve diferença quanto à ocorrência de *A. ochraceus*, que foi a principal espécie ocratoxigênica encontrada, o que permite afirmar que não há influência do sistema de cultivo sobre a contaminação por espécies de *Aspergillus* e nem sobre a ocorrência de espécies ocratoxigênicas pertencentes a esse gênero, ou seja, ambos os sistemas de cultivo apresentam os mesmos riscos de contaminação.

Também pode-se concluir que nem todos os isolados da espécie *A. ochraceus* foram produtores da ocratoxina A. Portanto, apenas a presença dessa espécie ocratoxigênica não implica que haverá, necessariamente, produção da micotoxina.

REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L. et al. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 66, n. 3, p. 504-506, Mar. 2003.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de ochratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun. 2007.

BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2009.

_____. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Sept. 2003.

BOKHARI, F. M. Mycotoxins and toxigenic fungi in arabic coffee beans in Saudi Arabia. **Advances in Biological Research**, Islamabad, v. 1, n. 1/2, p. 56-66, Jan./Apr. 2007.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Ochratoxina A non-conventional sources: a review. **Microchemical Journal**, New York, v. 93, n. 2, p. 115-120, Nov. 2009.

_____. Review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 2, p. 187-198, Apr. 2010.

FERRAZ, M. B. M. et al. Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 6, p. 872-877, June 2010.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic molds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, London, v. 13, n. 3, p. 128-130, Sept. 1980.

FRISVAD, J. C. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 50, n. 4, p. 23-43, Oct. 2004.

GIL-SERNA, J. et al. Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* Section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 2, p. 343-345, Feb. 2011.

GREENACRE, M. **Correspondence analysis in practice**. New York: Academic, 1993. 270 p.

ILIC, Z. et al. Survey of Vietnamese coffee beans for the presence of ochratoxigenic *Aspergilli*. **Mycopathologia**, New York, v. 163, n. 3, p. 177-182, Mar. 2007.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, v. 56, n. 3, p. 489-521, June 1993.

JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Buenos Aires, 2001. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm#1.0>>. Acesso em: 21 abr. 2010.

JOOSTEN, H. M. L. J. et al. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 1/2, p. 39-44, Apr. 2001.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002. 116 p.

LEONG, S. L. et al. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 301-306, Sept. 2007.

MAGNOLI, C. et al. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina market. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 179-184, Aug. 2003.

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

NOONIM, P. et al. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A- producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 197-202, Dec. 2008.

PARDO, E. et al. Non-specificity of nutritional substrate for ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus*. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 4, p. 351-358, June 2006.

_____. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, London, v. 10, n. 1, p. 45-50, Feb. 2004.

PASIN, L. A. A. P.; ALMEIDA, J. R.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 1129-1132, out. 2009.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Micology**, Netherlands, v. 59, n. 1, p. 53-66, Dec. 2007.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 17-22, Dec. 2000.

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

PONSONE, M. L. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 131-135, Mar. 2007.

ROMERO, S. M. et al. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 104, n. 1, p. 43-49, Sept. 2005.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food and airborne fungi**. Centraalbureau: Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000. 260 p.

_____. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* Section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 50, n. 1, p. 45-61, Oct. 2004.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. B.; SCHWAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 521-526, July/Sept. 2008.

SILVA, C. F. et al. Microbial diversity during maturation and natural producessing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 1/2, p. 251-260, Sept. 2000.

SILVA, R. A. et al. Inquérito sobre o consumo de alimentos possíveis de contaminação por micotoxinas na ingesta alimentar de escolares da cidade de Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 439-447, mar./abr. 2007.

SUÁREZ-QUIROZ, M. et al. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 629-634, Dec. 2004a.

_____. Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science and Technology**, Weinheim, v. 39, n. 5, p. 501-507, May 2004b.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

URBANO, G. R. et al. Occurrence of ochratoxin A-production fungi in raw Brazilian coffee. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, Aug. 2001.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, Dec. 2010.

ZINEDINE, A.; MAÑES, J. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 4, p. 334-344, Apr. 2009.

APÍTULO 3 Incidência de ocratoxina A em grãos de café de cultivo convencional e orgânico

RESUMO

Ocratoxina A é a micotoxina mais relevante e mais estudada em grãos de café e derivados, por ser comum nesse substrato e tóxica para humanos e animais. Vários fungos podem produzir a ocratoxina A, por exemplo, espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Em países de clima tropical espécies ocratoxigênicas do gênero *Aspergillus* são mais comuns. O presente trabalho objetivou quantificar ocratoxina A presente em grãos de café de cultivo convencional e orgânico da região sul de Minas Gerais e comparar a ocorrência de espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri*, produtoras de ocratoxina A. Foram analisadas 30 amostras de grãos de café arábica (*Coffea arabica* L.), sendo 20 amostras de café convencional e 10 amostras de café orgânico. A incidência de ocratoxina A nas amostras de grãos de café foi realizada por CLAE. Das amostras analisadas isolou-se 480 fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* Seções *Circumdati* e *Nigri*. Em todas as amostras de grãos de café, a principal espécie produtora de ocratoxina A foi *A. ochraceus* (83% dos isolados). Quanto à presença da ocratoxina A no grão, apenas uma amostra de café orgânico colhido por varrição, apresentou alguma concentração de ocratoxina, 1,12µg/Kg. Considerando-se esses resultados, pode-se afirmar que a presença de *A. ochraceus* produtor de ocratoxina A não implica na contaminação do grão pela micotoxina e que os dois sistemas de cultivo de café apresentam os mesmos riscos de contaminação. O fato de ter sido detectada micotoxina em uma única amostra de grãos de café indica que o café do sul de Minas Gerais possui boa qualidade quanto à segurança do produto.

