

ISOLADOS DE FUNGOS OCRATOXIGÊNICOS DA SECÇÃO *Circundati* (GRUPO *Aspergillus ochraceus*) ASSOCIADOS A GRÃOS DE CAFÉ VERDES¹

Luís Roberto BATISTA², Sára Maria CHALFOUN³, Guilherme PRADO⁴; ² Departamento de Ciência de Alimentos-Universidade Federal de Lavras - LTFLA-MG (luisrb@ufla.br); ³ EPAMIG-CTSM/EcoCentro; ⁴ Fundação Ezequiel Dias - FUNED - Belo Horizonte-MG

RESUMO: Os fungos pertencentes ao Subgênero *Circundati* Secção *Circundati* (sinônimo do Grupo *Aspergillus ochraceus* são de grande importância econômica e principalmente para a saúde pública, pois algumas espécies destes fungos são produtores de ocratoxina A. Ocratoxina A é uma micotoxina de efeitos nefrotóxicos e hepatóxicos para humanos e animais. Os fungos da Secção *Circundati* são constantemente encontrados em grãos de café estocados. *Aspergillus ochraceus* é o mais comum desta Secção. Outras espécies como *A. melleus*, *A. sulphureus*, *A. sclerotiorum*, *A. ostianos* e *A. alliaceus* fazem parte desta Secção e todas estas espécies já foram relatados por produzirem ocratoxina A em diferentes produtos. Um levantamento das espécies produtoras de ocratoxina A em grãos de café vem sendo realizado no CTSM da EPAMIG-Lavras. Até o momento 34 fungos foram isolados de grãos de café por plaqueamento direto, identificados e testados quanto a produção de ocratoxina A em meio sólido (YES) e realizada a confirmação por Cromatografia de Camada Delgada (CCD). Dos 34 isolados obtidos 27 são *A. ochraceus*, 3 *A. sulphureus*, 2 *A. melleus*, 1 *A. petrakii* e 1 *A. sclerotiorum*. Destes isolados, 58,82 % foram produtores de ocratoxina A. Sendo, *A. ochraceus* 16 em 27, *A. sulphureus* 2 em 3, *A. petrakii* 1 em 1 e *A. sclerotiorum* 1 em 1. Os dois isolados de *A. melleus* não foram produtores de ocratoxina A. Entretanto, um isolado de *A. sulphureus*, um isolado de *A. ochraceus* e *A. sclerotiorum* foram produtores de ocratoxina A, isolados de uma amostra de grãos de café. Em análises posteriores, não foi detectada a presença de ocratoxina A nessa amostra.

PALAVRAS-CHAVE: Secção *Circundati*, ocratoxina A, grãos de café verde.

ABSTRACT: Fungi belonging to Subgênero *Circundati* / Section *Circundati* (synonym of the Group *Aspergillus ochraceus* are of great economic importance, mainly for the public health. Some species of these fungi are producers of ochratoxin A, a mycotoxin of nephrotoxic and hepatotoxic effects. Section *Circundati*'s fungi are constantly found in stored coffee beans. *Aspergillus ochraceus* is the most common of this Section. Other species, as *A. melleus*, *A. sulphureus*, *A. sclerotiorum*, *A. ostianos* and *A. alliaceus*, are part of this Section and all these species were already reported producing ochratoxin A in different foods. A survey of the species producers of ochratoxin A in green coffee beans was accomplished in CTSM of the EPAMIG-Lavras, MG. Until now, 34 fungi were isolated of the green coffee beans by direct plating, identified and tested for the production of ochratoxin A in solid medium (YES) and confirmed by thin layer chromatography (TLC). Among 34 isolated, 27 are *A. ochraceus*, 3 *A. sulphureus*, 2 *A. melleus*, 1 *A. petrakii* and 1 *A. sclerotiorum*. Among these isolated 58,82% produce ochratoxin A, including 16 of 27 *A. ochraceus*, 2 of 3 *A. sulphureus*, 1 of 1 *A. petrakii* and 1 of 1 *A. sclerotiorum*. Two isolates of *A. melleus* were not producers of ochratoxin A. However, one isolated of *Aspergillus sulphureus*, one isolated of *A. ochraceus* and the *A. sclerotiorum* are producers of ochratoxin A. All three isolates were established from the same sample of green coffee beans. In posterior analyses, the presence ochratoxin A was not detected in the sample.