Palavras-chave: *Aspergillus ochraceus*. Ocratoxina A. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

ABSTRACT

Mycotoxin ochratoxin A is the most important and the most studied in coffee beans and derivatives, because it is common on this substrate and it is toxic to humans and animals. Many fungi can produce ochratoxin A, for example, *Aspergillus* and *Penicillium* species. In tropical countries ochratoxigenic species of the *Aspergillus* genus are most common. This study aimed to quantify ochratoxin A present in coffee beans from conventional and organic crops in the south of Minas Gerais and compare the occurrence of some species of *Aspergillus*, *Circumdati* Section and *Nigri* Section, producers of ochratoxin A. 30 samples of arabica coffee beans (*Coffea arabica* L.) were analyzed, 20 samples of conventional coffee and 10 samples of organic coffee. The incidence of ochratoxin A in samples of coffee beans was done by HPLC. Among all samples were isolated 480 filamentous fungi of *Aspergillus* genus *Circumdati* and *Nigri* Sections. In all samples of coffee beans, the principal species producing ochratoxin A was *A. ochraceus* (83% of isolates). Regarding the presence of ochratoxin A in grain, only a sample of organic coffee harvested by brush, showed some concentration of OTA, 1.12 mg / kg. Considering these results, it can be argued that the presence of *A. ochraceus* producing ochratoxin A was not imply the mycotoxin contamination of grain and the two coffee cultivation systems have the same risk of contamination. The fact that mycotoxins have been detected in a single sample of coffee beans indicates that the coffee in southern Minas Gerais has good quality as the product safety.

Keywords: *Aspergillus ochraceus*. Ochratoxin A. High Performance Liquid Chromatography.

1 INTRODUÇÃO

A presença de ocratoxina A em fluidos corporais de humanos é associada à ingestão de alimentos contaminados (PRADO et al., 2008). São vários os efeitos nocivos da exposição à ocratoxina A (SHERIF; SALAMA; ABDEL, 2009). Esse metabólito secundário pode ter efeitos teratogênicos, nefrotóxico, imunossupressor, possível carcinogênico, classificada no grupo 2B (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 1993; JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES - JECFA, 2001). Caldas, Silva e Oliveira (2002) estimaram que aproximadamente 35% dos casos de câncer estão relacionados com a alimentação.

A micotoxina mais relevante no café é a ocratoxina A (BATISTA et al., 2003, 2009; PRADO et al., 2008). A ocorrência dessa micotoxina em grãos de café verde, torrado e solúvel produzidos no Brasil, tem sido alvo de estudo de muitos pesquisadores nos últimos anos (BATISTA et al., 2009; FERRAZ et al., 2010; PASIN; ALMEIDA; ABREU, 2009; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008). O café produzido no Brasil apresenta riscos de contaminação com a micotoxina e os níveis de contaminação variam significativamente. As concentrações relatadas vão de 0,12 µg/Kg até 109 µg/Kg (ALMEIDA et al., 2007; BATISTA et al., 2003; GOLLÜCKE; TANIWAKI; TAVARES, 2004; LEONI et al., 2001; PRADO et al., 2008; TANIWAKI et al., 2003).

Os resultados dos estudos da ocratoxina A em alimentos despertaram preocupação da União Européia, que estabeleceu legislação específica limitando em até 5 µg/Kg a concentração de ocratoxina A para grãos de café torrado e moído e 10 µg/Kg para café solúvel (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES - CEC, 2006; JECFA, 2001). Para grãos de café verde ainda não foi definido um limite (PRADO et al., 2008). Estes limites asseguram proteção à saúde dos consumidores contra os efeitos tóxicos da ocratoxina A

(BATISTA et al., 2003), já que o consumo de café representa risco de exposição a essa importante micotoxina (ILIC et al., 2007; PARDO et al., 2004). Além do café, a ocratoxina A pode ser encontrada em cereais (DUARTE; PENA; LINO, 2010), grãos (BATISTA et al., 2009), uva e derivados (CLOUVEL et al., 2008), entre outros.

A ocratoxina A em café é produzida por fungos do gênero *Aspergillus* Seções *Circumdati* e *Nigri* (BATISTA et al., 2009; GIL-SERNA et al., 2011). As principais espécies produtoras de ocratoxina A em café são: *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. sclerotiorum*, *A. steynii*, *A. sulphureus* e *A. westerdijkiae* (BATISTA et al., 2009; FRISVAD et al., 2004; GIL-SERNA et al., 2011; SAMSON et al., 2004; TANIWAKI et al., 2003; ZINEDINE; MAÑES, 2009).

Estudos realizados para avaliar a concentração de ocratoxina A em produtos agrícolas cultivados em sistema convencional e orgânico mostram maior tendência de contaminação dos produtos orgânicos do que os produtos convencionais (CZERWIECKI; CZAJKOWSKA; WITKOWSKA, 2002; GONZÁLEZ et al., 2006; JORGENSEN; JACOBSEN, 2002; JUAN et al., 2008). Jestoi et al. (2004), analisando os níveis de micotoxina em grãos, não observaram diferença significativa para a concentração da toxina entre sistema de cultivo convencional e orgânico, embora a concentração média total da micotoxina tenha sido ligeiramente superior para produtos orgânicos. Como os produtos orgânicos não recebem insumos químicos, os frutos e grãos estão expostos à contaminação com fungos, entre estes, os fungos potencialmente tóxicos (GONZÁLEZ et al., 2006; JESTOI et al., 2004; JUAN et al., 2008). Na realidade, a maioria dos estudos concluem que mais investigações são necessárias antes que possamos avaliar a segurança dos produtos agrícolas (JESTOI et al., 2004).

Este estudo teve como objetivo quantificar a ocratoxina A em grãos de café produzidos na região sul de Minas Gerais e comparar as concentrações nos sistemas de cultivo convencional e orgânico, além de avaliar a ocorrência de espécies ocratoxigênicas do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e *Nigri*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foram analisadas 30 amostras (Tabela 1) de grãos de café arábica (*Coffea arabica* L.) cedidas pelas Cooperativas dos municípios de Lavras e Poço Fundo – MG. Dessas amostras, 10 eram de café orgânico e 20 de café convencional. As amostras foram analisadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos – Micologia e Micotoxinas - do Departamento de Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Lavras.

Tabela 1 Amostras de café estudadas. Lavras, 2010

Amostras	Café	Colheita	Cidade
5	Orgânico	Pano	Poço Fundo
3	Orgânico	Varrição	Poço Fundo
1	Orgânico	Pano	Sto. Ato. Amparo
1	Orgânico	Varrição	Sto. Ato. Amparo
4	Convencional	Varrição	Poço Fundo
4	Convencional	Pano	Poço Fundo
12	Convencional	Pano	Lavras

2.2 Isolamento dos fungos

Para o isolamento dos fungos filamentos associados aos grãos de café, foi utilizada a Técnica de Plaqueamento Direto em meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) sendo 100 grãos de café sem desinfecção superficial e 100 grãos com desinfecção superficial com hipoclorito a 1%, conforme Samson et al. (2000). As placas foram incubadas em BOD de 25 °C por 5-7 dias.

2.3 Identificação

Os fungos isolados foram purificados e identificados conforme Klich (2002), Pitt (2000), Pitt e Hocking (1997) e Samson et al. (2000).

2.4 Determinação da produção de ocratoxina A por fungos pelo método Plug Agar

Para determinação do potencial de produção de ocratoxina A, os isolados da Seção *Circumdati* foram inoculados em meio YES (Yeast Extract Sucrose Agar) e os da Seção *Nigri* CYA (Czapek Yeast Agar) a 25 °C por 7 dias, conforme Filtenborg e Frisvad (1980). Foi utilizado o padrão de OTA (Sigma-Aldrich), Placas de Cromatografia de Camada Delgada (Merk-Sílica Gel 60, 20x20) e como Fase móvel TEF-Tolueno Acetato de Etila e Ácido Fórmico 90% (60:30:10).

2.5 Análise de ocratoxina A em grãos de café

As análises de ocratoxina A foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no Laboratório de Micotoxinas da Fundação Ezequiel Dias – FUNED em Belo Horizonte-MG. A metodologia de extração e quantificação da ocratoxina A foi a descrita por Vargas e Santos (2005) e descrita a seguir:

2.5.1 Padrão de ocratoxina A e elaboração da curva de calibração

Foi utilizado padrão de ocratoxina A da marca Sigma (St. Louis, MO) e determinada a concentração conforme descrita na Association of Official

Analytical Chemists - AOAC (2000). A partir de uma solução estoque de padrão de ocratoxina A ($111,05 \mu\text{g mL}^{-1}$) em tolueno: ácido acético (99:1, v/v), foi preparada uma solução de concentração $11,105 \mu\text{g mL}^{-1}$ no mesmo solvente (Solução Intermediária 1). A partir desta foi preparada a Solução de Trabalho de concentração de ocratoxina A de $11,105 \text{ ng mL}^{-1}$ em tolueno:ácido acético (99:1, v/v). A partir da Solução de Trabalho foi elaborada, por diluições sucessivas, a curva de calibração, na faixa de 0,28 a $11,1 \text{ ng mL}^{-1}$.

2.5.2 Extração

As amostras de café de cultivo convencional e orgânico foram moídas em moedor de facas 20 mesh. Em Erlenmeyer de 500 mL foram pesados 12,5g do produto finamente triturado e adicionou-se 200 mL de uma mistura de metanol-bicarbonato de sódio 3% (1:1). O frasco foi fechado com parafilme e papel alumínio e colocado em agitador mecânico tipo shaker durante 30 minutos. Após um período de descanso, aproximadamente 2 minutos, as amostras foram filtradas em papel filtro Whatman N. 4 e posteriormente em microfibra Whatman GF/B de 47 mm de diâmetro, sob vácuo. Imediatamente, uma alíquota de 8 mL do filtrado foi transferida para um balão de 100 mL e diluída com 92 mL de solução tampão fosfato PBS (pH=7) e posteriormente homogeneizada.

2.5.3 Purificação em coluna de imunoafinidade

Foi aplicado todo o volume do extrato diluído em uma coluna de imunoafinidade Ochra Test WB Ref. G1033, em fluxo de 2-3 mL/min com auxílio de vácuo. A coluna foi lavada com 10 ml de água destilada em fluxo de 3 mL/min e deixada secar por gravidade. Seguiu então uma aplicação de vácuo

durante 30 s. A coluna foi então adaptada em uma seringa de vidro para a etapa de eluição.

2.5.4 Eluição da ocratoxina A

Foi aplicado 3 mL de metanol grau CLAE (3 back-flashing de 1 mL cada) e deixado em contato durante 3 minutos. A eluição foi feita por gravidade recolhendo o eluato em frasco âmbar. Seguiu-se a evaporação até secura, em temperatura de 40-50 °C, em corrente de nitrogênio. No momento da injeção no cromatógrafo líquido, o produto da evaporação foi ressuscitado em 500 µL de fase móvel (Acetonitrila, Metanol, Solução aquosa de ácido acético glacial (35+35+30, v/v/v). Seguiu-se homogeneização e filtração em unidade filtrante de celulose regenerada de 13 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm. Foi injetado, então, no cromatógrafo líquido, 50 µL de cada amostra e de cada solução da curva padrão de calibração de ocratoxina A. Os limites de detecção e quantificação da metodologia descrita são, respectivamente, 0,2 e 0,6 µg kg⁻¹.

2.5.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A separação e quantificação da ocratoxina A foi conduzida em um sistema de cromatografia líquida Shimadzu com detector de fluorescência (excitação: 330 nm e emissão: 470 nm) e com coluna Shim-pack CLC-ODS RP-18 de 5 µm, 4,6 x 250 mm, precedida de pré-coluna Shim-pack G-ODS, de 5 µm, 4,0 x 10 mm. A coluna foi lavada isocraticamente, a temperatura ambiente, em um fluxo de 0,8 mL/min. A fase móvel utilizada foi acetonitrila: metanol: solução aquosa de ácido acético (35:35:30, v/v/v) Nestas condições, o tempo de retenção foi aproximadamente de 10 min. A partir do cálculo da área do pico da

ocratoxina A das soluções dos extratos das amostras e padrões foi calculado o teor de ocratoxina A nas amostras.