INTRODUÇÃO

O café como as demais culturas cultivadas em campo aberto estão sujeitos a contaminação fúngica natural do meio ambiente. Os principais gêneros de fungos contaminantes do café são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Entretanto, a presença destes fungos nos alimentos pode ser reduzida através de um manejo adequado durante a pré e pós colheita. Os fungos da Secção *Circundati* e da Secção *Nigri* são os maiores contaminantes do café, principalmente na fase final de secagem e durante a armazenagem, alterando a qualidade final do café. Estes fungos estão relacionados com bebida de qualidade inferior. Além disso, as

espécies de fungos pertencentes a estas Secções juntamente com o fungo *Penicillium verrucosum* são citados como os principais fungos produtores de ocratoxina A, uma toxina de efeitos nefratóxico e hepatóxicos, que coloca em risco a segurança do produto. Entretanto, a presença da toxina em grãos de café verdes é muito questionada, a maioria dos estudos tem detectado pequenas concentrações de ocratoxina A em café. Na maioria das vezes em quantidades inferior a 4µg/Kg, limite este estipulado por alguns países europeus. Este estudo teve como objetivo identificar as espécies produtoras de ocratoxina A, da Secção Circundati, isoladas de grãos de café verdes (beneficiados).

MATERIAL E MÉTODOS

Os fungos utilizados neste experimento foram isolados de grãos de café verde, em amostras provenientes da região Sul de Minas Gerais. Para o isolamento, foi utilizada a técnica de plaqueamento direto de acordo com Samson *et al* (1995). A identificação das espécies foi realizada utilizando meios padronizados e a metodologia seguida por Raper & Fennell (1965), Klich & Pitt (1988) e Christenten (1982). Os isolados produtores de ocratoxina A foram identificados pela técnica de "Plug Agar" de acordo com Filtenborg & Frisvad (1980). Em uma amostra que foi realizada análise de ocratoxina A em grãos de café utilizando a metodologia descrita por Pittet *et al* (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados descritos na tabela 1 mostram que, dos fungos identificados houve um predomínio da espécie de *A. ochraceus* com 79,41 % do isolados, com menor frequência foram isolados *A. sulphureus* (8,82%), *A. melleus* (5,88%), *A. petrakii* (2,94%) e *A. sclerotiorum* (2,94%). Uma das principais características que possibilitaram a diferenciação das espécies foi a cor dos escleródios quando formados. Entretanto as características morfológicas e microscópicas (conidióforo, vesículas, e conídios) foram fundamentais para a elucidação das espécies. O predomínio da espécie *A. ochraceus* está de acordo com ICMSF (1996) que relata que esta é a espécie mais comum desta Secção. O *A. ochraceus* e as espécies pertencentes a esta Secção (grupo *A. ochraceus*) já foram isoladas de grãos verdes de café (Tsubouchi et all 1984).

Espécies da Secção Circundati	Total de isolados	Total e percentagem de isolados ocratoxigênicos
<i>Aspergillus ochraceus</i>	27	16 (59,25%)
<i>Aspergillus sulphureus</i>	3	2 (66,66%)
<i>Aspergillus melleus</i>	2	0 (0,0%)
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	1	1(100%)
<i>Aspergillus petrakii</i>	1	1(100%)

Tabela 1. Fungos potencialmente ocratoxigênicos isolados de grãos de café verde.

Dentro de cada espécie houve predomínio dos isolados produtores de ocratoxina A, com exceção de *A. melleus* onde nenhum dos dois isolados foram produtores da toxina. A quantidade de *A. ochraceus* produtores de ocratoxina A, vai de encontro aos resultados obtidos por Pitt & Hocking (1997), onde alguns estudos mostram que a minoria desta espécie é produtora de ocratoxina A. A metodologia de isolamento pode ter influenciado neste resultado, pois cada fungo que apresentava coloração característica de *A. ochraceus* nos diferentes grãos dentro da mesma placa de Petri foi purificado e considerado como sendo um(1) isolado, podendo assim estar se tratando da população de um único fungo. As demais espécies, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, *A. melleus* e *A. sulphureus* já, foram citadas como produtoras da toxina investigada (ICMSF, 1996, Hessltine *et al.*, 1972)