Para avaliar a eficiência da metodologia utilizada e a performance do laboratório, amostra de café, isenta de ocratoxina A, foi contaminada, em triplicata, em 3 concentrações diferentes. Paralelamente, amostra de café torrado e moído, com teor conhecido de ocratoxina A, do Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS), Inglaterra, foi também analisado. Esta amostra faz parte do Ochratoxin Report No. 1733, Series 17, Round 33, Proficiency Testing.

2.5.6 Confirmação da ocratoxina A

A confirmação positiva de ocratoxina A foi evidenciada pelo desaparecimento do pico de ocratoxina A no tempo de retenção de aproximadamente 10 minutos e aparecimento de um novo pico (éster metílico de ocratoxina A) em um tempo de retenção para cerca de 37 minutos (PITTET et al., 1996).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado de ocratoxina A na amostra do Teste de Proficiência foi de 7,2 ng g⁻¹, para um valor teórico de 9,6 ng g⁻¹ e uma faixa aceitável de 5,4 a 13,8 ng g⁻¹. Os resultados obtidos de recuperação e coeficientes de variação (Tabela 2), nas amostras fortificadas com ocratoxina A em três diferentes concentrações foram superiores a 70% e inferiores a 20%, revelando que a metodologia utilizada está de acordo com o estabelecido pela Lei N.º 401/2006, de 23/02/2006 da Commission Regulation (CEC, 2006) e Horwitz, Kamps e Boyer (1980).

Tabela 2 Teste de recuperação de ocratoxina A em grãos de café verde. Lavras, 2010

Contaminação (µg/Kg)	Resultado (µg/Kg)	Recuperação (%)	Resultado médio (µg/Kg)	Recuperação média (%)
1,78	1,36	76	1,44	81
1,78	1,42	80		CV 6,2%
1,78	1,54	87		
2,66	1,97	74	2,61	98
2,66	2,78	104		CV 22,2%
2,66	3,09	116		
3,55	4,04	114	3,6	102
3,55	3,23	91		CV 11,4%
3,55	2,54	100		

A linearidade foi avaliada na faixa de 0,28 a 11,1 ng g⁻¹ e calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Foi utilizado o coeficiente de correlação linear (r^2) como indicador da reta como modelo matemático. Os valores sempre foram superiores a 0,99, conforme recomendado por Green (1996) (Figura 1).

Das 30 amostras de grãos de café analisadas quanto à presença da micotoxina e apenas em uma amostra (3,33%) foi detectada ocratoxina A

(Figura 2). O resultado da análise de concentração de ocratoxina A, apresentado na Tabela 3, revelou ainda que as amostras estavam dentro dos limites recomendados pela legislação Européia, que é de 5 µg/Kg para café torrado (CEC, 2006; JECFA, 2001). Resultados semelhantes foram encontrados por Batista et al. (2003), que analisaram 40 amostras de grãos de café processados e em nenhuma delas foram detectados valores de ocratoxina A acima de 5 µg/Kg (Tabela 4).

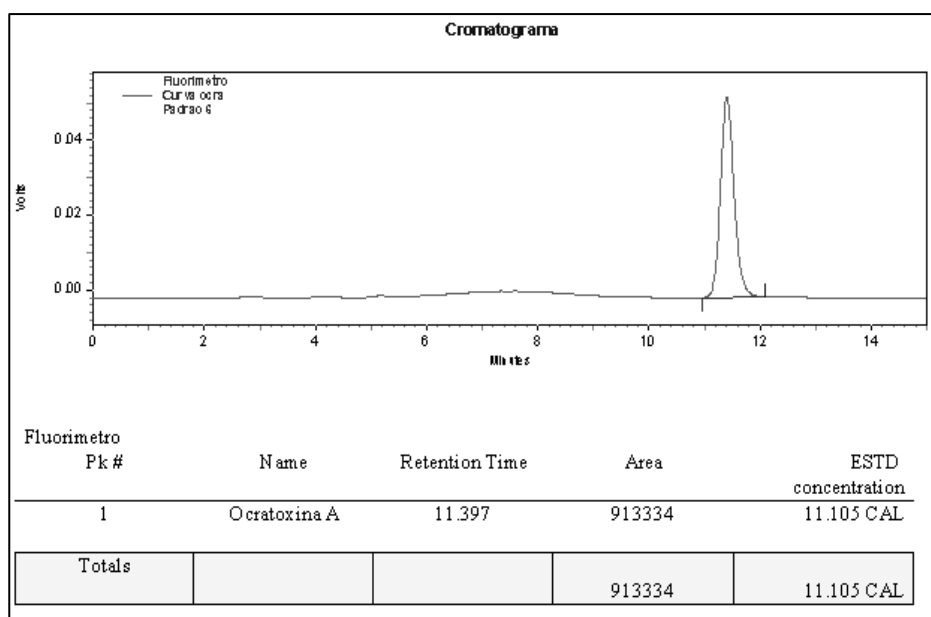


Figura 1 Cromatograma da curva de calibração com o padrão de ocratoxina A

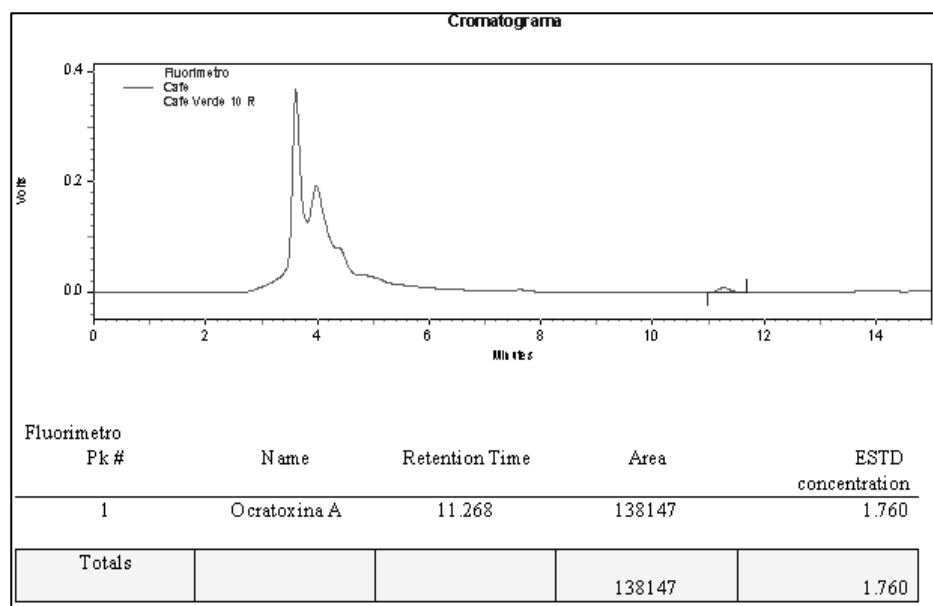


Figura 2 Cromatograma da confirmação da ocratoxina A na amostra

Baseado nos dados apresentados na Tabela 3, quanto à presença de fungo potencialmente produtor de ocratoxina A, *Aspergillus ochraceus* foi a espécie de maior ocorrência nos grãos de café (83%), independente do sistema de cultivo (análises demonstradas no capítulo 2). Em outros estudos, que também analisaram a ocorrência de ocratoxina A em café, *A. ochraceus* foi descrito como a principal espécie produtora da micotoxina (BATISTA et al., 2009; TANIWAKI et al., 2003; VILELA et al., 2010). Apesar da espécie ocratoxigênica *A. ochraceus*, ter sido encontrada em quase todas as amostras de grãos de café neste estudo, não foi detectada ocratoxina A em 29 das 30 amostras analisadas (Tabela 3) isso indica que a presença do fungo toxigênico não implica obrigatoriamente a presença da micotoxina no substrato colonizado.

Tabela 3 Relação entre o nível de contaminação com ocratoxina A e fungos potencialmente ocratoxigênicos presentes em grãos de café de cultivo convencional e orgânico. Lavras, 2010

Amostra	Região	Colheita	Nível de contaminação ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	No. (e espécie) fungos potencialmente ocratoxigênico*
1 orgânico	Poço Fundo	Pano	ND ^a	(1) 1. <i>A. niger</i> Agregado
2 orgânico	Poço Fundo	Pano	ND	(5) 1. <i>A. auricomus</i> 4. <i>A. ochraceus</i>
3 orgânico	Poço Fundo	Pano	ND	(10) 1. <i>A. auricomus</i> 9. <i>A. ochraceus</i>
4 orgânico	Poço Fundo	Pano	ND	(2) 2. <i>A. ochraceus</i>
5 orgânico	Poço Fundo	Pano	ND	(5) 4. <i>A. ochraceus</i> 1. <i>A. ostianus</i>
6 orgânico	Poço Fundo	Varrição	1,12	(3) 2. <i>A. ochraceus</i> 1. <i>A. niger</i> Agregado
7 orgânico	Poço Fundo	Varrição	ND	(4) 1. <i>A. auricomus</i> 3. <i>A. ochraceus</i>
8 orgânico	Poço Fundo	Varrição	ND	(9) 1. <i>A. auricomus</i> 8. <i>A. ochraceus</i>
Amostra	Região	Colheita	Nível de contaminação ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	No. (e espécie) fungos potencialmente ocratoxigênico*
9 orgânico	Sto. Ato. Amparo	Pano	ND	(5) 3. <i>A. ochraceus</i> 1. <i>A. ostianus</i> 1. <i>A. sulphureus</i>
10 orgânico	Sto. Ato. Amparo	Varrição	ND	(2) 2. <i>A. ochraceus</i>
11 convencional	Poço Fundo	Varrição	ND	(8) 8. <i>A. ochraceus</i>
13 convencional	Poço Fundo	Varrição	ND	(3) 2. <i>A. ochraceus</i> 1. <i>A. ostianus</i>
14 convencional	Poço Fundo	Varrição	ND	(9) 2. <i>A. niger</i> 6. <i>A. ochraceus</i> 1. <i>A. ostianus</i>
15 convencional	Poço Fundo	Pano	ND	(1) 1. <i>A. ochraceus</i>
17 convencional	Poço Fundo	Pano	ND	(7) 2. <i>A. niger</i> 5. <i>A. ochraceus</i>
18 convencional	Poço Fundo	Pano	ND	(6) 6. <i>A. ochraceus</i>

“Tabela 3, conclusão”

Amostra	Região	Colheita	Nível de contaminação (µg/Kg)	No. (e espécie) fungos potencialmente ocratoxigênico*
19 convencional	Lavras	Pano	ND	(3) 3. <i>A. ochraceus</i>
20 convencional	Lavras	Pano	ND	(3) 1. <i>A. niger</i> Agregado 2. <i>A. ochraceus</i>
22 convencional	Lavras	Pano	ND	(1) 1. <i>A. ochraceus</i>

^a ND – não detectável.

* Isolamento e identificação das espécies não apresentadas.

Amostras que não apresentaram contaminação fúngica e com ocratoxina A, não estão expressas na tabela.