A presença de um único isolado de *A. sulphureus*, de *A. ochraceus* e de *A. sclerotiorum* produtores de ocratoxina A em uma mesma amostra alertou para os riscos da presença desta toxina. Entretanto, análises posteriores utilizando HPLC com nível de detecção 0,05 µ/Kg na não foi detectada a presença de ocratoxina A na amostra onde foram isolados os três fungos ocratoxigênicos. A presença de fungos ocratoxigênicos não indica necessariamente que os grãos de café verde crus estejam contaminados com ocratoxina A. Segundo Mantle & Chow (2000), o café é um substrato pobre para a produção de ocratoxina. Tal fato pode ser devido a presença da cafeína e do ácido tânico nos grãos de café, que podem afetar o crescimento e a produção de micotoxinas pelos fungos toxigênicos (Hasan, 1996). Além disso as condições do meio sintético (YES) como nutriente, temperatura e umidade são favoráveis à produção da toxina o que algumas vezes não ocorre quando os fungos estão no ambiente natural onde se encontra o produto.

CONCLUSÕES

Aspergillus ochraceus é a espécie de fungo predominante em relação as demais espécies da Secção Circundati. A maioria dos isolados de *A. ochraceus* são produtores de ocratoxina A. Espécie como *Aspergillus petrakii*, *Aspergillus sclerotiorum* e *Aspergillus sulphureus* fazem parte da microbiota fúngica do café e podem produzir ocratoxina A, a partir do momento em que as condições ambientais forem favoráveis. A presença de *Aspergillus melleus* não apresenta um risco em relação a ocratoxina A nas amostras. A presença destes fungos potencialmente produtores de ocratoxina A, não indicam necessariamente que as amostras de grãos de café verde estejam contaminadas com a toxina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHRISTENSEM, M. The *Aspergillus ochraceus* Group: Two new species from western soils and a synoptic key, **Mycologia**, vol 74(2), p. 210-225, 1982.
- FILTENBORG, O. & FRISVAD., J. C., A simple Screening- Method for Toxicogenic Moulds in pure Cultures, **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, n.13, p. 128-130, 1980.
- HASAN, H. A. H., Anti-Toxicogenic Properties of Coffee and Tea. Proceedings of the **First International Conference on Fungi: Hopes & Challenges**. Cairo, 2-5 Set. 1996. Vol. I, p. 75-78
- HESELTINE, C. W., VANDERGRAFT, E. E., FENNELL, D. I., SMITH, M. L. E SHOTWELL, O. L. *Aspergilli* as ochratoxin Producers. **Mycologia**, vol 64, p. 539-550, 1972.
- ICMSF(International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1996. Toxicogenic Fungi: *Aspergillus*. In **Microorganisms in Foods**, Characteristics of Food Pathogens. London: Blakie Academic and Professional. p. 341-381. 1996.
- KLICH, M. A. & PITT, J. I. **A Laboratory Guide to Common Aspergillus species and their Teleomorphs**, North Ryde, 1997.
- MANTLE, P. G. E CLOW, A. M., Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. **International Journal of Food Microbiology**. Vol 56, p.105-109, 2000.
- PITTET, A. TORNARE, D. HUGGETT, A. E VIANI, R. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 44, n.11, p. 3564-3569. 1996.
- RAPER, K.B., E FENNELL, D. I. **The Genus Aspergillus**. Baltimore, ed Williams and Wilkins Co., 1965.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C. E FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne Fungi**, 1995.
- TSUBOUCHI, H. YAMAMOTO, K. HISADA, K. E SAKABE. A Survey occurrence of mycotoxins and toxicogenic fungi in imported green coffee beans. **Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.** n. 19, p. 16-21. 1984.

AVISO

ESTA PUBLICAÇÃO PODE SER ADQUIRIDA NOS
SEGUINTE ENDEREÇOS:

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES

Edifício Sede, s/nº. - Campus Universitário da UFV
Viçosa - MG
Cep: 36571-000
Tels: (31) 3891-3204 / 3899-2485
Fax : (31) 3891-3911

EMBRAPA CAFÉ

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (Final)
Edifício Sede da Embrapa - sala 321
Brasília - DF
Cep: 70770-901
Tel: (61) 448-4378
Fax: (61) 448-4425