Tabela 4 Concentração de ocratoxina A em grãos de café de diferentes regiões. Lavras, 2010

Amostras	Origem	OTA µg/Kg	Autor
132 amostras grãos	Brasil	0.7 – 47.8	Leoni et al. (2001)
40 amostras grãos	Brasil	0,64 - 4,14	Batista et al. (2003)
135 amostras grãos	Brasil	<0,2 - >100	Taniwaki et al. (2003)
37 amostras grãos	Brasil	<0.16 - 6.24	Gollücke, Taniwaki e Tavares (2004)
57 amostras grãos	Vários países	1.3 - 31.5	Pardo et al. (2004)
82 amostras grãos	Brasil	0,17 - 6,29	Almeida et al. (2007)
238 amostras diferentes frações de grãos	Brasil	0,1 - >100	Batista e Chauffoun (2007)
48 amostras grãos	Arábia Saudita	0,92 - 25,97	Bokhari (2007)
50 amostras grãos	Vietnã	0.8 - 1.8	Leong et al. (2007)
62 amostras grãos	Tailândia	0,60 – 27,0	Noonim et al. (2008)
71 amostras torrado e moído	Brasil	0,80 - 58,0	Prado et al. (2008)
289 amostras grãos	Brasil	0,10 – 189,0	Batista et al. (2009)
Cinco cultivares	Brasil	0	Pasin, Almeida e Abreu (2009)

Os resultados encontrados indicam que a contaminação com ocratoxina A é baixa quando comparados aos dados de outros trabalhos (Tabela 4). Pasin, Almeida e Abreu (2009) relataram ausência da ocratoxina A em todas as amostras estudadas, resultado semelhante ao deste estudo. A ausência da micotoxina sugere que boas práticas agrícolas no campo, pós-colheita e processamento do café foram realizadas (BATISTA et al., 2003; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008).

As amostras foram plaqueadas com e sem desinfecção superficial. A desinfecção superficial permite o isolamento e estudo dos fungos no interior dos grãos. Após a desinfecção superficial dos grãos de café, 5,6% da contaminação foram com espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e Seção *Nigri*. Os grãos plaqueados sem desinfecção superficial apresentaram 56,5% de contaminação com espécies do gênero *Aspergillus* Seção *Circumdati* e Seção *Nigri*. Além de fungos do gênero *Aspergillus*, outros microrganismos também podem contaminar os grãos e serem competidores pelo substrato, diminuindo o desenvolvimento dos fungos toxigênicos e a produção da micotoxina no grão. No café, o gênero *Fusarium* é competidor com as espécies ocratoxigênicas do gênero *Aspergillus* (SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008). As amostras que foram plaqueadas com desinfecção superficial apresentaram 39% de contaminação com fungos do gênero *Fusarium* e nas amostras plaqueadas sem a desinfecção superficial, a contaminação com esse gênero foi de 26,77%. Esses resultados sugerem que a baixa contaminação dos grãos com a ocratoxina A pode ser devido à presença reduzida dos fungos ocratoxigênicos e maior contaminação com fungos do gênero *Fusarium* no interior dos grãos.

Além disso, fatores ambientais podem atuar como uma barreira natural à produção de ocratoxina A no grão de café, por exemplo, condições climáticas, disponibilidade de nutrientes e composição química dos grãos de café, como níveis de cafeína e ácido clorogênico, o tempo para a produção da toxina foi

insuficiente, ou seja, não ocorreram as condições favoráveis para a produção de ocratoxina A (ASTORECA et al., 2009; BATISTA et al., 2009; ILIC et al., 2007; SILVA; BATISTA; SCHWAN, 2008; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004).

As condições ambientais favoráveis para a produção de ocratoxina A por *A. ochraceus* são: atividade de água entre 0,86 a 0,98 e temperatura de 25 °C a 35 °C (PALACIOS-CABEIRA et al., 2004, 2005; PARDO et al., 2006; SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004). Dessa forma, é evidente que a presença de micotoxinas no café indica falhas nas práticas de colheita, processamento e armazenamento dos grãos (PALACIOS-CABEIRA et al., 2005), principalmente no estágio de secagem, Silva, Batista e Schwan (2008) sugerem que ao final da secagem o grão deve ter 11% de umidade. Existe um perigoso potencial de contaminação com ocratoxina A em condições de estocagem. O uso de boas práticas de estocagem como, atividade de água abaixo de 0.93 e níveis de temperatura menores que 15 °C é de grande importância para controlar a presença de fungos e prevenir a contaminação por ocratoxina A em alimentos destinados ao consumo humano (ASTORECA et al., 2007).

Fujii et al. (2004) afirmam que a cafeína pode exercer efeito fungistático em grãos de café e sugerem que a ação inibitória no crescimento micelial decorre da similaridade estrutural entre purinas e cafeínas, ambos compostos cíclicos nitrogenados. A inibição competitiva reduziria a síntese de ácidos nucléicos, afetando conseqüentemente o desenvolvimento fúngico. Chalfoun, Pereira e Angélico (2000) e Pasin, Almeida e Abreu (2009) relataram que a cafeína pode exercer atividade biológica contra vários gêneros de fungos, inclusive os toxigênicos.

A ocratoxina A pode ser degradada do substrato sob influencia de outros microrganismos. Varga, Rigó e Téren (2000) observaram que *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* foram capazes de eliminar ocratoxina A do meio. A enzima carboxipeptidase secretada por *A. niger* pode decompor ocratoxina A em

fenilalanina e ocratoxina α , que é um composto menos tóxico. A informação de que *A. niger* pode ser um antitoxigênico, é promissora para a eliminação biológica de micotoxinas em substratos sólidos como grãos de café e cereais (VARGA; RIGÓ; TÉREN, 2000). Neste estudo, de todas as amostras estudadas, *A. niger* correspondeu por 9,6% dos isolados identificados. Algumas leveduras como *Pichia anomala* e *P. kluyveri* inibem o crescimento de *A. ochraceus* e conseqüentemente a produção de ocratoxina A em meio de cultura. A redução de ocratoxina A produzida por *A. ochraceus* pode ocorrer devido à degradação ou adsorção ou ainda pode ser inibida por compostos extracelulares secretados pelas leveduras. Existe, diante disso, a possibilidade de uso de *P. anomala* e *P. kluyveri* no controle biológico de fungos ocratoxigênicos durante a fermentação do café (MASOUD; KALTOFT, 2006).

A única amostra de café em que foi possível a detecção de ocratoxina A (Tabela 3) foi procedente de cultivo orgânico e colhido por varrição. Batista et al. (2009) afirmam que a fração de café de varrição possui maior risco de contaminação devido ao contato com o solo, que é uma fonte natural de fungos toxigênicos, incluindo produtores de ocratoxina A. Em um estudo semelhante, Batista e Chalfuon (2007) analisaram a presença de ocratoxina A em diferentes frações de café de cultivo convencional (*Coffea arabica* L.) secos em terreiro de terra, asfalto e cimento e também concluíram que a presença de ocratoxina A em café de varrição é maior, isso em função do tempo que os frutos ficam em contato com o solo, pois o solo é o habitat natural dos fungos produtores de ocratoxina A e o período de secagem dos frutos de café no terreiro é maior devido à umidade do solo, desse modo, os frutos ficam mais tempo expostos a condições favoráveis à colonização de fungos ocratoxigênicos e síntese da micotoxina.

Quanto aos resultados da presença de *A. ochraceus* toxigênico e da ocratoxina A no grão, não houve diferença entre os sistemas de cultivo

(convencional e orgânico). Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores que analisaram outros produtos agrícolas de fazendas orgânicas e convencionais. Ponsone et al. (2007) estudaram ocratoxina A e espécies de *Aspergillus* ocratoxigênicos em cultivares de uva de sistema de cultivo convencional e orgânico na Argentina, eles não observaram diferenças de contaminação com fungos do gênero *Aspergillus* Seção *Nigri* entre os sistemas de cultivo analisados, estes autores observaram que a presença desses fungos não é influenciada pelo sistema de cultivo e sim pelo estágio de maturação dos frutos.

Bakutis, Baliukoniene e Lugauskas (2006) fizeram um estudo de fatores que predeterminaram a abundância de fungos e micotoxinas em cevada e trigo de fazendas convencionais e orgânicas e observaram no trigo uma quantidade pequena de ocratoxina A nos dois sistemas de cultivo ($< 1 \mu\text{g/Kg}$) e o teor desta toxina foi menor em fazendas orgânicas do que convencionais. Já na cevada, encontraram contaminação de $0,3 \mu\text{g/Kg}$ em fazendas orgânicas e nenhuma contaminação em fazendas convencionais, a concentração de ocratoxina A nos dois substratos de sistema de cultivo convencional e orgânico não diferiram-se estatisticamente. De acordo com esses autores, os fatores mais importantes para o desenvolvimento de fungos e a produção de micotoxinas são: condições climáticas, localização geográfica, processamento e armazenamento, considerando esses fatores os riscos de contaminação são iguais nos dois sistemas de cultivo. Czerwiecki, Czajkowska e Witkowska (2002) analisaram amostras de grãos de cereais poloneses de fazendas de cultivo orgânico e convencional, a frequência de contaminação dos grãos e a concentração de octatoxina A foi maior nos grãos de cultivo orgânico. Juan et al. (2008) estudaram a ocorrência de ocratoxina A em cereais (arroz, trigo, cevada, centeio, aveia e milho) orgânicos e convencionais provenientes da Espanha e Portugal. Esses autores encontraram que as amostras orgânicas apresentavam número

maior de grãos contaminados em comparação com as convencionais e ainda observaram, em algumas amostras, níveis de contaminação pela micotoxina que excederam os limites para a ocratoxina A (5 µg/kg). Nestes dois trabalhos também não existiram diferenças estatísticas entre os sistemas de cultivo. Jestoi et al. (2004) analisando os níveis de micotoxina em grãos, não observaram diferença significativa para a concentração da toxina entre sistema de cultivo convencional e orgânico, embora a concentração média total da micotoxina tenha sido ligeiramente superior para produtos orgânicos.

A presença dos fungos produtores de micotoxinas não indica necessariamente a presença da toxina, mas existe um risco potencial, uma combinação apropriada entre os fatores fungo, planta e ambiente, determina a quantidade da colonização do substrato e o tipo e quantidade da micotoxina produzida (PITT et al., 2000). Um aspecto importante durante o processamento do café é a prevenção da produção da ocratoxina A. Estudos sugerem que a solução para o problema reside na melhoria das práticas agrícolas (MASOUD; KALTOFT, 2006; TANIWAKI et al., 2003).

4 CONCLUSÕES

Com base nestes resultados conclui-se que os grãos de café do sul de Minas Gerais – Brasil, estão de acordo com a legislação da União Européia, em relação à concentração permitida de ocratoxina A nos grãos.

Não houve diferenças na presença de ocratoxina A entre os sistemas de cultivo convencional e orgânico. Os resultados mostraram boa qualidade dos grãos quanto à presença da micotoxina.

Em ambos os sistemas de cultivo a principal espécie ocratoxigênica foi *Aspergillus ochraceus*. A contaminação por essa espécie não implica na presença de ocratoxina A no substrato. A produção da micotoxina está relacionada com um conjunto de fatores ambientais, de processamento e de estocagem e não apenas com a presença do *A. ochraceus*. O risco de contaminação pelo fungo ocratoxigênico e produção de ocratoxina A mostrou-se igual nos dois sistemas de cultivo, convencional e orgânico.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. P. et al. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 300-303, June 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Gaithersburg, 2000. Disponível em: <sid.gsi.co.jp/product/food/isogrid/isogrid_aoac.pdf>. Acesso em: 10 out. 2010.

ASTORECA, A. et al. Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* Aggregate strains on irradiated peanut seeds. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 131-135, Feb. 2009.

_____. Ochratoxin A production in relation to ecophysiological factors by *Aspergillus* Section *Nigri* strains isolated from different substrates in Argentina. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 388, n. 1/3, p. 16-23, Dec. 2007.

BAKUTIS, B.; BALIUKONIENE, V.; LUGAUSKAS, A. Factos predetermining the abundance of fungi and mycotoxins in grain from organic and conventional farms. **Ekologija**, Sverdlovsk, v. 3, n. 1, p. 122-127, Aug. 2006.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidência de ochratoxina A em diferentes frações do café (*Coffea arabica* L.): bóia, mistura e varrição após secagem em terreiros de terra, asfalto e cimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, maio/jun. 2007.

BATISTA, L. R. et al. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 9, p. 784-790, Sept. 2009.

_____. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Sept. 2003.

BOKHARI, F. M. Mycotoxins and toxigenic fungi in arabic coffee beans in Saudi Arabia. **Advances in Biological Research**, Islamabad, v. 1, n. 1/2, p. 56-66, Jan./Apr. 2007.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319-323, jun. 2002.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Commission regulation n°. 1881/2006**: setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Brussels, 2006. 364 p.

CHALFOUN, S. M.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L. Efeito da cafeína (1,3,7-trimethylxantina) sobre o crescimento micelial de fungos associados ao café. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, n. 1, p. 50-53, set. 2000. Edição Especial.

CLOUVEL, P. et al. Wine contamination by ochratoxin A in relation to vine environment. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 123, n. 1/2, p. 74-80, Mar. 2008.

CZERWIECKI, L.; CZAJKOWSKA, D.; WITKOWSKA, G. A. Ochratoxin A and fungal flora cereals from conventional and ecological farms. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 5, p. 470-477, July 2002.

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. Ochratoxina A non-conventional sources: a review. **Microchemical Journal**, New York, v. 93, n. 2, p. 115-120, Nov. 2009.

_____. Review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 2, p. 187-198, Apr. 2010.

FERRAZ, M. B. M. et al. Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 6, p. 872-877, June 2010.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic molds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, London, v. 13, n. 3, p. 128-130, Sept. 1980.

FRISVAD, J. C. et al. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* Section *Circumdati*. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 50, n. 4, p. 23-43, Oct. 2004.

FUJII, S. et al. Fungistatic activity of caffeine “in vitro” in fungi associated with coffee grains. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 279-285, Sept. 2004.

GIL-SERNA, J. et al. Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* Section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 2, p. 343-345, Feb. 2011.

GOLLÜCKE, A. P. B.; TANIWAKI, M. H.; TAVARES, D. Q. Investigação de ocratoxina A em café verde brasileiro destinado à exportação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 641-645, out./dez. 2004.

GONZÁLEZ, L. et al. Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 223-227, Mar. 2006.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, New York, v. 68, n. 9, p. 305-309, Sept. 1996.

HORWITZ, W.; KAMPS, L. R.; BOYER, K. W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **Journal Association Official and Analytical Chemists**, Washington, v. 63, n. 1, p. 1344-1354, Sept. 1980.

ILIC, Z. et al. Survey of Vietnamese coffee beans for the presence of ochratoxigenic *Aspergilli*. **Mycopathologia**, New York, v. 163, n. 3, p. 177-182, Mar. 2007.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, v. 56, n. 3, p. 489-521, June 1993.

JESTOI, M. et al. Levels of mycotoxins and sample cytotoxicity of selected organic and conventional grain-based products purchased from Finnish and Italian markets. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 48, n. 4, p. 229-307, Sept. 2004.

JOINT EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Buenos Aires, 2001. Disponível em:

<<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm#1.0>>. Acesso em: 21 abr. 2010.

JORGENSEN, K.; JACOBSEN, J. S. Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992 and 1999. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 12, p. 1184-1189, Dec. 2002.

JUAN, C. et al. Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, n. 1, p. 525-530, Mar. 2008.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelaantwoorden, 2002. 116 p.

LEONG, S. L. et al. Ochratoxin A-producing *Aspergillus* in Vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 301-306, Sept. 2007.

LEONI, L. A. B. et al. Ochratoxina A em grãos de café brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 105-107, jan./abr. 2001.

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**, Amsterdam, v. 106, n. 2, p. 229-234, Feb. 2006.

NOONIM, P. et al. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 197-202, Dec. 2008.

PALACIOS-CABEIRA, H. et al. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 24-28, Jan./Mar. 2005.

_____. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 7, p. 531-535, Oct. 2004.

PARDO, E. et al. Non-specificity of nutritional substrate for ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus*. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 4, p. 351-358, June 2006.

_____. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. **Food Science and Technology International**, London, v. 10, n. 1, p. 45-50, Feb. 2004.

PASIN, L. A. A. P.; ALMEIDA, J. R.; ABREU, M. S. Fungos associados a grãos de cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 1129-1132, out. 2009.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 17-22, Dec. 2000.

PITT, J. I. et al. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 41-46, Dec. 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food Spoilage**. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593 p.

PITTET, A. et al. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated and soluble coffee using an immunoaffinity column clean-up procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 3, p. 3564-3569, Sept. 1996.

PONSONE, M. L. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 131-135, Mar. 2007.

PRADO, G. et al. Ocorrência de ocratoxina a em café torrado e moído comercializado em Minas Gerais: 2003/2005. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, n. 10, p. 24-28, mar. 2008. Edição Especial.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food and airborne fungi**. Centraalbureau: Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000. 260 p.

_____. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* Section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 50, n. 1, p. 45-61, Oct. 2004.

SHERIF, S. O.; SALAMA, E. E.; ABDEL, M. A. W. Mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 212, n. 4, p. 347-368, July 2009.

SILVA, C. F.; BATISTA, L. B.; SCHWAN, R. F. Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea arabica* L.) beans. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 521-526, July/Sept. 2008.

SUÁREZ-QUIROZ, M. et al. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 629-634, Dec. 2004.

TANIWAKI, M. H. et al. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003.

VARGA, J.; RIGÓ, K.; TÉREN, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 1/2, p. 1-7, July 2000.

VARGAS, E. A.; SANTOS, E. A. Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 68, n. 3, p. 773-779, May 2005.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, Dec. 2010.

ZINEDINE, A.; MAÑES, J. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 4, p. 334-344, Apr. 2009.